



Technische Universität München

TUM School of Life Science

Genomweite Analysen komplexer Merkmale in bayerischen
Schweinezuchtpopulationen

Gabriele Bernadette Floßmann

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Benjamin Schusser

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hans Rudolf Fries
2. Prof. Dr. Chris-Carolin Schön

Die Dissertation wurde am 19.11.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 04.04.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Next Generation Sequenzierung.....	3
2.2 Genomweite Assoziationsstudien zur Identifizierung von QTL.....	5
2.3 Genomweite Assoziationsstudien beim Schwein.....	8
2.4 Bekannte kausale Varianten beim Schwein.....	9
2.5 Bekannte Quantitative Trait Nukleotide (QTN).....	11
3 Tiere, Material und Methoden.....	13
3.1 Tiere und Phänotypen.....	13
3.1.1 Genotypen und Phänotypen für genomweite Assoziationsstudien.....	13
3.1.2 Schweine der Next-Generation-Sequenzierung.....	14
3.1.3 Unfruchtbare Sauen der Deutschen Landrasse.....	14
3.1.4 Risikoanpaarungen zur Überprüfung des Effektes der BMP15:p.R212X Variante auf Reproduktionsorgane.....	14
3.2 Isolierung genomischer DNA.....	15
3.2.1 DNA-Isolierung aus Sperma.....	15
3.2.2 DNA-Isolierung aus Gewebe.....	16
3.2.3 DNA-Isolierung aus Blut.....	16
3.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle von DNA.....	17
3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	17
3.4.1 Primerdesign.....	17
3.4.2 Standard-PCR.....	17
3.5 Sanger-Sequenzierung.....	18
3.5.1 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	18

3.5.2 Sequenzierreaktion.....	18
3.5.3 Aufreinigung und Kapillargelelektrophorese.....	19
3.6 Genotypisierung.....	19
3.6.1 KASP™ Typisierung.....	19
3.6.2 Genomweite Genotypisierung.....	20
3.7 Next Generation Sequenzierung.....	21
3.7.1 Library Herstellung.....	21
3.7.2 Sequenzierung und Datenanalyse.....	21
3.8 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS).....	22
3.8.1 Imputation.....	22
3.8.2 Durchführung der GWAS.....	22
3.8.3 Schätzung pleiotroper Effekte.....	23
3.9 In-silico Analysen.....	23
3.9.1 Sequenz- und Genotypen-Abgleich.....	23
3.9.2 Hauptkomponentenanalyse.....	24
3.9.3 Genotypen-Abgleich zur Identitätsbestimmung.....	24
3.9.4 Deskriptive Statistik.....	24
3.9.5 Charakterisierung des Kandidatengens <i>BMP15</i>	25
3.9.6 Sequenz- und Polymorphismen-Analyse.....	25
4 Ergebnisse.....	26
4.1 Sequenz- und Genotypenabgleich.....	26
4.2 Imputation.....	29
4.3 Genomweite Assoziationsstudien.....	30
4.3.1 Deutsche Landrasse.....	30
4.3.2 Piétrain.....	34
4.3.3 Anomaliendaten.....	37
4.3.3.1 GWAS mit Rohdaten.....	37
4.3.3.2 GWAS mit Anomalienzuchtwerten.....	41
4.3.4 Pleiotrope QTL-Effekte.....	43
4.3.5 Metaanalysen.....	45

4.4 Unfruchtbare Sauen der Deutschen Landrasse.....	47
4.4.1 Beschreibung des Phänotyps.....	47
4.4.2 Genomweite Assoziationsstudie.....	48
4.4.3 Identifizierung der kausalen Variante.....	49
4.4.4 Das <i>BMP15</i> Gen.....	51
4.4.5 Validierung der kausalen Variante.....	54
4.4.6 Ursprung der p.R.212X Mutation im <i>BMP15</i>	55
4.4.7 Effekt der p.R212X-Mutation auf Leistungsmerkmale.....	57
4.4.8 Entwicklung der Allelfrequenz der p.R212X-Mutation im <i>BMP15</i>	59
4.4.9 Auswirkungen der p.R212X Variante auf Reproduktionsorgane.....	61
5 Diskussion.....	65
5.1 Sequenz- und Genotypenabgleich.....	65
5.2 Imputation.....	65
5.3 Genomweite Assoziationsstudien.....	67
5.3.1 GWAS in der Deutschen Landrasse.....	67
5.3.2 GWAS in der Rasse Piétrain.....	68
5.3.3 GWAS mit Anomaliendaten.....	70
5.3.4 Schlachtkörperlänge.....	73
5.3.4.1 QTL auf Chromosom 7.....	73
5.3.4.2 QTL auf Chromosom 17.....	75
5.3.5 Metaanalyse.....	76
5.3.6 Identifizierung kausaler Varianten.....	77
5.4 Unfruchtbare Sauen der Deutschen Landrasse.....	78
5.4.1 Phänotyp „atypisch kleine Vulva“.....	78
5.4.1.1 Anomalien weiblicher Geschlechtsmerkmale.....	78
5.4.1.2 „Atypisch kleine Vulva“ als Hilfsmerkmal.....	79
5.4.2 <i>BMP15</i> in polyovulatorische Spezies.....	79
5.4.3 Züchterische Nutzung der <i>BMP15</i> :p.R212X Variante.....	81
5.4.4 Auswirkungen der p.R212X Variante auf Reproduktionsorgane.....	82
6 Zusammenfassung.....	85
7 Summary.....	87

Inhaltsverzeichnis

8 Literatur.....	89
9 Anhang.....	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kostenentwicklung für DNA Sequenzierung von 2000 bis 2018.....	5
Abbildung 2: Abgleich der Sequenzdaten mit den Chip-Genotypdaten.....	26
Abbildung 3: Hauptkomponentenanalyse der Sequenzdaten (Chromosom 1: 2.278.428 Varianten) von 60 Schweinen.....	27
Abbildung 4: Genotypenabgleich zwischen Ingenis-90 und 2.238 Piétrains.....	28
Abbildung 5: Imputationsgenauigkeit (R^2) in Abhängigkeit von der Allelfrequenz für Deutsche Landrasse (A) und Piétrain (B).....	29
Abbildung 6: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Fleisch:Fett-Verhältnis in der Deutschen Landrasse.....	32
Abbildung 7: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Bauchfleischanteil in der Deutschen Landrasse.....	33
Abbildung 8: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Deutschen Landrasse.....	34
Abbildung 9: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Fleischanteil in der Rasse Piétrain.....	36
Abbildung 10: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Rasse Piétrain.....	37
Abbildung 11: Verteilung der Anomalien betroffener Ferkel.....	38
Abbildung 12: Anteil betroffener Ferkel pro Eber und Anomalie.....	39
Abbildung 13: Genomweite Assoziationsstudie mit den Rohdaten des Merkmals Zittern in der Rasse Piétrain.....	40
Abbildung 14: Genomweite Assoziationsstudie mit den Rohdaten des Merkmals Kryptorchismus in der Rasse Piétrain.....	41
Abbildung 15: Verteilung der Sicherheit des Anomalienzuchtwertes.....	42
Abbildung 16: Genomweite Assoziationsstudie mit den Zuchtwerten für das Merkmal Grätschen in der Rasse Piétrain.....	43
Abbildung 17: Pleiotrope Effekte der Lead-SNPs in der Deutschen Landrasse.....	44
Abbildung 18: Pleiotrope Effekte der Lead-SNPs in der Rasse Piétrain.....	45
Abbildung 19: Metaanalyse für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Deutschen Landrasse (N = 1.754) und Piétrain (N = 3.091).....	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Vulven von Fall- und Kontrolltieren.....	48
Abbildung 21: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal "atypisch kleine Vulva" in 1.835 Sauen der Deutschen Landrasse.....	49
Abbildung 22: Multispezies Alignment der BMP15-Proteinsequenzen.....	53
Abbildung 23: Chromatogramme der Sanger-Sequenzierung aller drei Genotypen der BMP15:p.R212X-Mutation.....	54
Abbildung 24: Stammbaum der zehn bekannten Väter von Sauen mit kleiner Vulva.....	56
Abbildung 25: Anzahl genotypisierter Sauen für die p.R212X-Mutation und den jeweiligen Frequenzen des T-Allels.....	60
Abbildung 26: Anzahl Sauen mit Genotyp (genotypisiert und abgeleitet) für die p.R212X-Mutation und den jeweiligen Frequenzen des T-Allels.....	61
Abbildung 27: Uteri von 8 Vollgeschwister im Alter von 6 Monaten.....	63
Abbildung 28: Eierstöcke von 8 Vollgeschwister der Risikoanpaarung im Alter von 6 Monaten.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Sequenziermethoden und -plattformen.....	4
Tabelle 2: Literaturübersicht für die geschätzten Effekte des QTL im <i>VRTN</i> Gen auf Anzahl Brustwirbel, Rippen, Zitzen und Körperlänge.....	11
Tabelle 3: Zusammenfassung der Sequenz-Imputation.....	29
Tabelle 4: QTL der Deutschen Landrasse für Fleisch-, Schlachtkörper- und Fruchtbarkeitsmerkmale.....	31
Tabelle 5: QTL der Rasse Piétrain für Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale.....	34
Tabelle 6: QTL der Rasse Piétrain für Rohdaten der Anomalien.....	39
Tabelle 7: QTL der Rasse Piétrain für Anomalienzuchtwerte.....	42
Tabelle 8: Gemeinsame Assoziationssignale für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Deutschen Landrasse und Piétrain.....	46
Tabelle 9: Stoppmutationen in der mit dem Merkmal "atypisch kleine Vulva" signifikant assoziierten Region (38,6 – 108,7 Mb) des X-Chromosoms.....	50
Tabelle 10: Übersicht der beim Schaf bekannten Mutationen im BMP15.....	51
Tabelle 11: Genotypen der p.R212X-Mutation für 4.941 Sauen der Deutschen Landrasse (DL).....	55
Tabelle 12: T-Allel Wahrscheinlichkeit basierend auf den Genotyp der Eltern.....	57
Tabelle 13: T-Allel Wahrscheinlichkeiten von Sauen (genotypisiert und zugewiesen) ab Geburtsjahr 2007.....	58
Tabelle 14: Geschätzte Effekte der p.R212X-Mutation auf Leistungsmerkmale.....	58

Abkürzungsverzeichnis

A (Nukleotid)	Adenin
AF	Allelfrequenz
ABG	abgesetzte Ferkel
AGF	aufgezogene Ferkel
AS	Aminosäure
BAFL	Bauchfleischanteil
BCORL1	BCL6 corepressor like 1
BMP15	Bone Morphogenetic Protein 15
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
bp	Basenpaar
C (Nukleotid)	Cytosin
CCND2	Cyclin D2
ChIP-Seq	Chromatin Immuno Precipitation DNA-Sequenzierung
CNV	Copy Number Variation
DL	Deutsche Landrasse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENTPD5	Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 5
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
FFV	Fleisch:Fett-Verhältnis
FLAN	Fleischanteil

Abkürzungsverzeichnis

FSH	follikelstimulierendes Hormon
FUT1	Fucosyltransferase 1
FVW	Futterverwertung
Gb	Gigabasen
GDF9	Growth Differentiation Factor 9
GDF11	Growth Differentiation Factor 11
GFRA2	GDNF Family Receptor Alpha 2
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
IGF2	Insulin Growth Factor 2
IGV	Integrative Genomic Viewer
IMF	intramuskulärer Fettgehalt
kb	Kilobasen
LD	Linkage Disequilibrium
LGF	lebend geborene Ferkel
LTBP2	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2
MAF	Minor-Allelfrequenz
Mb	Megabasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHS	Maligne Hyperthermie Syndrom
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N _e	effektive Populationsgröße
NGS	Next Generation Sequenzierung
OMIA	Online Mendelian Inheritance in Animals
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerasekettenreaktion
pH1	pH-Wert nach 1 Stunde im Kotelett
PI	Piétrain
PSS	Porcines Stress Syndrom
q_f	Allelfrequenz des T-Allels in Sauen
q_m	Allelfrequenz des T-Allels in Eber
qPCR	quantitative PCR
QTL	Quantitative Trait Locus
QTN	Quantitative Trait Nukleotid
R	Arginin
R^2	Imputationsgenauigkeit
RMFL	Rückenmuskelfläche
RNA	Ribonukleinsäure
RYR1	Ryanodinrezeptor 1
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SIFT	Sorting intolerant from tolerant
SKL	Schlachtkörperlänge
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
SSC	Sus Scrofa Chromosom
STZ	Stülpzitzen
T (Nukleotid)	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TSV	Tropfsaftverlust

Abkürzungsverzeichnis

TZ	tägliche Zunahmen
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
VCF	Variant Call Format
VEP	Variant Effect Predictor
VRTN	Vertnin
X	Kettenabbruch
ZNF410	Zinc Finger Protein 410

1 Einleitung und Zielsetzung

Durch die Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden der Genotypisierung und Sequenzierung wurde es möglich, auch bei Nutztieren genomweite Assoziationsstudien (GWAS) im großen Umfang durchzuführen. Mit Hilfe von GWAS können Marker, die mit kausalen Varianten gekoppelt sind identifiziert werden und züchterisch genutzt werden. Ein Nachteil von GWAS mit Chipdaten ist, dass nur eine begrenzte Anzahl Varianten auf Assoziationen überprüft werden können und lediglich Marker identifiziert werden, die mit kausalen Varianten gekoppelt sind. Für die Identifizierung kausaler Mutationen sind weiterführende Analysen (Feinkartierung) notwendig. Die Genomsequenzierung für sequenzbasierte GWAS mit einer großen Individuenzahl ist trotz großer Technologiefortschritte zu kostenintensiv. Deshalb greift man bei Nutztieren häufig auf die Imputation zurück. Bei diesem bioinformatischen Verfahren werden die Chipdaten durch sequenzierte und haplotypisierte Tiere auf Sequenzniveau gehoben. Die Anzahl der verfügbaren Varianten wird von etwa 50.000 SNPs auf mehrere Millionen erhöht, was eine genauere Eingrenzung des signifikanten Bereiches um die kausale Mutation ermöglicht. Im Optimalfall ist die kausale Mutation in den Daten enthalten und am stärksten mit dem Merkmal assoziiert.

In der Praxis ist eine gute Infrastruktur notwendig, um GWAS in geeigneten Stichprobengrößen durchführen zu können. Bayern hat mit über 3 Millionen gehaltenen Schweinen den drittgrößten Schweinebestand in Deutschland, nach Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen (Newmiwaka, 2019). Das landeseigene Schweinezuchtprogramm mit Leistungsprüfung und Zuchtwertschätzung nutzt in der Linienzucht Deutsches Edelschwein und Deutsche Landrasse als Mutterrassen und Piétrain als Vatterrasse. Im Rahmen mehrerer Projekte (FrOGS, GOGS und InGeniS) wurde 2016 eine eigene genomische Zuchtwertschätzung eingeführt. Dadurch sind für mehrere Tausend Schweine Genotypdaten vorhanden. Die Zuchtwerte werden für Merkmale der Mast-, Schlachtleistung und Fleischqualität, sowie für die Zuchtleistung (nur bei Mutterrassen) geschätzt. Zusätzlich wird seit 2013 ein Anomalienwert berechnet, in dem die Zuchtwerte von acht Anomalien berücksichtigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, in den bayerischen Populationen der Deutschen Landrasse und Piétrain genomweite Assoziationsstudien mit Hilfe von imputierten Sequenzen, Anomaliendaten und Zuchtwerten von Leistungsmerkmalen wie zum Beispiel Fleischanteil, tägliche Zunahmen oder lebend geborene Ferkel durchzuführen. Mit Hilfe der GWAS sollten Kandidatengene und mögliche

kausale Varianten im Bereich der identifizierten QTL aufgedeckt werden. Zu diesem Zweck standen Genotypdaten von rund 9.000 Schweinen und genomweite Sequenzdaten von 46 Piétrain-Tieren und 29 Schweinen der Deutschen Landrasse zur Verfügung. Ein weiteres Ziel war es, die ursächliche Mutation für das Auftreten von unfruchtbaren Sauen der Deutschen Landrasse, die im Rahmen der Anomalieerfassung gemeldet wurden, zu identifizieren und deren Effekt auf die Fruchtbarkeit und andere Leistungsmerkmale zu überprüfen.

2 Literaturübersicht

2.1 Next Generation Sequenzierung

Seit der Entdeckung der DNA-Struktur durch Watson & Crick (1953) hat eine Vielzahl von Innovationen zu einem besseren Verständnis der Komplexität von Genomen beigetragen, und es konnten die Auswirkungen von Sequenzvarianten auf Gesundheitsmerkmale und Krankheiten aufgeklärt werden (Goodwin et al., 2016). Eine dieser Erfindungen ist die DNA Sequenzierung mit der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977), welche auch als erste Generation der DNA-Sequenzierung bezeichnet wird. Eine Reihe von Verbesserungen der Methode, wie zum Beispiel auf Fluoreszenzphotometrie basierenden Erkennung und Auftrennung mittels Kapillargelelektrophorese ermöglichten die Sequenzierung von Fragmenten bis zu 1.000 bp und die Entschlüsselung komplexer Genome (Heather & Chain, 2016). Durch das Human Genome Project wurde die Notwendigkeit von besseren Technologien der Sequenzierung und größeren Datensätzen aufgezeigt, um die komplexen biologischen Fragestellungen beantworten zu können (Goodwin et al., 2016). Es folgte die zweite Generation der Sequenzierung, mit der auf Pyrosequenzierung beruhenden Sequenzierplattform von 454 Life Sciences (ab 2007 Roche 454) (Heather & Chain, 2016). Die neuen Sequenziermethoden, auch als Next Generation Sequenzierung (NGS) bekannt, zeichnen sich durch eine massive Parallelisierung aus, die es erlaubt große Mengen Sequenzdaten zu generieren. Eine höhere Abdeckung gleicht den Verlust an Genauigkeit im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung aus (Kulski, 2016). Bei der Sequenzierung der zweiten Generation kommen vor allem zwei verschiedene Methoden zur Anwendung: die Sequenzierung durch Synthese z.B. von Illumina und die Sequenzierung durch Ligation z.B. SOLiD von Applied Biosystems. Bei der Sequenzierung durch Ligation binden farblich unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sonden an die DNA-Vorlage. Die anschließende Spaltung der Sonde setzt die Markierung frei und wird gemessen. Bei der Sequenzierung durch Synthese wird ein komplementärer DNA Strang mit Hilfe einer Polymerase synthetisiert, wobei die eingebauten Nukleotide fluoreszenzmarkiert sind und nach jedem Zyklus die Fluoreszenz des eingebauten Nukleotids erfasst wird (Goodwin et al., 2016). Ein Vergleich der verschiedenen Sequenzierplattformen erfolgt meist auf der Basis der folgenden drei Parameter: Readlänge, Anzahl Reads, die in einem Durchgang sequenziert werden und die Datenmenge, die generiert wird (Kumar et al., 2019). Tabelle 1 gibt einen Überblick der drei genannten Parameter verschiedener Sequenziermethoden bzw. Plattformen der ersten, zweiten und dritten Generation.

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Sequenziermethoden und -plattformen

Plattform	Readlänge [bp]	Max. Output [Gb]	Max. Reads pro Durchgang	Laufzeit pro Durchgang
Life Technologies Sanger ¹	800		1	2 h
Illumina HiSeq2500v4 ²	1 × 36 2 × 50–125	64–72 (1 ×) 180–500 (2 ×)	2 Mrd (1×) 4 Mrd (2×)	29 h (1×) 2,5–6 d (2×)
Illumina MiSeq *	1 × 36 2 × 25–300	15	25 Mio (1 ×) 50 Mio (1 ×)	4 h (1 ×) 5,5–56 h (2 ×)
Illumina NextSeq 550 *	1 × 75 2 × 75–150	120	400 Mio (1 ×) 800 Mio (2 ×)	12 h (1 ×) 15–30 h (2 ×)
SOLiD 5500xl *	2 × 60	95	800 Mio (2 ×)	6 d (2 ×)
SOLiD 5500 Wildfire *	2 × 50	240	2,4 Mrd (2 ×)	10 d (2 ×)
PacBio Sequel ³	10.000–30.000	20	0,5 Mio	10–20 h
Illumina NovaSeq 6000 ²	2 × 50–250	80–6.000	1,6–40 Mrd	13–44 h

bp: Basenpaar; Max. Output [Gb]: Maximaler Output in Gigabasen; 1 ×: single Read Sequenzierung; 2 ×: paired-end Sequenzierung; h: Stunden; d: Tage; Quellen: ¹ Kulski, (2016), ² Goodwin et al., (2016), ³ Kumar et al., (2019); * Herstellerangaben: „<https://allseq.com/>“, o. J.; „<https://www.illumina.com/>“, o. J.;

Durch die Einführung von Hochdurchsatz Sequenzierplattformen Mitte der 2000er wurden die Sequenzierkosten des menschlichen Genoms enorm gesenkt (Abbildung 1). Als Grundlage für die Berechnung der Kosten pro Genom wurde eine Genomgröße von 3 Gb angenommen und eine sechsfache Abdeckung für Sanger-basierte Sequenzierung, eine zehnfache Abdeckung für 454-basierte Sequenzierung und eine 30-fache Abdeckung für Illumina und SOLiD-basierte Sequenzierung. Die Kosten beliefen sich im Jahr 2006 auf ca. 10.000.000 \$ pro Genom und fielen auf ca. 1.500 \$ im Jahr 2016. Ebenso sind die Kosten pro Mb von knapp unter 1.000 \$ im Jahr 2006 auf etwas über 0,01 \$ im Jahr 2016 gesunken („<https://www.genome.gov/>“, o. J.).

Komplexe Genome enthalten viele lange repetitive Elemente, unterschiedliche Wiederholungen von copy number variations (CNV) und strukturelle Varianten (z.B. Indels >50 bp). Die kurzen Readlängen der Next Generation Sequenzierplattformen reichen oft nicht aus, um diese komplexen DNA-Elemente zu entschlüsseln (Goodwin et al., 2016). Eine neue Generation von Plattformen zeichnet sich vor allem durch sehr lange Reads aus (bis zu 100.000 bp). Eine der ersten Plattformen der dritten Generation ist der PacBio Sequel von Pacific Biosciences of California (Tabelle 1) (Kumar et al., 2019). Die langen Reads vereinfachen die Erstellung von *de novo* Genom-

Assemblies, ermöglichen die Aufdeckung langer komplexer DNA-Strukturen und die Sequenzierung von Transkripten in voller Länge (Goodwin et al., 2016).

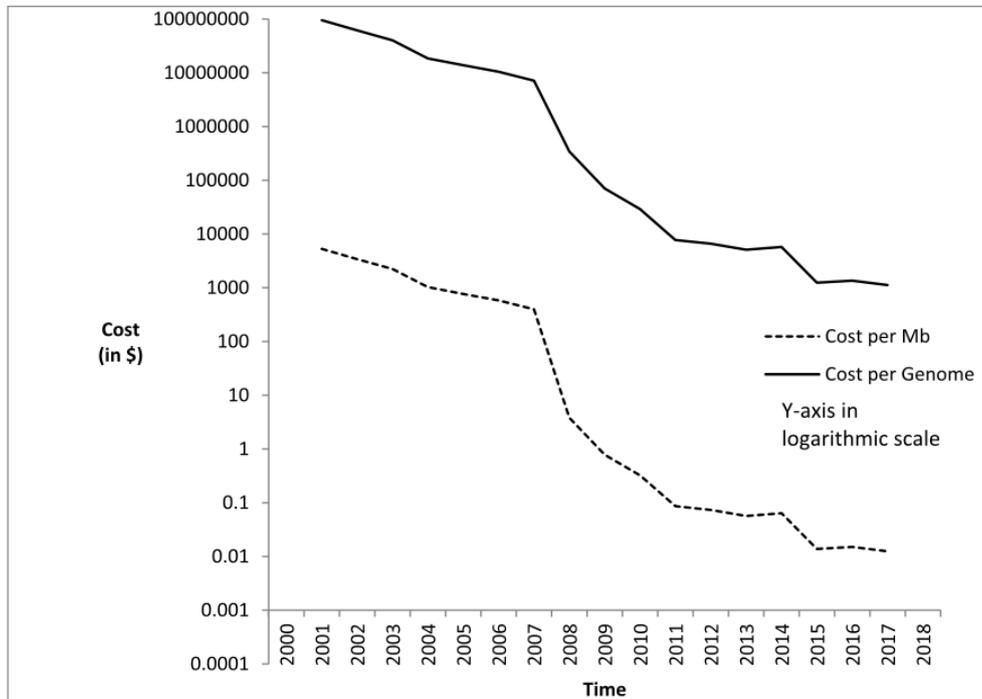


Abbildung 1: Kostenentwicklung für DNA Sequenzierung von 2000 bis 2018
Quelle: Wadapurkar & Vyas (2018)

Weitere Anwendungsbereiche der Next Generation Sequenzierung sind Transkriptom- und Genexpressionsanalysen (RNA-Seq), die Bestimmung regulatorischer Elemente, wie Transkriptionsfaktorbindestellen, Promotoren oder Enhancer (ChIP-Seq) und das Sequenzieren einzelner Zellen (Single-Cell Sequenzierung) (Kumar et al., 2019).

2.2 Genomweite Assoziationsstudien zur Identifizierung von QTL

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurden durch zwei große internationale Forschungsverbände „Human Genome Project“ (Lander et al., 2001) und das „HapMap Project“ (Gibbs et al., 2003) die Grundsteine für die Entwicklung von DNA-Chips (Affymetrix und Illumina) gelegt, welche zu einer weltweiten Verbreitung von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) führte (Ikegawa, 2012). Das Ziel von GWAS ist es, Zusammenhänge zwischen genetische Varianten und komplexen Merkmalen oder Krankheiten aufzudecken (Visscher et al., 2012). Dabei wird das Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium, LD) zwischen Markern und kausale Varianten

genutzt (Hayes, 2013; Visscher et al., 2012). Allgemein gilt, dass Loci, die nah beieinanderliegen, in einem größeren LD sind als Loci, die weiter entfernt voneinander auf dem Chromosom liegen. Das LD wird auch von der effektiven Populationsgröße (N_e) beeinflusst: je größer N_e ist, umso geringer ist das LD für eine bestimmte Distanz (Visscher et al., 2012). In der GWAS wird ein Single Nukleotid Polymorphismus (SNP) nach dem anderen analysiert. Das gemischt-lineare Modell beinhaltet den Phänotyp als Reaktionsvariable, den additiven SNP Effekt als fixen Effekt, weitere fixe Effekte wie Geschlecht und Kohortenzugehörigkeit und den zufälligen Polygeneffekt (Goddard & Hayes, 2009). Im Polygeneffekt sind die Effekte aller SNPs durch die genomische Verwandtschaftsmatrix akkumuliert (Yang et al., 2014). In der Nullhypothese wird angenommen, dass der SNP keinen Effekt auf das untersuchte Merkmal hat. Die Alternativhypothese besagt, dass der Marker einen Effekt hat, weil er in LD mit einem Quantitativen Trait Locus (QTL) steht (Hayes, 2013).

Die erste GWAS wurde von Klein et al. (2005) veröffentlicht. In der Studie wurden zwei SNPs mit signifikant unterschiedlichen Allelfrequenzen zwischen gesunden und an Makulardegeneration erkrankten Menschen identifiziert (Sharma et al., 2015). Im Jahr 2007 lag die Anzahl veröffentlichter GWAS bereits bei ca. 60 (Visscher et al., 2012).

Der erste SNP-Chip, der für Nutztiere auf den Markt kam, war der Illumina BovineSNP50 BeadChip für Rinder im Jahr 2008 (Matukumalli et al., 2009). Auf Grund der großen Nachfrage folgten SNP-Chips für weitere Nutztierarten, wie Schaf (2009), Schwein (2009), Pferd (2012), Huhn (2013) und Ziege (2014) (Nicolazzi et al., 2015).

Zwischen GWAS beim Menschen und Nutztieren gibt es einige Unterschiede. Beim Menschen werden als Phänotypen meist komplexe Krankheiten untersucht, wohingegen bei Nutztieren häufig ökonomisch wichtige Merkmale wie Fleischanteil, Milchleistung oder Fruchtbarkeit analysiert werden (Sharma et al., 2015). Ein weiterer Unterschied ist in den LD-Strukturen zu beobachten. Bei kurzen Distanzen ist die LD-Struktur zwischen Mensch und Nutztieren vergleichbar, aber beim Menschen gibt es fast kein Kopplungsungleichgewicht auf langen Distanzen. Begründen lässt sich dies durch die Unterschiede in den effektiven Populationsgrößen (N_e (Nutztiere) < N_e (Mensch)) (Wray et al., 2019). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung bei der Durchführung von GWAS, dass bei Nutztieren weniger SNPs notwendig sind, um das Genom abzudecken (z.B. Illumina BovineSNP50 BeadChip) (Goddard & Hayes, 2009).

Trotz vieler Erkenntnisse, die durch GWAS gewonnen werden können, gibt es Kritiker, die deren Nutzen anzweifeln. Ein Kritikpunkt ist, dass bei komplexen Merkmalen häufig viele assoziierte SNPs identifiziert werden, die nur einen kleinen Teil der Heritabilität erklären (Goddard & Hayes, 2009; Ikegawa, 2012; Tam et al., 2019). Schwachstellen liegen auch in der Konstruktion von GWAS. Einerseits wurden für die SNP-Chips häufig vorkommende Varianten (common variants) ausgewählt, die nur Assoziationen mit kausalen Varianten, die weit verbreitet sind, identifizieren können (Visscher et al., 2012). Andererseits werden bei GWAS Kopplungsungleichgewichte zwischen Markern und kausalen Varianten genutzt. Liegen mehrere Varianten im vollständigen LD mit der kausalen Variante, wird das Identifizieren kausaler Varianten erschwert (Tam et al., 2019).

Ihre Stärken haben GWAS vor allem bei monogenen Merkmalen, bei denen große Erfolge erzielt werden (Goddard & Hayes, 2009). Auch wenn es nicht möglich ist, die gesamte Heritabilität durch GWAS zu erklären, gewinnt man ein besseres Verständnis über Merkmale. Ein Beispiel dafür ist die Entdeckung, wie wichtig Autophagie bei Morbus Crohn ist (Visscher et al., 2012). Häufig werden auch Merkmale mit Genen, deren Funktion unbekannt sind, assoziiert und mit Hilfe von nachfolgenden funktionellen Studien können neue biologische Mechanismen aufgeschlüsselt werden (Ikegawa, 2012; Pausch et al., 2014; Tam et al., 2019).

Durch GWAS konnten bereits viele mit Merkmalen assoziierte Varianten identifiziert werden, obwohl noch längst nicht alle Möglichkeiten ausgeschöpft wurden. Bisher werden die meisten GWAS mit leicht zu erfassenden Phänotypen und additiven Genmodellen durchgeführt. Durch detailliertere Phänotypen und Anwendung verschiedener Vererbungsmodelle könnte die Power von GWAS erhöht werden (Tam et al., 2019). Eine weitere Stellschraube, um die Power zu erhöhen, ist die Stichprobengröße, da die Anzahl signifikant assoziierter Varianten stark mit der Anzahl Individuen korreliert. Eine grobe Schätzung zeigt, dass sich die Anzahl assoziierter Varianten bei Verdoppelung der Stichprobengröße, unterhalb derer keine Varianten identifizierbar sind, verdoppelt (Visscher et al., 2012). Um einen größeren Teil der Heritabilität erklären zu können, müssen GWAS mit Daten von genomweiten Sequenzierungen durchgeführt werden. Wainschtein et al. (2019) haben gezeigt, dass seltene (Minor-Allelfrequenz (MAF) $< 0,01$), proteinverändernde Mutationen mit geringem LD zu anderen genomischen Varianten große Effekte auf Merkmale haben können. Auf Grund des geringen LD können solche Varianten nicht zuverlässig auf die Sequenzebene imputiert werden. Für die Zukunft bedeutet das, dass große Studien mit sequenzierten Individuen notwendig sind, um diese seltenen Varianten zu identifizieren.

2.3 Genomweite Assoziationsstudien beim Schwein

Wie zuvor beschrieben, werden für GWAS Genotypinformationen von Zehntausenden SNPs und sehr vielen Individuen benötigt. SNPs können im Hochdurchsatz mit sogenannten SNP-Chips typisiert werden. Für Schweine kam der erste kommerziell verfügbare SNP-Chip der Firma Illumina (*PorcineSNP60 BeadChip*) 2009 auf den Markt. Für die SNP-Auswahl wurden Schweine der Rassen Duroc, Piétrain, Landrasse, Edelschwein und Wildschwein sequenziert. Die Tiere stammten aus den USA, den Niederlanden, Dänemark und Japan (5 der 36 Wildschweine) und sollten die weltweit wichtigsten Rassen repräsentieren. Insgesamt wurden 64.232 SNPs auf dem Chip integriert. Für 14.529 dieser SNPs war die chromosomale Position nicht bekannt (Ramos et al., 2009).

Die ersten GWAS, die mit dem *PorcineSNP60 BeadChip* durchgeführt wurden, sind 2010 veröffentlicht worden. Duijvesteijn et al. (2010) führten eine Studie mit 987 Durocs und dem Merkmal Androstenon-Konzentration im Fettgewebe durch und konnten drei QTL auf SSC1 und einen QTL auf SSC6 identifizieren. Die fünf am stärksten assoziierten SNPs erklärten zusammen 13,7% der genetischen Varianz für die Androstenon-Konzentration im Fettgewebe. Sironen et al. (2010) untersuchten einen Defekt des Akrosoms in finnischen Yorkshire Ebern, der eine geringe Fruchtbarkeit verursacht, und konnten eine 3 Mb große Region auf SSC15 mit dem Defekt in Zusammenhang bringen. Die kausale Variante wurde jedoch erst 10 Jahre später durch Genomsequenzierungen von zwei betroffenen und drei nicht betroffenen Ebern identifiziert. Es wurde eine 55 kb große Deletion im Bereich zwischen 101,5 und 101,7 Mb auf Chromosom 15 entdeckt, die das *BOLL* Gen beinhaltet und als ursächlich für den Akrosomendefekt betrachtet werden kann (Nosková et al., 2020).

Einen Überblick über die bisher identifizierten QTL beim Schwein gibt die PigQTL Database (PigQTLdb). Dort werden QTL-Informationen gesammelt und öffentlich zugänglich gemacht. Da auf Grund der unterschiedlichen genetischen Architektur bei verschiedenen Rassen und der polygenen Vererbung komplexer Merkmale häufig unterschiedliche Regionen des Genoms bzw. Gene für das gleiche Merkmal bei unterschiedlichen Rassen identifiziert werden (Sharma et al., 2015), sollen durch die Datenbank zukünftige Arbeiten erleichtert werden, indem Daten und Methoden verglichen werden können (Hu et al., 2005). In der aktuellen Version (Release 44, 26. April 2021) sind 33.143 QTL hinterlegt. Diese stammen von 733 Publikationen und enthalten 699 verschiedene Merkmale. Die meisten QTL wurden für Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale

identifiziert (17.193), gefolgt von Gesundheits- (6.716), Reproduktions- (3.165), Produktions- (2.911) und Exterieurmerkmalen (2.492) („Pig QTL Database“, 2021).

Der nächste Schritt in der Entwicklung von GWAS sind Studien mit Sequenzdaten. Das Sequenzieren des gesamten Genoms ist zu teuer, um eine ausreichend große Anzahl Schweine sequenzieren zu können. Durch Imputation können GWAS mit mehr als den auf den BeadChips vorhandenen Varianten durchgeführt werden. Die Power der Studie wird erhöht und die Wahrscheinlichkeit, dass kausale Varianten entdeckt werden steigt, da in den Sequenzdaten oft die kausale Mutation enthalten ist und keine Feinkartierung (z.B. Sanger-Sequenzierung der Kandidatengene) nötig ist (Marchini & Howie, 2010; Marchini et al., 2007).

2.4 Bekannte kausale Varianten beim Schwein

Die Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) Datenbank sammelt Informationen zu Merkmalen und Erbkrankheiten in über 200 Tierarten (ausgenommen Mensch, Maus und Ratte für die es eigene Datenbanken gibt). Für Schweine beinhaltet die Datenbank kausale Varianten von 41 Merkmalen („Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA“, o. J.).

Die kausalen Varianten für die folgenden zwei beschriebenen Phänotypen, das Maligne Hyperthermie Syndrom (MHS) und die *E. coli* Rezeptor F18-Resistenz, wurden vor der Ära der Chip-Typisierung und GWAS identifiziert. Eine Methode kausale Varianten zu lokalisieren war mit Hilfe von Kopplungsanalysen. Im Falle der *E. coli* Rezeptor F18-Resistenz wurden zusätzlich Polymorphismen in 14 Blutgruppensystemen für die Kartierung verwendet (Meijerink et al., 1997).

Das MHS oder auch Porcines Stress Syndrom (PSS), das durch einen rezessiven Defekt der Kalziumregulation in der Skelettmuskulatur verursacht wird, manifestiert sich durch maligne Hyperthermie und plötzlichen Tod. Eine weiterer Aspekt des PSS ist blasses (pale), weiches (soft) und wässriges (exudative) Fleisch nach dem Schlachten, sogenanntes PSE Fleisch, welches als Qualitätsmangel gewertet wird. Durch eine Missense-Mutation im porcinen Ryanodinrezeptor (*RYR1*-Gen, p.R615C, rs344435545) wird die Funktion des Kalziumionen-Kanals beeinflusst, wodurch Kalziumionen unkontrolliert in die Muskelzellen eintreten und die Muskelfasern dadurch aktiviert werden. Die Reaktion wird bei den für die Missense-Mutation homozygoten Tieren durch Stress oder Inhalation von Halothan, einem Inhalationsanästhetikum, ausgelöst (Fujii et al., 1991). Trotz der Stressanfälligkeit solcher Tiere und des negativen Effektes auf Fleischqualität, wurde die Missense-Variante noch nicht aus der bayerischen Piétrainpopulation eliminiert („BaZI Schwein -

Detailseite“, o. J.). Ein Grund dafür könnte der mit dem stressanfälligen Allel assoziierte, höhere Magerfleischanteil sein (Zhang et al., 1992).

Durch eine Missense-Mutation im Fucosyltransferase 1 Gen (*FUT1*-Gen, c.304A>G, rs335979375) wird die Aminosäure Alanin an der Proteinposition 103 durch Threonin ersetzt (p.T103A), wodurch Rezeptoren auf der Darmoberfläche verändert werden und *E. coli*-Stämme mit F18 Fimbrien nicht mehr anhaften können (*E. coli* F18-resistent: Nukleotid Adenin (A), *E. coli* F18-anfällig: Nukleotid Guanin (G)). Die *E. coli* Rezeptor F18 Resistenz wird rezessiv vererbt und schützt homozygote Tiere (A/A) vor dem sogenannten Absetzdurchfall und der Ödemkrankheit (Meijerink et al., 2000).

Der Absetzdurchfall tritt in der ersten Woche nach dem Absetzen auf. Stark betroffene Ferkel sterben plötzlich, ohne Krankheitsanzeichen bzw. einer sehr kurzen Krankheitsdauer. Die meisten der erkrankten Ferkel sind gut genährt. Andere Tiere zeigen einen milderen Verlauf mit geringerer Futteraufnahme und einem wässrigen Durchfall, der zur Dehydrierung führen kann. Nach dem Tod ist der Dünndarm erweitert und hyperämisch (van Beers-Schreurs et al. 1992). Ausgelöst wird der Absetzdurchfall durch enterotoxische *E. coli* (ETEC), welche sowohl hitzestabile, als auch hitzelabile Enterotoxine produzieren. Die F18ac-Fimbrien ermöglichen eine Besiedelung der Dünndarmschleimhaut, auf der entsprechende Rezeptoren ausgebildet sind (Fairbrother et al., 2005). Die Ödemkrankheit wird meist 2–3 Wochen nach dem Absetzen beobachtet. Erste Anzeichen sind verminderte Futteraufnahme, gefolgt von Muskelzuckungen und Ataxien. Der Tod tritt meist innerhalb weniger Tage ein. Charakteristisch bei Autopsien sind Ödeme im Bauchraum, den Augenlidern und dem Mesocolon (van Beers-Schreurs et al., 1992). Verursacht wird die Ödemkrankheit von Shiga-like Toxin produzierenden ETEC, welche die Dünndarmschleimhaut mit Hilfe von F18ab-Fimbrien besiedeln (Moxley, 2000).

In der bayerischen Schweinezucht unterscheidet sich die Häufigkeit des Resistenzallels A (Nukleotid Adenin) sehr stark zwischen den drei Hauptrassen. Am häufigsten kommt das Allel A beim Deutschen Edelschwein mit einer Allelfrequenz von 0,65 vor, gefolgt von 0,28 beim Piétrain und nur 0,06 in der Deutschen Landrasse („Zuchtbericht Schwein 2019“, 2020).

Wie Binder (2004) in seiner Dissertation zeigen konnte, liegt in der bayerischen Piétrainpopulation ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden Loci (MHS und *E. coli* F18-Resistenz) vor, wobei der Haplotyp stressstabil und *E. coli* F18-resistent (N-A) nur eine Frequenz von 0,03 aufwies. Der nicht wünschenswerte Haplotyp stresslabil und *E. coli* F18-anfällig (P-G) konnte mit einer Häufigkeit von 0,53 beobachtet werden. Es wurde die Befürchtung geäußert, dass durch die

Stresssanierung in der bayerischen Piétrainpopulation das Allel für die *E. coli* F18-Resistenz ebenfalls eliminiert wird.

2.5 Bekannte Quantitative Trait Nukleotide (QTN)

Quantitative Trait Nukleotide sind im Gegensatz zu QTL (ein Bereich des Genoms das eines oder mehrere Gene umfasst) einzelne Basen im Genom, die einen Teil der Varianz eines quantitativen Merkmals erklären.

Ein bekannter QTL, welcher die Anzahl Wirbel beim Schwein beeinflusst, befindet sich auf Chromosom 7 und beinhaltet das *VRTN* Gen (Fan et al., 2013; Mikawa et al., 2005; Nakano et al., 2015; Ren et al., 2012; Rohrer et al., 2015; Yang et al., 2016), welches für die Bildung von Brustwirbeln unentbehrlich ist (Duan et al., 2018). Der Effekt des QTL auf die Anzahl Brustwirbel und den damit korrelierten Merkmalen Körperlänge, Zitzen- und Rippenzahl wurde mehrfach nachgewiesen (Tabelle 2) Pro mutiertem Allel erhöht sich die Brustwirbelzahl um etwa 0,5 und die Zitzenzahl um 0,3. Die Körperlänge steigert sich um >0,5 cm pro Allel.

Tabelle 2: Literaturübersicht für die geschätzten Effekte des QTL im *VRTN* Gen auf Anzahl Brustwirbel, Rippen, Zitzen und Körperlänge

Quelle	Merkmal	Effekt pro Allel
Mikawa et al. (2011)	Brustwirbel [N]	+0,51
Fan et al. (2013)	Brustwirbel [N]	+0,50
Hirose et al. (2013)	Körperlänge [cm]	+0,54
Lopes et al. (2014)	Zitzenzahl [N]	+0,29
Rohrer et al. (2015)	Rippenzahl [N]	+0,76
Nakano et al. (2015)	Körperlänge [cm]	+0,78
Nakano et al. (2015)	Brustwirbel [N]	+0,57
Rohrer & Nonneman (2017)	Zitzenzahl [N]	+0,35

Zwei funktionelle Varianten (g.19034A>C und g.20311_20312ins291), die sich in einem hohen Kopplungsungleichgewicht befinden wurden als QTN für den assoziierten Bereich auf Chromosom 7 identifiziert. Die Punktmutation g.19034A>C (Sscrofa11.1_7:g.97614602A>C, rs709317845) liegt in der Promotorregion des *VRTN* und die Insertion g.20311_20312ins291 (Sscrofa11.1_7:g.97615896_97615897ins291) im Intron des Gens (Fan et al., 2013). Beide Mutationen wirken als Enhancer additiv positiv auf die Expression von *VRTN*, dessen Protein die

Expression von *NOTCH2* (notch receptor 2) und des Notch-Signalweges beeinflusst (Duan et al., 2018), welcher wiederum die Somitogenese-Taktung (Segmentation clock) reguliert (Jiang et al., 2000).

Ein QTN auf Chromosom 2 im Insulin Growth Factor 2 Gen (*IGF2*) beeinflusst Muskelwachstum und Fetteinlagerung. Er erklärt 15 – 30% der phänotypischen Muskelmassevarianz und 10 – 20% der Rückenspeckdicke (Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999). Im Gegensatz zu *IGF2* Knockout-Mäusen, bei denen das embryonale Wachstum eingeschränkt ist (DeChiara et al., 1991), bewirkt die Mutation im *IGF2* des Schweines ein höheres postnatales Muskelwachstum. Die kausale Variante *IGF2* intron3-g.3072G>A (Sscrofa11.1_2:g.1483817G>A) ist eine regulatorische Mutation im dritten Intron des Gens und bewirkt eine höhere postnatale Expression im Skelett- und Herzmuskel (Van Laere et al., 2003). Da *IGF2* Imprinting unterliegt, wird nur die vererbte Kopie des Vaters exprimiert (Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere und Phänotypen

3.1.1 Genotypen und Phänotypen für genomweite Assoziationsstudien

Für die genomweiten Assoziationsstudien wurden vom LKV Bayern e.V. (Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V.) Genotypen für die Rasse Piétrain (PI) von 3.700 Schweinen und von 6.105 Schweinen der Deutschen Landrasse (DL) zur Verfügung gestellt. Als Phänotypen der Rasse Piétrain wurden Zuchtwerte für zehn Leistungsmerkmale (Futtermittelverwertung [kg/kg], tägliche Zunahmen [g/Tag], Fleischanteil [%], Bauchfleischanteil [%], Rückenmuskelfläche [cm²], Fleisch:Fett-Verhältnis [cm²/cm²], Schlachtkörperlänge [cm], intramuskulärer Fettgehalt [%], pH-Wert im Kotelett nach 1 Stunde, Tropfsaftverlust [%]) und acht Anomalien (siehe unten) verwendet, sowie Rohdaten der Anomalienzuchtwertschätzung. Für die Deutsche Landrasse standen ebenfalls Zuchtwerte für die zehn Leistungsmerkmale und fünf Fruchtbarkeitsmerkmale (lebend geborene Ferkel [N], aufgezogene Ferkel (überlebende Ferkel der Sau) [N], abgesetzte Ferkel (überlebende Ferkel an der Sau) [N], Verbleiberate [% der Sauen, die den 2. Wurf erreichen] und Stülpzitzen [N]) zur Verfügung. Die Zuchtwerte wurden mit Hilfe eines Single-Step BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) Verfahrens geschätzt. Grundlage der Zuchtwertschätzung für Anomalien sind die Meldungen der Landwirte oder deren Ringberater in den LKV-Sauenplanern. Für jeden Wurf von Prüfebern soll gemeldet werden, ob und falls ja, welche Anomalien beobachtet wurden. Erfasst werden folgende acht Anomalien: afterlose Ferkel, Hodenbruch, Nabelbruch, Kryptorchismus (Binneneber), Zwitter, Kopfmissbildung, Zittern (Tremor) und Grätscher (auch Spreizer genannt: die Ferkel sind nicht in der Lage auf den Hintergliedmaßen zu stehen, da diese nach außen wegrutschen). Ziel ist, dass pro Eber mindestens 40 Würfe erfasst werden. Da die Meldungen nicht verpflichtend sind, gibt es je nach Ringberater regionale Schwankungen der gemeldeten Würfe, was zu Verzerrungen führen kann („Zuchtwertschätzung für Anomalien“, o. J.).

Die Zuchtwerte und Rohdaten stammen vom Februar 2020 und wurden vom Institut für Tierzucht der LfL übermittelt. Es wurden nur Zuchtwerte mit einer Sicherheit $\geq 50\%$ für die GWAS berücksichtigt bzw. Rohdaten von Ebern mit mindestens 5 Würfen.

3.1.2 Schweine der Next-Generation-Sequenzierung

Im Rahmen des InGeniS-Projektes war geplant jeweils 30 Schlüsseltiere der Rassen Piétrain und Deutsche Landrasse genomweit zu re-sequenzieren, welche den höchsten Anteil der genetischen Variation der Herdbuchpopulation erklären. Die Auswahl der Tiere erfolgte mit der Software *PEDIG* (Boichard, 2002). Da nicht von allen ausgewählten Schlüsseltieren ausreichend DNA vorhanden war, wurden stattdessen Schweine, die weniger Einfluss auf die Herdbuchpopulation erklären, sequenziert. Insgesamt wurden 29 DL und 31 PI sequenziert. Zusätzlich standen Sequenzen von 15 Baden-Württembergischen PI, 74 DL Tieren aus dem „PleuroRes“-Projekt und vier Hampshire für die Arbeit zur Verfügung (siehe Anhang 1).

3.1.3 Unfruchtbare Sauen der Deutschen Landrasse

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion standen Ohrstanzen von insgesamt 43 Tieren, die auf Grund ihrer kleinen Vulva als betroffene Tiere eingestuft wurden, zur Verfügung. Zusätzlich wurden, wenn möglich, Gewebeproben von weiblichen Vollgeschwistern mit normal großen Vulven als Kontrollen gezogen. Die ersten 17 betroffenen Tiere wurden für die Durchführung einer genomweiten Assoziationsstudie mit dem *Illumina Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina inc., San Diego, CA, USA) genotypisiert. Die DNA des Vaters der ersten 8 Fälle wurde aus Sperma extrahiert. Der Eber wurde sowohl mit dem *Illumina Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina inc., San Diego, CA, USA) genotypisiert, als auch mit der Next-Generation-Sequenzierung genomweit re-sequenziert. Für die Überprüfung, ob die kausale Variante in der Deutschen Edelschweinpopulation segregiert, wurden Spermaproben von 12 Ebern und Ohrstanzen von 145 Sauen für die DNA-Isolierung und anschließenden Genotypisierung von den Besamungsstationen Bayern-Genetik GmbH und Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V., sowie Zuchtbetrieben zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Risikoanpaarungen zur Überprüfung des Effektes der BMP15:p.R212X

Variante auf Reproduktionsorgane

Für die Risikoanpaarung wurden zwei Herdbuchjungsaunen der Deutschen Landrasse, die auf Grund ihrer Abstammung heterozygot für die BMP15:p.R212X Variante waren, im Alter von 8 Monaten mit einem ebenfalls die Mutation tragenden Eber künstlich besamt. Die tragenden Sauen wurden in der Versuchsstation Thalhausen der TU München eingestallt. Eine Sau gebar nur männliche Ferkel, die für weitere Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden. Die zweite Sau gebar 13 Ferkel,

wovon zehn weiblich waren. Die Ferkel wurden nach vier Wochen abgesetzt und unter Standardbedingungen gehalten. Im Alter von acht Wochen wurde den weiblichen Nachkommen Blut abgenommen, um den Genotyp der BMP15:p.R212X Variante zu bestimmen. Nach sechs Monaten wurden acht der zehn Jungsauen (fünf mit Genotyp T/T, drei mit Genotyp C/T) im Schlachthof der LfL in Grub nach Betäubung mit CO₂ geschlachtet. Uteri und Eierstöcke wurden für genauere Betrachtung entnommen. Die Blutentnahme und das Schlachten der Tiere wurde von der Regierung von Oberbayern (Sachgebiet 54) nach Einreichen einer Tierversuchsanzeige genehmigt.

3.2 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA standen Sperma, Gewebe und gerinnungsgehemmtes Vollblut zur Verfügung. Die DNA-Isolierung wurde mit verschiedenen Methoden, je nach Ausgangsmaterial durchgeführt. Die angegebenen Einheiten entsprechen den Abkürzungen der physikalischen SI Einheiten.

3.2.1 DNA-Isolierung aus Sperma

Die Isolierung von DNA aus Spermien wurde nach einem abgewandelten Extraktionsprotokoll von Binder (2004) durchgeführt. Die Spermaproben lagerten bis zur Bearbeitung bei -20°C und wurden für die Bearbeitung bei Raumtemperatur aufgetaut. Um die Spermien von der Flüssigkeit (Seminalplasma und Verdünnungsmittel) zu trennen, wurden 150 µl Sperma in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Spermienpellet wurde in 1000 µl PBS (50 mM Phosphat-gepufferte Salzlösung, 150 mM NaCl, pH 7,2) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde je nach Viskosität des Spermias zwei- bis dreimal durchgeführt. Die Zellyse erfolgte unter Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml), 15 µl DTT (1 M) und 400 µl PKS-Puffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS) bei 56°C über Nacht. Für die Trennung von DNA und Proteinen wurde zu den Proben 600 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben, invertiert und zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vermischt und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Isopropanol-Fällung wurde 1/10 Volumen Natrium-Acetat (3 M, pH 7,6) und 1 Volumen Isopropanol (100%) zugegeben, invertiert und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen und nach Entfernen des Ethanols bei Raumtemperatur

getrocknet und anschließend in 1× TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Die DNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.2 DNA-Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben wurde mit dem *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen®, Hilden, Deutschland) unter Verwendung des Hersteller-Protokolls durchgeführt.

3.2.3 DNA-Isolierung aus Blut

Zur DNA-Isolierung aus gerinnungsgehemmten Vollblut (1,6 mg EDTA/ 1 ml Blut) wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Für die genomweite Re-Sequenzierung von Schlüsseltieren standen für die DNA-Isolierung meist nur Rückstellproben mit einem Blutvolumen kleiner 1 ml zur Verfügung. Aus diesen Blutproben wurde mit Hilfe des *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen®, Hilden, Deutschland) unter Verwendung des Hersteller-Protokolls die genomische DNA isoliert.

Von den Ferkeln der Risikoanpaarung standen jeweils 5 ml Blut für die Isolation zur Verfügung. Das Blut wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 35 ml H₂O_{bidest} und 5 ml NaCl (1,8%) gemischt, für 30 min bei 2.500 rcf zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Für die Kernlyse wurde das Pellet in 40 ml NP40 (0,1%) resuspendiert und erneut für 30 min bei 2.500 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Proteinlyse wurden 2,5 ml 1× PK-Puffer (0,2 M Tris-HCl, 0,4 M EDTA, 1 M NaCl), 200 µl SDS (10%) und 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) zum Pellet gegeben, gemischt und bei 56°C über Nacht inkubiert. Die Trennung von DNA und Proteinen erfolgte durch Aussalzen mittels Zugabe von 2 ml NaCl (5 M) und anschließender Zentrifugation (30 min bei 3.600 rcf). Für die Isopropanol-Fällung wurde der Überstand in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol (100%) präzipitiert und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 700 µl Ethanol (70%) gewaschen und nach entfernen des Ethanols bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Weiterverarbeitung wurde das getrocknete DNA-Pellet je nach Pelletgröße in 100–200 µl 1× TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle von DNA

Die benötigten DNA-Konzentrationen lagen für die Genotypisierung mit dem *Illumina Porcine 60K BeadChip* bei 60 ng/μl, für die Next-Generation-Sequenzierung mit dem *Illumina HiSeq2500* bei 25 ng/μl, für die Amplifikation mittels PCR bei 10 ng/μl und für die Genotypisierung mittels *KASP™* bei 2 ng/μl. Die Quantifizierung der genomischen DNA erfolgte mit dem *NanoDrop™ 1000* Spektrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine zusätzliche Qualitätskontrolle erfolgte mit der Kennzahl A260/280 zur Überprüfung auf Proteinrückstände und A260/230 als Wert zur Überprüfung auf Verunreinigungen aus der Isolierung.

3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.4.1 Primerdesign

Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der *Primer3* Software (<http://primer3.ut.ee/>) (Untergasser et al., 2012) basierend auf den Sequenzinformationen der porcinen *Sscrofa10.2*- und *Sscrofa11.1*-Assemblies. Die Primer sollten eine Länge von 20 Nukleotiden mit einem GC-Gehalt von etwa 50% haben. Die optimale Schmelztemperatur wurde mit 60°C angegeben, wobei Schmelztemperaturen zwischen 57°C und 63°C toleriert wurden. Die Standardeinstellungen für Primerrückfaltungen und Primerdimer-Bildung wurden übernommen. Die Länge der amplifizierten Produkte sollte zwischen 300 und 750 Basen liegen. Für die Überprüfung der Stoppmutation im *BMP15*-Gen wurden 5'-CGCCATCAACTTCACCTAGC-3' als forward Primer und 5'-TCTGGGAAGAAGTTTGGCCT-3' als reverse Primer designed. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Die gefrieretrockneten Primer wurden in Tris-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0) gelöst. Die Konzentration der Primer-Stammlösung betrug 100 μM. Die Arbeitslösungen (5 μM) der Primer für die PCR wurden durch Verdünnung mit Tris-Puffer hergestellt.

3.4.2 Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen unter Standardbedingungen wurden in einem Reaktionsansatz von 20 μl durchgeführt und enthielten jeweils 10 ng genomische DNA, 1× *Coral Load PCR Puffer* mit 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Deutschland), 20 μM dNTP-Mix (Carl Roth, Karlsruhe,

Deutschland), je 0,25 μM des Forward- bzw. Reverse-Primers und 1 U Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Amplifizierung erfolgte in einem T-Gradient Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland), wobei die Temperaturabläufe der Standard-PCR eine initiale Denaturierung bei 95°C für 4 min, die zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung (95°C) für 40 s, Annealing (60°C) für 1 min und Elongation (72°C) für 1 min, sowie einen abschließenden Elongationsschritt bei 72°C für 4 min umfassten. Für die Standard-PCR wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Die Überprüfung der PCR wurde mit einem 1,5%igen Agarosegel (0,001% Ethidiumbromid, 0,5 \times Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)) durchgeführt. Die PCR-Produkte und der Längenstandard *GeneRuler 100bp-DNA-Ladder* (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) wurden ca. 30 min bei 100 V in 0,5 \times TBE-Puffer aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.5 Sanger-Sequenzierung

Die DNA Re-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977).

3.5.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Bevor die PCR-Produkte für die Sequenzierreaktion verwendet wurden, erfolgte eine enzymatische Aufreinigung um nicht eingebaute dNTPs, Primer und einzelsträngige DNA-Fragmente zu entfernen. Hierfür wurden 0,4 U alkaline Phosphatase *FastAP* (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) und 2 U Exonuklease I (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) mit dem PCR-Ansatz gemischt, bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend die Enzyme bei 80°C für 15 min deaktiviert. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

3.5.2 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierungen wurden mit dem *BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 μl und enthielt 0,25 μM forward oder reverse Primer, 1 \times *BigDye Terminator*, 1 \times *BigDye Sequenzierpuffer*, 1 \times Dilutionpuffer (5 mM MgCl_2 , 0,2 mM Tris-HCl, pH 8,0) und das aufgereinigte PCR-Produkt. Die Amplifizierung mit einer initialen Denaturierung bei 95°C für 20 s und 25

Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 12 s, Annealing bei 51°C für 8 s und Elongation bei 60°C für 4 min erfolgte im T-Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland).

3.5.3 Aufreinigung und Kapillargelelektrophorese

Die Sequenzierreaktion wurde anschließend mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration aufgereinigt. Hierfür wurden 20 mg *Sephadex*[®] *G-50* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in *MultiScreen HV Platten* (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) unter Zugabe von 300 µl H₂O_{bidest} für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Wasser durch Zentrifugation entfernt. Die Sequenzierreaktion wurde mit 15 µl EDTA (0,1 mM) verdünnt und mittig auf die Sephadex-Säulchen pipettiert. Durch Zentrifugation wurden nicht eingebaute Nukleotide von der Sequenzierreaktion entfernt.

Die Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktion erfolgte durch eine Kapillargelelektrophorese im *ABI Prism 3110xl Genetic Analyzer* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit dem Polymer *3130 POP7* und einer 36 cm *3130xl & 3100*-Kapillare unter Standardeinstellungen. Die qualitative Datenbeurteilung und Zuordnung der Nukleotide erfolgte mit der *AB Sequencing Analysis Software* (v5.2).

3.6 Genotypisierung

3.6.1 KASP[™] Typisierung

Die mit Hilfe von GWAS und genomweiten Re-Sequenzierungsdaten identifizierte Stoppmutation im *BMP15* Gen (p.R212X) wurde mit einem KASP-Assay (He et al. 2014) unter Verwendung des *ABI 7500 Fast Real-Time PCR Systems* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) genotypisiert. Die Erstellung des Assays erfolgte durch *LGC Limited* (Teddington, Vereinigtes Königreich). Für die Genotypisierung wurden zwei Polymorphismen-spezifische forward PCR-Primer (5'-GACACATGAAGCGGAGTCG-3' für das Referenzallel C und 5'-GCTGACACATGAA GCGGAGTCA-3' für das mutierte Allel T) und ein universeller reverse Primer (5'-TCACAAG GGGCGCAGGGTTCT-3') erstellt. Der 10 µl umfassende Versuchsansatz setzte sich aus dem SNP-spezifischen Assay, dem KASP Master Mix (*LGC Limited*, Teddington, Vereinigtes Königreich) und 4 ng DNA zusammen. Nach einer 15-minütigen Enzym Aktivierung bei 94°C, folgten 10 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 20 s und einem kombinierten Annealing-Elongationsschritt für 60 s, wobei die Temperatur beim ersten Zyklus 61°C betrug und

bei jedem folgenden Zyklus um 0,6°C reduziert wurde, so dass beim zehnten Zyklus die Temperatur bei 55°C lag. Anschließend folgten 30 weitere Zyklen mit einer Denaturierung bei 94°C für 20 s und einem kombinierten Annealing-Elongationsschritt für 60 s bei 55°C. Abschließend wurde im Post-PCR Read (40°C für 1 min) die Fluoreszenz gemessen. Die Bestimmung der Genotypen erfolgte mit der *7500 Software v2.0.5*.

3.6.2 Genomweite Genotypisierung

Die genomweite Genotypisierung wurde mit der iScan-Genotypisierungsplattform von Illumina (Illumina inc., San Diego, CA, USA) und dem *Illumina Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina inc., San Diego, CA, USA) nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Für die Untersuchung der „kleinen Vulven“ wurden 17 betroffene DL-Sauen und 1.825 unauffällige DL-Sauen genomweit genotypisiert und die Genotypen mit Hilfe der *GenomeStudio* Software von Illumina (Illumina inc., San Diego, CA, USA) bestimmt. Die chromosomalen Positionen der SNPs basieren auf dem Sscrofa11.1-Assembly (Warr et al., 2019). Die Qualitätskontrolle wurde mit *PLINK v1.90beta* (Chang et al., 2015) durchgeführt, wobei sieben Saue und 2.923 Varianten auf Grund der schlechten Genotypisierungsrate (<90%), 264 Varianten wegen Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ($P < 0,000001$) und 6.950 wegen zu niedriger Allelfrequenz ($MAF < 0,01$) für weitere Analysen ausgeschlossen wurden. Des Weiteren wurden 621 nicht annotierte SNPs und 32 Y-chromosomale SNPs nicht berücksichtigt. Der finale Datensatz für die GWAS enthielt 1.835 Saue (17 Falltiere und 1.818 Kontrolltiere) und 50.649 SNPs.

Für die GWAS mit den Zuchtwerten der Leistungsmerkmale (Fleisch-, Schlachtkörper-, Fruchtbarkeitsmerkmale und Anomalien) bzw. Rohdaten der Anomalien wurden 3700 Piétrains und 6105 Schweine der Deutschen Landrasse genotypisiert und mit der *GenomeStudio* Software von Illumina (Illumina inc., San Diego, CA, USA) die Genotypen bestimmt. Die chromosomalen Positionen der SNPs basieren auf dem Sscrofa11.1-Assembly (Warr et al., 2019). Die Qualitätskontrolle ($MAF > 0,01$) und das Erstellen der Variant Call Format (VCF) Dateien für die Imputation wurden mit *PLINK v1.90beta* (Chang et al., 2015) durchgeführt.

3.7 Next Generation Sequenzierung

3.7.1 Library Herstellung

Die Libraries wurden mit dem *TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit* von *Illumina®* (Illumina inc., San Diego, CA, USA) unter Verwendung des Herstellerprotokolls (Catalog # FC-121-9006DOC, Part # 15036187 Rev. B, November 2013) hergestellt. Als Ausgangsmaterial wurde 1 µg genomische DNA verwendet, um Libraries mit einer Insert Größe von 350 bp zu generieren. Die Fragmentierung der genomischen DNA erfolgte mit dem *Covaris S220* (Covaris Ltd., Brighton, UK) mit folgenden Einstellungen: Duty factor 5%, Peak Incident Power 175 W, 200 Cycles per burst, Dauer 50 s bei einer Temperatur von 5,5–6°C.

Die Qualitätskontrolle der Libraries wurde mit dem *High Sensitivity DNA Chip des Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, inc., Santa Clara, CA, USA) durchgeführt, wodurch die Fragmentgrößen bestimmt wurden. Die Quantifizierung erfolgte mittels qPCR und dem *KAPA Library Quantification Kit* (Roche Sequencing and Life Science, Kapa Biosystems, Willmington, MA, USA), mit jeweils drei Ansätzen pro Library und dem Verdünnungsgrad 1:1000.

3.7.2 Sequenzierung und Datenanalyse

Die Libraries wurden mit dem HiSeq2500 (Illumina inc., San Diego, CA, USA) im 125 bp paired-end Modus sequenziert. Die Schweine für das „InGenis“-Projekt (29 DL, 31 PI), die 15 Piétrains aus Baden-Württemberg, vier Hampshire und vier Schweine aus dem „PleuroRes“-Projekt sollten mit zehnfacher Abdeckung und 70 Schweine aus dem „PleuroRes“-Projekt mit fünffacher Abdeckung sequenziert werden (siehe Anhang 1). Das Alignment der erzeugten Reads an die Referenzsequenz Sscrofa11.1 wurden mit dem *Burrow-Wheeler Aligner* (BWA) durchgeführt (Li et al., 2009). Duplikate wurden mit *Picard* (<http://broadinstitute.github.io/picard>) markiert. Die Varianten (SNPs, kleine Indels) wurden mit *GATK* identifiziert (McKenna et al., 2010) und mit dem *Ensembl Variant Effect Predictor* (VEP) (McLaren et al., 2016) entsprechend der RefSeq (v. 2017_05) Annotation des Sscrofa11.1 Assemblies annotiert.

3.8 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

3.8.1 Imputation

Für die Imputation standen Genotypdaten von insgesamt 3.700 PI und 6.105 DL Schweinen, die mit dem *Illumina Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina inc., San Diego, CA, USA) typisiert wurden, zur Verfügung. Als Referenzdaten wurden Genomsequenzen von 46 PI (31 PI aus dem „InGenis“-Projekt und 15 Piétrains aus Baden-Württemberg) und 29 DL Schweinen („InGeniS“-Projekt) verwendet.

Die Imputation wurde mit *Beagle 5.1* durchgeführt (Browning et al., 2018). Für beide Rassen wurden folgende Parameter verwendet: $window = 20$, $overlap = 2$, $ne = 250$, $ap = true$ und $gp = true$.

3.8.2 Durchführung der GWAS

Die GWAS wurden mit Hilfe eines gemischten linearen Ansatzes nach folgendem Modell durchgeführt:

$$y = a + bx + g + e,$$

wobei y den Phänotyp beschreibt, a den Mittelwert, b den additiven Effekt (fixer Effekt) des zu testenden SNPs, x den Genotyp des SNPs (kodiert mit 0, 1 und 2), g den polygenen Effekt (zufälliger Effekt) und e den Restfehler.

Für das Merkmal „Unfruchtbarkeit / atypisch kleine Vulva“ in der Deutschen Landrasse wurde die *MLMA*-Funktion (mixed linear model based association analysis) von *GCTA* (Yang et al., 2011) für die Berechnung verwendet, wobei y mit 1 für betroffene und 0 für gesunde Tiere kodiert wurde.

Die Assoziationsstudien mit den Zuchtwerten der Leistungsmerkmale (Fleisch-, Schlachtkörper-, Fruchtbarkeitsmerkmale und Anomalien) bzw. den Rohdaten der Anomalien wurden auf Grund des höheren Datenvolumens ($> 16.000.000$ Varianten pro Studie) mit dem Programm *fastGWA* von *GCTA* (Jiang et al., 2019) durchgeführt.

Die Ergebnisse der GWAS wurden als signifikant betrachtet, wenn der P-Wert kleiner der Bonferroni-korrigierten Signifikanzgrenze ($0,05 \div \text{Anzahl Varianten}$) war.

Die Metaanalyse der zehn Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale, für die sowohl bei der Deutschen Landrasse als auch bei Piétrains GWAS durchgeführt wurden, erfolgte mit der Software *METAL* (Willeret al., 2010). In der Metaanalyse wurde für jede Variante ein Z-Wert, unter Berücksichtigung des jeweiligen P-Wertes und Effektes der GWAS innerhalb der Rassen, berechnet.

3.8.3 Schätzung pleiotroper Effekte

Die pleiotropen Effekte der Lead-SNPs auf die Merkmale, mit denen sie signifikant assoziiert waren, wurden mit folgender Formel geschätzt:

$$\left(\frac{2 \times p \times q \times \beta^2}{\sigma^2}\right) \times 100$$

Es wurde berechnet, wie viel von der gesamten Varianz des Merkmals von dem jeweiligen Lead-SNP erklärt wird. Wobei p und q die Allelfrequenzen des jeweiligen Lead-SNPs darstellen, β den jeweiligen SNP-Effekt und σ^2 die phänotypische Varianz des Merkmals.

3.9 In-silico Analysen

3.9.1 Sequenz- und Genotypen-Abgleich

Die für das „InGeniS“-Projekt sequenzierten Schweine ($n = 60$) wurden zusätzlich mit dem *Illumina Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina inc., San Diego, CA, USA) genotypisiert. Um sicher zu gehen, dass keine Proben verwechselt wurden, wurde ein Abgleich der Sequenzdaten mit den Genotypdaten durchgeführt.

Mit *PLINK v1.90beta* (Chang et al., 2015) wurde die VCF-Datei von Chromosom 1 der Sequenzen in Plink-Dateien (bed, bim, fam Dateien) umgewandelt und nur die auf dem SNP-Chip enthaltenen SNPs übernommen. Aus den Genotypdaten wurden die 60 Schweine, deren Genom sequenziert wurden, extrahiert und anschließend beide Dateien in Plink long-format genotype Dateien (lgen Datei) umgeschrieben. Mit *R* (<https://www.R-project.org>) wurden die lgen-Dateien zusammengefügt und die Übereinstimmung zwischen den Genotypen der Chip-Typisierung und der Genom-Sequenzierung überprüft.

3.9.2 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse der 60 genomweit re-sequenzierten Schweine des „InGeniS“-Projektes wurde mit *GCTA* (Yang et al., 2011) durchgeführt. Für die Berechnung der Hauptkomponenten wurde die VCF-Datei des ersten Chromosoms mit *PLINK v1.90beta* (Chang et al., 2015) in Plink Dateien umgewandelt und gefiltert. Von den 2.442.312 Varianten auf SSC1 wurden 163.884 wegen zu niedriger Allelfrequenz ($MAF < 0,001$) ausgeschlossen. Es mussten keine Tiere oder Varianten auf Grund einer zu niedrigen Genotypisierungsrate ($< 90\%$) ausgeschlossen werden. Die genomische Verwandtschaftsmatrix der 60 Schweine wurde über die verbliebenen 2.278.428 Varianten mit *GCTA* erstellt und anschließend die ersten zehn Hauptkomponenten berechnet. Die graphische Darstellung des Ergebnisses erfolgte mit R (<https://www.R-project.org>), wobei die Werte der ersten zwei Hauptkomponenten berücksichtigt wurden.

3.9.3 Genotypen-Abgleich zur Identitätsbestimmung

Der Sequenz- und Genotypen-Abgleich, sowie die Hauptkomponentenanalyse ergab, dass einem genomweit re-sequenziertem Tier eine falsche Identität zugeordnet wurde. Um die Identität zu klären, wurde ein Vergleich der Sequenzdaten des Tieres mit den bis dahin SNP-Chip genotypisierten Piétrains ($N = 2.238$) mit Hilfe von *BCFtools* (Li et al., 2009) durchgeführt. Für den Abgleich wurden die Chip-Genotypen der 2.238 Piétrains mit *PLINK v1.90beta* (Chang et al., 2015) in VCF-Dateien umgewandelt und eine VCF-Datei des Tieres mit allen autosomalen SNPs, die auf dem *Illumina Porcine SNP60 BeadChip* (Illumina inc., San Diego, CA, USA) enthalten sind, erstellt. Mit *gtcheck* von *BCFtools* wurde jeweils die Übereinstimmung der Genotypen des Schweines mit den Genotypen der 2.238 Piétrains berechnet. Die graphische Darstellung des Ergebnisses erfolgte mit R (<https://www.R-project.org>).

3.9.4 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik wurde mit der Software *IPython 3.7* (Perez & Granger, 2007) und ergänzenden Modulen *pandas* (McKinney, 2010), *NumPy* (Harris et al., 2020) und *statsmodels* (Seabald & Perktold, 2010) durchgeführt. Die Abbildungen zur Darstellung der deskriptiven Statistik wurden mit dem Pythonmodul *matplotlib* erstellt (Hunter, 2007).

3.9.5 Charakterisierung des Kandidatengens *BMP15*

Die Konservierung der Proteinsequenz des Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) wurde mit *Clustal Omega* von *EMBL-EBI* (Madeira et al., 2019) überprüft und mit der Software *Jalview 2.11* visualisiert (Waterhouse et al., 2009). Für das Multi Spezies Alignment wurde die Proteinsequenz des Schweines mit der des Menschen, der Maus und des Schafes verglichen. Die jeweiligen Sequenzen wurden der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Für die Darstellung der Aminosäuren wurde die *IUPAC* Nomenklatur (Johnson, 2010) verwendet.

3.9.6 Sequenz- und Polymorphismen-Analyse

Die Datenanalyse der Sanger-Sequenzierungen wurde mit der *Phred/Phrap/Polyphred* Software (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Nickerson et al., 1997) durchgeführt und die Chromatogramme mit Hilfe von *Consed* (Gordon et al., 1998) oder *GEAR-Genomics* (<https://www.gear-genomics.com/>) visualisiert.

Die Daten der Genomsequenzierungen wurden mit der Software *Integrative Genomics Viewer* (IGV) visualisiert (Robinson et al., 2011) (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

4 Ergebnisse

4.1 Sequenz- und Genotypenabgleich

Im Rahmen des „InGeniS“-Projektes war geplant, pro Rasse (DL und PI) 30 Individuen genomweit zu re-sequenzieren und mit dem SNP-Chip zu genotypisieren. Von den 30 DL-Schweinen waren bereits Genotypen von 17 Tieren („FrOGS“-Projekt) vorhanden, unter anderem von InGenis-90. Um mögliche Verwechslungen oder Kontaminationen aufzudecken, wurde ein Abgleich der Chip-Genotypen mit den Sequenzdaten des ersten Chromosoms durchgeführt. Nach der Qualitätskontrolle konnten 4.690 SNPs für den Abgleich verwendet werden. Wie Abbildung 2 zeigt, korrelieren bei 59 Tieren die Genotypen zu mehr als 0,9. Bei einem Tier (InGenis-90) ergab der Abgleich nur eine Übereinstimmung von unter 0,5 (siehe Anhang 2). Daraus lässt sich schließen, dass die Genomsequenzen und die Chip-Genotypen von unterschiedlichen Tieren stammen müssen.

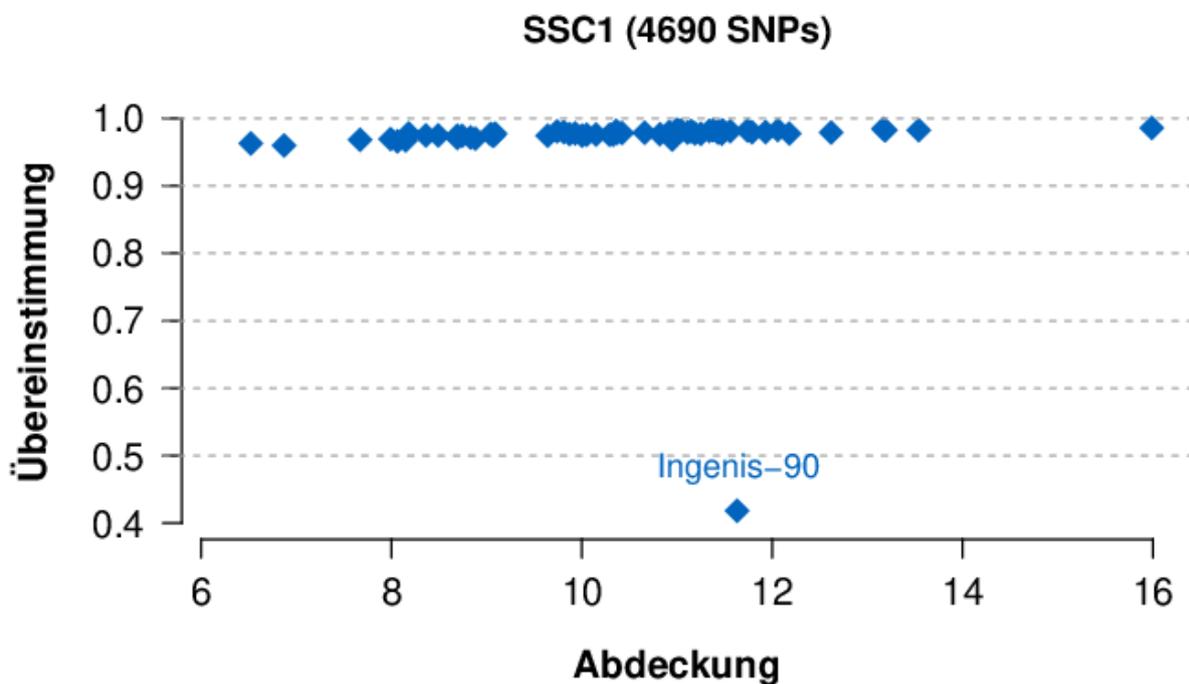


Abbildung 2: Abgleich der Sequenzdaten mit den Chip-Genotypdaten

Die X-Achse gibt die Abdeckung der Genomsequenzen an. Die Y-Achse zeigt den Grad der Übereinstimmung der Genotypen aus der Sequenzierung und der Chip-Genotypisierung.

Um die Identität des Tieres InGenis-90 zu klären, wurde eine Hauptkomponentenanalyse der 60 sequenzierten Schweine durchgeführt. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der mit Hilfe von 2.278.428

Varianten durchgeführten Analyse, wobei die ersten beiden Hauptkomponenten dargestellt sind. Die 60 Schweine bilden eindeutig zwei Cluster, welche den beiden Rassen DL und Piétrain zugeordnet werden können. Das Tier Ingenis-90 liegt eindeutig im Cluster der Piétrains, obwohl es ein DL-Eber sein sollte.

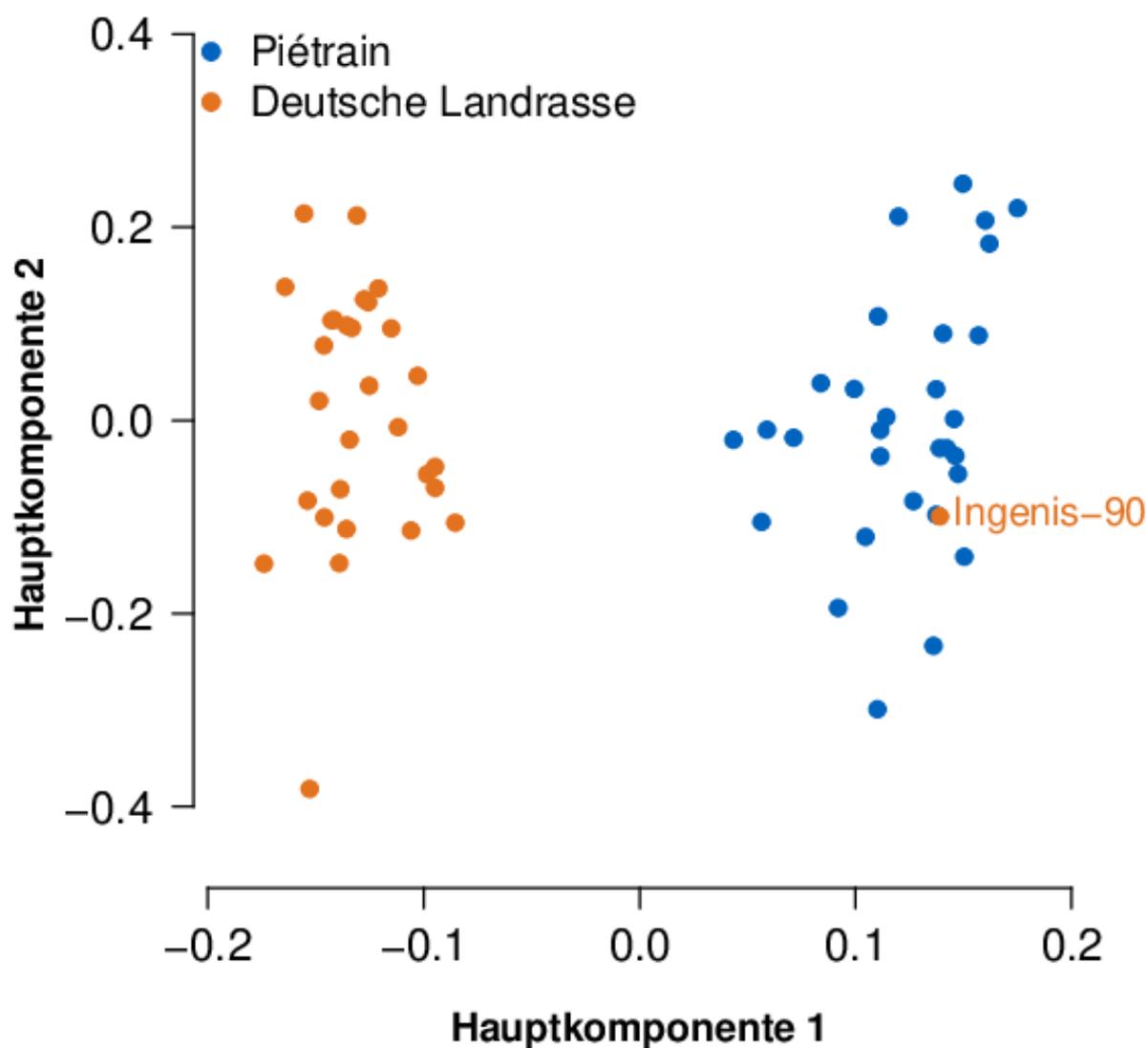


Abbildung 3: Hauptkomponentenanalyse der Sequenzdaten (Chromosom 1: 2.278.428 Varianten) von 60 Schweinen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die als Ingenis-90 gekennzeichnete Probe einem PI-Eber zugeordnet werden muss, wurde ein Abgleich mit allen bis dahin genotypisierten Piétrains durchgeführt. Die Übereinstimmung der Genotypen lag zwischen 0,49 und 0,67 (Abbildung 4).

Folglich kann die Probe Ingenis-90 keinem der 2.238 Piétrain Schweine zugeordnet werden. Die größten Übereinstimmungen gibt es mit Zagunt (0,67) und zwei seiner Söhne (Zabek: 0,66, Zadent: 0,65) (Anhang 3).

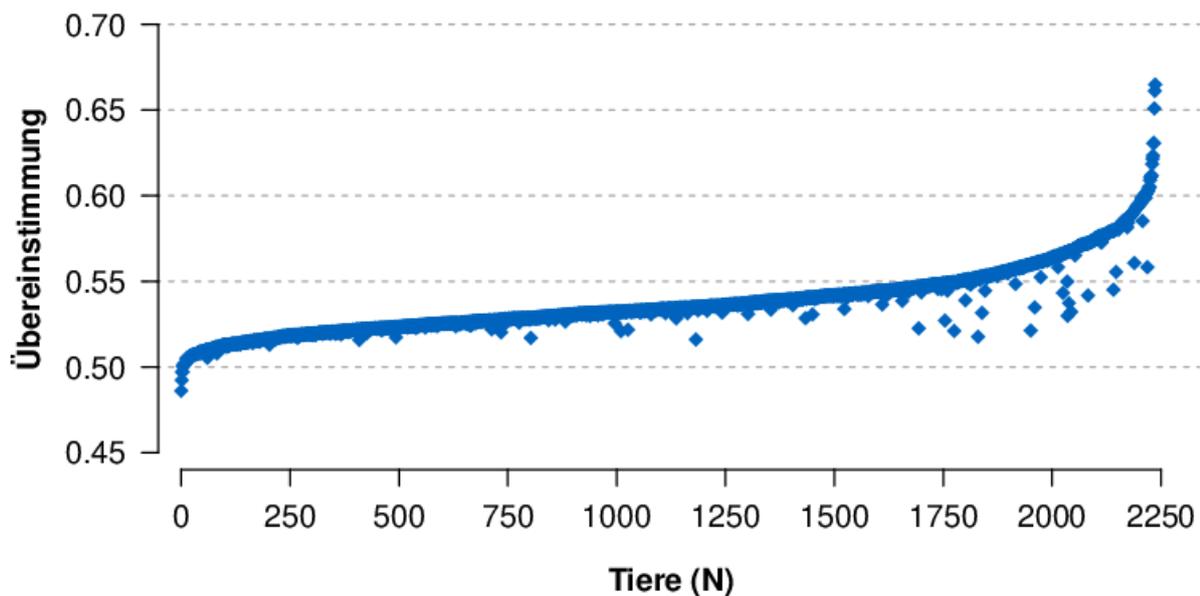


Abbildung 4: Genotypenabgleich zwischen Ingenis-90 und 2.238 Piétrains

Die X-Achse gibt die Anzahl Tiere an, mit denen ein Abgleich mit Ingenis-90 durchgeführt wurde und die Y-Achse gibt an, wie hoch die Übereinstimmung der jeweiligen Genotypen mit Ingenis-90 war.

Nach Rücksprache mit dem ITZ der Landesanstalt für Landwirtschaft und der Besamungsstation, von der die Spermaprobe geliefert wurde, konnte Ingenis-90 einem ungeprüften Zagunt-Sohn zugeordnet werden, der nach ca. sechs Monaten wegen mangelnder Fruchtbarkeit die Besamungsstation wieder verlassen musste. Da kein Material zur DNA Isolation eingelagert war, konnte kein Abgleich durchgeführt werden.

4.2 Imputation

Als Basis für die Imputation standen Sequenzinformationen von 29 DL und 46 PI Schweinen (31 Bayerische PI und 15 Baden-Württembergische PI) zur Verfügung. Die Positionen der Chip- und Sequenzdaten bezogen sich auf das aktuelle Assembly Sscrofa11.1. Durch die Imputation wurde die Genotypeninformation an 45.000 Positionen des *Illumina Porcine SNP60 BeadChips* durch Genotypen an ca. 16,5 Mio. zusätzlichen Positionen erweitert. Die Imputationsgenauigkeit (R^2) für beide Rassen ist Tabelle 3 und Abbildung 5 zu entnehmen.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Sequenz-Imputation

Rasse	Anzahl Varianten	Genauigkeit (R^2)
Deutsche Landrasse	16.575.436	0,79
Piétrain	16.474.451	0,84

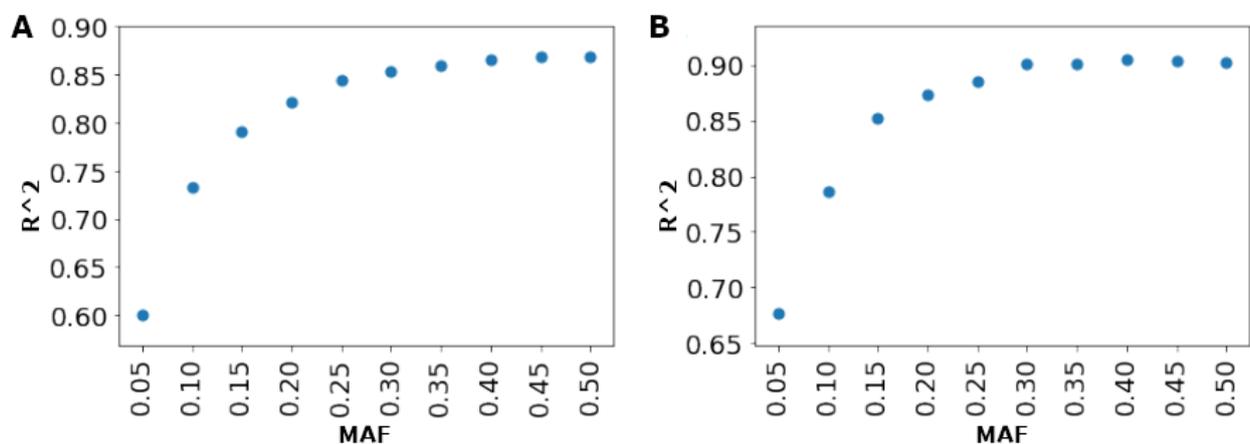


Abbildung 5: Imputationsgenauigkeit (R^2) in Abhängigkeit von der Allelfrequenz für Deutsche Landrasse (A) und Piétrain (B)

MAF: Frequenz des seltenen Allels;

Die durchschnittliche Imputationsgenauigkeit ist bei PI etwas höher als bei DL, was an der höheren Anzahl sequenzierter Individuen bei PI liegen könnte. Wie in Abbildung 5 dargestellt, steigt die Genauigkeit der Imputation mit steigender Allelfrequenz, wobei das Maximum der Genauigkeit in PI bei knapp über 0,90 liegt und in DL 0,90 nicht überschritten wird. Bei einer MAF von 0,05 liegt die Imputationsgenauigkeit in DL bei 0,6 und in PI bei etwas über 0,65.

4.3 Genomweite Assoziationsstudien

In der Rasse Piétrain wurden GWAS mit Zuchtwerten für Fleisch-, Schlachtkörpermerkmale und Anomalien, sowie Rohdaten von Anomalien durchgeführt. Für die Deutsche Landrasse standen zusätzlich Fruchtbarkeits- aber keine Anomaliendaten zur Verfügung. Bei den Zuchtwerten handelt es sich um genomische Zuchtwerte, die für Reinzucht und Kreuzung in einem gemeinsamen Schätzverfahren ermittelt werden. Für die Analysen wurden nur Tiere mit einer Zuchtwertsicherheit von $\geq 50\%$ berücksichtigt. Die identifizierten QTL auf dem X-Chromosom sind in den nächsten Abschnitten aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt, werden jedoch nicht näher betrachtet. Die Imputationsgenauigkeit des X-Chromosoms war nicht zufriedenstellend und dies beeinträchtigt die Plausibilität der Ergebnisse.

4.3.1 Deutsche Landrasse

Für DL standen mit dem zusätzlichen Merkmal „Stülpzitzen“ und den Fruchtbarkeitsmerkmalen Zuchtwerte von 15 Merkmalen zur Verfügung. Eine Zuchtwertsicherheit $\geq 50\%$ war bei 108.168 Tieren gegeben. Eine Zusammenfassung der 15 Merkmale ist in Anhang 4 zu finden.

Nach Imputation und Qualitätskontrolle wurden GWAS mit 1.754 DL-Schweinen (527 Eber und 1.227 Sauen) und 16.510.704 Varianten für die Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale, sowie den Stülpzitzen durchgeführt. Für die Fruchtbarkeitsmerkmale konnten für die Analyse 3.697 Schweine (532 Eber und 3.165 Sauen) mit 16.498.116 Varianten verwendet werden.

Die Identifikation der QTL erfolgte für jedes Merkmal anhand der Manhattanplots (für nicht in den Ergebnissen dargestellte Manhattanplots siehe Anhang 5, 6 und 7). Insgesamt konnten 14 QTL ($P < 3,03 \times 10^{-9}$, Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau) identifiziert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: QTL der Deutschen Landrasse für Fleisch-, Schlachtkörper- und Fruchtbarkeitsmerkmale

Lead-SNP (Chr_Pos)	Merkmal (Top-SNP)	AF	Beta	P-Wert	Gen
2_1253937	FFV (2_1253937)	0,47	0,025	$9,88 \times 10^{-22}$	<i>TNNI2</i>
	FLAN (2_1253937)	0,47	0,671	$2,81 \times 10^{-20}$	<i>TNNI2</i>
	BAFL (2_1253937)	0,47	0,651	$9,01 \times 10^{-20}$	<i>TNNI2</i>
	IMF (2_1480969)	0,53	-0,061	$2,44 \times 10^{-15}$	
	FVW (2_1655019)	0,45	0,033	$6,83 \times 10^{-14}$	<i>TRPM5</i>
	RMFL (2_1692499)	0,43	0,749	$2,36 \times 10^{-10}$	<i>KCNQ1</i>
	TZ (2_1302783)	0,48	12,243	$2,39 \times 10^{-09}$	<i>TNNT3</i>
3_12551512	STZ (3_12551512)	0,51	0,752	$2,12 \times 10^{-09}$	<i>LOC102157493</i>
3_95748786	STZ (3_95748786)	0,04	-1,979	$8,96 \times 10^{-10}$	<i>CAMKMT</i>
6_12869238	STZ (6_12869238)	0,04	-1,973	$1,27 \times 10^{-09}$	<i>FA2H</i>
7_97297122	SKL (7_97297122)	0,77	0,399	$8,98 \times 10^{-10}$	<i>ENTPD5</i>
10_1316786	STZ (10_1316786)	0,96	2,021	$1,38 \times 10^{-10}$	<i>LOC102166310</i>
10_25181328	BAFL (10_25181328)	0,20	0,648	$4,03 \times 10^{-12}$	
	FLAN (10_25181328)	0,20	0,642	$1,41 \times 10^{-11}$	
	FFV (10_25181328)	0,20	0,022	$2,53 \times 10^{-10}$	
11_76110023	STZ (11_76110023)	0,08	-1,386	$4,06 \times 10^{-10}$	<i>MYO16</i>
12_40636103	FVW (12_40636103)	0,18	-0,039	$8,26 \times 10^{-10}$	
17_15691030	SKL (17_15691030)	0,04	-0,909	$1,12 \times 10^{-10}$	
19_49752471	VR (19_49752471)	0,07	0,890	$5,58 \times 10^{-11}$	
19_90993443	IMF (19_90993443)	0,35	-0,048	$2,92 \times 10^{-10}$	
19_104639808	FLAN (19_104639808)	0,13	-0,624	$6,10 \times 10^{-10}$	
19_109040194	IMF (19_109040194)	0,08	-0,082	$2,09 \times 10^{-09}$	<i>HS6ST2</i>

Lead-SNP: Variante innerhalb 1 Mb mit dem niedrigsten P-Wert; Chr_Pos: Chromosom und Position der Variante; Top-SNP: Variante mit dem niedrigsten P-Wert für das jeweilige Merkmal; AF: Allelfrequenz des alternativen Allels; Gen: Gen, in dem der jeweilige Top-SNP liegt; BAFL: Bauchfleischanteil; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FLAN: Fleischanteil; FVW: Futtermittelverwertung; IMF: intramuskulärer Fettgehalt; RMFL: Rückenmuskelfläche; SKL: Schlachtkörperlänge; STZ: Stülpzitzen; TZ: tägliche Zunahmen; VR: Verbleiberate;

Zwei der 14 QTL-Regionen zeigen signifikante Signale für mehrere Merkmale. In der durch den Lead-SNP 2_1253937 charakterisierten Region finden sich signifikante Signale für sieben

Merkmale, wobei vor allem Fleischmerkmale (FFV, FLAN, BAFL, IMF, RMFL), FVW und TZ beeinflusst werden. Das Merkmal mit dem niedrigsten P-Wert auf Chromosom 2 ist FFV. Die Merkmale FLAN, BAFL, RMFL und FVW sind stark ($> 0,65$) mit FFV korreliert, wohingegen die Korrelation mit TZ mäßig positiv und mit IMF mäßig negativ ist ($> 0,15$) (siehe Anhang 8). Die Allelfrequenzen der Top-SNPs (alternatives Allel) liegen zwischen 0,43 und 0,53 und haben auf alle Merkmale einen positiven Effekt, IMF ausgenommen (Tabelle 4).

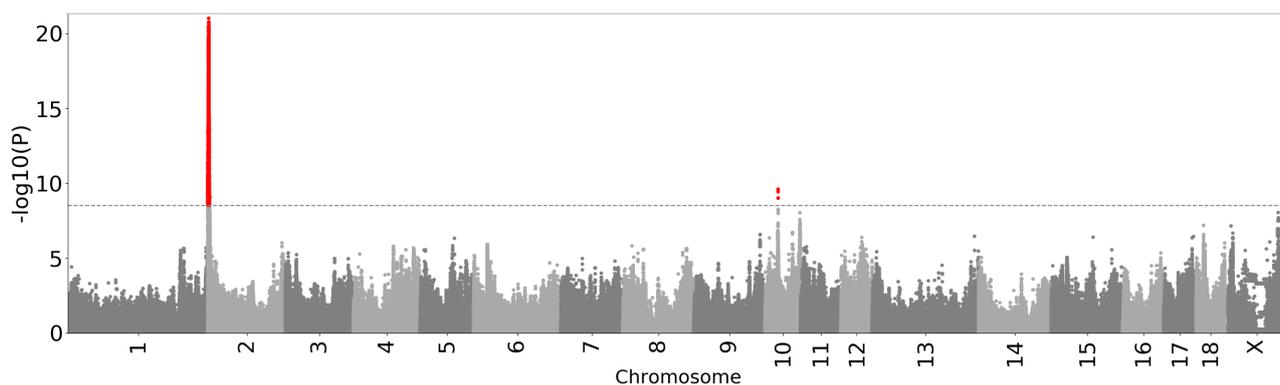


Abbildung 6: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Fleisch:Fett-Verhältnis in der Deutschen Landrasse

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

Die Top-SNPs des QTL auf Chromosom 2 liegen in vier verschiedenen Genen (siehe Tabelle 4). Der Lead-SNP (2_1253937) und zugleich Top-SNP der Merkmale FFV, FLAN und BAFL liegt im Troponin I2 Gen (*TNNI2*). Der Top-SNP des Merkmals tägliche Zunahmen (2_1302783) liegt ebenfalls in einem Gen des Troponinkomplexes, im *TNNT3* Gen (Troponin T3, fast skeletal). In den beiden Genen *TRPM5* (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 5) und *KCNQ1* (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1) liegen die Top-SNPs der Merkmale FVW (2_1655019) und RMFL (2_1692499). Die kausale Variante des bekannten QTL für höheren Magerfleischanteil und geringere Rückenspeckdicke auf SSC2 im *IGF2* Gen (*IGF2* intron3-g.3072G>A; SSC2:1483817, Sscrofa11.1) (Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999; Van Laere et al., 2003) ist mit vier Merkmalen (FFV, FLAN, BAFL und IMF) signifikant assoziiert, wengleich die P-Werte höher sind als die der jeweiligen Top-SNPs (Anhang 9).

Der QTL auf Chromosom 10 (10_25181328) wirkt sich ebenfalls auf Fleischmerkmale (BAFL, FLAN und FFV) aus, wobei der Top-SNP beim Merkmal Bauchfleischanteil den niedrigsten P-Wert

aufweist (Abbildung 7 und Tabelle 4). Der Top-SNP des QTL auf Chromosom 10 befindet sich nicht direkt in einem Gen. Die nächstgelegenen Gene sind zwei Pseudogene (LOCs), eine nichtcodierende RNA LOC100525248 (ncRNA) und CTSV (Cathepsin V).

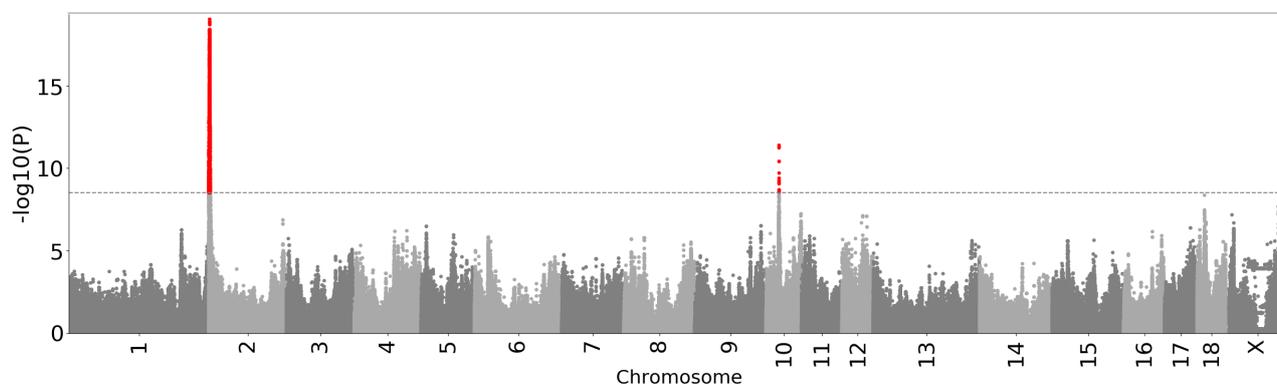


Abbildung 7: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Bauchfleischanteil in der Deutschen Landrasse

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

Für das Merkmal Schlachtkörperlänge konnten zwei QTL auf den Chromosomen 7 und 17 identifiziert werden (Abbildung 8). Der Top-SNP des QTL auf SSC7 (7_97297122) liegt im Gen *ENTPD5* (Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 5) und ist etwa 318 kb von den beiden bekannten Kandidatenmutationen (g.19034A>C und g.20311_20312ins291 (Fan et al., 2013)) im *VRTN* Gen (Vertnin) entfernt. Mit einem P-Wert von $1,07 \times 10^{-8}$ haben insgesamt 12 Varianten im *LTBP2* Gen (Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2) den zweitgrößten Effekt auf die Schlachtkörperlänge, gefolgt von weiteren SNPs im *LTBP2* Gen. Die g.19034A>C Mutation war eine der rund 16 Millionen Varianten der GWAS und war mit einem P-Wert von 0,06 (Allelfrequenz des C-Allels: 0,94) nicht signifikant mit der Schlachtkörperlänge assoziiert. Die Insertion wurde in der GWAS nicht berücksichtigt, da diese mit 291 bp zu groß ist, um mit der Next Generation Sequenzierung erfasst werden zu können und somit nicht imputiert werden konnte. Das nächstgelegene Gen zum QTL auf SSC17 ist das *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein 2), welches ca. 59 kb vom Top-SNP entfernt liegt. Das alternative Allel hat einen negativen Effekt ($\beta = -0,91$) auf die SKL, kommt jedoch mit einer Allelfrequenz von 0,04 sehr selten in der Deutschen Landrasse vor.

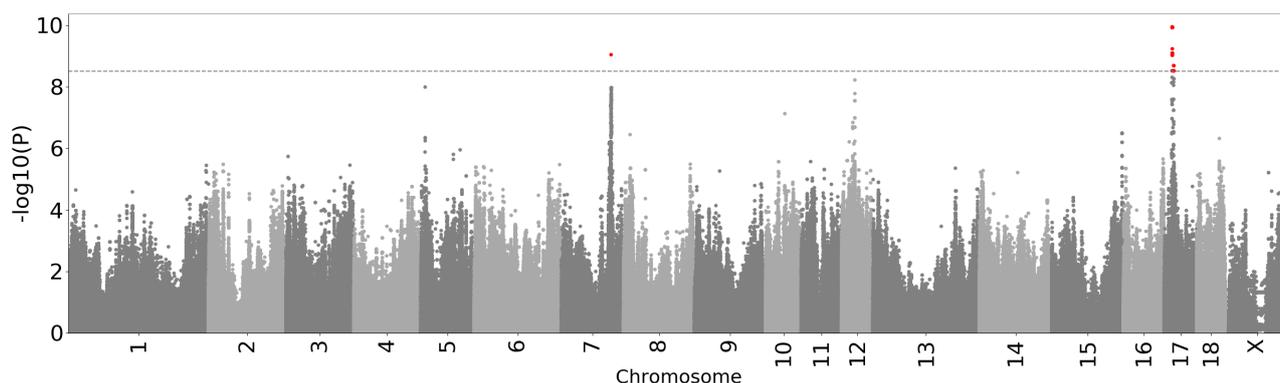


Abbildung 8: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Deutschen Landrasse

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

4.3.2 Piétrain

Für die Rasse Piétrain standen Zuchtwerte für 10 Merkmale bei 28.949 Tieren mit einer Sicherheit $\geq 50\%$ zur Verfügung. Eine Zusammenfassung der 10 Merkmale befindet sich in Anhang 10.

Imputierte Genotypen für die GWAS waren von 3.091 Piétrains (2.913 Eber und 178 Sauen) und 16.459.378 Varianten vorhanden. Insgesamt konnten auf acht Chromosomen 21 QTL ($P < 3,04 \times 10^{-9}$, Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau) identifiziert werden (Tabelle 5). (Für nicht im Ergebnisteil gezeigte Manhattanplots siehe Anhang 11 und 12.)

Tabelle 5: QTL der Rasse Piétrain für Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale

Lead-SNP (Chr_Pos)	Merkmal (Top-SNP)	AF	Beta	P-Wert	Gen
2_6586058	RMFL (2_6586058)	0,79	0,749	$2,93 \times 10^{-10}$	
2_14287644	IMF (2_14287644)	0,44	-0,022	$9,13 \times 10^{-13}$	LOC110259269
5_66129589	FVW (5_66129589)	0,48	0,014	$4,93 \times 10^{-11}$	LOC106507534
6_47663320	pH1 (6_47663320)	0,72	0,079	$9,94 \times 10^{-87}$	
	TSV (6_47663320)	0,72	0,130	$1,24 \times 10^{-77}$	
	FLAN (6_47663320)	0,72	-0,339	$1,61 \times 10^{-16}$	
	BAFL (6_47663320)	0,72	-0,359	$1,75 \times 10^{-15}$	
	FFV (6_47663320)	0,72	-0,007	$5,18 \times 10^{-15}$	
	RMFL (6_47663320)	0,72	-0,766	$4,72 \times 10^{-13}$	

4 Ergebnisse

7_97574641	SKL (7_97574641)	0,61	0,529	$1,73 \times 10^{-34}$	ABCD4
	RMFL (7_97890142)	0,15	0,879	$1,64 \times 10^{-10}$	AREL1
7_120413590	TZ (7_120413590)	0,42	9,344	$1,08 \times 10^{-09}$	SETD3
14_5938246	FLAN (14_5938246)	0,11	0,631	$3,05 \times 10^{-23}$	
	BAFL (14_5938246)	0,11	0,636	$5,70 \times 10^{-20}$	
	FFV (14_5938246)	0,11	0,012	$1,84 \times 10^{-18}$	
	RMFL (14_5805444)	0,84	-1,141	$1,54 \times 10^{-17}$	GFRA2
15_135892205	IMF (15_135892205)	0,02	-0,064	$1,30 \times 10^{-09}$	AGAP1
17_15299488	SKL (17_15299488)	0,19	0,489	$2,12 \times 10^{-19}$	
19_10356374	IMF (19_10356374)	0,03	0,046	$3,48 \times 10^{-13}$	TRAPPC2B
19_39933281	IMF (19_39933281)	0,21	0,017	$7,85 \times 10^{-11}$	
19_45182208	SKL (19_45182208)	0,26	0,221	$7,98 \times 10^{-11}$	
19_83352863	FVW (19_83352863)	0,18	-0,014	$6,05 \times 10^{-12}$	
	SKL (19_83470006)	0,18	0,248	$1,54 \times 10^{-10}$	ZMAT1
19_90717683	TZ (19_90717683)	0,51	7,008	$1,56 \times 10^{-10}$	CHRD1
19_92087433	TSV (19_92087433)	0,39	-0,029	$3,16 \times 10^{-10}$	RTL4
19_99632624	TSV (19_99632624)	0,06	-0,056	$6,91 \times 10^{-10}$	
19_101092749	FLAN (19_101092749)	0,43	-0,192	$1,06 \times 10^{-12}$	GRIA3
19_102402929	BAFL (19_102402929)	0,33	0,226	$4,04 \times 10^{-13}$	TENM1
	RMFL (19_103209091)	0,37	-0,513	$6,46 \times 10^{-13}$	
19_109535138	IMF (19_109535138)	0,05	0,043	$9,03 \times 10^{-19}$	GPC3
	FFV (19_109165922)	0,05	0,313	$1,23 \times 10^{-13}$	
19_113869771	FVW (19_113869771)	0,36	-0,012	$4,23 \times 10^{-14}$	FGF13
19_124576927	TSV (19_124576927)	0,22	0,034	$4,44 \times 10^{-10}$	

Lead-SNP: Variante innerhalb 1 Mb mit dem niedrigsten P-Wert; Chr_Pos: Chromosom und Position der Variante; Top-SNP: Variante mit dem niedrigsten P-Wert für das jeweilige Merkmal; AF: Allelfrequenz; Gen: Gen, in dem der jeweilige Top-SNP liegt; BAFL: Bauchfleischanteil; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FLAN: Fleischanteil; FVW: Futtermittelverwertung; IMF: Intramuskulärer Fettgehalt; pH1: pH-Wert des Fleisches nach 1 Stunde; RMFL: Rückenmuskelfläche; SKL: Schlachtkörperlänge; TSV: Tropfsaftverlust; TZ: tägliche Zunahmen;

Der QTL, der die meisten Merkmale beeinflusst, befindet sich auf Chromosom 6 und liegt in der Nähe des bekannten MHS Locus bzw. des *RYR1* Gens. Er hat signifikante Effekte auf die Fleischqualität (pH1-Wert und TSV) und Fleischquantität (FLAN, BAFL, FFV und RMFL). Der

Top-SNP (6_47663320) mit einer Allelfrequenz von 0,72 hat einen positiven Effekt auf die Qualität des Fleisches (TSV und pH1-Wert) und beeinflusst die Fleischquantität negativ (Tabelle 5). Die bekannte kausale Mutation des MHS Locus rs3443554 (Fujii et al., 1991) liegt 305 kb vom Top-SNP entfernt und ist ebenfalls mit den sechs oben genannten Merkmalen assoziiert, jedoch mit höheren P-Werten (P-Wert TSV: $1,83 \times 10^{-45}$; P-Wert pH1: $8,37 \times 10^{-42}$). Ein weiterer QTL, der sich auf die Fleischquantität (FLAN, BAFL, FFV und RMFL) auswirkt liegt auf Chromosom 14 (Abbildung 9). Das sich positiv auf die Fleischquantität auswirkende Allel kommt mit einer Allelfrequenz von 0,11 relativ selten in der Piétrainpopulation vor.

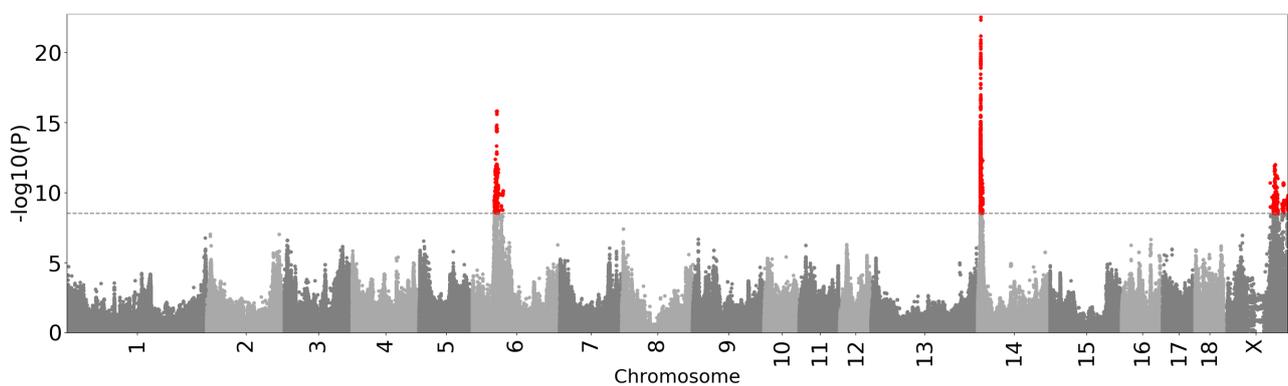


Abbildung 9: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Fleischanteil in der Rasse Piétrain

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

Der Lead-SNP (14_5938246), zugleich der Top-SNP der Merkmale FLAN, BAFL und FFV (welche stark miteinander korrelieren: Anhang 13), liegt im intergenischen Bereich. Der Top-SNP des Merkmals Rückenmuskelfläche (14_5805444) liegt nur 132,8 kb entfernt und befindet sich in einem Intron des *GFRA2* Gens (GDNF Family Receptor Alpha 2).

Ein QTL für FVW liegt auf Chromosom 5. Der Top-SNP (5_66129589) liegt in einer nicht kodierenden RNA und das nächstgelegene proteinkodierende Gen ist das Cyclin D2 (*CCND2*).

Für das Merkmal Schlachtkörperlänge wurden, wie bei DL, zwei QTL auf Chromosom 7 und 17 identifiziert (Abbildung 10). Das bekannte Kandidatengen *VRTN* für Anzahl Wirbel liegt zwischen den beiden Top-SNPs für die Schlachtkörperlänge und Rückenmuskelfläche auf Chromosom 7, wobei der Top-SNP für Schlachtkörperlänge (7_97574641) etwa 40 kb von den beiden Kandidatenmutationen (g.19034A>C und g.20311_20312ins291, (Fujii et al., 1991)) entfernt liegt.

Die g.19034A>C Variante ist ebenfalls signifikant mit der Schlachtkörperlänge assoziiert, aber mit einem wesentlich höheren P-Wert ($P = 1,33 \times 10^{-16}$) als der Top-SNP dieser Studie ($P = 1,73 \times 10^{-34}$). Das nächstgelegene Gen des Top-SNPs auf Chromosom 17 ist das *FERMT1* (Fermentin Family Member 1), das sich etwa 161 kb strangaufwärts befindet. Das bekannte Kandidatengen *BMP2* (Blaj et al., 2018; Falker-Gieske et al., 2019; Fan et al., 2011) befindet sich ca. 451 kb strangabwärts. Auf dem X-Chromosom liegen zwei weitere QTL, die sich auf die Schlachtkörperlänge auswirken, wobei ein QTL im intergenischen Bereich (19_45182208) und der andere im Gen *ZMAT1* (Zinc Finger Martin-Type 1) liegt, dessen Funktion nicht bekannt ist.

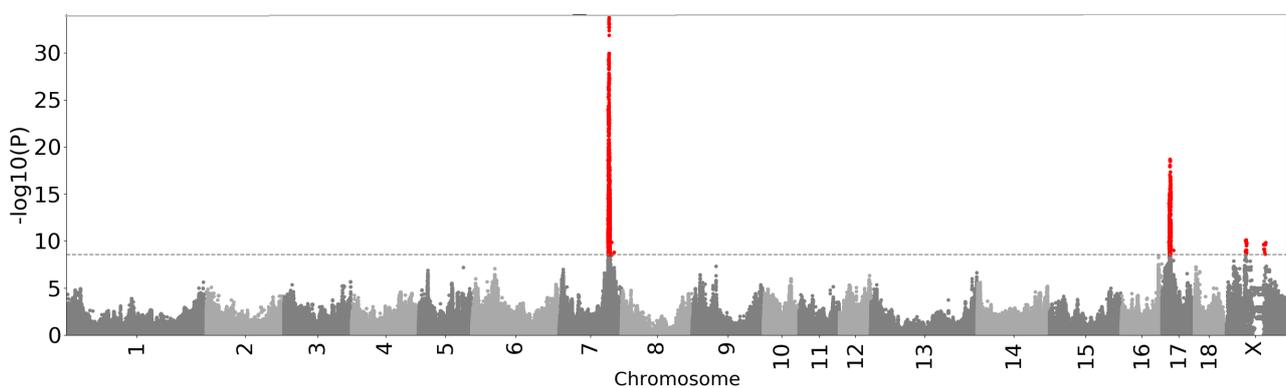


Abbildung 10: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Rasse Piétrain

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

4.3.3 Anomaliendaten

4.3.3.1 GWAS mit Rohdaten

Die Rohdaten enthalten folgende Informationen: Anzahl gemeldeter Würfe, Anzahl geborener bzw. lebend geborener Ferkel und die Anzahl betroffener Ferkel pro Anomalie, jeweils pro Eber. Für die Auswertungen wurden nur Eber mit mindestens fünf gemeldeten Würfen ($N = 1.987$) verwendet. Die Anzahl Würfe pro Eber variierte zwischen 1 und 661 (Anhang 14), wobei im Mittel 76 Würfe pro Eber gemeldet wurden und der Median 48 Würfe pro Eber betrug. Insgesamt wurden für die 1.987 Eber 161.683 Würfe mit 2.123.542 geborenen Ferkeln gemeldet, wovon 1.999.231 lebten. Bei 2% der lebend geborenen Ferkel (39.973 Ferkel) wurde eine Anomalie beobachtet. Am häufigsten traten Hodenbrüche (35,8%) auf, gefolgt von Kryptorchismus (28,4%) und Grätschern

(25,5%). Am seltensten wurden Zwitter (1,2%), Afterlosigkeit (0,9%) und Nabelbrüche (0,7%) gemeldet (Abbildung 11).

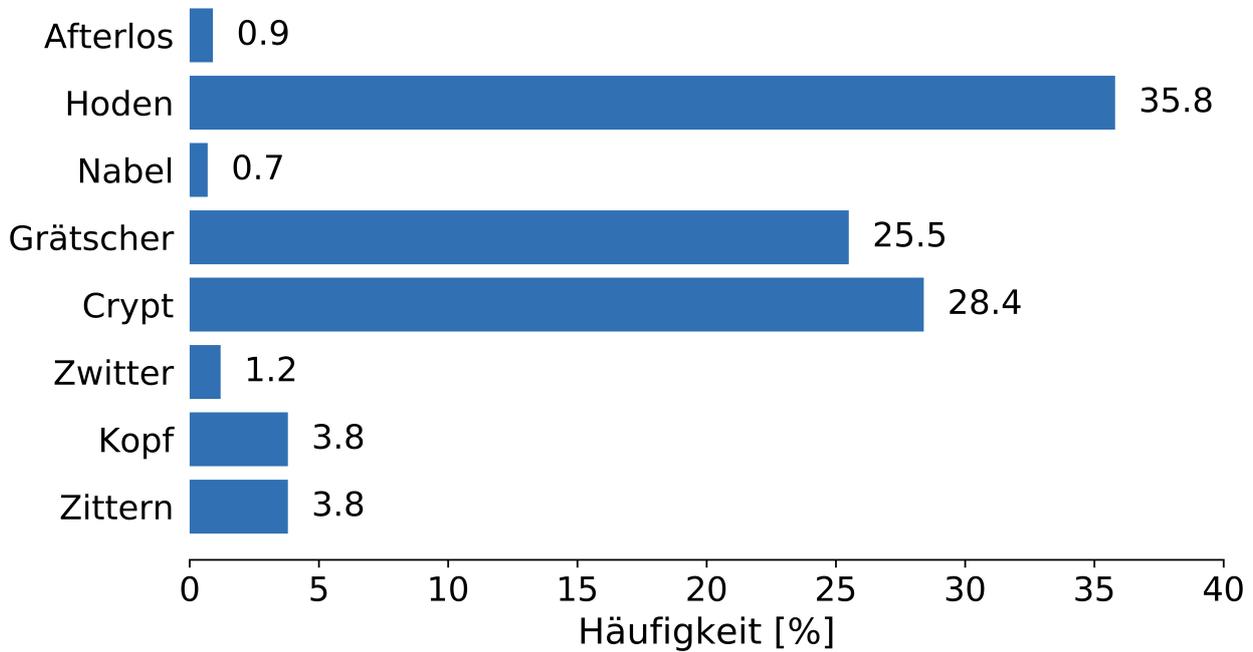


Abbildung 11: Verteilung der Anomalien betroffener Ferkel

Kopf: Kopfmissbildung; Crypt: Kryptorchismus; Nabel: Nabelbruch; Hoden: Hodenbruch;

Für die GWAS mit den Rohdaten wurden pro Eber und Anomalie die relativen Häufigkeiten von Nachkommen mit Anomalien als Phänotypen verwendet. Die Frequenzverteilung pro Anomalie ist in Abbildung 12 zu sehen. Bei den Anomalien, die am seltensten vorkamen (Zwitter, Afterlosigkeit und Nabelbruch), ist auch die geringste Varianz in den Frequenzen zu beobachten (siehe Abbildung 12).

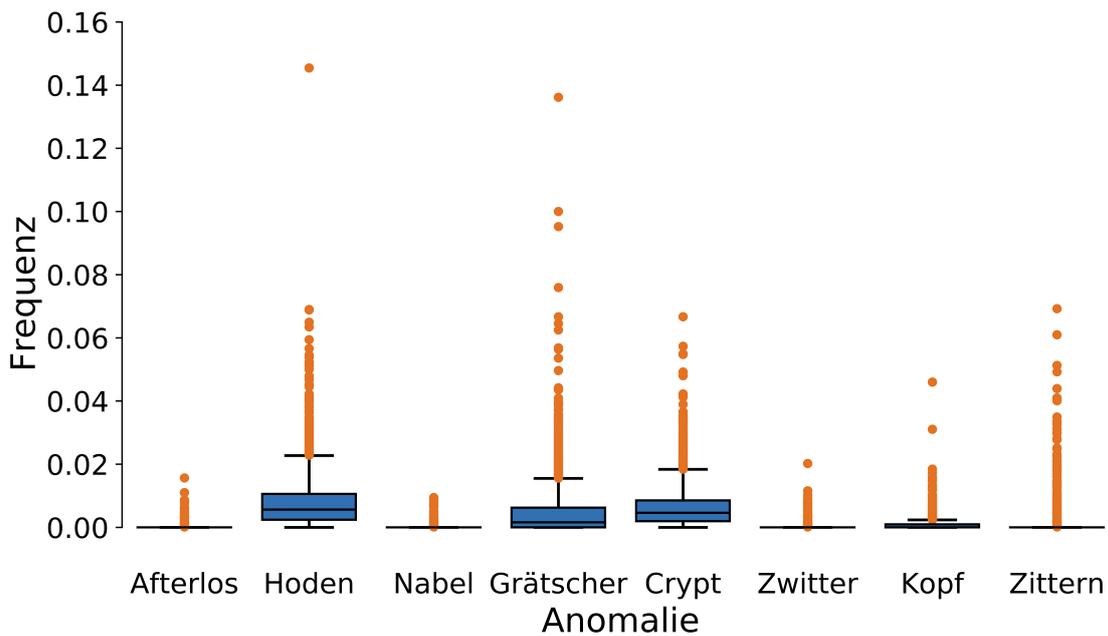


Abbildung 12: Anteil betroffener Ferkel pro Eber und Anomalie

Hoden: Hodenbruch; Nabel: Nabelbruch; Crypt: Kryptorchismus; Kopf: Kopfmisbildung;

Von den 1.987 Ebern mit mindestens fünf Würfen standen von 1.675 Ebern Genotypen für 16.224.549 SNPs zur Durchführung der GWAS zur Verfügung. Die Varianzen der Merkmale Kopfmisbildung, Zwitter, Nabelbruch und Afterlosigkeit waren zu gering, um eine GWAS durchführen zu können.

Für die Merkmale Kryptorchismus, Hodenbruch, Grätscher und Zittern konnten GWAS durchgeführt werden. Insgesamt wurden vier QTL identifiziert ($P\text{-Wert} < 3,08 \times 10^{-9}$, Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau). Für das Merkmal Zittern drei und für Kryptorchismus ein QTL (Tabelle 6). Die nicht in den Ergebnissen gezeigten Manhattanplots finden sich in Anhang 16.

Tabelle 6: QTL der Rasse Piétrain für Rohdaten der Anomalien

Lead-SNP (Chr_Pos)	Merkmal (Top-SNP)	AF	Beta	P-Wert	Gen
4_2206929	ZIT (4_2206929)	0,05	0,002	$2,72 \times 10^{-09}$	
4_103481426	ZIT (4_103481426)	0,03	0,003	$2,06 \times 10^{-13}$	VTCN1
11_70069217	KRYP (11_70069217)	0,09	0,003	$1,22 \times 10^{-10}$	ITGBL1
13_6344399	ZIT (13_6344399)	0,02	0,003	$4,00 \times 10^{-10}$	KCNH8

Lead-SNP: Variante innerhalb 1 Mb mit dem niedrigsten P-Wert; Chr_Pos: Chromosom und Position der Variante; Top-SNP: Variante mit dem niedrigsten P-Wert für das jeweilige Merkmal; AF: Allelfrequenz; Gen: Gen, in dem der jeweilige Top-SNP liegt; ZIT: Zittern; KRYP: Kryptorchismus;

Für das Merkmal Zittern wurden zwei QTL auf Chromosom 4 und ein QTL auf Chromosom 13 identifiziert (Abbildung 13).

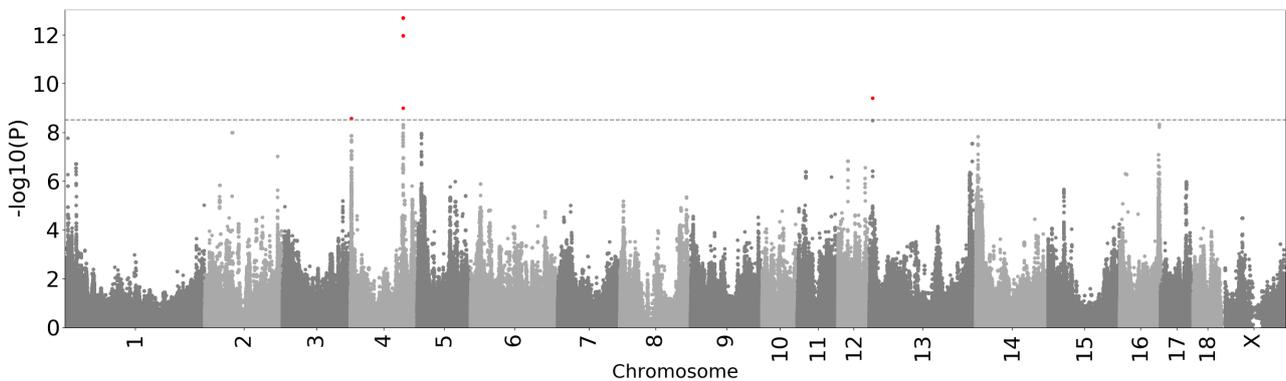


Abbildung 13: Genomweite Assoziationsstudie mit den Rohdaten des Merkmals Zittern in der Rasse Piértrain

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

Für den QTL auf SSC4 mit dem Top-SNP auf Position 2.206.929 bp ist nur ein SNP signifikant assoziiert. Der SNP liegt in keinem annotierten Gen und ist nicht in der SNP Datenbank von Ensembl (Ensembl Variation database, Hunt et al. (2018) vermerkt. Die am nächsten liegenden proteinkodierenden Gene sind *MROH5* (maestro heat like repeat family member 5), *PTP4A3* (protein tyrosine phosphatase 4A3) und *GPR20* (G protein-coupled receptor 20) (NCBI: Sscrofa11.1, Annotation release 106; Ensembl: Sscrofa11.1, Ensembl release: 101). Der zweite QTL auf SSC4 für das Merkmal Zittern mit dem Top-SNP auf Position 103.481.426 bp enthält insgesamt sechs Varianten mit einem P-Wert $< 3,08 \times 10^{-9}$. Die Mutationen liegen im Bereich von 103.439.447 bis 103.488.720 bp und sind Intron Varianten des *VTCNI* Gens (V-set domain containing T cell activation inhibitor 1). Auf SSC13 liegt der dritte QTL, der für das Merkmal Zittern identifiziert worden ist. Der Top-SNP befindet sich auf Position 6.344.399 bp und ist die einzige Variante des QTL, die signifikant mit dem Merkmal assoziiert ist. Der Top-SNP liegt in einem Intron des *KCNH8* Gens (potassium voltage-gated channel subfamily H member 8). In den Sequenzdaten befinden sich drei nicht imputierte Missense-Mutationen (13_6491317: rs338117404, 13_6531431: rs326961983, 13_653157: rs329613397), wobei sich die letzten beiden im vollständigen Kopplungsungleichgewicht befinden.

Der QTL für Kryptorchismus auf SSC11 umfasst insgesamt 32 signifikant assoziierte Varianten im Bereich von 70.032.146 und 70.929.215 bp (Abbildung 14).

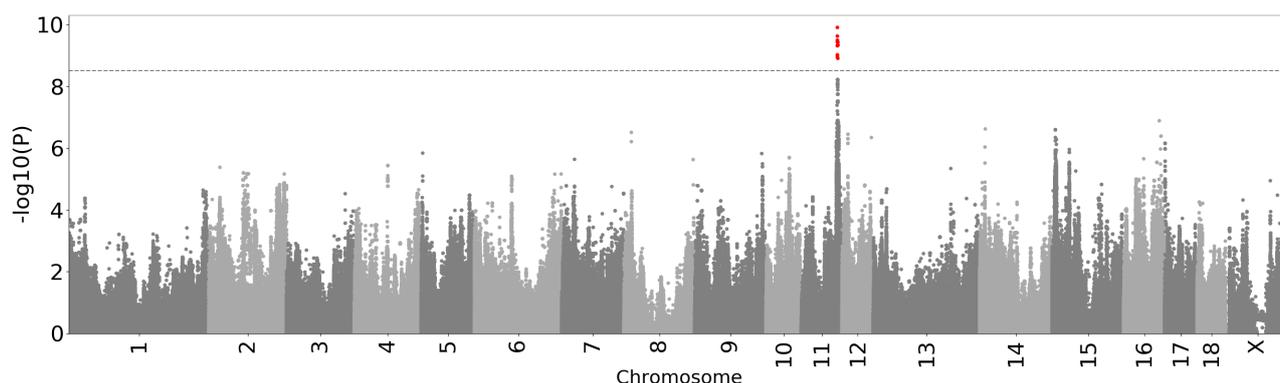


Abbildung 14: Genomweite Assoziationsstudie mit den Rohdaten des Merkmals Kryptorchismus in der Rasse Piétrain

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

Der Großteil der Varianten liegt in Introns (18 Intron Varianten: 9 im *ITGBL1* und 9 im *FGF14* Gen), sechs Mutationen befinden sich im 5'-UTR des *FGF14* Gens, sechs Mutationen liegen in keinem annotierten Gen und haben keinen Eintrag in der dbSNP-Datenbank und zwei Mutationen liegen in nicht kodierenden Bereichen von LOC-Genen. In den Sequenzdaten befinden sich zwei nicht imputierte Missense-Mutationen, wobei eine der beiden durch SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, Vaser et al. (2016)) als „deleterious“ eingestuft wurde und weiter untersucht werden sollte.

4.3.3.2 GWAS mit Anomalienzuchtwerten

Es standen insgesamt von 2.835 Eber Zuchtwerte für acht erfasste Anomalien zur Verfügung. In die Studie flossen nur Eber mit ein, die eine Zuchtwertsicherheit von mindestens 50% hatten ($n = 1.590$). Abbildung 15 zeigt die Verteilung der Sicherheiten, wobei eine große Anzahl Eber eine Sicherheit $\leq 5\%$ besitzt. Eine Zusammenfassung der Anomalienzuchtwerte finden sich in Anhang 17.

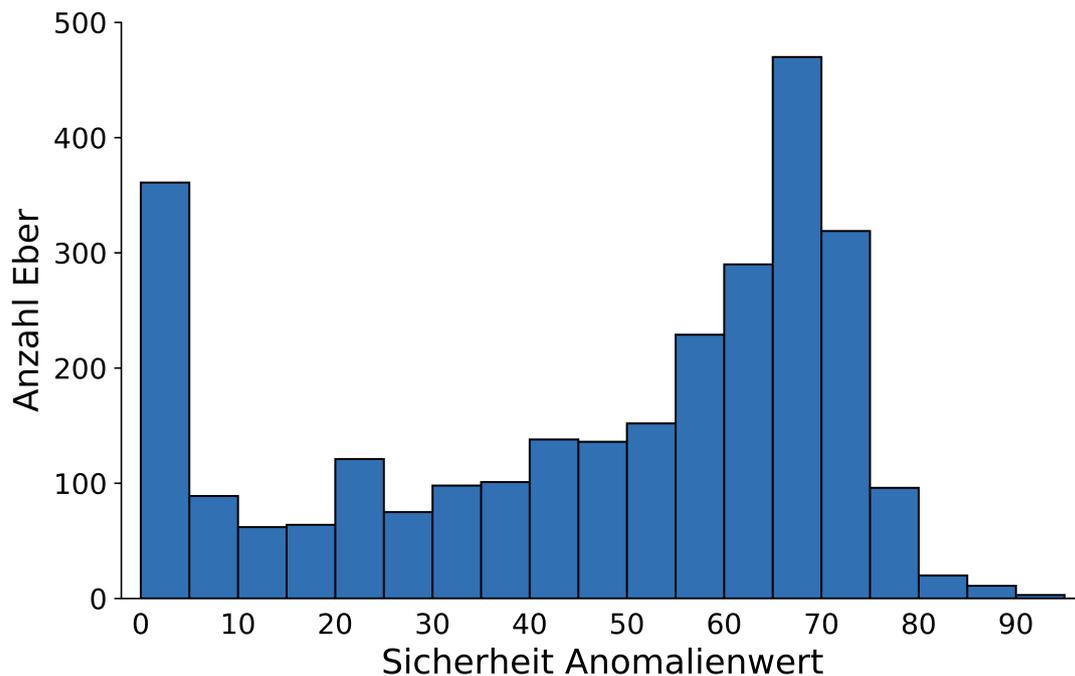


Abbildung 15: Verteilung der Sicherheit des Anomalienzuchtwertes

Die GWAS wurden mit 1.455 Eber und 16.161.372 (P-Wert $< 3,09 \times 10^{-9}$, Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau) durchgeführt. Insgesamt konnten drei QTL für die Merkmale Grätscher, Zwitter und Kopfmissbildung identifiziert werden (Tabelle 7). Die nicht in den Ergebnissen gezeigten Manhattanplots sind in Anhang 18 und 19.

Tabelle 7: QTL der Rasse Piétrain für Anomalienzuchtwerte

Lead-SNP (Chr_Pos)	Merkmal (Top-SNP)	AF	Beta	P-Wert	Gen
1_267003877	GRA (1_267003877)	0,06	-0,030	$4,13 \times 10^{-10}$	MVB12B
10_260637	ZWIT (10_260637)	0,05	-0,022	$1,20 \times 10^{-09}$	
19_106559176	KOPF (19_106559176)	0,09	-0,011	$2,96 \times 10^{-10}$	BCORL1

Lead-SNP: Variante innerhalb 1 Mb mit dem niedrigsten P-Wert; Chr_Pos: Chromosom und Position der Variante; Top-SNP: Variante mit dem niedrigsten P-Wert für das jeweilige Merkmal; AF: Allelfrequenz; Gen: Gen, in dem der jeweilige Top-SNP liegt; GRA: Grätschen; ZWIT: Zwitter; KOPF: Kopfmissbildung;

Der QTL für das Merkmal Grätschen umfasst fünf signifikant assoziierte SNPs (Abbildung 16). Der Top-SNP liegt in einem Intron des *MVB12B* Gens (Multivesicular Body Subunit 12B), das mit dem Stoffwechselweg der Endozytose in Verbindung steht („<https://www.genecards.org>“, o. J.).

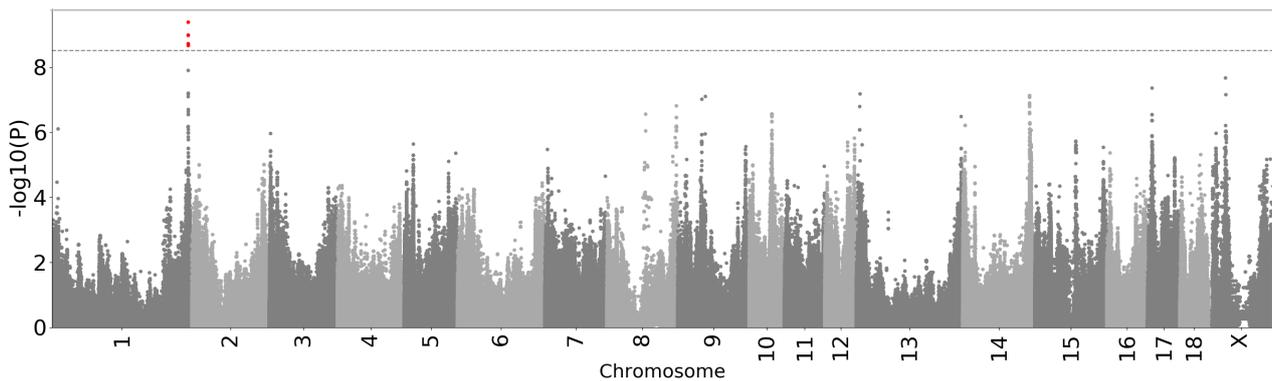


Abbildung 16: Genomweite Assoziationsstudie mit den Zuchtwerten für das Merkmal Grätschen in der Rasse Piétrain

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

Der QTL für Zwitter besteht aus einem einzelnen SNP, der sich unterhalb der Signifikanzgrenze befindet. Der SNP befindet sich in einem intergenischen Bereich auf Chromosom 10. Für die Kopfmissbildung konnte ein 11 SNPs umfassender QTL auf dem X-Chromosom identifiziert werden. Der Top-SNP liegt in einem Intron des *BCORL1* Gens (BCL6 Corepressor Like 1). Das Protein BCORL1 kann mit verschiedenen Histon-Deacetylasen der Klasse 2 interagieren, um Transkription zu unterdrücken.

4.3.4 Pleiotrope QTL-Effekte

Pleiotropie bezeichnet das Phänomen, dass ein Locus auf verschiedene unabhängige Merkmale einen Effekt ausübt. Um für alle QTL die pleiotropen Effekte zu untersuchen, wurden für alle Lead-SNPs die Effekte auf die Merkmale geschätzt, mit denen sie signifikant assoziiert waren. Dabei wurde berechnet, wie viel von der gesamten Varianz des Merkmals von dem jeweiligen Lead-SNP erklärt wird. Die Effekte der Autosomen für die Deutsche Landrasse sind in Abbildung 17 und Anhang 20 (inklusive des X-Chromosoms) dargestellt. Die beiden Lead-SNPs 2_1253937 und 10_25181328 haben positive Effekte auf mehrere Merkmale. Die restlichen Lead-SNPs beeinflussen jeweils nur ein Merkmal, was bedeutet, dass keine Pleiotropie vorliegt bzw. nicht nachgewiesen werden kann.

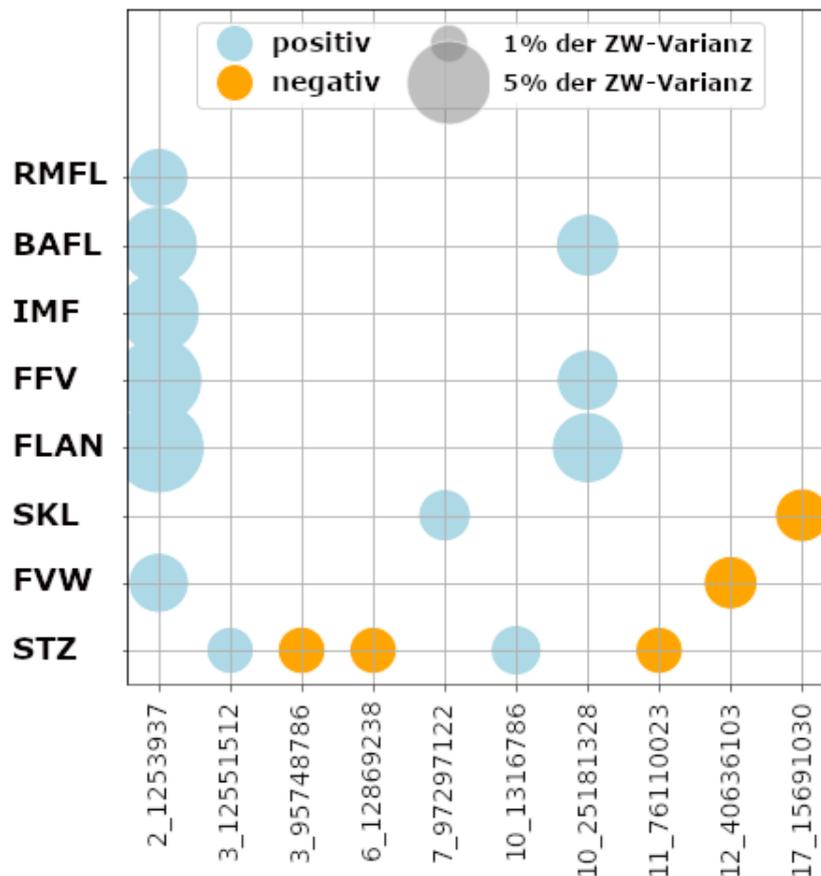


Abbildung 17: Pleiotrope Effekte der Lead-SNPs in der Deutschen Landrasse

ZW: Zuchtwert; RMFL: Rückenmuskelfläche [cm²]; BAFL: Bauchfleischanteil [%]; IMF: intramuskulärer Fettgehalt [%]; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FLAN: Fleischanteil [%]; SKL: Schlachtkörperlänge [cm]; FVW: Futtermittelverwertung [kg Zunahme / kg Futter]; STZ: Stülpzitzen [% betroffene Würfe];

Für Piétrain sind die Effekte der Lead-SNPs in Abbildung 18, Anhang 21 und 22 dargestellt. Es gibt zwei QTL (SSC6 und SSC14), die sich auf Fleischmerkmale (RMFL, BAFL, FFV und FLAN) auswirken. Der QTL auf Chromosom 6 befindet sich in der Nähe des *RYR1* Gens (MHS Locus) und hat einen negativ korrelierten Effekt auf die Fleischqualität (positiver Effekt auf Fleischqualität und negativer Effekt auf Fleischquantität). Der QTL auf Chromosom 14 wirkt sich nur auf die Fleischquantität aus und erklärt tendenziell mehr von deren Varianz als der MHS Locus.

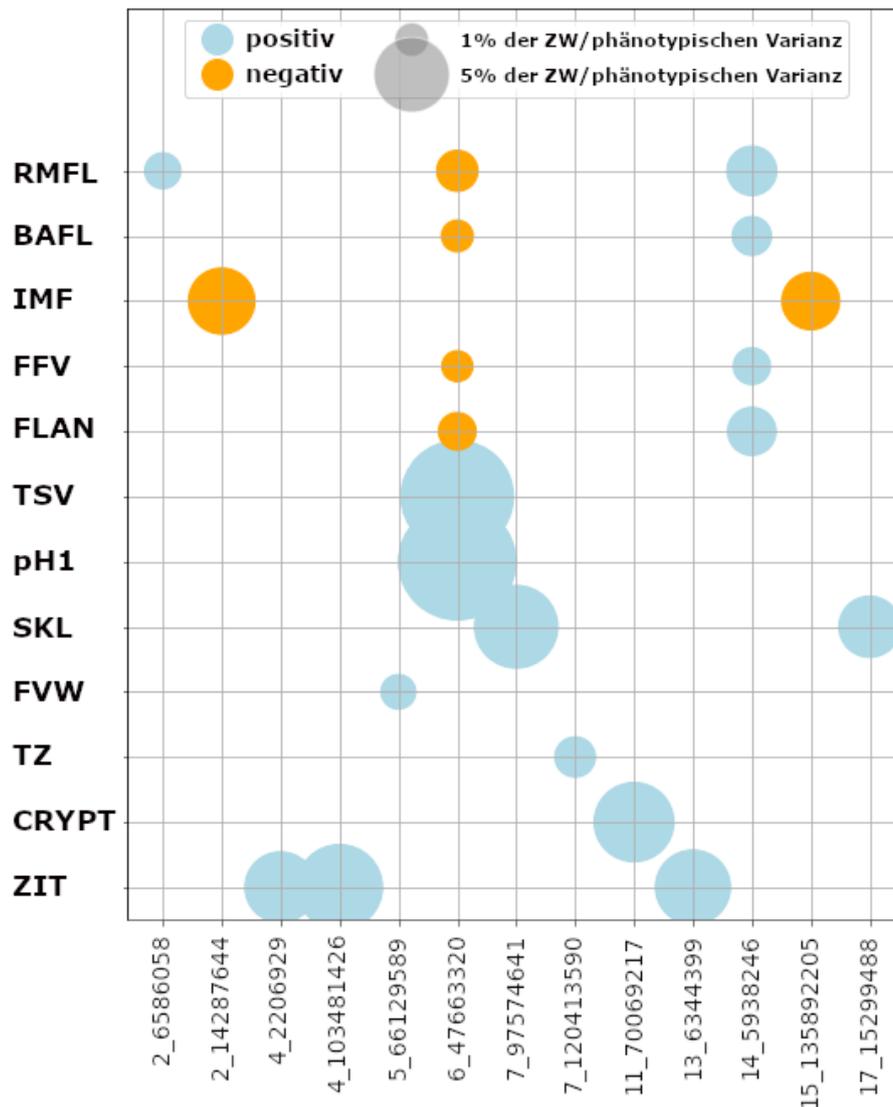


Abbildung 18: Pleiotrope Effekte der Lead-SNPs in der Rasse Piétrain

ZW: Zuchtwert; RMFL: Rückenmuskel­fläche (ZW, [cm²]); BAFL: Bauch­fleischanteil (ZW, [%]); IMF: intramus­kulärer Fett­gehalt (ZW, [%]); FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FLAN: Fleischanteil (ZW, [%]); TSV: Tropfsaftverlust (ZW, [%]); pH1: pH-Wert des Fleisches nach 45 Minuten (ZW); SKL: Schlachtkörperlänge (ZW, [%]); FVW: Fut­ter­verwertung (ZW, [kg Zunahme / kg Fut­ter]); TZ: tägliche Zunahmen (ZW, [g/Tag]); CRYPT: Kryptorchismus (Phänotyp, [% betroffene Ferkel]); ZIT: Zittern (Phänotyp, [% betroffene Ferkel]);

4.3.5 Metaanalysen

Es wurden Metaanalysen mit den zehn Fleisch- und Schlachtkörpermerkmalen, für die sowohl bei DL als auch bei PI Zuchtwerte berechnet wurden, durchgeführt. Als gemeinsame Assoziationssignale wurden SNPs definiert, deren P-Werte in der Metaanalyse kleiner 10^{-14} und mindestens vier Größenordnungen kleiner waren als der kleinste P-Wert innerhalb der Rassen. Ziel

war es nur QTL zu identifizieren, die in beiden Rassen vorkommen. Da die Power von Metaanalysen höher ist als in GWAS innerhalb einer Rasse (Panagiotou et al., 2013) wurde eine niedrigere Signifikanzgrenze gewählt. Diese Bedingungen wurden nur für das Merkmal Schlachtkörperlänge und den beiden Signalen auf SSC7 und SSC17 erfüllt (Tabelle 8 und Abbildung 19).

Tabelle 8: Gemeinsame Assoziationssignale für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Deutschen Landrasse und Piétrain

SNP	Rasse	AF	Beta	P-Wert GWAS	P-Wert Meta	Gen
7_97225468	DL	0,11	-0,50	$4,02 \times 10^{-08}$	$2,11 \times 10^{-35}$	ZNF410
	PI	0,39	-0,50	$3,70 \times 10^{-30}$		
17_15767086	DL	0,97	0,80	$8,00 \times 10^{-10}$	$2,11 \times 10^{-18}$	BMP2
	PI	0,49	0,27	$2,49 \times 10^{-10}$		

DL: Deutsche Landrasse; PI: Piétrain; AF: Allelfrequenz in der jeweiligen Rasse; P-Wert GWAS: P-Wert des SNPs in der GWAS innerhalb der Rasse; P-Wert Meta: P-Wert des SNPs in der Metaanalyse;

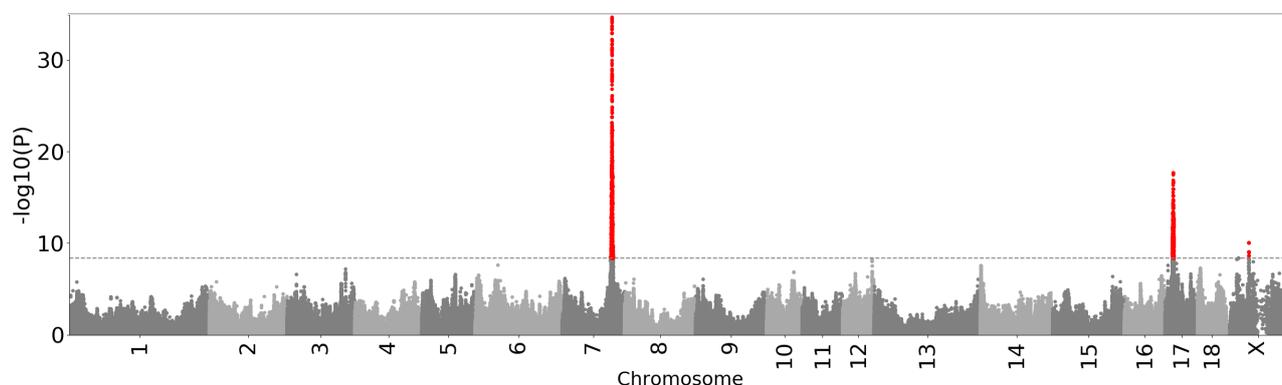


Abbildung 19: Metaanalyse für das Merkmal Schlachtkörperlänge in der Deutschen Landrasse (N = 1.754) und Piétrain (N = 3.091)

Die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei rote Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen;

Die signifikant assoziierte Region ($P\text{-Wert} < 1,0 \times 10^{-14}$) auf Chromosom 7 umfasst etwa 4 Mb (95,7 Mb bis 99,3 Mb) und insgesamt 64 Gene, unter anderem die beiden bekannten Kandidatengene *VRTN* und *LTBP2*. Der Top-SNP liegt in einem Intron des *ZNF410* Gens (Zinc Finger Protein 410) und ist etwa 390 kb von den bereits bekannten Kandidatenmutationen

(g.19034A>C und g.20311_20312ins291, Fan et al. (2013)) im *VRTN* Gen entfernt. Die g.19034A>C Variante ist ebenfalls mit der Schlachtkörperlänge assoziiert, hat jedoch einen höheren P-Wert ($P = 1,08 \times 10^{-14}$) als der Top-SNP. Dieser hat für beide Rassen den gleichen negativen Effekt auf die Schlachtkörperlänge (-0,50), wobei die Variante in der Deutschen Landrasse mit einer Allelfrequenz von 0,11 wesentlich seltener vorkommt als in den Piétrains (AF = 0,39).

Der Top-SNP auf Chromosom 17 ist eine Downstream Variante des *BMP2* Gens. In DL ist die Variante mit einer Frequenz von 0,97 nahezu fixiert und hat einen größeren Effekt auf SKL ($\beta = 0,80$) als in der Rasse Piétrain ($\beta = 0,27$), in der sie nur mit einer Allelfrequenz von 0,49 vorkommt. Der P-Wert des Top-SNPs auf dem X-Chromosom ist mit $9,18 \times 10^{-11}$ größer als 10^{-14} und wurde deshalb nicht näher betrachtet.

4.4 Unfruchtbare Sauen der Deutschen Landrasse

4.4.1 Beschreibung des Phänotyps

Im Rahmen der Anomalienerfassung wurden im Laufe des Jahres 2014 reinrassige Deutsche Landrasse Sauen mit atypisch kleiner Vulva gemeldet. Die meisten der Sauen kamen nicht in die Rausche, und wenn doch Brunstsymptome beobachtet wurden, konnte der Besamungskatheter nicht eingeführt werden und deshalb keine Besamung durchgeführt werden. Insgesamt wurden 43 Fälle aus vier verschiedenen Betrieben gemeldet (Anhang 27). Die Identifikation der Fälle erfolgte über die Größe der Vulva, auch wenn die Phänotypen nicht immer eindeutig unterscheidbar waren. Abbildung 20 zeigt Vulven von vier etwa gleichaltrigen Sauen, wobei zwei Sauen als Falltiere (a und b) und zwei Sauen als Kontrolltiere (c und d) eingestuft wurden. Der Größenunterschied zwischen den Vulven a und b im Vergleich zur Vulva c ist deutlich ersichtlich, während zwischen Vulva a und Vulva d bei Fall- bzw. Kontrolltier kaum ein Unterschied wahrgenommen werden kann.

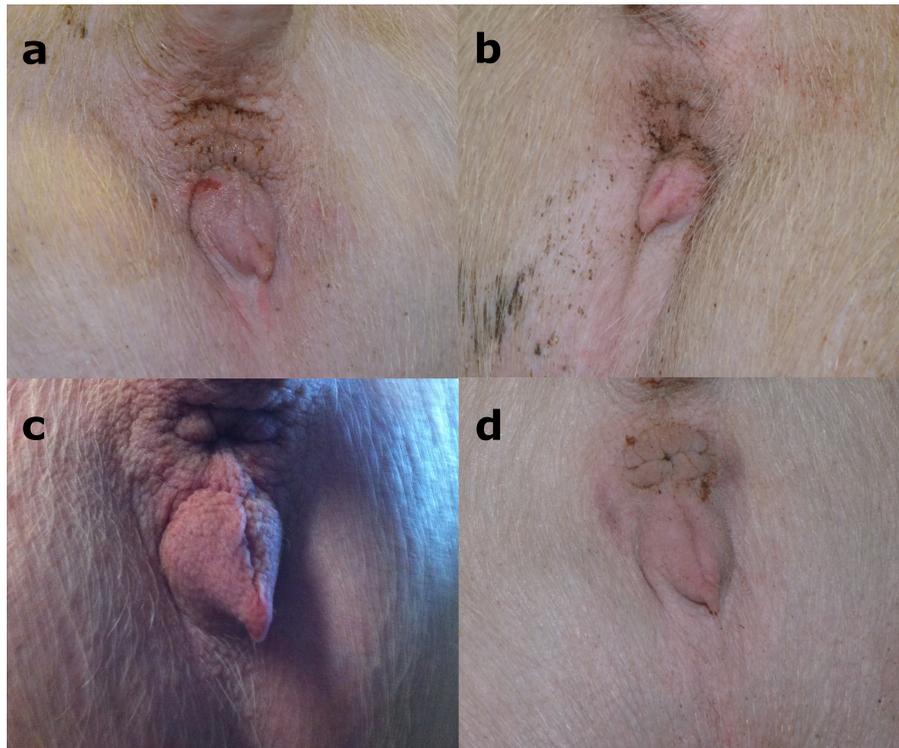


Abbildung 20: Vulven von Fall- und Kontrolltieren

a und b zeigen Vulven von Falltieren, c und d zeigen Vulven gleichaltriger Kontrolltiere

Die Identifikation der Fälle wurde auf den Betrieben von den jeweiligen Landwirten visuell im Vergleich zu den gleichaltrigen Schwestern durchgeführt. Es gab keine Vorgaben, was das Alter der Tiere oder die Zyklusphase betraf und die Größen der Vulven (Messung der Breite und Länge) wurden nicht erfasst.

4.4.2 Genomweite Assoziationsstudie

Um eine genetische Ursache für die atypisch kleinen Vulven nachzuweisen und die ursächliche Region besser eingrenzen zu können, wurde eine GWAS durchgeführt. Als Falltiere wurden zunächst die ersten 17 gemeldeten Sauen mit dem Illumina 60K BeadChip genotypisiert. Die restlichen 26 betroffenen Sauen wurden erst später gemeldet. Als Kontrollen dienten Genotypen von 1.825 bereits genotypisierten fruchtbaren DL-Sauen aus dem FrOGS-Projekt. Nach der Qualitätskontrolle, dem Ausschluss von nicht annotierten und Y-chromosomalen SNPs, standen von 1.835 Sauen (1.818 Kontrollen und 17 Fälle) Informationen zu 50.649 SNPs für die GWAS zur Verfügung. Neben schwächeren Signalen auf drei autosomalen Chromosomen, konnte auf dem X-Chromosom ein hoch-signifikantes Signal ausgemacht werden (Abbildung 21). (vgl. Flossmann et al. (2021))

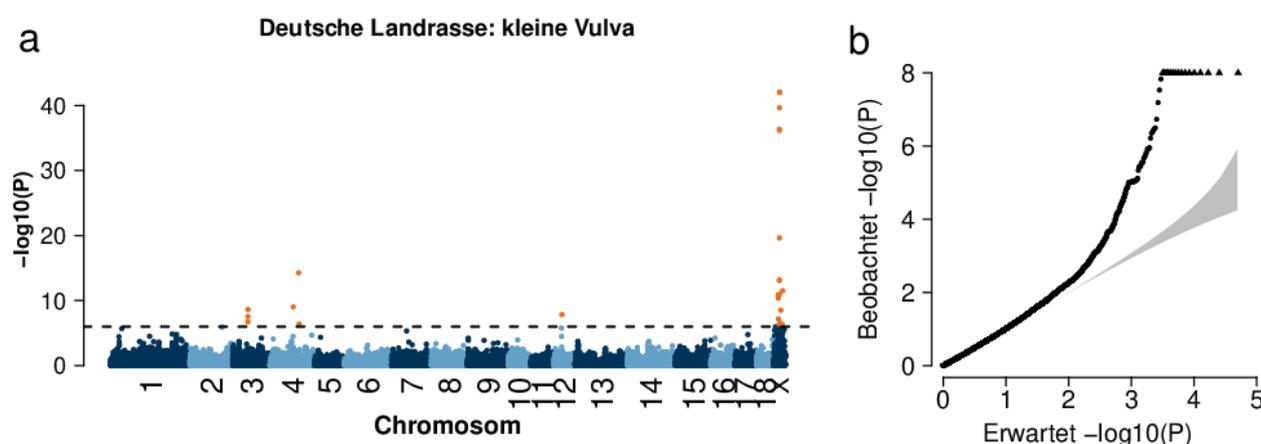


Abbildung 21: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal "atypisch kleine Vulva" in 1.835 Sauen der Deutschen Landrasse

Manhattanplot (a): die X-Achse zeigt die Positionen der Varianten nach dem Sscrofa11.1 Assembly und die Y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte; die gestrichelte Linie entspricht dem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau, wobei orange Punkte signifikant assoziierte Varianten darstellen; Quantile-Quantile-Plot (b): graue Fläche repräsentiert die erwarteten P-Werte unter Annahme der Nullhypothese (keine Assoziation); schwarze Dreiecke stellen die beobachteten P-Werte dar; (vgl. Flossmann et al. (2021))

Der signifikant assoziierte Bereich auf dem X-Chromosom umfasst 70,1 Mb (38,6–108,7 Mb), in dem sich 18 SNPs ($P < 9,87 \times 10^{-7}$) befinden. Der am stärksten assoziierte SNP ($P = 8,81 \times 10^{-43}$) liegt auf Position 88.499.366 bp (rs328794518, Sscrofa11.1 Assembly) des X-Chromosoms. Die signifikant assoziierten SNPs auf den anderen Chromosomen (SSC 3, 4 und 12) wurden aufgrund des relativ hohen Inflationsfaktors ($\lambda = 1,26$) als Artefakte eingestuft. (vgl. Flossmann et al. (2021))

4.4.3 Identifizierung der kausalen Variante

Zur Identifizierung einer möglichen kausalen Variante standen Sequenzdaten des gesamten Genoms von insgesamt 154 Schweinen zur Verfügung. Als möglicher Erbgang wurde ein X-chromosomal rezessiver Erbgang in Betracht gezogen, weshalb auch der Vater der ersten acht eingegangenen Fälle genomweit re-sequenziert wurde. Im signifikant assoziierten Bereich (38,6 – 108,7 Mb) liegen 1.376 Varianten mit einer Auswirkung (VEP Impact LOW, MODERATE oder HIGH) auf das jeweilige Protein (McLaren et al., 2016). Für die Identifikation der kausalen Variante wurden zunächst Stoppmutationen genauer betrachtet, da sie großen Einfluss auf die Funktionalität von Proteinen haben. Insgesamt liegen 15 Stoppmutationen in dieser Region, wobei der Vater der ersten acht Fälle für zwei der Stoppmutationen hemizygot ist (Tabelle 9).

Tabelle 9: Stoppmutationen in der mit dem Merkmal "atypisch kleine Vulva" signifikant assoziierten Region (38,6 – 108,7 Mb) des X-Chromosoms

Position (bp)	Gen	SNP-ID	Stoppmutation	Genotyp Vater
41.090.325	ENSSSCG00000012264	rs343349394	p.R72X	Ref
41.116.990	ENSSSCG00000012264	rs323755315	p.R456X	Ref
44.618.787	BMP15		p.R212X	Alt
46.912.265	ENSSSCG00000045777		p.Q77X	Ref
47.782.208	ENSSSCG00000041777		p.E69X	Alt
48.960.673	ENSSSCG00000041254		p.W67X	Ref
49.213.437	ENSSSCG00000044870		p.L12X	Ref
49.715.509	ENSSSCG00000044675		p.W260X	Ref
71.397.388	ENSSSCG00000051391		p.W213X	Ref
73.204.157	ENSSSCG00000044275		p.Q77X	Ref
83.343.123	ENSSSCG00000028913		p.W498X	Ref
84.110.193	LOC110257687		p.W494X	Ref
99.542.242	ENSSSCG00000044000		p.R115X	Ref
99.542.305	ENSSSCG00000044000		p.R94X	Ref
105.307.060	ENSSSCG00000043161	rs787167842	p.K692X	Ref

bp: Basenpaar; Ref: Referenzallel; Alt: alternatives Allel;

Die Stoppmutation p.E69X im *ENSSSCG00000041777* Gen wurde als kausale Mutation ausgeschlossen, da diese in allen sequenzierten Rassen (Deutsche Landrasse, Piétrain und Hampshire) vorkommt und keine Funktion des Genes bekannt ist.

Als plausible kausale Mutation wurde eine bisher noch nicht bekannte Stoppmutation (p.R212X, g.X:44618787C>T, Sscrofa11.1 Assembly) im bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*) in Betracht gezogen. Die p.R212X-Variante kommt bei den sequenzierten Rassen nur in der bayerischen Linie der Deutschen Landrasse vor. Zudem ist bekannt, dass Mutationen im *BMP15* Unfruchtbarkeit beim Schaf verursachen können (Bodin et al., 2007; Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017; Martinez-Royo et al., 2008). Laut NGS-Daten sind 2 weitere Eber hemizygot und eine Sau heterozygot für die p.R212X-Mutation (Anhang 28). Alle vier Tiere, die das mutierte T-Allel tragen sind miteinander verwandt (Abbildung 24). Alle anderen genomweit re-sequenzierten Schweine haben an dieser Position das Wildtypallel C. Mit der Stoppmutation konnte also eine plausible kausale Mutation identifiziert werden. (vgl. Flossmann et al. (2021))

4.4.4 Das *BMP15* Gen

Das *BMP15* Gen ist Mitglied der transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily und spielt eine wichtige Rolle bei der Follikulogenese. Die beiden Gene *BMP15* und *GDF9* (Growth Differentiation Factor 9) der Familie sind ausschlaggebend für die Funktion der Ovarien (Otsuka et al., 2011). Es wird vermutet, dass das *BMP15* durchgängig in die Follikulogenese involviert ist, da es die ersten Schritte des Follikelwachstums, das eng mit der Proliferation der Granulosazellen zusammenhängt, kontrolliert und später die Wirkung von FSH (follikelstimulierendes Hormon), und damit die Follikelreifung, beeinflusst. Zusätzlich hat es Funktionen beim Verhindern der Apoptose der Granulosazellen und beeinflusst die Ovulationsrate (Persani et al., 2014).

Beim Schaf sind neun Mutationen im *BMP15* bekannt, die zwei verschiedene Phänotypen verursachen (Tabelle 10). Der erste und häufigere Phänotyp (7 Mutationen) ist dadurch gekennzeichnet, dass heterozygote Auen eine erhöhte Fruchtbarkeit (höhere Ovulationsrate) im Vergleich zu Wildtyp-Auen zeigen, wohingegen alternativ homozygote Auen steril sind (Bodin et al., 2007; Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017; Martinez-Royo et al., 2008).

Tabelle 10: Übersicht der beim Schaf bekannten Mutationen im *BMP15*

Name	Mutation	Phänotyp der Auen	Quelle
FecX-I	p.V299D	Het: erhöhte Fruchtbarkeit; Alt. Hom: steril	Galloway et al. (2000)
FecX-H	p.Q291X	Het: erhöhte Fruchtbarkeit; Alt. Hom: steril	Galloway et al. (2000)
FecX-B	p.S367I	Het: erhöhte Fruchtbarkeit; Alt. Hom: steril	Hanrahan et al. (2004)
FecX-G	p.Q239X	Het: erhöhte Fruchtbarkeit; Alt. Hom: steril	Hanrahan et al. (2004)
FecX-L	p.C321Y	Het: erhöhte Fruchtbarkeit; Alt. Hom: steril	Bodin et al. (2007)
FecX-R	p.W154NfsX55	Het: erhöhte Fruchtbarkeit; Alt. Hom: steril	Martinez-Royo et al. (2008)
FecX-Gr	p.T317I	Het und alt. Hom: erhöhte Fruchtbarkeit	Demars et al. (2013)
FecX-O	p.N337H	Het und alt. Hom: erhöhte Fruchtbarkeit	Demars et al. (2013)

4 Ergebnisse

Fruchtbarkeit

FecX-Bar p.A101CfsX113 Het: erhöhte Fruchtbarkeit; Lassoued et al. (2017)

Alt. Hom: steril

Het: heterozygote Auen; Alt. Hom: alternativ homozygote Auen;

Im Gegensatz zum häufigeren Phänotyp zeigen die alternativ homozygoten Auen der beiden anderen Mutationen (FecX-O und FecX-Gr) eine sehr hohe Fruchtbarkeit und sind nicht steril (Demars et al., 2013). Um die beiden Phänotypen erklären zu können, muss die Wirkung von *BMP15* genauer betrachtet werden. Bei der Fruchtbarkeit von uniparen Tieren geht man davon aus, dass sie von drei Signalwegen kontrolliert wird: BMP15-Homodimere, BMP15/GDF9-Heterodimere und GDF9-Homodimere (Demars et al., 2013). Laut Hypothese löst die Kombination der drei Signalwege (*BMP15* und *GDF9* intakt) die Ovulation einer Eizelle aus, das Unterschreiten eines Schwellenwertes führt zur Sterilität (totaler Ausfall durch Homozygotie von Mutationen in *BMP15* oder *GDF9*) und alles zwischen dem Schwellenwert und dem normalen Niveau (verminderte Expression durch Heterozygotie von Mutationen in *BMP15* oder *GDF9*) erhöht die Ovulationsrate (Demars et al., 2013). Bei Heterozygotie von *BMP15* Mutationen, welche die Funktion des Proteins beeinträchtigen (z.B. Missense-Mutationen) oder zum totalen Verlust der Funktion führen (z.B. Stoppmutationen), wird die wachstumsfördernde Funktion des BMP15 beeinträchtigt und es entstehen Follikel mit einer geringeren Anzahl Granulosazellen. Durch die ebenfalls verringerte Hemmaktivität des BMP15 auf den FSH-Signalweg in den Granulosazellen erhöht sich die FSH-Sensitivität, was zur Selektion mehrerer kleiner Follikel führt (Fabre et al., 2006).

Abbildung 22 zeigt ein Multispezies Alignment der BMP15-Proteinsequenz von Maus, Mensch, Schaf und Schwein. Auffällig ist, dass die Proteinsequenz des Schweines mit 402 Aminosäuren (AS) zehn (Mensch und Maus) bzw. neun AS (Schaf) länger ist, als die Proteinsequenzen der anderen drei Spezies. Der Ursache dafür ist, dass die ersten acht AS des porcinen Proteins bei den anderen Spezies fehlen.

4 Ergebnisse



Abbildung 22: Multispezies Alignment der BMP15-Proteinsequenzen

Vergleich der BMP15-Proteinsequenzen von Maus (*Mus musculus*: NP_033887.1), Mensch (*Homo sapiens*: NP_005439.2), Schaf (*Ovis aries*: NP_001108239.1) und Schwein (*Sus scrofa*: NP_001005155.2). „Conservation“ gibt die Konservierung der jeweiligen Position im Protein an. Orange markierte Positionen sind bekannte Mutationen im Schaf, bei denen heterozygote Auen fruchtbarer sind als Wildtyp-Auen und alternativ homozygote Auen steril sind. Grün markierte Positionen sind Mutationen, bei denen alternativ homozygote Auen noch fruchtbarer sind als Wildtyp- oder heterozygote Auen. Die blau markierte Position ist die p.R212X-Mutation beim Schwein.

Am besten stimmen die Proteinsequenzen von Schwein und Schaf überein (87,5%) und die geringste Übereinstimmung gibt es zwischen Maus und Mensch (63,2%). Die p.R212X-Mutation

beim Schwein ist blau markiert und liegt zwischen zwei Varianten vom Schaf (FecX-R und FecX-G), welche ebenfalls zum Translationsstopp führen und homozygot Unfruchtbarkeit verursachen.

4.4.5 Validierung der kausalen Variante

Um die p.R212X-Mutation als Artefakt des NGS auszuschließen, wurden die genomsequenzierten DL-Schweine der bayerischen Linie mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Für alle 29 Schweine konnte der NGS-Genotyp und somit auch die Existenz der Mutation bestätigt werden (Abbildung 23).

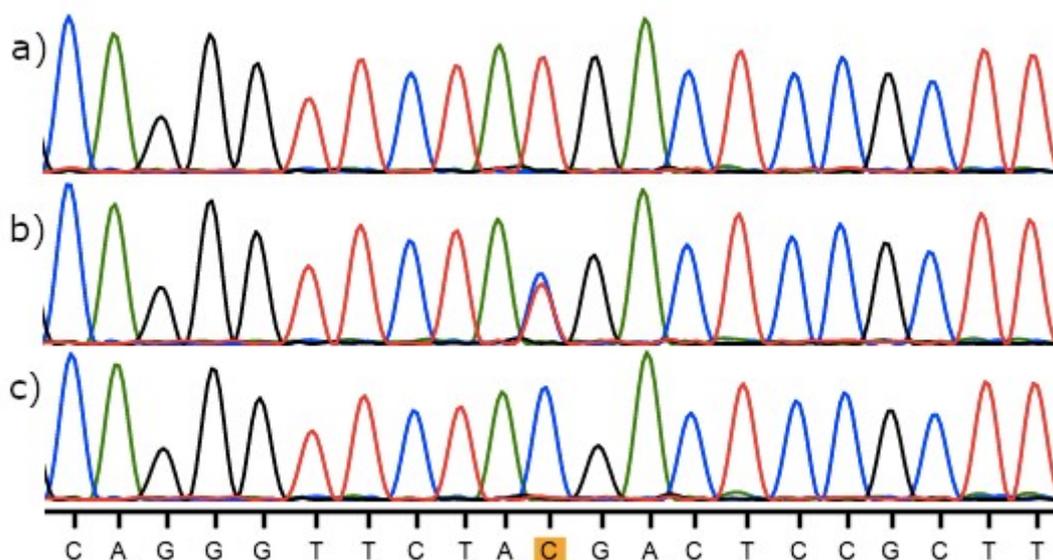


Abbildung 23: Chromatogramme der Sanger-Sequenzierung aller drei Genotypen der BMP15:p.R212X-Mutation

Unten angegebene Sequenz ist die Referenzsequenz, das orange markierte C kennzeichnet die Position der Mutation. a) Sequenz eines Ebers (I-87) hemizygot für das alternative T-Allel; b) Sequenz einer heterozygoten Sau (I-108); c) Sequenz einer Sau (I-30) homozygot für das Wildtypallel C; (vgl. Flossmann et al. (2021))

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die p.R212X-Mutation für die beobachteten atypischen (kleinen) Vulven ursächlich ist, wurden vorerst alle gemeldeten Fälle (n=43), die jeweiligen Vollgeschwister (n=29) mit normal großen Vulven und 1.005 fruchtbare DL-Sauen (Teilmenge der 1.818 Sauen der GWAS) mittels Sanger-Sequenzierung oder KASP™-Assay genotypisiert. Von den 43 Sauen mit atypisch kleiner Vulva waren 36 alternativ homozygot für die p.R212X-Mutation, drei waren heterozygot und vier homozygot für das Wildtypallel. Von den 17 Sauen, die als Fälle für die GWAS verwendet wurden, waren nur 11 Sauen alternativ homozygot, drei Sauen waren heterozygot und drei waren homozygot für das Wildtypallel. Alle 29 Vollgeschwister trugen die Variante

heterozygot (Tabelle 11) und keine der fruchtbaren 1.005 DL-Sauen trug zwei Kopien der Mutation. (vgl. Flossmann et al. (2021))

Die p.R212X-Mutation wurde auf den Custombereich des *Illumina Porcine60K BeadChips* integriert, um für alle Sauen und Eber, die routinemäßig für die genomische Zuchtwertschätzung genotypisiert werden, auch der Genotyp für die p.R212X-Mutation bestimmt wird. Inzwischen stehen Genotypen für 4.869 fruchtbare DL-Sauen zur Verfügung, wobei keine der DL-Sauen alternativ homozygot war (Tabelle 11). (vgl. Flossmann et al. (2021))

Die Allelfrequenz des T-Allels betrug bei den Falltieren 0,87 und bei den fruchtbaren DL-Sauen 0,06. Die Stoppmutation tritt bei den Sauen mit atypisch kleinen Vulven hoch signifikant häufiger homozygot auf als bei normal eingestuften Sauen (Fisher-Exakt-Test, $P = 1,78 \times 10^{-84}$).

Tabelle 11: Genotypen der p.R212X-Mutation für 4.941 Sauen der Deutschen Landrasse (DL)

Genotyp	DL-Sauen mit atypisch kleiner Vulva	Vollgeschwister mit normal großer Vulva	Fruchtbare DL-Sauen
C/C (ref/ref)	4	0	4.263
C/T (ref/alt)	3	29	606
T/T (alt/alt)	36	0	0
Anzahl Sauen	43	29	4.869

(vgl. Flossmann et al. (2021))

Obwohl in der F1 Generation der bayerischen Schweinezucht (DL-Sauen gepaart mit DE-Eber) keine Sauen mit kleinen Vulven gemeldet wurden, wurden die Deutschen Edelschwein Eber der bayerischen Besamungsstationen ($n = 12$) und die Edelschwein Reinzuchtsauen ($n = 145$) auf die p.R212X Variante des BMP15 untersucht. Die Genotypisierung der Tiere bestätigte die Vermutung, dass die Variante im Deutschen Edelschwein sehr wahrscheinlich nicht segregiert.

4.4.6 Ursprung der p.R.212X Mutation im BMP15

Um gemeinsame Ahnen und einen möglichen Founder der p.R212X Mutation zu identifizieren, wurden die Stammbäume der Väter von Sauen mit kleinen Vulven analysiert. Insgesamt stammten die 43 Sauen mit atypisch kleiner Vulva von zehn bekannten Ebern und einem unbekanntem Eber. Abbildung 24 zeigt, dass acht der Väter (Nummer 22, 33, 40, 41, 42, 43, 44 und 45) den Eber Nummer 2 als Vorfahren haben und nur zwei Eber (Nummer 9 und 46) nicht mit Eber Nummer 2 verwandt sind. Die drei orange-schwarz markierten Eber (Nummer 9, 42 und 46) haben Töchter,

welche die Stoppmutation nicht homozygot tragen. Dies kann auch durch den Stammbaum erklärt werden. Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, können die beiden Eber 9 und 42 nicht das mutierte T-Allel tragen, da die Eltern entweder homozygot bzw. hemizygot für das Referenzallel C sind (Eber 9) oder nur der Vater das T-Allel tragen könnte (Eber 42), der es auf Grund des X-chromosomal Erbgangs nicht auf männliche Nachkommen übertragen kann. Der Eber 46 kann das T-Allel ebenfalls nicht tragen, da die mütterlichen Großeltern homo- bzw. hemizygot für das Referenzallel C waren (Anhang 29).

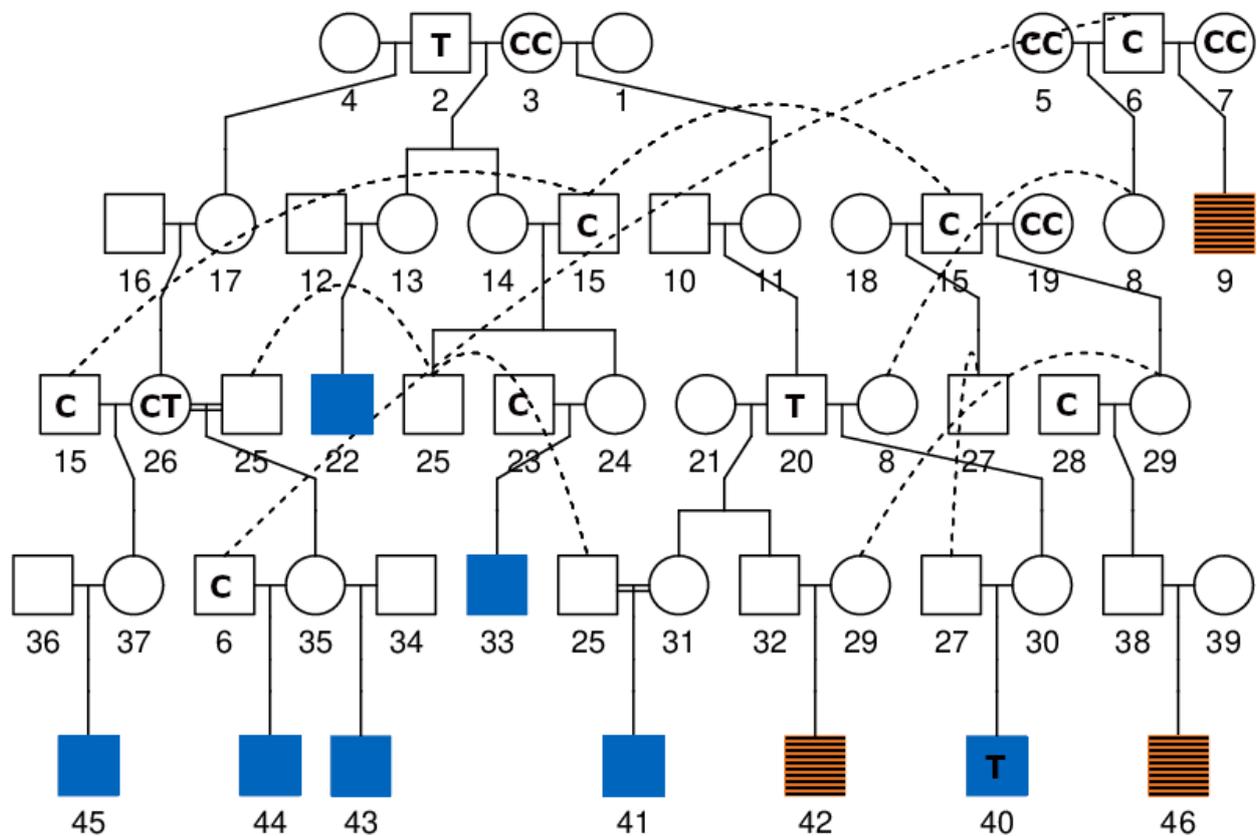


Abbildung 24: Stammbaum der zehn bekannten Väter von Sauen mit kleiner Vulva

Quadrate stehen für Eber, Kreise für Sauen; blau gefüllte Quadrate sind Eber, deren Töchter kleine Vulven aufwiesen und den alternativ homozygoten Genotyp T/T der p.R212X Mutation trugen; orange-schwarz gestreifte Quadrate sind Eber, deren Töchter kleine Vulven aufwiesen, aber nicht den alternativ homozygoten Genotyp trugen; Quadrate und Kreise mit einem „T“, „C“, „CT“ oder „CC“ sind genomweit re-sequenzierte Tiere mit jeweiligen Genotyp; (vgl. Flossmann et al.,(2021))

Der Eber Nummer 2 ist im Jahr 2006 geboren, ist aber nicht der älteste Eber, der das T-Allel trägt. Von den insgesamt 394 für die p.R212X Mutation genotypisierten Eber (KASP-Typisierung oder Illumina *Porcine60K BeadChip*) trugen 27 das T-Allel, wobei der Älteste im Jahr 1997 geboren

wurde und zwei weitere im Jahr 2004. Die beiden Eber mit Geburtsjahr 2004 sind miteinander verwandt (Mutter des einen ist die Großmutter mütterlicherseits des anderen), aber nicht mit dem Eber aus dem Jahr 1997 oder mit Eber Nummer 2. Ebenso ist Eber Nummer 2 nicht mit dem Eber aus dem Jahr 1997 verwandt. Es wurde in Betracht gezogen, dass das Founder-Tier der p.R212X-Mutation ein Sau ist. Da die ersten genotypisierten Sauen erst nach 1997 geboren wurden, kann diese Hypothese nicht überprüft werden.

4.4.7 Effekt der p.R212X-Mutation auf Leistungsmerkmale

Da BMP15-Mutationen in heterozygoten Auen die Ovulationsrate erhöhen und dem Produkt von *BMP15* möglicherweise eine Funktion als Wachstumsfaktor zukommt, wurde eine Schätzung des Effektes der p.R212X Mutation auf Fruchtbarkeits-, Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale beim Schwein durchgeführt. Für die Schätzung des Effektes standen Zuchtwerte dieser Merkmale zur Verfügung. Nicht alle Sauen mit Zuchtwerten wurden für die p.R212X Mutation genotypisiert. Deshalb wurden den Sauen ohne bekannten Genotyp anhand der genotypisierten Eltern und der Allelfrequenz des T-Allels in weiblichen und männlichen Tieren Wahrscheinlichkeiten, das T-Allel zu tragen, zugewiesen. Insgesamt sind 5.263 DL-Schweine für die p.R212X Variante genotypisiert worden, wobei 4.263 Sauen den Genotyp C/C und 606 Sauen den Genotyp C/T hatten. Bei den männlichen Schweinen trugen 367 Eber das C-Allel und 27 Eber das T-Allel. Die entsprechenden Allelfrequenzen des T-Allels sind $q_m = 0,069$ bei den Ebern und $q_f = 0,062$ bei den Sauen. Tabelle 12 zeigt die T-Allel Wahrscheinlichkeiten, abgeleitet von den Genotypen der Eltern und Tabelle 13 gibt die Anzahl Sauen pro zugewiesener Wahrscheinlichkeit an. (vgl. Flossmann et al. (2021))

Tabelle 12: T-Allel Wahrscheinlichkeit basierend auf den Genotyp der Eltern

	C/C-Sau	C/T-Sau	C/N-Sau
C-Eber	0	0,5	$q_f = 0,062$
T-Eber	1	1	1
N-Eber	$q_m = 0,069$	$q_m + 0,5 = 0,569$	$q_m + q_f = 0,131$

q_m : T-Allelfrequenz in Eber; q_f : T-Allelfrequenz in Sauen; C: Wildtypallel; T: alternatives Allel; N: unbekanntes Allel; (vgl. Flossmann et al. (2021))

Tabelle 13: T-Allel Wahrscheinlichkeiten von Sauen (genotypisiert und zugewiesen) ab Geburtsjahr 2007

	T-Allel Wahrscheinlichkeiten						
	0	0,062	0,069	0,131	0,5	0,569	1
Anzahl	8.400	9.623	1.092	9.969	1.185	565	1.455
Sauen	(4.156)	(9.623)	(1.092)	(9.969)	(1.185)	(565)	(579)

Die Zahlen in den Klammern gibt die Anzahl Sauen an, bei denen die T-Allel Wahrscheinlichkeit von den Genotypen der Eltern abgeleitet wurde; (vgl. Flossmann et al. (2021))

Die Effekte wurden mit Hilfe von linearen Regressionen geschätzt, wobei nur Sauen mit einer Zuchtwert-Sicherheit von $\geq 40\%$ in die Schätzung einbezogen wurden. Das ist auch der Grund, weshalb für die Schätzung des Effektes auf das Merkmal „lebend geborene Ferkel“ mehr Sauen (20.549 Sauen) zur Verfügung standen als für die Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale (10.072 Sauen). Die Schätzung ergab einen signifikant positiven Effekt auf die Fruchtbarkeit (+0,41 leben geborene Ferkel) und IMF (+0,07), aber einen negativen Effekt auf Fleischmerkmale (FLAN, BAFL, RMFL, FVW und FFV) (Tabelle 14). (vgl. Flossmann et al. (2021))

Tabelle 14: Geschätzte Effekte der p.R212X-Mutation auf Leistungsmerkmale

Merkmal	Anz. Sauen	Effekt (\pm sd)	P-Wert	Signifikanz
Lebend geborene Ferkel [N]	20.549	0,411 (0,021)	$4,50 \times 10^{-83}$	****
Futterverwertung [kg/kg]	10.072	-0,028 (0,004)	$7,60 \times 10^{-15}$	****
Tägliche Zunahmen [g/Tag]	10.072	-0,847 (1,684)	$6,15 \times 10^{-01}$	
Fleischanteil [%]	10.072	-0,889 (0,059)	$2,50 \times 10^{-51}$	****
Bauchfleischanteil [%]	10.072	-0,906 (0,057)	$2,21 \times 10^{-56}$	****
Rückenmuskelfläche [cm²]	10.072	-1,216 (0,097)	$1,12 \times 10^{-35}$	****
Fleisch:Fett-Verhältnis [cm²/cm²]	10.072	-0,031 (0,002)	$1,06 \times 10^{-51}$	****
Schlachtkörperlänge [cm]	10.072	-0,030 (0,045)	$5,13 \times 10^{-01}$	
Intramuskulärer Fettgehalt [%]	10.072	0,068 (0,007)	$6,20 \times 10^{-25}$	****
pH1-Wert	10.072	0,002 (0,002)	$1,16 \times 10^{-01}$	
Tropfsaftverlust [%]	10.072	-0,005 (0,004)	$2,16 \times 10^{-01}$	

Anz. Sauen: Sauen mit einer Zuchtwertsicherheit $\geq 40\%$; \pm sd: Standardabweichung; Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau für 11 Tests: P-Wert $\leq 4,50 \times 10^{-03}$; **** signifikant ab $P \leq 1 \times 10^{-04}$; (vgl. Flossmann et al. (2021))

Auf TZ, SKL und TSV konnten negative Effekte beobachtet werden, die aber nicht signifikant waren und auf pH1-Wert hatte die p.R212X-Mutation keinen Einfluss.

Im Hinblick auf eine mögliche züchterische Nutzung, wurde der ökonomische Grenznutzen der Ferkelzahl und der signifikanten Mast- und Schlachtmerkmale in Betracht gezogen. Für das Merkmal „lebend geborene Ferkel“ ist der ökonomische Wert pro Einheit bei 3,98 €, für die Futtermittelverwertung bei 22,70 € und für den Fleischanteil bei 1,66 €. Der Mehrwert durch die höhere Ferkelzahl ($0,41 \times 3,98 \text{ €} = 1,63 \text{ €}$) war kleiner als die Verluste durch die negativen Effekte auf Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale (-2,11 €). Damit ergab sich ein ökonomischer Effekt des T-Allels von -0,48 € pro Mastschwein. Aus diesem Grund scheint die züchterische Nutzung des T-Allels nicht sinnvoll und es sollte aus der Population eliminiert werden. (vgl. Flossmann et al. (2021))

4.4.8 Entwicklung der Allelfrequenz der p.R212X-Mutation im *BMP15*

Die ersten Fälle von Sauen mit atypisch kleinen Vulven wurden im Jahr 2014 gemeldet und die p.R212X-Mutation wurde im Laufe des Jahres 2015 identifiziert. Nachdem nachgewiesen wurde, dass der negative Effekt der Mutation auf Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale den positiven Einfluss auf Fruchtbarkeit überwiegt, sollte die Mutation aus der Population eliminiert werden. Die Entwicklung der Allelfrequenz des mutierten T-Allels ist in den Abbildung 25 und 26 dargestellt, wobei in Abbildung 25 nur genotypisierte Sauen und in Abbildung 26 alle Sauen, auch die mit abgeleiteten Genotyp berücksichtigt wurden.

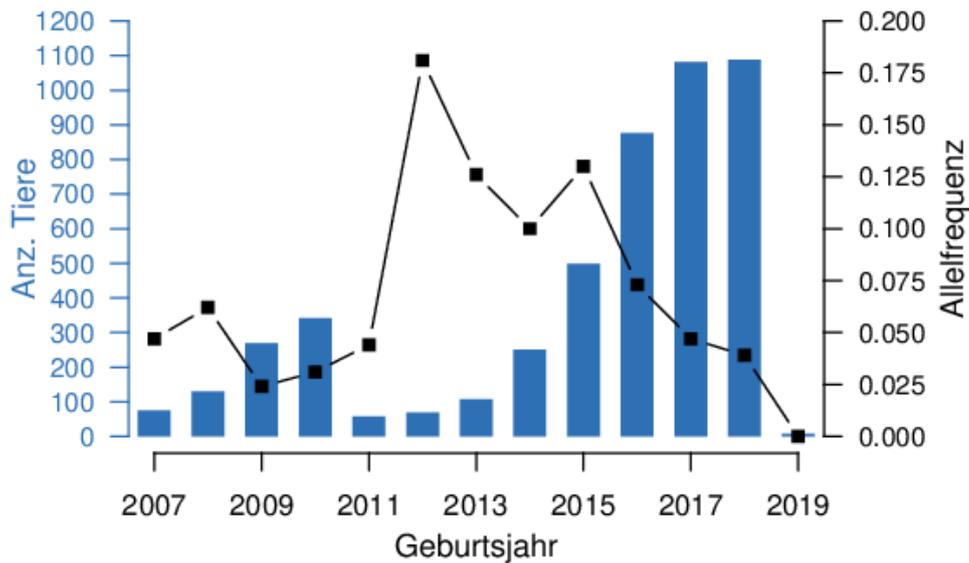


Abbildung 25: Anzahl genotypisierter Sauen für die p.R212X-Mutation und den jeweiligen Frequenzen des T-Allels

Wie Abbildung 25 zeigt, lag die Allelfrequenz des T-Allels zwischen 0,0 und 0,18, wobei die höchste Frequenz im Geburtsjahr 2012 und die niedrigste 2019 geschätzt wurde (Anhang 30). Man kann von einer Verzerrung der Frequenz ausgehen, da in beiden Jahren nur eine sehr geringe Anzahl Sauen genotypisiert worden sind (2012: 69 Sauen; 2019: 8 Sauen). Deutlich zu sehen ist ein stetiger Rückgang der Allelfrequenz ab dem Jahr 2015 bis 2019.

Um die Verzerrung auf Grund der geringen Anzahl genotypisierter Sauen in den früheren Jahren (2007–2014) auszugleichen, wurden die Allelfrequenzen auf Basis aller Sauen (genotypisiert und mit von den Eltern genotypen abgeleiteten Genotyp) geschätzt. Die Anzahl verfügbarer Sauen lag zwischen 1.091 (Jahr 2019) und 3.654 (Jahr 2017) und war gleichmäßiger verteilt, als bei den genotypisierten Sauen (Abbildung 26 und Anhang 30).

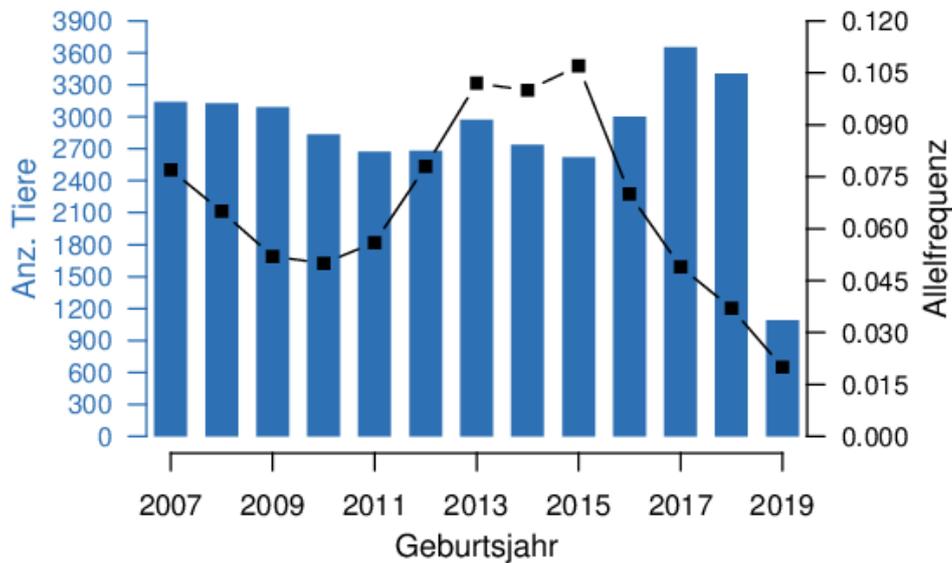


Abbildung 26: Anzahl Sauen mit Genotyp (genotypisiert und abgeleitet) für die p.R212X-Mutation und den jeweiligen Frequenzen des T-Allels

Wie in Abbildung 26 dargestellt, stieg die Allelfrequenz des T-Allels in den Jahren 2010 bis 2013, blieb drei Jahre stabil auf einem relativ hohen Niveau ($> 0,1$) und sank anschließend stetig bis zum Jahr 2019 auf 0,02.

4.4.9 Auswirkungen der p.R212X Variante auf Reproduktionsorgane

Um die Auswirkungen der p.R212X Mutation auf die Reproduktionsorgane überprüfen zu können, wurden Risikoanpaarungen von zwei heterozygoten Sauen (Genotyp C/T) mit einem hemizygoten Eber (Genotyp T) durchgeführt. Ziel war es alternativ homozygote Sauen zu produzieren, sie im geschlechtsreifen Alter zu schlachten und deren Uteri und Eierstöcke zu untersuchen. Eine der beiden Sauen gebar nur männliche Ferkel, die nicht weiter beobachtet wurden. Im Wurf der zweiten Sau waren 10 weibliche Ferkel, wovon fünf heterozygot und fünf homozygot für die p.R212X Variante waren. Im Alter von sechs Monaten wurden acht Sauen (fünf p.R212X homozygot und drei heterozygot) geschlachtet und deren Uteri und Eierstöcke untersucht. Bei der Größe der Uteri konnten deutliche Unterschiede zwischen den heterozygoten (Abbildung 27: a bis c) und den alternativ homozygoten Sauen (Abbildung 27: d bis h) beobachtet werden. Die Uteri der Tiere e, g und h waren nur rudimentär ausgebildet, wohingegen die Uteri der Tiere a bis c wesentlich größer und voluminöser waren. Die Uteri der beiden Tiere waren voluminöser als die der anderen drei

p.R212X homozygoten Sauen (e, g und h in Abbildung 27), aber hatten sichtlich weniger Windungen, als die Uteri der heterozygoten Sauen (a, b und c in Abbildung 27). (vgl. Flossmann et al. (2021))

Bei den Eierstöcken war ein erheblicher Unterschied zwischen den alternativ homozygoten und heterozygoten Sauen zu erkennen. Die Eierstöcke der heterozygoten Sauen hatten zahlreiche Follikel, wohingegen bei den alternativ homozygoten Sauen keine Follikel erkennbar waren (Abbildung 28). Auffällig war, dass sich bei zwei der fünf alternativ homozygoten Sauen jeweils an einem Eierstock eine Zyste gebildet hatte (d und f in Abbildung 28). (vgl. Flossmann et al. (2021))

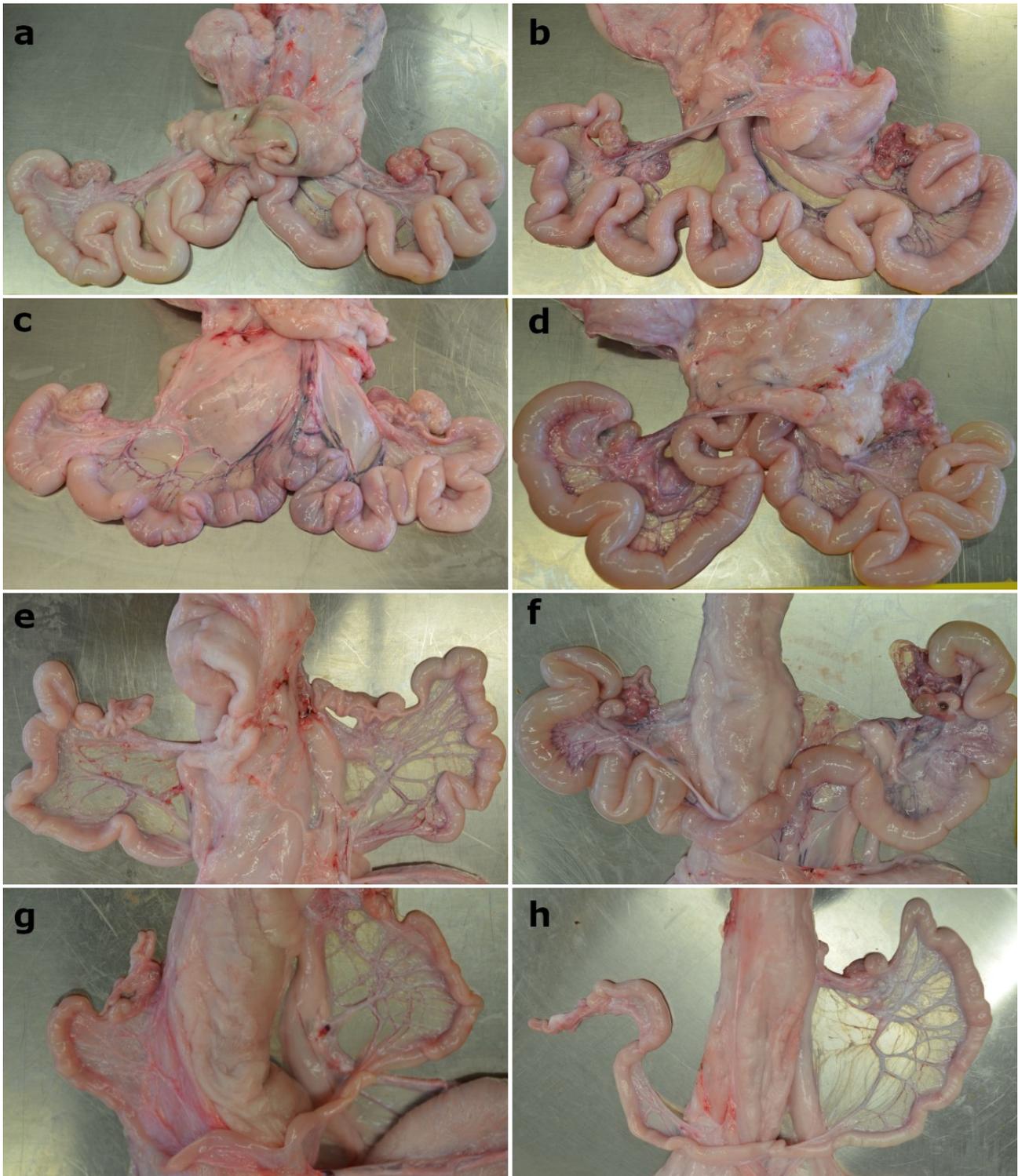


Abbildung 27: Uteri von 8 Vollgeschwister im Alter von 6 Monaten

Bilder a bis c zeigen Uteri von Sauen, die heterozygot für die p.R212X-Mutation sind; Bilder d bis h sind Uteri von alternativ homozygoten Sauen; d und f zeigen vergrößerte Uteri auf Grund von Zysten an jeweils einem Eierstock; (vgl. Flossmann et al. (2021))

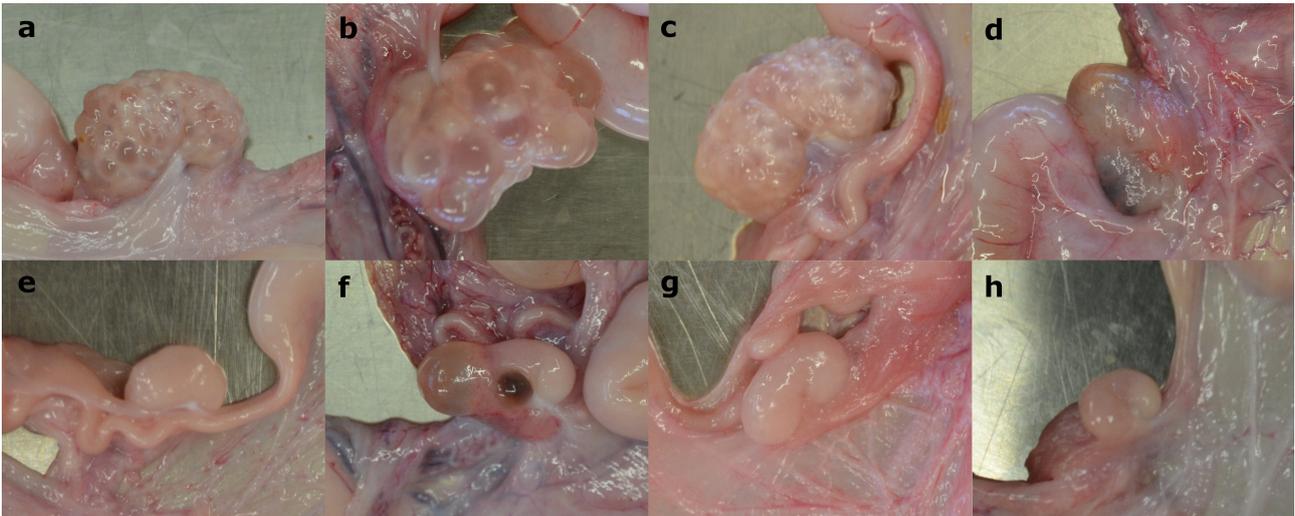


Abbildung 28: Eierstöcke von 8 Vollgeschwister der Risikoanpaarung im Alter von 6 Monaten
Bilder a, b und c zeigen Eierstöcke von Sauen, die heterozygot für die p.R212X-Mutation sind;
Bilder d bis h sind Eierstöcke von alternativ homozygoten Sauen; (vgl. Flossmann et al. (2021))

5 Diskussion

5.1 Sequenz- und Genotypenabgleich

Die genomweite Sequenzierung und Chip-Genotypisierung besteht aus vielen, nicht automatisierten Einzelarbeitsschritten (wie z.B. Probenahme, DNA-Extraktion, Quantifizierung, Library Herstellung, Qualitätskontrolle, Sequenzierung bzw. Genotypisierung), während denen es zu Verwechslungen von Proben kommen kann (Westra et al., 2011). Um Fehler dieser Art auszuschließen, wurden die Sequenzdaten von genomsequenzierten Tieren mit den jeweiligen Chip-Genotypdaten routinemäßig verglichen. Bei einem Tier (Ingenis-90) stimmten die Sequenzdaten nicht mit den Genotypdaten überein (Abbildung 2) und die Hauptkomponentenanalyse zeigte (Abbildung 3), dass es sich bei dem Tier um einen Piétraîneber statt einem DL-Eber handelte. Das Tier Ingenis-90 war bereits genotypisiert und von der Genotypisierung war keine Rückstellprobe vorhanden, weshalb für die Sequenzierung erneut eine Spermaprobe von der Besamungsstation angefordert wurde. Nachdem alle Laborarbeitsschritte kontrolliert und mögliche Verwechslungen ausgeschlossen worden waren, kam es mit großer Wahrscheinlichkeit während der Probenahme bzw. des Aliquotierens der Probe zu einer Verwechslung.

Dies zeigt, wie wichtig eine genaue Überprüfung der generierten Genotyp- und Sequenzdaten ist, bevor mit den Analysen begonnen wird. Zudem sollten die Anzahl Arbeitsschritte, die per Hand durchgeführt werden müssen, weitestgehend reduziert und Kontrollmechanismen eingeführt werden, um Verwechslungen von Proben minimieren zu können. Dies gilt sowohl für die Probenahme, als auch für die anschließenden Laborarbeiten.

5.2 Imputation

Ein Vorteil von GWAS mit Sequenzdaten ist, dass kausale Varianten direkt auf Assoziationen getestet werden können und man nicht auf Marker angewiesen ist, die im LD mit kausalen Varianten stehen, was zu einer Genauigkeitssteigerung von GWAS führen kann (van Binsbergen et al., 2014; Daetwyler et al., 2014; Qanbari et al., 2014). Die Sequenzierung des Genoms ist zu teuer, um eine ausreichend große Anzahl Individuen für GWAS sequenzieren zu können. Ein Vorteil bei Nutztieren ist jedoch die geringe effektive Populationsgröße und die damit verbundene LD-Struktur, durch die eine zuverlässige Imputation ermöglicht wird, weshalb man auf imputierte Sequenzdaten zurückgreifen kann. Auch wenn seltene Varianten ($MAF < 0,01$) wegen fehlendem LD nicht

imputiert werden können (Wainschtein et al., 2019), erhöht sich durch GWAS mit imputierten Sequenzdaten die Wahrscheinlichkeit neue QTL und kausale Varianten identifizieren zu können (Huang et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chipdaten von DL und PI auf Sequenzniveau imputiert, wobei die Imputationsgenauigkeit nach der Qualitätskontrolle bei DL 0,79 und bei PI 0,84 betrug. In anderen Studien mit Schweinen waren die Imputationsgenauigkeiten vergleichbar, obwohl mehr Referenztiere oder HD-Chips zur Verfügung standen. Yan et al. (2017; 2018) imputierten Genotypen des Illumina PorcineSNP60 BeadChips auf Sequenzniveau (Sscrofa10.2). Für die Durchführung 2017 standen von 403 Schweinen verschiedener Rassen Sequenzen zur Verfügung, wobei eine Genauigkeit von 0,80 erreicht wurde. In der Studie im Jahr 2018 wurden für die Imputation insgesamt 117 Schweine als Referenz verwendet, wobei 19 Schweine Ahnen der zu imputierenden Population waren. Es wurde eine Imputationsgenauigkeit von 0,85 erreicht. Van den Berg et al. (2019) konnten in einer Edelschweinpopulation mit 32 sequenzierten Schweinen (Sscrofa 10.2) als Referenz eine Genauigkeit von 0,93 erreichen, indem sie einen Zwischenschritt mit HD-Genotypen durchführten. Für die Imputation von 80K (Geneseek-Neogen GPHD 80K SNP Chip) auf 660K (Affymetrix Axiom porcine 660K SNP Chip) standen HD-Genotypen von 120 Schweinen zur Verfügung.

Die Imputationsgenauigkeit wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Ein wichtiger Faktor ist die Allelfrequenz. Je kleiner die Frequenz des seltenen Allels ist, desto schlechter ist die Imputationsgenauigkeit (van Binsbergen et al., 2014; Daetwyler et al., 2014), wobei die Genauigkeit von seltenen Varianten durch eine Erweiterung der Referenzgruppe mit zusätzlichen Rassen verbessert werden kann (van Binsbergen et al., 2014; Bouwman & Veerkamp, 2014; Pausch et al., 2017; VanRaden et al., 2013). Es sollte jedoch darauf geachtet werden, dass die zusätzlichen Rassen bzw. Linien nicht zu weit von der Zielgruppe (die zu imputierenden Individuen) entfernt liegen, da diese ansonsten nicht zur Steigerung von R^2 beitragen (van den Berg et al., 2019). Die Verwandtschaft zwischen Referenztieren und Zielgruppe spielt eine wichtige Rolle (van Binsbergen et al., 2014; Yan et al., 2018), ebenso wie die Anzahl der Referenztiere und LD-Strukturen (van Binsbergen et al., 2014). Ein Grund für schlechte Imputation können Mappingfehler sein. Falsche Positionen von SNPs führen zu fehlerhaften Haplotypen und LD-Strukturen in den jeweiligen Regionen. Verbesserte Referenzsequenzen würden somit auch zu einer höheren Imputationsgenauigkeit beitragen (Daetwyler et al., 2014; Erbe et al., 2012; Pausch et al., 2013).

Der Unterschied der Imputationsgenauigkeit zwischen DL (0,79) und PI (0,84) in der vorliegenden Arbeit liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an der Anzahl Referenztiere, die bei DL mit 29 Tieren um ein Drittel kleiner war als bei PI mit 46 Tieren. Die Referenzgruppe der Piétrains setzte sich zudem aus zwei Linien zusammen, wobei 31 Tiere aus Bayern stammten und Ahnen der Zielgruppe waren und 15 Tiere aus Baden-Württemberg kamen. Die effektive Populationsgröße der beiden Rassen ist zwischen 200 und 300 Tieren (Ingwersen & Tholen, 2009) ähnlich und hat vermutlich keinen großen Effekt auf die Imputationsgenauigkeit.

5.3 Genomweite Assoziationsstudien

5.3.1 GWAS in der Deutschen Landrasse

Für die Deutsche Landrasse konnten insgesamt 14 QTL-Regionen identifiziert werden. Die QTL-Region auf Chromosom 2 (Lead-SNP: 2_1253937) hat einen großen Effekt auf Fleischquantität (FLAN, BAFL, RMFL, FFV), intramuskulären Fettgehalt und Mastleistungsmerkmale wie FVW und TZ. Die Top-SNPs für die Merkmale liegen im Bereich von 1.253.937 – 1.692.499 bp in vier verschiedenen Genen. Ein bekanntes QTN für höheren Magerfleischanteil und geringere Rückenspeckdicke befindet sich auf Chromosom 2 und liegt im Insulin Growth Factor 2 Gen (*IGF2*, NC_010444.4:c1.496.417-1.469.183, Sscrofa11.1 Assembly), welches sich im Bereich der Top-SNPs befindet. *IGF2* unterliegt Imprinting, wobei nur die vom Vater vererbte Kopie des Gens exprimiert wird (Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999). Die kausale Variante *IGF2* intron3-g.3072G>A ist eine regulatorische Mutation in einem Intron des *IGF2* (Sscrofa11.1_2:g.1483817G>A), wobei das Adenin eine höhere postnatale Expression im Skelett- und Herzmuskel bewirkt (Van Laere et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit ist die *IGF2* intron3-g.3072G>A Variante mit vier der sieben Merkmale (FFV, FLAN, BAFL und IMF) signifikant assoziiert, auch wenn die P-Werte weniger signifikant sind als die der Top-SNPs.

Der Lead-SNP des QTL auf SSC2 liegt im 3'-UTR des *TNNI2* Gens, welches zum Troponinkomplex gehört, der für die kalziumabhängige Regulation der Skelettmuskelkontraktion verantwortlich ist (Xu et al., 2010; Yang et al., 2009). Mutationen in *TNNI2* verursachen Myopahtie und distale Arthrogryposis Typ 2b (OMIM: 191043) (Ochala, 2008; Sheng & Jin, 2016). Beim Schwein wurde *TNNI2* bereits mit Merkmalen der Fetteinlagerung und des Muskelwachstums in Verbindung gebracht (Xu et al., 2010). Der Top-SNP für tägliche Zunahmen liegt in einem Intron des *TNNT3* Gens, welches ebenfalls zum Troponinkomplex gehört. Es spielt eine zentrale Rolle in

der Regulation der Muskelkontraktion und Relaxation. Mutationen im *TNNT3* verursachen distale Arthrogyriposis Typ 2b (Wei & Jin, 2016).

Welches der genannten Kandidatengene ursächlich für die positiven Effekte auf die Fleischquantität und FVW bzw. negativen Effekt auf IMF ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden.

In unmittelbarer Umgebung des QTL auf SSC10, der ebenfalls mit den Merkmalen für Fleischquantität (BAFL und FLAN) und Fleisch:Fett-Verhältnis assoziiert ist, befinden sich keine funktionellen Kandidatengene. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Top-SNP oder eine Variante in dessen Nähe als Enhancer für ein funktionelles Gen fungiert. Die beiden QTL für Schlachtkörperlänge werden in einem separaten Abschnitt diskutiert (siehe 5.3.4 Schlachtkörperlänge).

Für die restlichen zehn QTL (auf SSC3, SSC6, SSC10, SSC11, SSC12 und SSC19) konnten keine offensichtlichen positionellen bzw. funktionellen Kandidatengene identifiziert werden.

5.3.2 GWAS in der Rasse Piétrain

In den GWAS mit Piétrains konnten zwei QTL identifiziert werden, die sich auf die Fleischmerkmale (FLAN, BAFL, FFV, RMFL) auswirken. Bei dem QTL auf SSC6 handelt es sich um den bekannten MHS Locus, der sich nicht nur positiv auf die Fleischquantität, sondern vor allem auch negativ auf die Fleischqualität (TSV und pH1) auswirkt, wie schon mehrfach nachgewiesen wurde (Casteels et al., 1995; Silveira et al., 2011; de Smet et al., 1998; Tam et al., 1998; Zhang et al., 1992). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die kausale Variante (p.R615C) des Maligne Hyperthermie Syndroms in der bayerischen Piétrainpopulation noch segregiert und nicht vollständig eliminiert worden ist. Ein Grund dafür könnte die positive Auswirkung auf Fleischmerkmale sein. Der QTL auf SSC14 hat im Gegensatz zum MHS Locus nur positive Effekte auf die Fleischleistung und keinerlei negative Effekte auf andere Merkmale. Zusätzlich erklärt der QTL auf SSC14 mehr von der Varianz der Fleischmerkmale (RMFL: 2,17%; FLAN: 2,05%) als der MHS Locus (RMFL: 1,48%; FLAN: 1,24%). Aus diesen Gründen wäre eine Eliminierung der p.R615C Variante, deren Allelfrequenz in der bayerischen Piétrainpopulation 0,07 beträgt, und die damit verbundenen negativen Auswirkungen auf die Fleischquantität, sehr gut mit einer Selektion auf den QTL des SSC14 zu kompensieren. Zusätzlich würden durch die Eliminierung der p.R615C

Variante negative Folgen auf die Fleischqualität und die Gefahr stressanfällige Schweine zu erzeugen vermieden.

Als positionelles und funktionelles Kandidatengen für den QTL auf Chromosom 14 wird *GFRA2* Gen in Betracht gezogen. An *GFRA2* Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Gen für die Entwicklung einiger postganglionärer parasymphischer Neuronen notwendig ist. Bei Geburt waren die Knockout Mäuse unauffällig, zeigten jedoch nach dem Absetzen Wachstumsdefizite im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Am größten war der Gewichtsunterschied mit 30–50% im Alter von 4–6 Wochen. Anschließend verringerte sich die Differenz wieder und stagnierte bei etwa 20% im Alter von vier Monaten. In Tränen- und Speicheldrüsen wurde kaum Innervation nachgewiesen und der Dünndarm war schwächer innerviert als bei Wildtyp-Mäusen. An anderen Organen, wie Lunge, Leber, Niere und Milz wurden keine Schäden oder Unterschiede festgestellt. (Rossi et al., 1999)

Die kaum vorhandene Innervation beeinträchtigt die Sekretion von Bauchspeichel- und Speicheldrüse. Dies führt zu einer schlechten Verdauung und Malabsorption, was wiederum das Wachstumsdefizit hervorruft. Untersuchungen des Fettgehaltes zeigten zudem, dass Knockout Mäuse signifikant weniger Fett einlagerten, was zu einem höheren Muskel:Fett-Verhältnis führte (Rossi et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Top-SNPs wirken sich sowohl auf die Fleischquantität, als auch auf das Fleisch:Fett-Verhältnis positiv aus. Dies widerspricht den beschriebenen Phänotypen der *GFRA2* Knockout Mäuse, die bei einem geringeren Körpergewicht einen geringeren Fettgehalt zeigten. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Hauptursache des Gewichtsunterschiedes bei den Mäusen eine geringere Fetteinlagerung ist und beim Piétrain grundsätzlich wenig Fett angesetzt wird, da über Generationen auf einen hohen Magerfleischanteil selektiert wurde. Um klären zu können, ob und wie sich das *GFRA2* Gen auf die Fleischmerkmale beim Schwein auswirkt, und um mögliche kausale Mutationen zu identifizieren, sind weiterführende Studien notwendig.

Für das Mastleistungsmerkmal FVW wurde ein QTL auf SSC5 identifiziert (5_66129589), der etwa 15 kb vom 5'- Ende des *CCND2* Gens entfernt liegt, welches für das postnatale Wachstum der Langerhans-Inseln (auch Inselzellen genannt) und der Glukosehomöostase während des gesamten Erwachsenenlebens essentiell ist. *CCND2* Knockout Mäuse entwickelten Diabetes auf Grund von Veränderungen und einer geringeren Anzahl dieser Zellen (Kushner et al., 2005). Beim Menschen wurde nachgewiesen, dass eine Intronvariante des *CCND2* Gens (rs76895963) dessen Expression erhöht und dadurch die Insulinsekretion verbessert und eine schnellere Reduzierung des

Blutzuckerspiegels bewirkt wird. Zusätzlich ist das Allel mit einer größeren Körpergröße assoziiert und verringert das Risiko an Typ 2 Diabetes zu erkranken (Steinthorsdottir et al., 2014; Yaghootkar et al., 2015). Der Lead-SNP dieser Studie könnte einen ähnlichen Effekt auf die Expression von *CCND2* haben und über die Insulinsekretion die Futterverwertung positiv beeinflussen. Um den Einfluss des Lead-SNPs auf die Futterverwertung überprüfen zu können, müssen weiterführende Studien (vor allem Expressionsstudien) durchgeführt werden.

5.3.3 GWAS mit Anomaliendaten

Zur Identifizierung von Varianten, die im Zusammenhang mit angeborenen Fehlbildungen stehen, standen von acht Anomalien sowohl Rohdaten, als auch Zuchtwerte zur Verfügung. Für die beiden Phänotyparten waren von etwa 1.500 Piétrain-Ebern Genotypen und Phänotypen vorhanden. Auf Grund der geringen Datenmenge konnten für selten auftretende Anomalien (Afterlosigkeit, Nabelbruch, Zwitter und Kopfmissbildung) keine GWAS mit Rohdaten durchgeführt werden, da die Varianzen zu gering waren. Für die restlichen Merkmale wurden erfolgreich GWAS durchgeführt und insgesamt sieben QTL (Rohdaten: 4 QTL; Zuchtwerte: 3 QTL) identifiziert.

Für zwei QTL, die mit Hilfe der Zuchtwerte lokalisiert wurden, konnten keine funktionellen Kandidatengene zugeordnet werden. Der Top-SNP für das Merkmal Grätschen (1_267003877) liegt in einem Intron des *MVB12B* Gens, welches ein Bestandteil des ESCRT-I Komplexes (endosomal sorting complex required for transport) ist. Der Komplex ist bei der Sortierung von ubiquinierten Frachtmolekülen (Cargo-Molekülen) von der Plasmamembran zum Endosom beteiligt (Tsunematsu et al., 2010). Für die GWAS mit den Zwitter-Zuchtwerten lag die am stärksten assoziierte Variante in einer intergenischen Region, in der sich kein positionelles oder funktionelles Kandidatengen befindet.

Für das Merkmal Kopfmissbildung liegt der Top-SNP (19_106559176) in einem Intron des *BCORLI* Gens, welches als Kandidatengen in Betracht gezogen werden kann. Mutationen in diesem Gen verursachen das Shukla-Vernon Syndrom (OMIM: 301029), welches eine X-chromosomal rezessiv vererbte neurologische Entwicklungsstörung ist. Zu den Symptomen zählen intellektuelle Entwicklungs- und Verhaltensstörungen, wie Autismus-Spektrum-Störungen und Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS). Bei Betroffenen können auch Krampfanfälle und Kleinhirnatrophien auftreten, sowie dysmorphologische Merkmale, wie eine hohe bzw. große Stirn, hypoplastische Ohren mit angewachsenen Ohrläppchen, ein abfallender

Lidachsenverlauf (palpebral fissuren) oder hervorstehende Unterkiefer (Muthusamy et al., 2021; Shukla et al., 2019). Die Anomalie „Kopfmissbildung“ beim Schwein ist kein klar definierter Phänotyp und reicht von Fehlbildungen an Ohren, Rüssel und Kiefer bis zu Gaumenspalten oder Hydrocephalus. Auf Grund der vielfältigen Ausprägung von Kopfmissbildungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass das *BCORLI* Gen mit einem Teil der Missbildungen in Verbindung steht. Um dies genauer untersuchen zu können, wäre es notwendig mehr Fälle ausfindig zu machen und diese systematisch zu unterteilen, um genauere Phänotypen für weitere Studien zur Verfügung zu haben. Ein Problem ist, dass Kopfmissbildungen selten vorkommen (3,8% der gemeldeten Ferkel mit Anomalien, Abbildung 11) und es schwer sein wird eine ausreichend große Datenmenge zu generieren.

Zittern bei neugeborenen Ferkeln (auch Tremor genannt), ist eine neurologische Erkrankung. Die betroffenen Ferkel haben eine erhöhte Sterblichkeit, da ihre Fähigkeit zu Säugen beeinträchtigt ist. Zusätzlich erhöht sich durch ihre geringe Mobilität die Wahrscheinlichkeit, von ihrer Mutter erdrückt zu werden. Gründe für das Auftreten des Tremors können virale Erkrankungen der Sau während der Trächtigkeit sein, wobei auch genetische Ursachen vermutet werden (Stenberg et al., 2020). Für die Rohdaten des Merkmals Zittern konnten drei QTL identifiziert werden. Der QTL auf Chromosom 13 (13_6344399) liegt in einem Intron des *KCNH8* Gens, welches eine spannungsgesteuerte Kaliumkanaluntereinheit kodiert und als funktionelles Kandidatengen in Betracht gezogen werden kann. Zu den vielfältigen Funktionen von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen gehören unter anderem die Regulierung der Neurotransmitterfreisetzung, des Pulsschlags, der Insulinsekretion, neuronale Erregbarkeit, epithelialer Elektrolyttransport und Kontraktion der glatten Muskulatur (Ellinghaus et al., 2017; Jan & Jan, 2012). Mutationen in Kaliumkanälen sind mit der Pathogenese von Dyskinesie, Epilepsie und Ataxie verbunden. Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Erzeugung des Aktionspotentials und der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials. Störungen beeinträchtigen die Neurotransmission und können zu neuronalen Funktionsstörungen führen (Kumar et al., 2016). Es sind bereits mehrere Mutationen in Kaliumkanaluntereinheiten kodierenden Genen bekannt: bei Mäusen führen Mutationen im *KCNC1* und *KCNC3* zu Tremor, Myoklonien oder Ataxien (Matsukawa et al., 2003), eine Missense-Mutation im *KCNN2* Gen verursacht „Tremor dominant Kyoto“ (Trdk) Ratten (Kuramoto et al., 2017), beim Menschen ist eine Missense-Mutation im *KCNA1* Gen für eine Form der episodischen Ataxie Typ 1 verantwortlich (Klein et al., 2004) und eine Missense-Mutation im *KCNS2* Gen wurde bei Fällen von essenziellem Tremor (ET) identifiziert (Liu et al., 2016).

Letztgenannte Mutation wurde bei *Drosophila* im homologen Gen namens *Shab* editiert, wodurch ebenfalls Funktionsstörungen des Nervensystems beobachtet werden konnten, die sich in einem übererregbaren Phänotyp manifestierten (Smith et al., 2018). Um einen Zusammenhang zwischen dem *KCNH8* Gen und dem Auftreten von Zittern bei Ferkeln bestätigen zu können, müssten betroffene Ferkel genotypisiert werden. Zusätzlich sollte bei betroffenen Ferkeln eine Differentialdiagnose erstellt werden, da das Auftreten des Tremors auch durch Virusinfektionen ausgelöst werden kann (Stenberg et al., 2020).

Bei Ferkeln mit Kryptorchismus (auch Binneneber-Ferkel genannt), haben sich bei Geburt einer oder beide Hoden nicht in den Hodensack verlagert, sondern befinden sich weiterhin in der Bauchhöhle oder im Leistenkanal. Für die Vitalität des Ferkels hat diese Anomalie keine Auswirkung, jedoch ist ein operativer Eingriff durch einen Tierarzt notwendig, um die Ferkel zu kastrieren. Denn auch Binneneber entwickeln während ihrer Geschlechtsreife den von Verbrauchern unerwünschten Ebergeruch (Scollo et al., 2016). Auch für die Zucht sind Binneneber nicht geeignet, da bei Kryptorchiden meist eine beeinträchtigte Spermatogenese und endokrine Funktion vorliegt (Park et al., 2019). In Studien konnte gezeigt werden, dass die intrauterine Umgebung eine wichtige Rolle beim Auftreten von Kryptorchismus spielt, aber auch genetische Faktoren einen Einfluss haben und die Häufigkeit durch Gen-Hormon-Umwelt Interaktionen beeinflusst wird (Kalfa et al., 2019). In einer Studie beim Schwein (Landrasse und Edelschwein) wurde eine Heritabilität von 0,26 für Kryptorchismus geschätzt und es konnten mehrere QTL identifiziert werden (Sevillano et al., 2015). Keiner der QTL konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten GWAS mit Rohdaten für Kryptorchismus bestätigt werden. Der Top-SNP (11_70069217) des identifizierten QTL befindet sich in einem Intron des *ITGBL1* Gens, welches eine Integrin-Beta Untereinheit kodiert. Mittels Expressionsanalysen konnten Arena et al., (2018) zeigen, dass Veränderungen in der Expression von Integrin-Genen im Zusammenhang mit Kryptorchismus stehen. Zudem wurde in der Krebsforschung nachgewiesen, dass *ITGBL1* sowohl den Wnt Signalweg (Qi et al., 2020; Sun et al., 2016), als auch den TGF β Signalweg (Huang et al., 2020; Li et al., 2015) aktiviert. Störungen in beiden Signalwegen sind ebenfalls mit Kryptorchismus assoziiert (Kalfa et al., 2019). Um einen Zusammenhang zwischen dem Gen und dem Auftreten von Binnenebern zu bestätigen, sind weiterführende Studien notwendig.

Insgesamt war die Power der GWAS mit Anomaliendaten wegen der geringen Anzahl Eber (etwa 1.500) nicht besonders groß, weshalb nur wenige QTL identifiziert werden konnten. Ein

zusätzlicher Faktor, der sich negativ auf die Qualität der Ergebnisse auswirken kann ist die Qualität der Daten. Da die Anomaliendaten auf freiwilligen Meldungen basieren, können vor allem bei den Rohdaten Verzerrungen auftreten. Die Quantität der Daten wird durch die Schätzung des Anomalienwertes stetig vergrößert, weshalb die GWAS mit Anomaliendaten zu einem späteren Zeitpunkt mit mehr Daten wiederholt werden sollten. Zusätzlich könnte sich durch eine größere Datenmenge die Varianz von seltenen Anomalien wie Afterlosigkeit, Nabelbruch, Zwitter und Kopfmisbildung vergrößern wodurch auch in diesen Merkmalen eine GWAS durchführbar wäre. Außerdem wäre es wichtig Landwirte auf das Auftreten von Anomalien zu sensibilisieren und sie zu motivieren diese zu melden, um eine Verzerrung der Daten minimieren zu können.

5.3.4 Schlachtkörperlänge

5.3.4.1 QTL auf Chromosom 7

Auf Chromosom 7 wurde ein QTL für das Merkmal Anzahl Wirbel identifiziert (Fan et al., 2013; Mikawa et al., 2005; Nakano et al., 2015; Ren et al., 2012; Rohrer et al., 2015; Yang et al., 2016). Beim domestizierten Schwein ist die Anzahl Wirbel, im Vergleich zum Wildschwein mit 19 Brust- und Lendenwirbeln, nicht fixiert und variiert zwischen 21 und 23 Wirbeln (King & Roberts, 1960). Auch die mit Wirbelzahl korrelierten Merkmale Schlachtkörperlänge (Blaj et al., 2018; Nakano et al., 2015; Yang et al., 2016) und Anzahl Zitzen wurden mit diesem QTL wiederholt in Verbindung gebracht (Duijvesteijn et al., 2014; Rohrer & Nonneman, 2017; Yang et al., 2016). Als Kandidatengen wurde das *VRTN* Gen (Vertnin) identifiziert (Mikawa et al., 2011), welches für die Bildung von Brustwirbeln unentbehrlich ist. *VRTN*^{-/-} Embryonen der Maus sterben während der Entwicklung der Brustsomiten (Embryonaltag 10,5 bis 11,5) ab und *VRTN*^{+/-} Mäuse weisen signifikant weniger Brustwirbel auf als Wildtyp-Mäuse (Duan et al., 2018). Als mögliche kausale Mutationen kommen zwei funktionelle Varianten in Frage, die in einem hohen Kopplungsungleichgewicht liegen (Fan et al., 2013). Es handelt sich um eine Punktmutation g.19034A>C (Sscrofa11.1_7:g.97614602A>C, rs709317845) in der Promotorregion des *VRTN* Gens und einer Insertion g.20311_20312ins291 (Sscrofa11.1_7:g.97615896_97615897ins291) im Intron des Gens. Beide Mutationen agieren als Enhancer und haben eine additiv positive Wirkung auf die Expression von *VRTN* (Duan et al., 2018). Das *VRTN* Protein beeinflusst die Expression von *NOTCH2* (notch receptor 2) und damit die darauffolgenden Gene des Notch-Signalweges (Duan et al., 2018), welcher die Somitogenese-Taktung (Segmentation clock) reguliert (Jiang et al.,

2000). Dies führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu kürzeren Perioden der Somitogenese-Taktung und es werden mehr, aber kürzere Somiten (Vorstufe der Wirbel) gebildet (Herrgen et al., 2010). Literaturangaben über Wirbelgrößen beim Schwein (Lendenwirbel: 33,0 mm bis 37,2 mm) (Dath et al., 2007) und der Schlachtkörperlänge (15 mm längerer Schlachtkörper pro zusätzlichem Wirbel) (King & Roberts, 1960) stützen die Hypothese, dass bei Tieren mit mehr Wirbel die einzelnen Wirbel kleiner sind. Die Ergebnisse von Nakano et al. (2015) untermauern dies ebenfalls, indem die g.20311_20312ins291 Variante wesentlich stärker mit den Wirbelzahlen assoziiert ist (P-Wert für Brustwirbel: $1,7 \times 10^{-51}$) als mit Körperlängenmerkmalen (P-Wert für Schlachtkörperlänge: $1,0 \times 10^{-5}$; P-Wert für Lendenlänge: $1,8 \times 10^{-17}$).

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GWAS für das Merkmal Schlachtkörperlänge innerhalb der Rassen Piétrain und Deutsche Landrasse wurde ebenfalls ein QTL auf Chromosom 7 identifiziert. Die Top-SNPs befinden sich in der Nähe des *VRTN* Gens (Entfernung < 330 kb), lagen aber in anderen Genen (Piétrain: *ABCD4*; DL: *ENTPD5*). Varianten im *ABCD4* Gen (ATP Binding Cassette Subfamily D Member 4) wurden bereits mit der Wirbelzahl in Verbindung gebracht und es wurde vermutet, dass sie funktionelle Effekte auf das Merkmal haben könnten (van Son et al., 2019). Transkriptomanalysen, um diese Hypothese zu überprüfen, wurden jedoch nicht durchgeführt. In der Deutschen Landrasse liegt der Top-SNP im Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 5 Gen (*ENTPD5*), welches bisher noch nicht mit Körperlänge oder Wirbelzahl in Verbindung gebracht wurde. Es spielt aber eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung der Knochen des Zebrafisches und wird vor allem in deren Osteoblasten exprimiert (Huitema et al., 2012). Lleras Forero et al. (2018) zeigten ebenfalls im Zebrafisch, dass *ENTPD5* bei der Entwicklung der Corda dorsalis (Urwirbelsäule) beteiligt ist. Die Funktion des Gens ist jedoch nicht ohne weitere Untersuchungen auf andere Wirbeltiere übertragbar. Diese weiterführenden Studien zur Untersuchung der Rolle des *ENTPD5* während der Wirbelbildung und der Somitogenese-Uhr müssen erst noch durchgeführt werden. Bei genauerer Betrachtung des QTL in der Deutschen Landrasse fällt eine Gruppe von 12 gekoppelten Varianten im *LTBP2* Gen (Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2) auf. Sie sind nach der Bonferroni-Korrektur nicht signifikant mit der Schlachtkörperlänge assoziiert, sollten aber nicht ignoriert werden, da das *LTBP2* Gen ein weiteres bekanntes Kandidatengen für Brustwirbel bzw. Anzahl Rippen ist (Park et al., 2017; Zhang et al., 2016). Das *LTBP2* reguliert die Aktivität von *GDF11* (Growth Differentiation Factor 11) (Sun et al., 2011). Eine höhere Expression von *GDF11* führt zur Ausbildung einer zusätzlichen Rippe, wie in transgenen Mäusen gezeigt werden konnte (Li et al.,

2010). In der Metastudie liegt der Top-SNP im Zinc Finger Protein 410 (*ZNF410*), welches bisher noch nicht mit Körperlänge, Wirbelzahl oder Knochenbildung in Verbindung gebracht worden ist. Im signifikant assoziierten Bereich des QTL befinden sich ebenfalls die beiden bekannten Kandidatengene *VRTN* und *LTBP2*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten nicht eindeutig auf die beiden Kandidatenmutationen g.19034A>C und g.20311_20312ins291 als kausale Varianten für den QTL auf SSC7 für die Schlachtkörperlänge hin. Es sind sowohl in den GWAS innerhalb der beiden Rassen, als auch in der Metastudie Varianten in anderen Genen stärker mit dem Merkmal assoziiert als die *VRTN* Varianten. Eine Erklärung könnte eine schlechte Imputationsgenauigkeit auf Grund einer niedrigen Allelfrequenz der g.19034A>C Variante sein.

Duan et al. (2018) haben gezeigt, dass sich beide *VRTN* Mutationen additiv positiv auf die Expression von *VRTN* auswirken und somit auch auf die Expression von *NOTCH2* und die Somitogenese-Taktung. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass innerhalb des QTL weitere Mutationen in entsprechenden Kandidatengenen (*LTBP2*, *ABCD4* und *ENTPD5*) liegen, die zusätzlich die Körperlänge beeinflussen.

5.3.4.2 QTL auf Chromosom 17

Auf Chromosom 17 wurde sowohl in den GWAS innerhalb der Rassen Piétrain und Deutsche Landrasse, als auch in der Metaanalyse ein QTL mit dem Merkmal Schlachtkörperlänge assoziiert. Das bone morphogenetic protein 2 (*BMP2*) ist sowohl ein positionelles, als auch ein funktionelles Kandidatengen. Es liegt in unmittelbarer Nähe des Top-SNPs der DL-Studie und der Top-SNP der Metastudie liegt in dessen Downstream Bereich. Als funktionelles Kandidatengen wird es wegen seiner wichtigen Rolle in der Knochen- und Knorpelentwicklung in Betracht gezogen (Wozney et al., 1988). Vor allem das postnatale Knochenwachstum und die Knochenstärke wird vom *BMP2* beeinflusst, wie in Knockout Mäusen gezeigt werden konnte (McBride et al., 2014; Tsuji et al., 2006). Es wurde sowohl beim Menschen (Gudbjartsson et al., 2008), als auch beim Schaf (Kijas et al., 2012; Kim et al., 2016) mit der Körpergröße in Verbindung gebracht und in Assoziationsstudien beim Schwein wurde *BMP2* ebenfalls mehrfach als Kandidatengen aufgeführt (Blaj et al., 2018; Falker-Gieske et al., 2019; Fan et al., 2011). Eine mögliche kausale Variante ist nicht bekannt. Es könnte sich um eine regulatorische Mutation handeln, da in den NGS Daten keine proteinverändernden Mutationen im *BMP2* zu finden waren. Um mögliche regulatorische Varianten

identifizieren zu können, müssten Expressionsanalysen oder CHIP-seq Studien durchgeführt werden, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar waren. Zusätzlich muss noch geklärt werden, wie *BMP2* die Körperlänge beeinflusst. Die Tatsache, dass der QTL auf Chromosom 17 bisher nur mit Körperlänge, aber nicht mit Wirbel- oder Zitzenzahl assoziiert wurde, lässt die Vermutung zu, dass sich der QTL auf die Größe aber nicht auf die Anzahl Wirbel auswirkt. Weitere Studien zur Wirkungsweise von *BMP2* sind daher noch notwendig. Eine züchterische Nutzung des QTL wäre nur bei PI sinnvoll, da die Allelfrequenz des positiv wirkenden Allels mit 0,19 relativ gering ist und leicht erhöht werden könnte. Bei DL ist das positive Allel nahezu fixiert (AF = 0,96) und eine Selektion zur weiteren Steigerung nicht angezeigt.

5.3.5 Metaanalyse

Die Durchführung von Metaanalysen hat das Ziel die Power der GWAS zu erhöhen und falsch positive Assoziationen zu reduzieren, da mehr Tiere in die Studie einfließen (Evangelou & Ioannidis, 2013). Ein weiterer Vorteil ist, dass sich QTL die zwischen den Rassen segregieren besser eingrenzen lassen, weil große LD Blöcke durch die verschiedenen Rassen besser aufgebrochen werden können. GWAS innerhalb der Rassen erklären hingegen einen größeren Anteil der Varianz, weil QTL, die nicht in mehreren Rassen vorkommen, nicht durch Metaanalysen detektiert werden können (Raven et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für zehn Merkmale, für die in beiden Rassen genomische Zuchtwerte geschätzt werden, Metaanalysen durchgeführt. Es konnten zwei gemeinsame QTL auf Chromosom 7 und 17 für das Merkmal Schlachtkörperlänge identifiziert werden. Diese wurden in den vorherigen Abschnitten ausführlich diskutiert. Durch die stringente Definition der Assoziationssignale (P-Wert der Metaanalyse kleiner 10^{-14} und mindestens vier Größenordnungen kleiner als der kleinste P-Wert innerhalb der Rassen) wurden die restlichen QTL nicht näher betrachtet, was zu Informationsverlusten geführt haben könnte. Dennoch scheint die verwendete Definition von Assoziationssignalen in der Metaanalyse geeignet, um QTL, die in beiden Rassen segregieren, identifizieren zu können (Anhang 23). Um die Power der Metastudien in Zukunft erhöhen zu können, gibt es zwei Möglichkeiten: 1) die Anzahl der Tiere innerhalb der Rassen erhöhen oder 2) näher verwandte Rassen miteinander untersuchen. Die Anzahl Tiere pro Rasse (DL: 1754; PI: 3091) ist im Vergleich zu anderen Metastudien beim Schwein in der gleichen Größenordnung, wobei auch in diesen Analysen keine zusätzlichen QTL identifiziert wurden (Blaj et al., 2018; Zhou et al., 2021; Zhuang et al., 2019). Die Literatur zeigt, dass deutlich mehr Tiere

(>15.000) notwendig sind, um mehr QTL in Metaanalysen als in den rasseinternen GWAS zu lokalisieren (Le et al., 2017; Pausch et al., 2017). Die zweite Möglichkeit die QTL Zahl zu erhöhen, wäre näher verwandte Rassen zu verwenden, die mehr gemeinsame QTL besitzen (Berg et al., 2016). Eine Durchführung solch großer Studien beim Schwein wird auch in Zukunft eine Ausnahme bleiben, da die Schweinezucht kleinstrukturiert ist und sich die Zusammenarbeit zwischen Bundesländern oder Zuchtunternehmen oft als schwierig gestaltet.

5.3.6 Identifizierung kausaler Varianten

Trotz des großen Erfolgs von genomweiten Assoziationsstudien QTL für komplexe Merkmale zu lokalisieren, wurden nur wenige kausale Varianten identifiziert. Dies hat mehrere Ursachen: Der Top-SNP eines QTL ist selten die kausale Variante, vor allem in GWAS, die mit Chipdaten durchgeführt wurden. Auch wenn die kausale Variante imputiert wurde, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass sie nicht die höchste Signifikanz aufweist, was einer zu geringen Power der GWAS oder einer niedrigen Imputationsgenauigkeit geschuldet ist (Schaid et al., 2018). Dies könnte erklären, weshalb in den GWAS der vorliegenden Arbeit bekannte QTN (*IGF2* intron3-g.3072G>A und g.19034A>C im *VRTN*) nicht am stärksten mit den jeweiligen Merkmalen assoziiert waren. Die Imputationsgenauigkeit hängt unter anderem vom Kopplungsungleichgewicht ab. Je höher das LD einer Region, desto höher die Genauigkeit der Imputation. Andererseits erschwert ein hohes LD die Feinkartierung, da Varianten in einem hohen LD ähnliche Effekte auf ein Merkmal haben und die Identifikation der kausalen Variante kaum möglich ist (Cano-Gamez & Trynka, 2020; Schaid et al., 2018). Des Weiteren ist unklar, welche Zelltypen für das Merkmal ursächlich sind, da die Pathophysiologie komplexer Merkmale häufig Wechselwirkungen zwischen mehreren Zelltypen beinhaltet (Cano-Gamez & Trynka, 2020). Als letztes, liegen mehr als 90% der in GWAS lokalisierten Varianten in nicht kodierenden Regionen des Genoms (Maurano et al., 2012). Die Wahrscheinlichkeit, dass diese in regulatorischen Bereichen liegen und die Expression eines Gens in ihrer Nähe beeinflussen und somit das Merkmal selbst, ist sehr groß (Cano-Gamez & Trynka, 2020; Schaid et al., 2018). Zur Vereinfachung der Feinkartierung wird meist angenommen, dass nur eine Variante pro Locus einen Effekt auf ein Merkmal hat. Dies entspricht nicht der Realität, da mehrere Varianten innerhalb eines QTL Effekte auf die Genexpression haben können. Das kann auf zwei Arten geschehen: entweder addiert sich die Wirkung der Varianten linear (additiver Effekt) oder es ist eine Wechselwirkung zwischen zwei oder mehr Varianten erforderlich, um die Genexpression zu beeinflussen (epistatischer Effekt) (Javierre et al., 2016; Maurano et al., 2015).

Daraus ergibt sich, dass weiterführende Studien erforderlich sind, um GWAS-Ergebnisse zu interpretieren und kausale Varianten, Gene, die sie regulieren, und Zelltypen, in denen sie wirken, zu ermitteln. Statistische Methoden zur Bewältigung dieser Herausforderungen integrieren GWAS-Ergebnisse mit funktionellen Genomdaten wie Genexpressions- oder Chromatinaktivitätsprofilen, die in einer Reihe von Zelltypen und Geweben untersucht wurden (Cano-Gamez & Trynka, 2020).

5.4 Unfruchtbare Sauen der Deutschen Landrasse

5.4.1 Phänotyp „atypisch kleine Vulva“

5.4.1.1 Anomalien weiblicher Geschlechtsmerkmale

Es gibt unterschiedliche Ursachen für das Auftreten atypisch ausgeprägter weiblicher Geschlechtsmerkmale. Umwelteffekte, wie mykotoxin-belastetes Futter kann sich auf den weiblichen Phänotyp auswirken. Zum Beispiel löst das Fusarium-Toxin Zearalenon (ZEA), das an den Estrogenrezeptor- β bindet, Hyperöstrogenismus aus, und kann bei Jungsaunen zu Vulvovaginitis und einem vergrößerten, ödematösen Uterus führen (Osweiler, 2000). Außerdem zeigen Jungsaunen, die zearalenonhaltiges Futter zu sich genommen haben, vergrößerte Vulven im Vergleich zu Saunen, die kein ZEA aufgenommen haben (Jiang et al., 2010). Andere Mykotoxine, wie Mutterkornalkaloide wirken sich negativ auf die Milchbildung aus (Osweiler, 2000).

Unfruchtbarkeit beim Schwein ist oft durch Intersexualität bedingt, welche mit einer Häufigkeit von 0,1 bis 0,6% auftritt (Pailhoux et al., 1997). Phänotypisch kann die Ausprägung der Intersexualität folgendermaßen unterschieden werden: 1) äußerlich rein männliche Geschlechtsmerkmale mit Hoden und Wolffschen Gang; 2) äußerlich nicht eindeutig männlicher Phänotyp mit Hoden, Wolffschen und Müllerschen Gang und vergrößerter Klitoris); 3) wahre Zwitter (Hermaphroditismus) mit Hoden und Eierstöcken oder Ovotestis und äußerlich weiblichen Geschlechtsmerkmalen (Pailhoux et al., 1997). Die Ursachen für Intersexualität teilten Pailhoux et al. (1997) in drei Kategorien ein, welche in folgenden Häufigkeiten beobachtet werden konnten: bei 4% der Fälle konnten sowohl XX- als auch XY-Zellen im gleichen Tier nachgewiesen werden (eventuell Freemartin-Syndrom); bei 2% der Fälle waren Fragmente des Y-Chromosoms, inklusive des sex determining region Y Gens (*SRY* Gen) in XX-Tieren die Ursache, und bei 94% der Tiere lag eine autosomale Geschlechtsumkehr vor (weiblichen Karyotyp: 38, XX ohne *SRY* Gen). Ein Gen,

das möglicherweise eine Rolle bei der autosomalen Geschlechtsumkehr beim Schwein spielt, ist das SRY-box transcription factor 9 Gen (*SOX-9* Gen) (Brenig et al., 2015; Rousseau et al., 2013).

5.4.1.2 „Atypisch kleine Vulva“ als Hilfsmerkmal

Das zur Identifizierung von Falltieren (hier: unfruchtbare DL-Sauen) verwendete Hilfsmerkmal „Atypisch kleine Vulva“ ist ein subjektiv erfasster Phänotyp, der nicht eindeutig definiert wurde. Trotz des nicht eindeutigen Phänotyps der Vulvagröße konnte durch einen Vergleich der Genotypen von 17 Sauen, die als Tiere mit „Atypisch kleiner Vulva“ klassifiziert wurden, und 1.818 fruchtbaren DL-Sauen eine Region auf dem X-Chromosom eingegrenzt werden, in der dann die kausale Variante identifiziert werden konnte. Die erfolgreiche Durchführung der GWAS zeigt, wie robust GWAS als Werkzeug bei der Aufklärung von monogenen Erbfehlern sind, obwohl nur 11 von 17 Falltieren die Stoppmutation im *BMP15* homozygot trugen. Die Vulvagröße wird von mehreren Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel dem Alter oder der Ernährung. Unterschiede in der Vulvagröße können nicht nur zwischen vorpubertären und postpubertären Jungsaunen erheblich sein, sondern die Größe variiert auch zwischen geschlechtsreifen Sauen (Knauer et al., 2011). Zusätzlich gibt es große individuelle Unterschiede beim Eintrittsalter der Pubertät (140. bis >200. Lebensstag) (Graves et al., 2020; Knauer et al., 2011). Um die Zuverlässigkeit des Merkmals zu verbessern, hätten von einer großen Stichprobe geschlechtsreifer Sauen die Vulven vermessen werden müssen (Graves et al., 2020), was im Rahmen dieser Studie nicht durchführbar war.

Abschließend ist festzuhalten, dass die natürlichen Schwankungen der Vulvagröße die Einteilung in Fall- und Kontrolltiere erschwerte, was zu einer falschen Einordnung in 7 von 43 Fällen führte (Tabelle 11). Dennoch war es eine günstige und schnelle Methode unfruchtbare Sauen zu identifizieren und die Genauigkeit ausreichend, um die kausale Mutation zu identifizieren.

5.4.2 BMP15 in polyovulatorische Spezies

BMP15-Mutationen führen bei Schafen zu Unfruchtbarkeit (Bodin et al., 2007; Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017; Martinez-Royo et al., 2008). Beim Menschen wurden *BMP15*-Varianten mit prämaturer Ovarialinsuffizienz (POI) in Verbindung gebracht (Di Pasquale et al., 2006; Di Pasquale et al., 2004; Persani et al., 2010). Um die Funktion des *BMP15* genauer untersuchen zu können, wurden von Yan et al. (2001) *BMP15* Knockout Mäuse erzeugt, welche nicht unfruchtbar waren, sondern eine verminderte Fruchtbarkeit (kleinere Wurfgrößen) zeigten. Daraus wurde gefolgert, dass *BMP15* eine wichtige Rolle bei der Fruchtbarkeit der Maus

spielt, aber nicht unentbehrlich ist. Galloway et al. (2002) stellten die Theorie auf, dass *BMP15* nur bei mono-ovulatorischen Spezies, wie Mensch oder Schaf aber nicht bei poly-ovulatorischen Spezies wie zum Beispiel der Maus notwendig ist. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von *BMP15*-Knockdown Sauen, in denen eine Unterdrückung der Follikelentwicklung und der Ovulation beobachtet wurde, widerlegt (Qin et al., 2019; Shi et al., 2020). Auch die natürlich auftretende Knockout Variante p.R212X im *BMP15*, welche im Rahmen dieser Arbeit als kausale Mutation für das Auftreten unfruchtbarer Sauen der Deutschen Landrasse identifiziert worden ist zeigt, dass *BMP15* auch in poly-ovulatorischen Spezies essentiell für die Fruchtbarkeit sein kann (Flossmann et al., 2021).

Ergebnisse, die Aufschluss über die Unterschiede der *BMP15*-Wirkung auf die Fruchtbarkeit in poly-ovulatorischen Spezies geben könnten, wurden von Crawford & McNatty (2012) erzielt. Untersuchungen der in Oozyten exprimierte mRNA von *GDF9* und *BMP15* zeigten, dass das mRNA Verhältnis von *GDF9* zu *BMP15* direkt mit der Wurfgröße verschiedener Tierarten korreliert. So stieg das in Oozyten exprimierte *GDF9*:*BMP15*-Verhältnis vom Rotwild (0,1), zum Rind (0,24) und Schaf (1,26) bis zur Ratte (3,65) und Maus (5,19) mit entsprechend steigenden Ovulationsraten der Tierart an. Das beim Schwein ermittelte *GDF9*:*BMP15*-Verhältnis von 0,51 stimmte jedoch nicht mit den restlichen Ergebnissen überein. Die Daten zeigen, dass in den Oozyten der Schweine im Verhältnis zu Maus und Ratte wesentlich mehr *BMP15* exprimiert wird. Dies könnte erklären, weshalb *BMP15* beim Schwein essentiell für die Follikulogenese bzw. Fruchtbarkeit ist, bei der Maus aber nicht. Weiterführende Analysen zeigten, dass porcine Granulosazellen, im Gegensatz zu den von anderen untersuchten Spezies (Ratte, Schaf und Rotwild), *GDF9* exprimieren und somit das *GDF9*:*BMP15*-Verhältnis erhöhen. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass das *GDF9*:*BMP15*-Verhältnis die Ovulationsrate einer Tierart bestimmt, und erklären das niedrige *GDF9*:*BMP15*-Verhältnis in den Oozyten, der poly-ovulatorischen Spezies Schwein (Christoforou & Pitman, 2019).

5.4.3 Züchterische Nutzung der *BMP15*:p.R212X Variante

Eine züchterische Nutzung des positiven Effektes des T-Allels der p.R212X Variante (+0,41 lebend geborene Ferkel) nach Vorbild der Inverdale® Schafe („Zoetis Genetics New Zealand“, o. J.) wurde geprüft. Ein mögliches Zuchtschema wäre wie folgt: Deutsche Edelschwein (DE) Sauen werden mit T-Eber (DL-Eber hemizygot für die p.R212X Mutation im *BMP15*) belegt und auf Grund des X-chromosomal Erbgangs wären 100% der weiblichen Nachkommen (F1-Sauen) heterozygot C/T.

Alternativ homozygote und somit unfruchtbare F1-Sauen könnten durch die Paarung nicht entstehen, da die p.R212X Mutation im Edelschwein nicht segregiert. Die höhere Fruchtbarkeit der F1-Sauen würde bei der Mastferkelproduktion ausgenutzt, indem die F1-Sauen mit einer Vaterrasse, wie zum Beispiel Piétrain, besamt würden. Gegen die beschriebene züchterische Nutzung der p.R212X Variante sprechen allerdings zwei Punkte: 1) Das Zuchtschema in der bayerischen Schweinezucht passt nicht zum beschriebenen Entwurf. In Bayern werden, um die F1-Sauen zu erzeugen, DL-Sauen mit DE-Eber belegt. Um die Mutation Nutzen zu können, müssten C/T-Sauen mit DE-Eber besamt werden, wobei nur 50% der F1-Sauen heterozygot und damit fruchtbarer wären. 2) Durch die negativen Effekte des T-Allels auf ökonomisch wichtige Merkmale wie Futtermittelverwertung, Fleischanteil oder Bauchfleischanteil überwiegen die negativen ökonomischen die positiven Effekte auf die Fruchtbarkeit und es entsteht ein Verlust von 0,48 € pro Mastschwein. Die negativen Effekte konnten in dem Ausmaß nicht erwartet werden, da *BMP15* fast ausschließlich in den Eierstöcken exprimiert wird, mit minimalen Spuren in Milz, Lunge, Niere und Hypothalamus (Tang et al., 2018). Ob sich ein *BMP15*-Knockout ausschließlich beim Schwein negativ auf die Mastleistung auswirkt, kann nicht beantwortet werden, da dies für die bekannten Mutationen beim Schaf nicht untersucht wurde (Bodin et al., 2007; Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017; Martinez-Royo et al., 2008). Aus diesen Gründen sollte die p.R212X Variante nicht züchterisch genutzt werden, sondern aus der Population eliminiert. Der Frequenzverlauf des T-Allels bestätigt, dass die Eliminierung der p.R212X Variante durch Selektion bereits erfolgreich durchgeführt wurde. Die Frequenz des T-Allels sank in den Jahren 2015 – 2019 von über 0,1 auf 0,02. Erzielt wurde der starke Rückgang durch strikte Selektion auf der männlichen Seite (merzen aller T-Eber in Besamungsstationen und keine Neuaufnahme von T-Ebern) und milder Selektion auf der weiblichen Seite (Ausschluss von C/T-Sauen für die Remontierung). Dass trotz negativer Effekte auf Fleischmerkmale die Allelfrequenz des T-Allels zwischen 2010 und 2013 deutlich anstieg, könnte an dem im Jahr 2010 neu eingeführten Zuchtziel gekoppelt sein. Der Schwerpunkt des Zuchtziels in der Deutschen Landrasse verlagerte sich stark auf die Verbesserung der Fruchtbarkeit („Lfl für Tierzucht - Jahresbericht 2009“, 2010), was mit einem Selektionsvorteil für das T-Allel gleichzusetzen ist. Erst durch die verstärkte Selektion auf Fruchtbarkeit erhöhte sich die Allelfrequenz so stark, dass die Häufung von unfruchtbaren Sauen mit atypisch kleiner Vulva bemerkt und gemeldet wurde.

5.4.4 Auswirkungen der p.R212X Variante auf Reproduktionsorgane

Die Auswirkungen der p.R212X Variante auf die Reproduktionsorgane wurden an fünf für die Stoppmutation homozygoten Sauen untersucht, die durch die Verpaarung einer heterozygoten Sau mit einem Stoppmutation tragenden Eber erzeugt wurden. Als Kontrolltiere dienten drei heterozygote Vollschwwestern. Es waren deutliche Unterschiede in Größe und Anzahl Windungen zwischen den Uteri von homozygoten und heterozygoten Sauen sichtbar. An den Eierstöcken der T/T-Sauen waren im Gegensatz zu den C/T-Sauen keine sichtbaren Follikel vorhanden. Das Fehlen sichtbarer Follikel an den Eierstöcken stimmt mit Beobachtungen überein, die von ovinen *BMP15* Mutationen (FecX-I, FecX-L und FecX-Bar) berichtet wurden (Bodin et al., 2007; Braw-Tal et al., 1993; Lassoued et al., 2017). Histologische Untersuchungen der Eierstöcke beim Schaf zeigten zudem, dass sich im Cortex nur Primordialfollikel und Primärfollikel befanden, wobei auch entartete oder zurückgebildete Primärfollikel beobachtet wurden (Bodin et al., 2007). Auch beim Schwein konnte mit Hilfe von Knockout-Sauen gezeigt werden, dass die Uteri von 400 Tage alten Knockout-Sauen in ihrer Größe und Anzahl der Windungen stark unterentwickelt waren. Die Eierstöcke der ausgewachsenen Sauen waren außergewöhnlich klein und es waren ebenfalls keine sichtbaren Follikel vorhanden. Durch genauere Untersuchungen der unterentwickelten Eierstöcke waren jedoch erhebliche Mengen von Primordialfollikeln erkennbar (Shi et al., 2020). Das Fehlen sichtbarer Follikel deckt sich mit der Hypothese, dass *BMP15* eine wichtige Funktion in der Follikelreifung spielt und durch das Fehlen des Proteins die Follikulogenese nicht stattfinden kann (Persani et al., 2014).

Die höhere Fruchtbarkeit von heterozygoten Sauen im Vergleich zu Wildtyp-Sauen, sowie die Unfruchtbarkeit von homozygoten Sauen, deckt sich mit dem bei Schafen beobachteten Phänotyp von sieben Mutation im *BMP15* (Bodin et al., 2007; Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017; Martinez-Royo et al., 2008). Die erhöhte Fruchtbarkeit von heterozygoten Tieren und die Unfruchtbarkeit homozygoter Tiere wird mit folgender Hypothese erklärt: die Kombination dreier Signalwege (BMP15-Homodimere, BMP15/GDF9-Heterodimere und GDF9-Homodimere) löst die Ovulation einer Eizelle aus, wenn *BMP15* und *GDF9* intakt sind. Wird ein Schwellenwert unterschritten, führt dies zur Sterilität (totaler Ausfall durch Homozygotie von Mutationen in *BMP15* oder *GDF9*) und alles zwischen dem Schwellenwert und dem normalen Niveau (verminderte Expression durch Heterozygotie von Mutationen in *BMP15* oder *GDF9*) erhöht die Ovulationsrate (Demars et al., 2013). Es sind zwei weitere Mutationen im ovinen

BMP15 bekannt, die alternativ homozygot eine höhere Fruchtbarkeit bewirken und keine Sterilität verursachen. Bei einer der Mutationen (FecX-O) wurde gezeigt, dass das Protein durch die Missense-Mutation nur teilweise seine Funktion verliert und somit auch homozygot das *BMP15* nicht komplett ausfällt. Die zweite Mutation (FecX-Gr) verhindert bei homozygoten Auen die Bildung der *BMP15*-Homodimere, aber eine Bildung der *BMP15*/*GDF9*-Heterodimere ist möglich, wodurch der Schwellenwert überschritten wird (Demars et al., 2013). Dieser Hypothese folgend wird durch die Stoppmutation im Schwein (p.R212X) in homozygoten Sauen kein funktionsfähiges *BMP15*-Protein gebildet. Dadurch wird der für die Ovulation notwendige Schwellenwert der drei Dimere nicht erreicht, was die Unfruchtbarkeit der Sauen verursacht.

An jeweils einem Eierstock zweier alternativ homozygoter Sauen hatte sich eine Ovarialzyste gebildet. Diese entstehen aus reifen Follikeln, die mit großer Wahrscheinlichkeit durch das Ausbleiben des LH-Peaks nicht ovulieren (Roth et al., 2012; Silvia et al., 2002). Durch den LH-Peak wird die Reifung des Kumulus-Oozyten-Komplexes ausgelöst, was entscheidend für die Ovulation ist und bei der die beiden Gene *BMP15* und *GDF9* involviert sind (Sánchez & Smitz, 2012). Ein Zusammenhang zwischen den beobachteten Zysten und der p.R212X Mutation konnte im Rahmen dieser Arbeit wegen der geringen Anzahl Sauen (n = 8) nicht untersucht werden. Jedoch lag der Anteil betroffener Tiere in der kleinen Stichprobe mit 25% wesentlich höher als in anderen Studien. Bei Untersuchungen von Reproduktionsorganen aus Schlachthöfen waren nur in 6,2% der Sauen Ovarialzysten zu finden (Heinonen et al., 1998) und in Sauen, die auf Grund von Fruchtbarkeitsproblemen geschlachtet wurden, wiesen 10,5–18,5% Ovarialzysten auf (Einarsson et al., 1974; Tummaruk & Kerdangsakonwut, 2012; Tummaruk et al., 2009). Bei der Analyse von lebenden Tieren wiesen Castagna et al. (2004) nur bei 13% der Sauen mit Reproduktionsproblemen Ovarialzysten nach.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass das Fehlen von *BMP15* die Bildung von Eierstockzysten begünstigen kann gibt eine Studie mit Knockout Mäusen, in denen ebenfalls an einem oder beiden Eierstöcken Zysten auftraten, obwohl in Wildtyp-Mäusen dieser Population nie Ovarialzysten beobachtet wurden (Yan et al., 2001). Um einen möglichen Zusammenhang von *BMP15* und der Entwicklung von Eierstockzysten untersuchen zu können, sind weitere Studien sowohl in uniparen, als auch in multiparen Spezies notwendig.

6 Zusammenfassung

Die Einführung von Hochdurchsatzmethoden der Genotypisierung und Sequenzierung revolutionierte die Forschung in der Genomik und Genetik. Mit Hilfe von Genotypisierungschips wurden genomweite Assoziationsstudien (GWAS) im großen Maßstab möglich. GWAS sind ein nützliches Werkzeug, um die genetische Architektur von quantitativen Merkmalen zu entschlüsseln und Einblicke in physiologische Zusammenhänge zu gewinnen.

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl GWAS mit imputierten Sequenzdaten und Zuchtwerten für Fleisch-, Schlachtkörper- und Fruchtbarkeitsmerkmalen in den bayerischen Populationen der Deutschen Landrasse und Piétrain, als auch mit Zuchtwerten und Rohdaten von acht Anomalien für Piétraineber durchzuführen. Zusätzlich sollte die kausale Variante für das Auftreten atypisch kleiner Vulven in Deutsche Landrasse Sauen, welche in mehreren Betrieben beobachtet worden sind und sich als unfruchtbar erwiesen, identifiziert werden.

Die Arbeit basiert auf Illumina *PorcineSNP60 BeadChip* typisierten Genotypen von 6.105 Schweinen der Deutschen Landrasse und 3.700 Piétrains. Für die Imputation wurden Sequenzen von 29 DL Tieren und 46 Piétrains verwendet. Für die GWAS in der Deutschen Landrasse standen für Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale Zuchtwerte von 1.754 Tieren und für Fruchtbarkeitsmerkmale von 3.697 Tieren zur Verfügung. Bei den Piétrain Tieren wurden für die GWAS Genotypen und Phänotypen von 3.091 Tieren mit Zuchtwerten von Fleisch- und Schlachtkörpermerkmalen, 1.455 Tieren mit Anomalienzuchtwerten und von 1.675 Tieren Anomalienrohdaten verwendet. Für die Fall-Kontroll-Studie mit atypisch kleinen Vulven bei DL-Sauen wurden 17 Falltiere genotypisiert. Als Kontrollen dienten Genotypen von 1.818 fruchtbaren Sauen.

Mit Hilfe der GWAS wurden insgesamt 25 QTL auf Autosomen identifiziert. Bei den Piétrain Tieren konnte ein QTL für Fleischquantität auf Chromosom 14 lokalisiert werden, der einen größeren Effekt auf Fleischigkeit hat als der MHS Locus. Der QTL mit dem Kandidatengen *GFRA2* hat im Gegensatz zum MHS Locus keinen negativen Effekt auf die Fleischqualität. Auf Chromosom 5 ist eine QTL-Region mit dem *CCND2* Gen mit dem Merkmal Futterverwertung assoziiert. Bei der Deutschen Landrasse wurde eine QTL-Region auf Chromosom 2 identifiziert, die mit Fleischmerkmalen, Futterverwertung und täglichen Zunahmen assoziiert ist. Der QTL befindet sich in der Nähe des *IGF2* Gens. Andere Kandidatengene wie *TNNI2* und *TNNT3* liegen ebenfalls

in der Region. Für das Merkmal Schlachtkörperlänge wurden in beiden Rassen jeweils zwei QTL lokalisiert, die mittels Metaanalysen bestätigt werden konnten. Der QTL auf Chromosom 7 liegt in der Nähe des *VRTN* Gens und der QTL auf Chromosom 17 liegt in der Region des *BMP2* Gens. Für Anomalien wurden zwei QTL mit möglichen Kandidatengenen lokalisiert. Das Kandidatengen für den QTL für Kryptorchismus auf Chromosom 11 ist *ITGBL1*. Auf Chromosom 13 befindet sich ein QTL für das Merkmal Zittern, dessen Top-SNP im *KCNH8* Gen liegt.

Die GWAS mit DL-Sauen, deren Vulven ungewöhnlich klein waren, ergab ein signifikantes Signal auf dem X-Chromosom. Die Genomdaten von Schlüsseltieren der Population ermöglichten die kausale Variante, eine Stoppmutation im *BMP15* Gen (p.R212X), zu identifizieren. Es wurde gezeigt, dass für die Stoppmutation homozygote Sauen unfruchtbar sind und nicht funktionelle Eierstöcke tragen, wohingegen heterozygote Sauen fruchtbarer sind und mehr Ferkel pro Wurf produzieren als für den Wildtyp homozygote Sauen. Wegen des negativen Effekts der p.R212X Variante auf Fleischmerkmale, Futtermittelverwertung und tägliche Zunahmen wurde eine züchterische Nutzung zur Steigerung der Fruchtbarkeit nicht empfohlen, sondern zur Eliminierung aus der bayerischen DL-Population geraten.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von GWAS QTL für Fleischmerkmale, Futtermittelverwertung und Anomalien identifiziert. Die Ergebnisse bilden eine gute Basis für weiterführende Studien, um kausale Varianten zu lokalisieren und für die Zucht verwenden zu können. Außerdem wurde eine für Unfruchtbarkeit verantwortliche Mutation in Sauen der Deutschen Landrasse identifiziert und erfolgreich eliminiert, ohne dass die Keulung heterozygoter Sauen oder weiterer unfruchtbarer Sauen nötig wurde.

7 Summary

The introduction of high-throughput genotyping and sequencing methods revolutionized research in genomics and genetics. Genotyping arrays made large-scale genome-wide association studies (GWAS) possible. GWAS are a useful tool to better understand the genetic architecture of quantitative traits and provide insights into their physiological contexts.

The aim of this work was to perform GWAS with imputed sequence data and breeding values for meat, carcass and fertility traits in Bavarian populations of German Landrace and Piétrain, as well as with breeding values and raw data of eight anomalies in Piétrain boars. In addition, the causal variant for atypically small vulvae in German Landrace sows should be identified. This phenotype, which is connected with infertility has been observed on several farms.

The studies were based on *Illumina PorcineSNP60 BeadChip* genotypes from 6,105 German Landrace pigs and 3,700 Piétrains. Sequences from 46 Piétrains and 29 German Landrace pigs were used for imputation. For GWAS in the German Landrace, breeding values were available for meat and carcass traits from 1,754 animals and for fertility traits from 3,697 animals. For the Piétrain breed, genotypes and phenotypes of 3,091 animals with breeding values of meat and carcass traits, 1,455 boars with breeding values for abnormalities, and raw data for abnormalities of 1,675 boars were used for GWAS. Seventeen animals with atypically small vulva were genotyped as cases. Genotypes from 1,818 fertile German Landrace sows served as controls.

Using GWAS, a total of 25 QTL were identified on autosomes. In the Piétrain breed, a QTL and its candidate gene *GFRA2* for meat traits could be located on SSC14, which has a greater effect on meat quantity than the MHS locus. In contrast to the MHS locus the SSC14 QTL has no negative effect on meat quality. A QTL on SSC5 with *CCND2* as candidate gene is associated with feed conversion. In the German Landrace, a QTL on SSC2 is associated with meat traits, feed conversion ratio and daily gain. The QTL is located near the *IGF2* gene. Other candidate genes such as *TNNI2* and *TNNT3* are also located in the region. Two QTL for carcass length were localized in each of the two breeds, which could be confirmed by meta-analyses. The QTL on SSC7 is located near the *VRTN* gene and the QTL on SSC17 encompasses the *BMP2* gene. Two Loci and possible candidate genes affecting abnormality traits could also be located. The candidate gene for the QTL on SSC11 affecting cryptorchidism is *ITGBL1*. The QTL on SSC13 whose top SNP is located in the *KCNH8* gene, affects the incidence of the tremor phenotype.

GWAS with German Landrace sows whose vulvae were unusually small revealed a significant signal on the X chromosome. Genomic data from key animals in the population allowed identification of the causal variant, a nonsense mutation (p.R212X) in the *BMP15* gene. It was shown that homozygous sows are infertile with non-functional ovaries, whereas heterozygous sows are more fertile and produce more piglets per litter than wildtype sows. Due to the negative effect of the p.R212X variant on meat traits, feed conversion ratio and daily gain, the variant was not used to breed for increasing fertility, but is being eliminated from the Bavarian German Landrace population.

The present GWAS identified QTL for meat traits, feed conversion ratio and abnormalities. The results form a good basis for further studies to localize causal variants and use them for breeding. In addition, an infertility-causing mutation in German Landrace sows was identified and is being successfully eliminated without culling heterozygous sows or producing additional infertile sows.

8 Literatur

- Arena, S., Favalaro, A., La Face, A., Romeo, P., Scalfari, G., Turiaco, N. et al. (2018). Altered Integrins Expression of Patients Affected by Cryptorchidism. *Urologia Internationalis*, 101 (2), 219–223. Karger Publishers.
- BaZI Schwein - Detailseite. (o. J.). . Zugriff am 17.11.2020. Verfügbar unter: <https://www.lfl.bayern.de/itz/schwein/bazi/anzeigen.php>
- van Beers-Schreurs, H.M., Vellenga, L., Wensing, T. & Breukink, H.J. (1992). The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: a review. *The Veterinary Quarterly*, 14 (1), 29–34.
- Berg, I. van den, Boichard, D. & Lund, M.S. (2016). Comparing power and precision of within-breed and multibreed genome-wide association studies of production traits using whole-genome sequence data for 5 French and Danish dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 99 (11), 8932–8945. Elsevier.
- van den Berg, S., Vandenplas, J., van Eeuwijk, F.A., Bouwman, A.C., Lopes, M.S. & Veerkamp, R.F. (2019). Imputation to whole-genome sequence using multiple pig populations and its use in genome-wide association studies. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 51.
- Binder, S. (2004). *Einfluss von Varianten des α (1,2) Fucosyltransferase (FUT1) - Gens auf Escherichia coli F18 - Adhäsionsphänotyp und auf Merkmale der Mastleistung und der Schlachtkörperqualität in bayerischen Schweinepopulationen* (Monographie). Technische Universität München.
- van Binsbergen, R., Bink, M.C., Calus, M.P., van Eeuwijk, F.A., Hayes, B.J., Hulsegge, I. et al. (2014). Accuracy of imputation to whole-genome sequence data in Holstein Friesian cattle. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 46 (1), 41.
- Blaj, I., Tetens, J., Preuß, S., Bennewitz, J. & Thaller, G. (2018). Genome-wide association studies and meta-analysis uncovers new candidate genes for growth and carcass traits in pigs. *PLOS ONE*, 13 (10), e0205576. Public Library of Science.
- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L. et al. (2007). A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*, 148 (1), 393–400.
- Boichard, D. (2002). PEDIG: A Fortran Package for Pedigree Analysis Suited for Large Populations. *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 28.
- Bouwman, A.C. & Veerkamp, R.F. (2014). Consequences of splitting whole-genome sequencing effort over multiple breeds on imputation accuracy. *BMC Genetics*, 15.
- Braw-Tal, R., McNatty, K.P., Smith, P., Heath, D.A., Hudson, N.L., Phillips, D.J. et al. (1993). Ovaries of Ewes Homozygous for the X-Linked Inverdale Gene (FecXI) are Devoid of Secondary and Tertiary Follicles but Contain Many Abnormal Structures. *Biology of Reproduction*, 49 (5), 895–907.
- Brenig, B., Duan, Y., Xing, Y., Ding, N., Huang, L. & Schütz, E. (2015). Porcine SOX9 Gene Expression Is Influenced by an 18bp Indel in the 5'-Untranslated Region. *PLoS ONE*, 10 (10).
- Browning, B.L., Zhou, Y. & Browning, S.R. (2018). A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels. *The American Journal of Human Genetics*, 103 (3), 338–348.
- Cano-Gamez, E. & Trynka, G. (2020). From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases. *Frontiers in Genetics*, 11, 424.

- Castagna, C.D., Peixoto, C.H., Bortolozzo, F.P., Wentz, I., Neto, G.B. & Ruschel, F. (2004). Ovarian cysts and their consequences on the reproductive performance of swine herds. *Animal Reproduction Science*, 81 (1), 115–123.
- Casteels, M., Van Oeckel, M.J., Boschaerts, L., Spincemaille, G. & Boucqué, Ch.V. (1995). The relationship between carcass, meat and eating quality of three pig genotypes. *Meat Science*, 40 (2), 253–269.
- Chang, C.C., Chow, C.C., Tellier, L.C., Vattikuti, S., Purcell, S.M. & Lee, J.J. (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4, 7.
- Christoforou, E.R. & Pitman, J.L. (2019). Intrafollicular growth differentiation factor 9: bone morphogenetic 15 ratio determines litter size in mammals†. *Biology of Reproduction*, 100 (5), 1333–1343.
- Crawford, J.L. & McNatty, K.P. (2012). The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348 (1), 339–343.
- Daetwyler, H.D., Capitan, A., Pausch, H., Stothard, P., van Binsbergen, R., Brøndum, R.F. et al. (2014). Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature Genetics*, 46 (8), 858–865. Nature Publishing Group.
- Dath, R., Ebinesan, A.D., Porter, K.M. & Miles, A.W. (2007). Anatomical measurements of porcine lumbar vertebrae. *Clinical Biomechanics*, 22 (5), 607–613.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64 (4), 849–859. Elsevier.
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L. et al. (2013). Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperproliferacy phenotype in sheep. *PLoS genetics*, 9 (4), e1003482.
- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P. & Persani, L. (2004). Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *American Journal of Human Genetics*, 75 (1), 106–111.
- Di Pasquale, E., Rossetti, R., Marozzi, A., Bodega, B., Borgato, S., Cavallo, L. et al. (2006). Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91 (5), 1976–1979.
- Duan, Y., Zhang, H., Zhang, Z., Gao, J., Yang, J., Wu, Z. et al. (2018). VRTN is Required for the Development of Thoracic Vertebrae in Mammals. *International Journal of Biological Sciences*, 14 (6), 667–681.
- Duijvesteijn, N., Knol, E.F., Merks, J.W., Crooijmans, R.P., Groenen, M.A., Bovenhuis, H. et al. (2010). A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. *BMC Genetics*, 11 (1), 42.
- Duijvesteijn, N., Veltmaat, J.M., Knol, E.F. & Harlizius, B. (2014). High-resolution association mapping of number of teats in pigs reveals regions controlling vertebral development. *BMC genomics*, 15, 542.
- Einarsson, S., Linde, C. & Settergren, I. (1974). Studies of the genital organs of gilts culled for anoestrus. *Theriogenology*, 2 (5), 109–113.
- Ellinghaus, E., Ellinghaus, D., Krusche, P., Greiner, A., Schreiber, C., Nikolaus, S. et al. (2017). Genome-wide association analysis for chronic venous disease identifies EFEMP1 and KCNH8 as susceptibility loci. *Scientific Reports*, 7.
- Erbe, M., Hayes, B.J., Matukumalli, L.K., Goswami, S., Bowman, P.J., Reich, C.M. et al. (2012). Improving accuracy of genomic predictions within and between dairy cattle breeds with

- imputed high-density single nucleotide polymorphism panels. *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 4114–4129. Elsevier.
- Evangelou, E. & Ioannidis, J.P.A. (2013). Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 14 (6), 379–389. Nature Publishing Group.
- Ewing, B. & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, 8 (3), 186–194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8 (3), 175–185.
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L. et al. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 20.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, É. & Gyles, C.L. (2005). Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, 6 (1), 17–39. Cambridge University Press.
- Falker-Gieske, C., Blaj, I., Preuß, S., Bennewitz, J., Thaller, G. & Tetens, J. (2019). GWAS for Meat and Carcass Traits Using Imputed Sequence Level Genotypes in Pooled F2-Designs in Pigs. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 9 (9), 2823–2834.
- Fan, B., Onteru, S.K., Du, Z.-Q., Garrick, D.J., Stalder, K.J. & Rothschild, M.F. (2011). Genome-wide association study identifies Loci for body composition and structural soundness traits in pigs. *PLoS One*, 6 (2), e14726.
- Fan, Y., Xing, Y., Zhang, Z., Ai, H., Ouyang, Z., Ouyang, J. et al. (2013). A Further Look at Porcine Chromosome 7 Reveals VRTN Variants Associated with Vertebral Number in Chinese and Western Pigs. *PLoS ONE*, 8 (4).
- Flossmann, G., Wurmser, C., Pausch, H., Tenghe, A., Dodenhoff, J., Dahinten, G. et al. (2021). A nonsense mutation of bone morphogenetic protein-15 (BMP15) causes both infertility and increased litter size in pigs. *BMC Genomics*, 22 (1), 38.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E. et al. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science (New York, N.Y.)*, 253 (5018), 448–451.
- Galloway, S.M., Gregan, S.M., Wilson, T., McNatty, K.P., Juengel, J.L., Ritvos, O. et al. (2002). Bmp15 mutations and ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191 (1), 15–18.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P.E., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S. et al. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25 (3), 279–283.
- Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Hardenbol, P., Willis, T.D., Yu, F., Yang, H. et al. (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426 (6968), 789–796. Nature Publishing Group.
- Goddard, M.E. & Hayes, B.J. (2009). Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics*, 10 (6), 381–391.
- Goodwin, S., McPherson, J.D. & McCombie, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17 (6), 333–351. Nature Publishing Group.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8 (3), 195–202.
- Graves, K.L., Mordhorst, B.R., Wright, E.C., Hale, B.J., Stalder, K.J., Keating, A.F. et al. (2020). Identification of measures predictive of age of puberty onset in gilts. *Translational Animal Science*, 4 (1), 285–292. Oxford Academic.

- Gudbjartsson, D.F., Walters, G.B., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Halldorsson, B.V., Zusmanovich, P. et al. (2008). Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nature Genetics*, 40 (5), 609–615.
- Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R. et al. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70 (4), 900–909.
- Harris, C.R., Millman, K.J., van der Walt, S.J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D. et al. (2020). Array programming with NumPy. *Nature*, 585 (7825), 357–362. Nature Publishing Group.
- Hayes, B. (2013). Overview of Statistical Methods for Genome-Wide Association Studies (GWAS). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1019, 149–169.
- He, C., Holme, J. & Anthony, J. (2014). SNP genotyping: the KASP assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1145, 75–86.
- Heather, J.M. & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107 (1), 1–8.
- Heinonen, M., Leppävuori, A. & Pyörälä, S. (1998). Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. *Animal Reproduction Science*, 52 (3), 235–244.
- Herrgen, L., Ares, S., Morelli, L.G., Schröter, C., Jülicher, F. & Oates, A.C. (2010). Intercellular Coupling Regulates the Period of the Segmentation Clock. *Current Biology*, 20 (14), 1244–1253. Elsevier.
- Hirose, K., Mikawa, S., Okumura, N., Noguchi, G., Fukawa, K., Kanaya, N. et al. (2013). Association of swine vertnin (VRTN) gene with production traits in Duroc pigs improved using a closed nucleus breeding system. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 84 (3), 213–221.
- <https://allseq.com/>. (o. J.). *AllSeq*. Zugriff am 8.1.2021. Verfügbar unter: <https://allseq.com/knowledge-bank/ngs-necropolis/solid/>
- <https://www.genecards.org>. (o. J.). . Zugriff am 12.1.2021. Verfügbar unter: <https://www.genecards.org/>
- <https://www.genome.gov>. (o. J.). *Genome.gov*. Zugriff am 7.1.2021. Verfügbar unter: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>
- <https://www.illumina.com>. (o. J.). . Zugriff am 8.1.2021. Verfügbar unter: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
- Hu, Z.-L., Dracheva, S., Jang, W., Maglott, D., Bastiaansen, J., Rothschild, M.F. et al. (2005). A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. *Mammalian Genome*, 16 (10), 792–800.
- Huang, J., Ellinghaus, D., Franke, A., Howie, B. & Li, Y. (2012). 1000 Genomes-based imputation identifies novel and refined associations for the Wellcome Trust Case Control Consortium phase 1 Data. *European Journal of Human Genetics*, 20 (7), 801–805.
- Huang, W., Yu, D., Wang, M., Han, Y., Lin, J., Wei, D. et al. (2020). ITGBL1 promotes cell migration and invasion through stimulating the TGF- β signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *Cell Proliferation*, 53 (7), e12836.
- Huitema, L.F.A., Apschner, A., Logister, I., Spoorendonk, K.M., Bussmann, J., Hammond, C.L. et al. (2012). *Entpd5* is essential for skeletal mineralization and regulates phosphate homeostasis in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (52), 21372–21377.

- Hunt, S.E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D. et al. (2018). Ensembl variation resources. *Database*, 2018 (bay119).
- Hunter, J.D. (2007). Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science and Engineering*, 9, 90–95.
- Ikegawa, S. (2012). A Short History of the Genome-Wide Association Study: Where We Were and Where We Are Going. *Genomics & Informatics*, 10 (4), 220–225.
- Ingwersen, J. & Tholen, E. (2009). *Erhebung von Populationsdaten tiergenetischer Ressourcen in Deutschland: Schweine* (No. BLE 114-50.10.02228/06-E). Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (2012). Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *The Journal of Physiology*, 590 (Pt 11), 2591–2599.
- Javierre, B.M., Burren, O.S., Wilder, S.P., Kreuzhuber, R., Hill, S.M., Sewitz, S. et al. (2016). Lineage-Specific Genome Architecture Links Enhancers and Non-coding Disease Variants to Target Gene Promoters. *Cell*, 167 (5), 1369-1384.e19. Elsevier.
- Jeon, J.-T., Carlborg, Ö., Törnsten, A., Giuffra, E., Amarger, V., Chardon, P. et al. (1999). A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nature Genetics*, 21 (2), 157–158. Nature Publishing Group.
- Jiang, L., Zheng, Z., Qi, T., Kemper, K.E., Wray, N.R., Visscher, P.M. et al. (2019). A resource-efficient tool for mixed model association analysis of large-scale data. *Nature Genetics*, 51 (12), 1749–1755. Nature Publishing Group.
- Jiang, S.Z., Yang, Z.B., Yang, W., Yao, B.Q., Zhao, H., Liu, F.X. et al. (2010). Effects of Feeding Purified Zearalenone Contaminated Diets with or without Clay Enterosorbent on Growth, Nutrient Availability, and Genital Organs in Post-weaning Female Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23.
- Jiang, Y.-J., Aerne, B.L., Smithers, L., Haddon, C., Ish-Horowicz, D. & Lewis, J. (2000). Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature*, 408 (6811), 475–479. Nature Publishing Group.
- Johnson, A.D. (2010). An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics*, 26 (10), 1386–1389.
- Kalfa, N., Gaspari, L., Ollivier, M., Philibert, P., Bergougnoux, A., Paris, F. et al. (2019). Molecular genetics of hypospadias and cryptorchidism recent developments. *Clinical Genetics*, 95 (1), 122–131.
- Kijas, J.W., Lenstra, J.A., Hayes, B., Boitard, S., Porto Neto, L.R., San Cristobal, M. et al. (2012). Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biology*, 10 (2).
- Kim, E.-S., Elbeltagy, A.R., Aboul-Naga, A.M., Rischkowsky, B., Sayre, B., Mwacharo, J.M. et al. (2016). Multiple genomic signatures of selection in goats and sheep indigenous to a hot arid environment. *Heredity*, 116 (3), 255–264.
- King, J.W.B. & Roberts, R.C. (1960). Carcass length in the bacon pig; its association with vertebrae numbers and prediction from radiographs of the young pig. *Animal Science*, 2 (1), 59–65. Cambridge University Press.
- Klein, A., Boltshauser, E., Jen, J. & Baloh, R.W. (2004). Episodic Ataxia Type 1 with Distal Weakness: A Novel Manifestation of a Potassium Channelopathy. *Neuropediatrics*, 35 (2), 147–149. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York.
- Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R.S., Haynes, C. et al. (2005). Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 308 (5720), 385–389.

- Knauer, M.T., Cassady, J.P., Newcom, D.W. & See, M.T. (2011). Phenotypic and genetic correlations between gilt estrus, puberty, growth, composition, and structural conformation traits with first-litter reproductive measures. *Journal of Animal Science*, 89 (4), 935–942.
- Kulski, J.K. (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. IntechOpen.
- Kumar, K.R., Cowley, M.J. & Davis, R.L. (2019). Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 45 (7), 661–673. Thieme Medical Publishers.
- Kumar, P., Kumar, D., Jha, S.K., Jha, N.K. & Ambasta, R.K. (2016). Chapter Three - Ion Channels in Neurological Disorders (Ion Channels as Therapeutic Targets, Part A). In R. Donev (Hrsg.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Band 103, S. 97–136). Academic Press.
- Kuramoto, T., Yokoe, M., Kunisawa, N., Ohashi, K., Miyake, T., Higuchi, Y. et al. (2017). Tremor dominant Kyoto (Trdk) rats carry a missense mutation in the gene encoding the SK2 subunit of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Brain Research*, 1676, 38–45.
- Kushner, J.A., Ciemerych, M.A., Sicinska, E., Wartschow, L.M., Teta, M., Long, S.Y. et al. (2005). Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (9), 3752–3762.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822), 860–921. Nature Publishing Group.
- Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., Rekik, M. et al. (2017). FecX Bar a Novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep. *BMC Genetics*, 18, 43.
- Le, T.H., Christensen, O.F., Nielsen, B. & Sahana, G. (2017). Genome-wide association study for conformation traits in three Danish pig breeds. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 49.
- LfL für Tierzucht - Jahresbericht 2009. (2010). . Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Zugriff am 20.1.2021. Verfügbar unter: https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/verschiedenes/dateien/jahresbericht_2009_itz_institut_f%C3%BCr_tierzucht.pdf
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. et al. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25 (16), 2078–2079.
- Li, X.-Q., Du, X., Li, D.-M., Kong, P.-Z., Sun, Y., Liu, P.-F. et al. (2015). ITGBL1 Is a Runx2 Transcriptional Target and Promotes Breast Cancer Bone Metastasis by Activating the TGFβ Signaling Pathway. *Cancer Research*, 75 (16), 3302–3313. American Association for Cancer Research.
- LI, Z., KAWASUMI, M., ZHAO, B., MOISYADI, S. & YANG, J. (2010). Transgenic Over-Expression of Growth Differentiation Factor 11 Propeptide in Skeleton Results in Transformation of the Seventh Cervical Vertebra Into a Thoracic Vertebra. *Molecular reproduction and development*, 77 (11), 990–997.
- Liu, X., Hernandez, N., Kisselev, S., Floratos, A., Sawle, A., Ionita-Laza, I. et al. (2016). Identification of candidate genes for familial early-onset essential tremor. *European Journal of Human Genetics*, 24 (7), 1009–1015.
- Lleras Forero, L., Narayanan, R., Huitema, L.F., VanBergen, M., Apschner, A., Peterson-Maduro, J. et al. (2018). Segmentation of the zebrafish axial skeleton relies on notochord sheath cells and not on the segmentation clock. *eLife*, 7.

- Lopes, M.S., Bastiaansen, J.W.M., Harlizius, B., Knol, E.F. & Bovenhuis, H. (2014). A genome-wide association study reveals dominance effects on number of teats in pigs. *PLoS One*, 9 (8), e105867.
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N. et al. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47 (W1), W636–W641.
- Marchini, J. & Howie, B. (2010). Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 11 (7), 499–511. Nature Publishing Group.
- Marchini, J., Howie, B., Myers, S., McVean, G. & Donnelly, P. (2007). A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nature Genetics*, 39 (7), 906–913. Nature Publishing Group.
- Martinez-Royo, A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A. et al. (2008). A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics*, 39 (3), 294–297.
- Matsukawa, H., Wolf, A.M., Matsushita, S., Joho, R.H. & Knöpfel, T. (2003). Motor Dysfunction and Altered Synaptic Transmission at the Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapse in Mice Lacking Potassium Channels Kv3.1 and Kv3.3. *The Journal of Neuroscience*, 23 (20), 7677–7684.
- Matukumalli, L.K., Lawley, C.T., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., Allan, M.F., Heaton, M.P. et al. (2009). Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. *PLoS ONE*, 4 (4).
- Maurano, M.T., Haugen, E., Sandstrom, R., Vierstra, J., Shafer, A., Kaul, R. et al. (2015). Large-scale identification of sequence variants influencing human transcription factor occupancy in vivo. *Nature Genetics*, 47 (12), 1393–1401.
- Maurano, M.T., Humbert, R., Rynes, E., Thurman, R.E., Haugen, E., Wang, H. et al. (2012). Systematic Localization of Common Disease-Associated Variation in Regulatory DNA. *Science*, 337 (6099), 1190–1195. American Association for the Advancement of Science.
- McBride, S.H., McKenzie, J.A., Bedrick, B.S., Kuhlmann, P., Pasteris, J.D., Rosen, V. et al. (2014). Long Bone Structure and Strength Depend on BMP2 from Osteoblasts and Osteocytes, but Not Vascular Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 9 (5).
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A. et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20 (9), 1297–1303.
- McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*, 56–61. Gehalten auf der Proceedings of the 9th Python in Science Conference.
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S.E., Riat, H.S., Ritchie, G.R.S., Thormann, A. et al. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17, 122.
- Meijerink, E., Fries, R., Vögeli, P., Masabanda, J., Wigger, G., Stricker, C. et al. (1997). Two $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase genes on porcine Chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammalian Genome*, 8 (10), 736–741.
- Meijerink, E., Neuenschwander, S., Fries, R., Dinter, A., Bertschinger, H.U., Stranzinger, G. et al. (2000). A DNA polymorphism influencing $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to Escherichia coli F18 adhesion. *Immunogenetics*, 52 (1), 129–136.

- Mikawa, S., Hayashi, T., Nii, M., Shimanuki, S., Morozumi, T. & Awata, T. (2005). Two quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosomes 1 and 7 affecting the number of vertebrae. *Journal of Animal Science*, 83 (10), 2247–2254.
- Mikawa, S., Sato, S., Nii, M., Morozumi, T., Yoshioka, G., Imaeda, N. et al. (2011). Identification of a second gene associated with variation in vertebral number in domestic pigs. *BMC Genetics*, 12, 5.
- Moxley, R.A. (2000). Edema disease. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 16 (1), 175–185.
- Muthusamy, B., Bellad, A., Girimaji, S.C. & Pandey, A. (2021). Shukla-Vernon Syndrome: A Second Family with a Novel Variant in the BCORL1 Gene. *Genes*, 12 (3).
- Nakano, H., Sato, S., Uemoto, Y., Kikuchi, T., Shibata, T., Kadowaki, H. et al. (2015). Effect of VRTN gene polymorphisms on Duroc pig production and carcass traits, and their genetic relationships. *Animal Science Journal*, 86 (2), 125–131.
- Newmiwaka, J. (2019). *Bericht zur Markt- und Versorgungslage Fleisch 2019*. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Verfügbar unter: https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/BZL/Daten-Berichte/Fleisch/2019BerichtFleisch.pdf?__blob=publicationFile&v=2
- Nezer, C., Moreau, L., Brouwers, B., Coppieters, W., Detilleux, J., Hanset, R. et al. (1999). An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nature Genetics*, 21 (2), 155–156. Nature Publishing Group.
- Nickerson, D.A., Tobe, V.O. & Taylor, S.L. (1997). PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Research*, 25 (14), 2745–2751.
- Nicolazzi, E.L., Biffani, S., Biscarini, F., Wengel, P.O. ter, Caprera, A., Nazzicari, N. et al. (2015). Software solutions for the livestock genomics SNP array revolution. *Animal Genetics*, 46 (4), 343–353.
- Nosková, A., Wurmser, C., Crysanto, D., Sironen, A., Uimari, P., Fries, R. et al. (2020). Deletion of porcine BOLL is associated with defective acrosomes and subfertility in Yorkshire boars. *Animal Genetics*, n/a (n/a).
- Ochala, J. (2008). Thin filament proteins mutations associated with skeletal myopathies: defective regulation of muscle contraction. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 86 (11), 1197–1204.
- Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA. Sydney School of Veterinary Science. (o. J.). . Zugriff am 11.11.2020. Verfügbar unter: <https://omia.org/>
- Osweiler, G.D. (2000). Mycotoxins. Contemporary issues of food animal health and productivity. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 16 (3), 511–530, vii.
- Otsuka, F., McTavish, K.J. & Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*, 78 (1), 9–21.
- Pailhoux, E., Pelliniemi, L., Barbosa, A., Parma, P., Kuopio, T. & Cotinot, C. (1997). Relevance of intersexuality to breeding and reproductive biotechnology programs; XX sex reversal in pigs (Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society). *Theriogenology*, 47 (1), 93–102.
- Panagiotou, O.A., Willer, C.J., Hirschhorn, J.N. & Ioannidis, J.P.A. (2013). The Power of Meta-Analysis in Genome Wide Association Studies. *Annual review of genomics and human genetics*, 14, 441–465.
- Park, H.-B., Han, S.-H., Lee, J.-B. & Cho, I.-C. (2017). Rapid Communication: High-resolution quantitative trait loci analysis identifies LTBP2 encoding latent transforming growth factor

- beta binding protein 2 associated with thoracic vertebrae number in a large F2 intercross between Landrace and Korean native pigs. *Journal of Animal Science*, 95 (5), 1957–1962.
- Park, H.-J., Song, H., Woo, J.-S., Chung, H.-J., Park, J.-K., Cho, K.-H. et al. (2019). Expression patterns of male germ cell markers in cryptorchid pig testes. *Acta Histochemica*, 121 (7), 784–790.
- Pausch, H., Aigner, B., Emmerling, R., Edel, C., Götz, K.-U. & Fries, R. (2013). Imputation of high-density genotypes in the Fleckvieh cattle population. *Genetics, selection, evolution: GSE*, 45, 3.
- Pausch, H., Emmerling, R., Gredler-Grandl, B., Fries, R., Daetwyler, H.D. & Goddard, M.E. (2017). Meta-analysis of sequence-based association studies across three cattle breeds reveals 25 QTL for fat and protein percentages in milk at nucleotide resolution. *BMC Genomics*, 18 (1), 853.
- Pausch, H., Kölle, S., Wurmser, C., Schwarzenbacher, H., Emmerling, R., Jansen, S. et al. (2014). A Nonsense Mutation in TMEM95 Encoding a Nondescript Transmembrane Protein Causes Idiopathic Male Subfertility in Cattle. *PLoS Genet*, 10 (1), e1004044.
- Pausch, H., MacLeod, I.M., Fries, R., Emmerling, R., Bowman, P.J., Daetwyler, H.D. et al. (2017). Evaluation of the accuracy of imputed sequence variant genotypes and their utility for causal variant detection in cattle. *Genetics, selection, evolution: GSE*, 49 (1), 24.
- Perez, F. & Granger, B.E. (2007). IPython: A System for Interactive Scientific Computing. *Computing in Science Engineering*, 9 (3), 21–29. Gehalten auf der Computing in Science Engineering.
- Persani, L., Rossetti, R. & Cacciato, C. (2010). Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45 (5), 257–279. Society for Endocrinology.
- Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciato, C. & Fabre, S. (2014). The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Human Reproduction Update*, 20 (6), 869–883.
- Pig QTL Database. (o. J.). . Zugriff am 30.6.2021. Verfügbar unter: <https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary?summ=clas&qtl=33,143&pub=733&trait=699&gene=288>
- Qanbari, S., Pausch, H., Jansen, S., Somel, M., Strom, T.M., Fries, R. et al. (2014). Classic Selective Sweeps Revealed by Massive Sequencing in Cattle. *PLoS Genetics*, 10 (2).
- Qi, L., Song, F. & Ding, Y. (2020). Regulatory Mechanism of ITGEBL1 in the Metastasis of Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. Frontiers.
- Qin, Y., Tang, T., Li, W., Liu, Z., Yang, X., Shi, X. et al. (2019). Bone Morphogenetic Protein 15 Knockdown Inhibits Porcine Ovarian Follicular Development and Ovulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7.
- Ramos, A.M., Crooijmans, R.P.M.A., Affara, N.A., Amaral, A.J., Archibald, A.L., Beever, J.E. et al. (2009). Design of a High Density SNP Genotyping Assay in the Pig Using SNPs Identified and Characterized by Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE*, 4 (8).
- Raven, L.-A., Cocks, B.G. & Hayes, B.J. (2014). Multibreed genome wide association can improve precision of mapping causative variants underlying milk production in dairy cattle. *BMC Genomics*, 15 (1), 62.
- Ren, D.R., Ren, J., Ruan, G.F., Guo, Y.M., Wu, L.H., Yang, G.C. et al. (2012). Mapping and fine mapping of quantitative trait loci for the number of vertebrae in a White Duroc × Chinese Erhualian intercross resource population. *Animal Genetics*, 43 (5), 545–551.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G. et al. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29 (1), 24–26.

- Rohrer, G.A. & Nonneman, D.J. (2017). Genetic analysis of teat number in pigs reveals some developmental pathways independent of vertebra number and several loci which only affect a specific side. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 49.
- Rohrer, G.A., Nonneman, D.J., Wiedmann, R.T. & Schneider, J.F. (2015). A study of vertebra number in pigs confirms the association of vertnin and reveals additional QTL. *BMC Genetics*, 16.
- Rossi, J., Herzig, K.-H., Vöikar, V., Hiltunen, P.H., Segerstråle, M. & Airaksinen, M.S. (2003). Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor $\alpha 2$. *The Journal of Clinical Investigation*, 112 (5), 707–716. American Society for Clinical Investigation.
- Rossi, J., Luukko, K., Poteryaev, D., Laurikainen, A., Sun, Y.F., Laakso, T. et al. (1999). Retarded Growth and Deficits in the Enteric and Parasympathetic Nervous System in Mice Lacking GFR $\alpha 2$, a Functional Neurturin Receptor. *Neuron*, 22 (2), 243–252. Elsevier.
- Roth, Z., Biran, D., Lavon, Y., Dafni, I., Yakobi, S. & Braw-Tal, R. (2012). Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95 (4), 1729–1737. Elsevier.
- Rousseau, S., Iannuccelli, N., Mercat, M.-J., Naylies, C., Thouly, J.-C., Servin, B. et al. (2013). A Genome-Wide Association Study Points out the Causal Implication of SOX9 in the Sex-Reversal Phenotype in XX Pigs. *PLOS ONE*, 8 (11), e79882. Public Library of Science.
- Sánchez, F. & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis (Molecular Genetics of Human Reproductive Failure). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822 (12), 1896–1912.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12), 5463–5467.
- Schaid, D.J., Chen, W. & Larson, N.B. (2018). From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nature reviews. Genetics*, 19 (8), 491–504.
- Scollo, A., Martelli, P., Borri, E. & Mazzoni, C. (2016). Pig surgery: cryptorchidectomy using an inguinal approach. *Veterinary Record*, 178 (24), 609–609.
- Seabald, S. & Perktold, J. (2010). statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. *9th Python in Science Conference*.
- Sevillano, C.A., Lopes, M.S., Harlizius, B., Hanenberg, E.H., Knol, E.F. & Bastiaansen, J.W. (2015). Genome-wide association study using deregressed breeding values for cryptorchidism and scrotal/inguinal hernia in two pig lines. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 47 (1).
- Sharma, A., Lee, J.S., Dang, C.G., Sudrajad, P., Kim, H.C., Yeon, S.H. et al. (2015). Stories and Challenges of Genome Wide Association Studies in Livestock — A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28 (10), 1371–1379.
- Sheng, J.-J. & Jin, J.-P. (2016). TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, Regulation, and Protein Structure-Function Relationships. *Gene*, 576 (1 Pt 3), 385–394.
- Shi, X., Tang, T., Lin, Q., Liu, H., Qin, Y., Liang, X. et al. (2020). Efficient generation of bone morphogenetic protein 15-edited Yorkshire pigs using CRISPR/Cas9. *Biology of Reproduction*, 103 (5), 1054–1068. Oxford Academic.
- Shukla, A., Girisha, K.M., Somashekar, P.H., Nampoothiri, S., McClellan, R. & Vernon, H.J. (2019). Variants in the transcriptional corepressor BCORL1 are associated with an X-linked disorder of intellectual disability, dysmorphic features, and behavioral abnormalities. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 179 (5), 870–874.

- Silveira, A.C.P., Freitas, P.F.A., César, A.S.M., Cesar, A.S.M., Antunes, R.C., Guimarães, E.C. et al. (2011). Influence of the halothane gene (HAL) on pork quality in two commercial crossbreeds. *Genetics and molecular research: GMR*, 10 (3), 1479–1489.
- Silvia, W.J., Hatler, T.B., Nugent, A.M. & Laranja da Fonseca, L.F. (2002). Ovarian follicular cysts in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis (Fourth International Conference on Farm Animal Endocrinology). *Domestic Animal Endocrinology*, 23 (1), 167–177.
- Sironen, A., Uimari, P., Nagy, S., Paku, S., Andersson, M. & Vilkki, J. (2010). Knobbed acrosome defect is associated with a region containing the genes STK17b and HECW2 on porcine chromosome 15. *BMC Genomics*, 11 (1), 699.
- de Smet, S., Bloemen, H., van de Voorde, G., Spincemaille, G. & Berckmans, D. (1998). Meat and carcass quality in two pig lines of different stress-susceptibility genotype and their crosses. *Animal Science*, 66 (02), 441–447.
- Smith, P., Arias, R., Sonti, S., Odgerel, Z., Santa-Maria, I., McCabe, B.D. et al. (2018). A Drosophila Model of Essential Tremor. *Scientific Reports*, 8.
- van Son, M., Lopes, M.S., Martell, H.J., Derks, M.F.L., Gangsei, L.E., Kongsro, J. et al. (2019). A QTL for Number of Teats Shows Breed Specific Effects on Number of Vertebrae in Pigs: Bridging the Gap Between Molecular and Quantitative Genetics. *Frontiers in Genetics*, 10.
- Steinhorsdottir, V., Thorleifsson, G., Sulem, P., Helgason, H., Grarup, N., Sigurdsson, A. et al. (2014). Identification of low-frequency and rare sequence variants associated with elevated or reduced risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 46 (3), 294–298.
- Stenberg, H., Jacobson, M. & Malmberg, M. (2020). A review of congenital tremor type A-II in piglets. *Animal Health Research Reviews*, 21 (1), 84–88. Cambridge University Press.
- Sun, L., Wang, D., Li, X., Zhang, L., Zhang, H. & Zhang, Y. (2016). Extracellular matrix protein ITGBL1 promotes ovarian cancer cell migration and adhesion through Wnt/PCP signaling and FAK/SRC pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 145–151.
- Sun, X., Essalmani, R., Susan-Resiga, D., Prat, A. & Seidah, N.G. (2011). Latent Transforming Growth Factor β -Binding Proteins-2 and -3 Inhibit the Proprotein Convertase 5/6A. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (33), 29063–29073.
- Tam, L.G., Berg, E.P., Gerrard, D.E., Sheiss, E.B., Tan, F.J., Okos, M.R. et al. (1998). Effect of halothane genotype on porcine meat quality and myoglobin autoxidation. *Meat Science*, 49 (1), 41–53.
- Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G. & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 20 (8), 467–484. Nature Publishing Group.
- Tang, J., Hu, W., Di, R., Liu, Q., Wang, X., Zhang, X. et al. (2018). Expression Analysis of the Prolific Candidate Genes, BMPR1B, BMP15, and GDF9 in Small Tail Han Ewes with Three Fecundity (FecB Gene) Genotypes. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 8 (10).
- Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B.D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L. et al. (2006). BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Genetics*, 38 (12), 1424–1429.
- Tsunematsu, T., Yamauchi, E., Shibata, H., Maki, M., Ohta, T. & Konishi, H. (2010). Distinct functions of human MVB12A and MVB12B in the ESCRT-I dependent on their posttranslational modifications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399 (2), 232–237.
- Tummaruk, P. & Kesdaangakonwut, S. (2012). Factors affecting the incidence of cystic ovaries in replacement gilts. *Comparative Clinical Pathology*, 21 (1), 1–7.

- Tummaruk, P., Kesdangsakonwut, S. & Kunavongkrit, A. (2009). Relationships among specific reasons for culling, reproductive data, and gross morphology of the genital tracts in gilts culled due to reproductive failure in Thailand. *Theriogenology*, *71* (2), 369–375.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. et al. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40* (15), e115.
- Van Laere, A.-S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L. et al. (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, *425* (6960), 832–836.
- VanRaden, P.M., Null, D.J., Sargolzaei, M., Wiggans, G.R., Tooker, M.E., Cole, J.B. et al. (2013). Genomic imputation and evaluation using high-density Holstein genotypes. *Journal of Dairy Science*, *96* (1), 668–678. Elsevier.
- Vaser, R., Adusumalli, S., Leng, S.N., Sikic, M. & Ng, P.C. (2016). SIFT missense predictions for genomes. *Nature Protocols*, *11* (1), 1–9. Nature Publishing Group.
- Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I. & Yang, J. (2012). Five Years of GWAS Discovery. *American Journal of Human Genetics*, *90* (1), 7–24.
- Wadapurkar, R.M. & Vyas, R. (2018). Computational analysis of next generation sequencing data and its applications in clinical oncology. *Informatics in Medicine Unlocked*, *11*, 75–82.
- Wainschtein, P., Jain, D.P., Yengo, L., Zheng, Z., TOPMed Anthropometry Working Group, T.-O. for P.M.C., Cupples, L.A. et al. (2019). Recovery of trait heritability from whole genome sequence data. *bioRxiv*, 588020. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Warr, A., Affara, N., Aken, B., Beiki, H., Bickhart, D.M., Billis, K. et al. (2019). An improved pig reference genome sequence to enable pig genetics and genomics research. *bioRxiv*, 668921. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. & Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, *25* (9), 1189–1191.
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, *171* (4356), 737–738. Nature Publishing Group.
- Wei, B. & Jin, J.-P. (2016). TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform Genes, Regulation, and Structure-Function Relationships. *Gene*, *582* (1), 1–13.
- Westra, H.-J., Jansen, R.C., Fehrmann, R.S.N., te Meerman, G.J., van Heel, D., Wijmenga, C. et al. (2011). MixupMapper: correcting sample mix-ups in genome-wide datasets increases power to detect small genetic effects. *Bioinformatics*, *27* (15), 2104–2111.
- Willer, C.J., Li, Y. & Abecasis, G.R. (2010). METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics*, *26* (17), 2190–2191.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W. et al. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science (New York, N.Y.)*, *242* (4885), 1528–1534.
- Wray, N.R., Kemper, K.E., Hayes, B.J., Goddard, M.E. & Visscher, P.M. (2019). Complex Trait Prediction from Genome Data: Contrasting EBV in Livestock to PRS in Humans: Genomic Prediction. *Genetics*, *211* (4), 1131–1141.
- Xu, Z.Y., Yang, H., Xiong, Y.Z., Deng, C.Y., Li, F.E., Lei, M.G. et al. (2010). Identification of three novel SNPs and association with carcass traits in porcine TNNI1 and TNNI2. *Molecular Biology Reports*, *37* (7), 3609–3613.
- Yaghootkar, H., Stancáková, A., Freathy, R.M., Vangipurapu, J., Weedon, M.N., Xie, W. et al. (2015). Association analysis of 29,956 individuals confirms that a low-frequency variant at CCND2 halves the risk of type 2 diabetes by enhancing insulin secretion. *Diabetes*, *64* (6), 2279–2285.

- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C. et al. (2001). Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Molecular Endocrinology*, 15 (6), 854–866.
- Yan, G., Guo, T., Xiao, S., Zhang, F., Xin, W., Huang, T. et al. (2018). Imputation-Based Whole-Genome Sequence Association Study Reveals Constant and Novel Loci for Hematological Traits in a Large-Scale Swine F2 Resource Population. *Frontiers in Genetics*, 9.
- Yan, G., Qiao, R., Zhang, F., Xin, W., Xiao, S., Huang, T. et al. (2017). Imputation-Based Whole-Genome Sequence Association Study Rediscovered the Missing QTL for Lumbar Number in Sutai Pigs. *Scientific Reports*, 7.
- Yang, H., Xu, Z., Ma, Z., Xiong, Y., Deng, C. & Zuo, B. (2009). Molecular Cloning and Comparative Characterization of the Porcine Troponin I Family. *Animal Biotechnology*, 21 (1), 64–76. Taylor & Francis.
- Yang, J., Huang, L., Yang, M., Fan, Y., Li, L., Fang, S. et al. (2016). Possible introgression of the VRTN mutation increasing vertebral number, carcass length and teat number from Chinese pigs into European pigs. *Scientific Reports*, 6, 19240.
- Yang, J., Lee, S.H., Goddard, M.E. & Visscher, P.M. (2011). GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *American Journal of Human Genetics*, 88 (1), 76–82.
- Yang, J., Zaitlen, N.A., Goddard, M.E., Visscher, P.M. & Price, A.L. (2014). Advantages and pitfalls in the application of mixed model association methods. *Nature genetics*, 46 (2), 100–106.
- Zhang, L.-C., Yue, J.-W., Pu, L., Wang, L.-G., Liu, X., Liang, J. et al. (2016). Genome-wide study refines the quantitative trait locus for number of ribs in a Large White × Minzhu intercross pig population and reveals a new candidate gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 1–6.
- Zhang, W., Kuhlers, D.L. & Rempel, W.E. (1992). Halothane gene and swine performance. *Journal of Animal Science*, 70 (5), 1307–1313.
- Zhou, S., Ding, R., Meng, F., Wang, X., Zhuang, Z., Quan, J. et al. (2021). A meta-analysis of genome-wide association studies for average daily gain and lean meat percentage in two Duroc pig populations. *BMC Genomics*, 22 (1), 12.
- Zhuang, Z., Li, S., Ding, R., Yang, M., Zheng, E., Yang, H. et al. (2019). Meta-analysis of genome-wide association studies for loin muscle area and loin muscle depth in two Duroc pig populations. *PLoS ONE*, 14 (6).
- Zoetis Genetics New Zealand. (o. J.). . Zugriff am 20.1.2021. Verfügbar unter:
<https://genetics.zoetisus.com/newzealand/newzealand/products/sheep/inverdale.aspx>
- Zuchtbericht Schwein 2019. (2020, März). . Verfügbar unter:
https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/itz/dateien/schwein_zuchtbericht2019.pdf
- Zuchtwertschätzung für Anomalien. (o. J.). . Zugriff am 12.8.2020. Verfügbar unter:
<https://www.lfl.bayern.de/itz/schwein/049905/index.php>

9 Anhang

Anhang 1: Übersicht der NGS Datenanalyse

Name	Rasse	Geschlecht	Lab-ID	Gesamte Reads	Kartierte Reads [%]	Duplikate [%]	Abdeckung
100788	DL	2	PL064	93.538.632	99,29	1,10	4,63
100787	DL	1	PL066	94.073.816	99,39	1,16	4,65
100781	DL	2	PL037	89.901.323	99,38	1,07	4,45
PL204	DL	1	PL204	109.020.130	99,38	1,24	5,39
Bremius	DL	1	I-100	259.252.672	99,07	3,01	12,55
Ma	DL	2	I-108	294.959.233	92,12	3,14	13,23
PL116	DL	1	PL116	111.974.527	99,28	1,22	5,53
PA	DL	2	I-103	241.173.530	99,25	3,01	11,68
Leichi	DL	2	I-106	256.922.612	96,70	2,66	12,17
PL130	DL	1	PL130	94.199.637	99,30	1,19	4,65
PL138	DL	2	PL138	86.143.760	99,29	0,65	4,28
PL163	DL	2	PL163	103.103.093	99,28	1,24	5,09
100772	DL	2	PL041	81.008.644	99,37	0,71	4,03
PL106	DL	1	PL106	90.040.366	99,13	1,20	4,44
100782	DL	1	PL027	99.056.893	99,23	1,15	4,89
PL104	DL	1	PL104	86.558.297	99,20	1,14	4,27
Ma	DL	2	I-105	262.003.092	96,01	2,70	12,32
PL063	DL	2	PL063	83.673.598	99,24	1,22	4,13
PL114	DL	1	PL114	94.171.718	99,29	1,11	4,66
Nortruma	DL	1	I-123	399.113.869	98,84	1,82	19,49
100777	DL	2	PL051	90.510.452	99,45	1,16	4,48
PL211	DL	2	PL211	138.122.245	99,36	0,66	6,87
PL119	DL	1	PL119	88.219.362	99,21	1,13	4,36
Berlinga	DL	2	I-31	247.374.075	99,13	1,33	9,77
Bretan	DL	1	I-20	267.397.963	99,21	4,41	10,24
100778	DL	1	PL069	91.928.702	99,38	1,17	4,55
PL054	DL	2	PL054	115.502.767	99,06	1,14	5,70
100771	DL	1	PL025	86.878.311	99,39	0,71	4,32
Belbery	DL	1	I-17	332.633.242	99,13	4,48	12,71
Nabret	DL	1	I-88	200.120.615	98,77	1,26	9,83
PL158	DL	1	PL158	103.154.838	99,24	1,29	5,09
PL125	DL	1	PL125	83.358.777	99,21	1,16	4,12

9 Anhang

Name	Rasse	Geschlecht	Lab-ID	Gesamte Reads	Kartierte Reads [%]	Duplikate [%]	Abdeckung
PL056	DL	2	PL056	81.758.205	99,24	1,25	4,03
100769	DL	2	PL033	244.157.714	99,40	1,29	12,06
100768	DL	2	PL049	247.746.027	99,15	1,32	12,21
100767	DL	1	PL052	233.476.299	99,33	1,34	11,52
PL132	DL	1	PL132	107.283.272	99,23	1,18	5,30
Lobito	DL	1	I-18	365.989.487	99,20	4,84	13,95
PL141	DL	2	PL141	93.660.808	99,30	1,25	4,62
PL201	DL	1	PL201	113.620.355	99,36	1,28	5,61
Eskuck	DL	1	I-99	259.543.749	99,05	2,98	12,55
PL136	DL	1	PL136	103.422.099	99,29	1,31	5,10
PL165	DL	2	PL165	116.151.728	99,24	1,22	5,73
100780	DL	1	PL070	85.654.742	99,38	1,08	4,24
PL194	DL	1	PL194	109.203.473	99,37	1,27	5,40
PL101	DL	2	PL101	123.117.576	99,29	1,27	6,08
PL127	DL	1	PL127	97.872.429	99,22	1,14	4,84
PL048	DL	2	PL048	110.252.541	99,26	1,24	5,44
Urgoro	DL	1	I-22	290.776.065	99,16	4,57	11,11
PL107	DL	1	PL107	85.039.046	99,28	1,35	4,19
PL172	DL	2	PL172	128.140.060	99,32	1,26	6,32
PL129	DL	1	PL129	101.885.436	99,21	1,25	5,03
Laut	DL	2	I-107	287.314.881	97,52	1,90	13,83
PL160	DL	2	PL160	98.063.062	99,31	1,22	4,84
PL023	DL	1	PL023	93.286.684	99,27	1,18	4,61
Tokat	DL	1	I-87	263.677.865	99,02	1,30	12,96
PL115	DL	1	PL115	91.598.232	99,27	1,21	4,52
Schrigrana	DL	2	I-32	160.534.207	99,15	1,37	7,90
PL146	DL	1	PL146	88.322.003	99,27	1,34	4,36
PL040	DL	1	PL040	116.434.954	99,23	1,27	5,74
PL131	DL	1	PL131	99.964.452	99,29	1,35	4,93
PL145	DL	2	PL145	110.682.098	99,25	1,29	5,46
PL205	DL	1	PL205	113.448.057	99,30	1,25	5,60
PL162	DL	1	PL162	85.455.030	99,07	1,28	4,20
PL177	DL	1	PL177	121.300.695	99,30	1,26	5,99
PL039	DL	2	PL039	115.028.934	99,22	1,27	5,68
PL143	DL	1	PL143	89.723.270	99,20	1,19	4,43

9 Anhang

Name	Rasse	Geschlecht	Lab-ID	Gesamte Reads	Kartierte Reads [%]	Duplikate [%]	Abdeckung
100786	DL	1	PL059	95.150.642	99,34	1,19	4,70
PL055	DL	1	PL055	97.065.754	99,10	1,30	4,78
PL182	DL	1	PL182	113.883.304	99,38	1,23	5,63
Ka	DL	2	I-30	192.954.496	97,39	1,45	9,33
PL139	DL	1	PL139	83.331.102	99,26	1,29	4,11
PL207	DL	2	PL207	139.787.246	99,33	0,63	6,95
Lobret	DL	1	I-19	271.452.078	99,22	4,45	10,39
PL178	DL	2	PL178	113.625.328	99,41	1,27	5,61
100775	DL	1	PL026	79.930.135	99,36	1,02	3,96
PL198	DL	1	PL198	110.906.264	99,36	1,13	5,48
PL150	DL	2	PL150	96.308.140	99,16	1,30	4,75
Ka	DL	2	I-102	281.750.903	98,84	2,74	13,64
100776	DL	1	PL021	80.558.790	99,45	1,21	3,99
Ka	DL	2	I-64	266.254.148	99,28	1,31	13,13
Filkat	DL	1	I-23	362.440.676	99,30	4,58	13,86
Lobrusus	DL	1	I-24	334.212.272	99,30	1,38	16,48
100785	DL	2	PL050	103.108.117	99,41	1,19	5,10
100784	DL	1	PL017	96.073.947	98,97	1,22	4,73
100770	DL	1	PL036	89.162.340	99,35	0,71	4,43
Lasko	DL	1	I-25	358.855.402	99,15	4,93	13,66
Ko	DL	2	I-124	170.630.785	98,64	1,51	8,33
PL058	DL	2	PL058	112.900.165	98,87	1,26	5,55
PL164	DL	1	PL164	86.030.736	99,18	1,15	4,25
PL135	DL	1	PL135	140.867.544	99,24	0,93	6,98
Nabuck	DL	1	I-72	245.902.649	99,26	1,28	12,11
PL202	DL	2	PL202	113.219.968	99,33	1,23	5,59
PL197	DL	1	PL197	109.247.673	99,32	1,24	5,40
Sudoku	DL	1	I-89	291.853.150	99,03	3,09	14,11
100774	DL	1	PL022	103.279.937	99,28	1,17	5,10
PL126	DL	1	PL126	95.307.192	99,26	1,23	4,71
PL210	DL	2	PL210	129.274.182	99,39	0,65	6,43
PL103	DL	1	PL103	114.971.323	99,31	1,25	5,67
100766	DL	1	PL028	245.191.172	99,39	1,31	12,11
Nasspa	DL	1	I-120	283.880.222	98,74	1,54	13,90
Epoche	DL	1	I-26	274.409.018	99,25	1,29	13,54

9 Anhang

Name	Rasse	Geschlecht	Lab-ID	Gesamte Reads	Kartierte Reads [%]	Duplikate [%]	Abdeckung
Norkum	DL	1	I-86	277.300.466	99,04	1,30	13,65
Hampshire1	HA	1	Hampshire1	261.108.629	99,30	2,17	12,77
Hampshire2	HA	1	Hampshire2	232.674.631	99,44	2,29	11,39
Hampshire4	HA	1	Hampshire4	273.862.036	99,40	2,23	13,40
Hampshire3	HA	1	Hampshire3	238.083.235	99,43	2,23	11,66
Sabine	PI	2	I-119	202.105.500	98,57	1,49	9,88
Botul	PI	1	I-74	240.994.828	99,41	1,04	11,94
Waldo	PI	1	I-12	288.640.720	99,00	3,01	13,95
Belli	PI	2	I-110	261.556.950	97,40	1,68	12,61
Zagunt	PI	1	I-15	381.876.091	99,21	3,14	14,81
Nimante	PI	2	I-116	218.528.770	98,69	1,55	10,69
Maestruk	PI	1	I-80	256.856.446	98,83	1,35	12,61
Moos	PI	1	I-2	275.180.232	99,05	3,16	13,28
Wadmil	PI	1	I-84	296.408.496	99,04	1,66	14,53
NAN	PI	2	I-90	293.207.037	98,92	3,02	14,17
Wadroc	PI	1	I-77	303.074.924	98,89	1,66	14,84
Mareno	PI	1	I-76	313.667.431	98,88	1,57	15,37
Rimond	PI	1	I-7	291.100.174	99,24	4,71	11,11
Wadhoch	PI	1	I-75	244.996.326	99,04	1,69	12,01
Maestik	PI	1	I-82	292.304.499	98,91	1,33	14,37
Ribul	PI	1	I-81	247.812.984	98,84	1,33	12,17
Menotti	PI	1	I-9	370.660.809	99,21	2,91	14,41
Hannibal	PI	1	I-3	298.941.427	90,61	1,59	13,41
Besara	PI	2	I-117	213.870.612	98,89	1,34	10,50
Velkan	PI	1	I-4	348.644.814	98,95	3,36	13,46
Rimoff	PI	1	I-115	284.369.371	99,25	1,72	13,97
Makrol	PI	1	I-78	326.993.518	99,06	1,55	16,05
Mutasch	PI	1	I-79	327.044.926	99,06	1,69	16,04
Boresch	PI	1	I-5	262.494.873	99,20	4,70	10,02
Indever	PI	2	I-96	229.370.230	97,68	2,99	10,95
Bazole	PI	2	I-109	246.465.054	97,01	1,44	11,87
Nizacue	PI	2	I-28	215.022.764	98,79	1,43	10,55
Falko	PI	1	I-29	221.484.147	98,45	1,58	10,81
Bosco	PI	1	I-73	215.396.902	99,36	0,97	10,67
Canadis	PI	1	I-83	283.196.101	99,06	1,40	13,93

9 Anhang

Name	Rasse	Geschlecht	Lab-ID	Gesamte Reads	Kartierte Reads [%]	Duplikate [%]	Abdeckung
Belkant	PI	1	I-14	347305678	99,22	2,94	13,50
100238	PI	1	100238	238.404.092	99,40	1,96	11,63
100227	PIH	1	100227	253.558.750	99,45	1,68	12,39
100228	PIH	1	100228	290.996.019	99,28	1,77	14,18
100229	PIH	1	100229	239.338.857	99,38	1,72	11,68
100230	PIH	1	100230	256.443.357	99,13	1,80	12,46
100231	PIH	1	100231	225.924.490	98,55	1,60	10,95
100232	PIH	1	100232	252.558.860	99,37	1,59	12,34
100233	PIH	1	100233	273.555.615	99,40	2,45	13,25
100234	PIH	1	100234	364.433.079	99,38	2,69	17,60
100235	PIH	1	100235	279.385.220	99,33	2,39	13,53
100236	PIH	1	100236	224.080.524	98,77	1,79	10,89
100237	PIH	1	100237	278.570.882	99,26	2,22	13,51
100239	PIH	1	100239	249.952.580	99,42	2,20	12,14
100240	PIH	1	100240	247.992.251	99,35	2,13	12,05
100241	PIH	1	100241	233.669.488	99,34	1,97	11,39

DL: Deutsche Landrasse; PI: Piétrain; PIH: Baden Württembergische Piétrain; HA: Hampshire;
Geschlecht 1: männlich; Geschlecht 2: weiblich;

Anhang 2: Abgleich der Sequenz- mit Chip-Genotypen (4.690 SNPs)

Lab-ID	Rasse	Anz. inkompatible SNPs	Übereinstimmung [%]
Ingenis-23	DL	87	98,13
Ingenis-120	DL	89	98,10
Ingenis-102	DL	108	97,70
Ingenis-14	PI	79	98,31
Ingenis-79	PI	73	98,44
Ingenis-81	PI	120	97,44
Ingenis-116	PI	133	97,16
Ingenis-106	DL	114	97,57
Ingenis-64	DL	110	97,65
Ingenis-103	DL	119	97,46
Ingenis-20	DL	118	97,48
Ingenis-86	DL	101	97,78
Ingenis-72	DL	103	97,80
Ingenis-110	PI	101	97,85
Ingenis-5	PI	104	97,78
Ingenis-7	PI	106	97,74
Ingenis-4	PI	95	97,97

9 Anhang

Lab-ID	Rasse	Anz. inkompatible SNPs	Übereinstimmung [%]
Ingenis-96	PI	109	97,67
Ingenis-29	PI	141	96,99
Ingenis-109	PI	94	98,00
Ingenis-3	PI	83	98,23
Ingenis-117	PI	135	97,12
Ingenis-15	PI	81	98,27
Ingenis-9	PI	83	98,23
Ingenis-19	DL	118	97,48
Ingenis-28	PI	121	97,42
Ingenis-105	DL	112	97,61
Ingenis-31	DL	144	96,93
Ingenis-84	PI	95	97,97
Ingenis-12	PI	84	98,21
Ingenis-77	PI	105	97,76
Ingenis-83	PI	97	97,93
Ingenis-30	DL	148	96,84
Ingenis-32	DL	174	96,28
Ingenis-24	DL	83	98,23
Ingenis-88	DL	159	96,61
Ingenis-115	PI	96	97,95
Ingenis-82	PI	95	97,95
Ingenis-73	PI	121	97,42
Ingenis-76	PI	98	97,91
Ingenis-119	PI	153	96,73
Ingenis-124	DL	189	95,97
Ingenis-87	DL	99	97,88
Ingenis-22	DL	121	97,41
Ingenis-74	PI	90	98,08
Ingenis-108	DL	146	96,88
Ingenis-75	PI	109	97,68
Ingenis-107	DL	106	97,74
Ingenis-78	PI	82	98,25
Ingenis-100	DL	113	97,59
Ingenis-99	DL	113	97,59
Ingenis-26	DL	99	97,89
Ingenis-2	PI	95	97,97
Ingenis-89	DL	89	98,10
Ingenis-90	DL	2.702	41,82
Ingenis-25	DL	89	98,10
Ingenis-80	PI	100	97,87

9 Anhang

Lab-ID	Rasse	Anz. inkompatible SNPs	Übereinstimmung [%]
Ingenis-17	DL	86	98,16
Ingenis-123	DL	65	98,61
Ingenis-18	DL	81	98,27

Anz. Inkompatible SNPs: Anzahl SNPs ohne Übereinstimmung der Sequenz- und Chip-Genotypen

Anhang 3: Top 20 des Genotypenabgleichs zwischen Ingenis-90 und 2.238 Piétrains

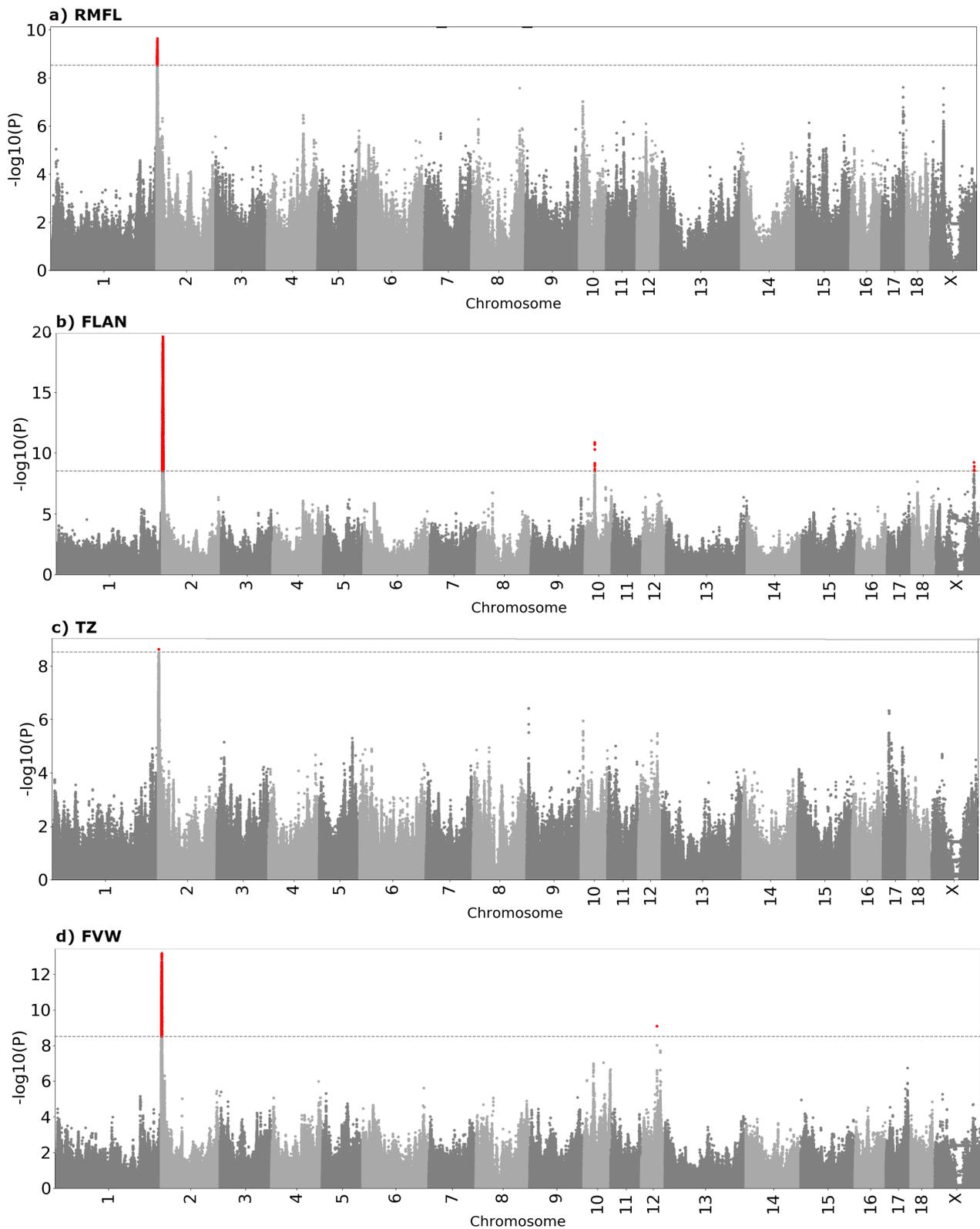
unique_id	Name	Vater	Anz. SNPs	Anz. inkompatible SNPs	Kompatibilität [%]
3565483	Zagunt	Zagel	22.178	7.430	66,50
3999207	Zabek	Zagunt	22.176	7.511	66,13
4032601	Zadent	Zagunt	22.163	7.737	65,09
4077341	Zagati	Zagunt	22.167	8.182	63,09
4161599	Zagbuch	Zagunt	22.169	8.191	63,05
4096488	Zukop	Zagunt	22.169	8.350	62,33
4020979	Zag	Zagunt	22.163	8.388	62,15
4075756	Zagreich	Zagunt	22.174	8.459	61,85
4231436	Zebu	Zagunt	22.169	8.604	61,19
3934265	Zapata	Zagunt	22.154	8.609	61,14
4232021	Bosat	Bosco	22.168	8.617	61,13
4304742	Zagsel	Zagunt	22.141	8.619	61,07
3967207	Zamu	Zagunt	22.170	8.668	60,90
4317496	Walnard	Waldo	22.166	8.753	60,51
4421716	Wadgold	Wadhoch	22.159	8.750	60,51
3614581	Zagus	Zagel	22.170	8.776	60,41
4161621	Zadif	Zagunt	22.167	8.799	60,31
4281709	Zagfus	Zagunt	22.155	8.795	60,30
4120431	Zagsa	Zagunt	22.163	8.821	60,20
3938619	Zalem	Zagunt	22.161	8.838	60,12

Anz. SNPs: Anzahl abgleichbarer SNPs zwischen Ingenis-90 und dem jeweiligen Eber; Anz. Inkompatible SNPs: Anzahl SNPs ohne Übereinstimmung zwischen Ingenis-90 und dem jeweiligen Eber;

Anhang 4: Zusammenfassung der Merkmale in der Deutschen Landrasse

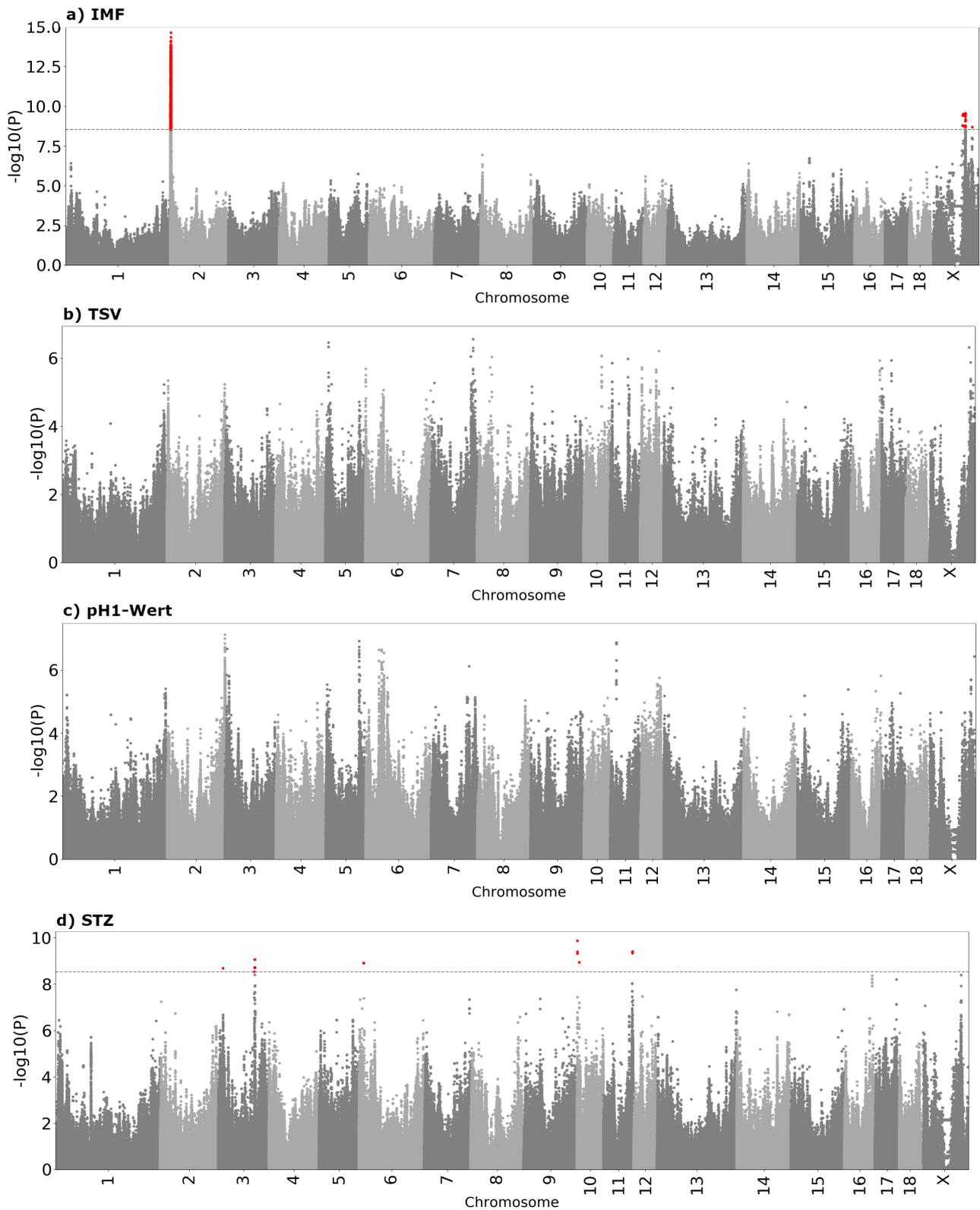
Merkmal	N	Minimum	Maximum	Mittelwert (±SD)
Rückenmuskelfläche [cm ²]	108.168	-14,96	18,91	0,32 (3,45)
Bauchfleischanteil [%]	108.168	-14,47	7,61	-1,72 (2,31)
Schlachtkörperlänge [cm]	108.168	-10,63	8,49	0,20 (1,83)
Tägliche Zunahmen [g/Tag]	108.168	-379,00	184,00	-86,39 (81,33)
Tropfsaftverlust [%]	108.168	-1,21	0,68	-0,06 (0,14)
Futtermittelnutzung [kg/kg]	108.168	-0,77	0,36	-0,17 (0,16)
Intramuskulärer Fettgehalt [%]	108.168	-1,10	0,80	-0,17 (0,19)
Fleisch-Fett-Verhältnis [cm ² /cm ²]	108.168	-0,55	0,27	-0,06 (0,08)
Fleischanteil [%]	108.168	-11,39	8,41	-1,15 (2,01)
pH1-Wert	108.168	-0,73	0,23	-0,03 (0,08)
Stülpzitzen	108.168	-39,00	20,00	-3,23 (4,58)
Lebend geborene Ferkel [N]	78.141	-4,29	2,2	-1,53 (0,88)
Aufgezoogene Ferkel [N]	78.141	-3,59	1,49	-1,27 (0,68)
Abgesetzte Ferkel [N]	78.141	-2,29	1,19	-0,55 (0,55)
Verbleiberate [% der Sauen im 2. Wurf]	78.141	-15	11	1,86 (2,35)

N: Anzahl Tiere; SD: Standardabweichung;

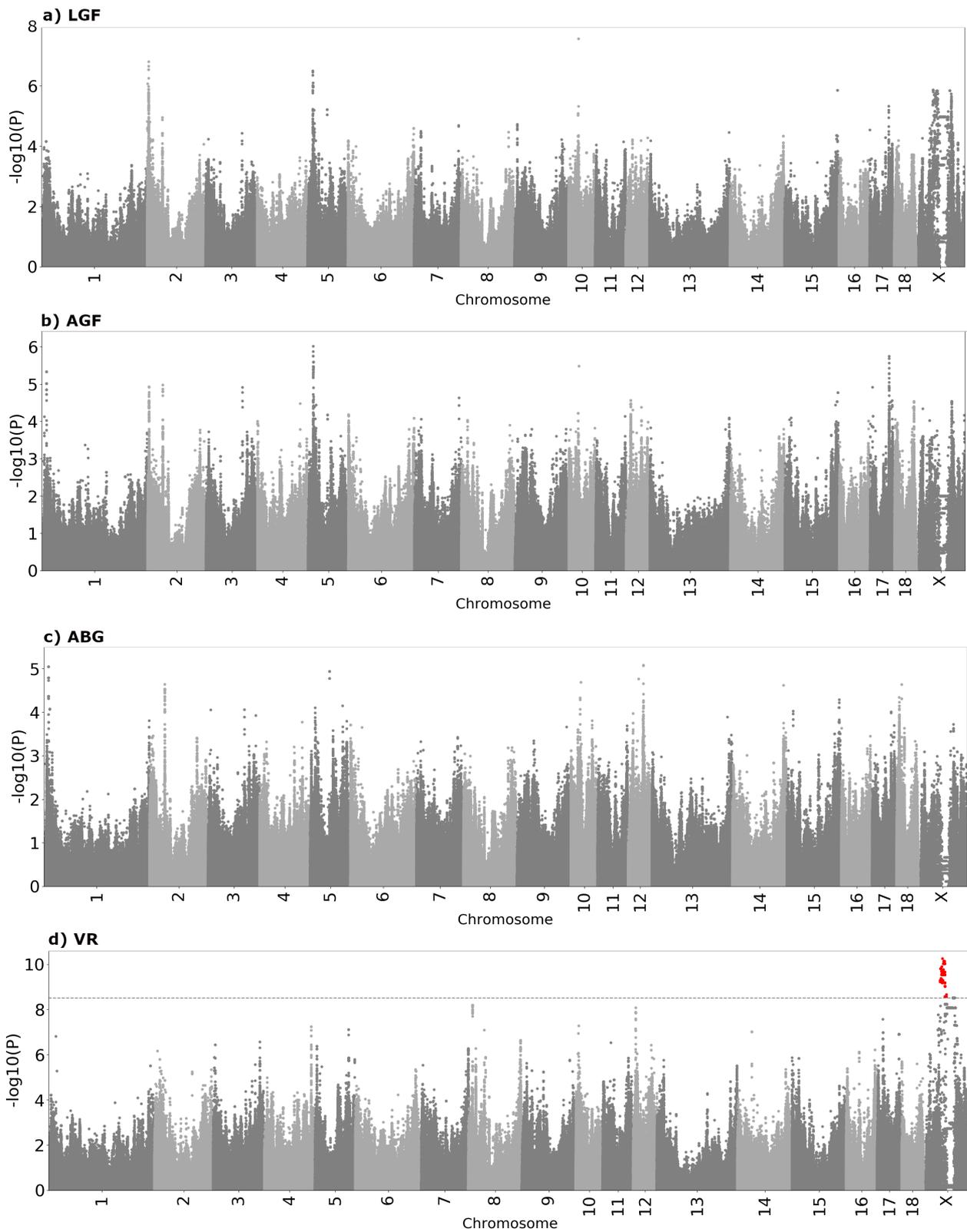


Anhang 5: Manhattanplots für die Deutsche Landrasse (Teil 1)

RMFL: Rückenmuskelfläche; FLAN: Fleischanteil; TZ: tägliche Zunahmen; FVW: Futterverwertung

**Anhang 6: Manhattanplots für die Deutsche Landrasse (Teil 2)**

IMF: intramuskulärer Fettgehalt; TSV: Tropfsaftverlust; pH1-Wert: pH-Wert nach 1 Stunde; STZ: Stülpzitzen;



Anhang 7: Manhattanplots für die Deutsche Landrasse (Teil 3)

LGF: lebend geborene Ferkel; AGF: aufgezogene Ferkel; ABG: abgesetzte Ferkel; VR: Verbleiberate

Anhang 8: Genetische Korrelationen der Merkmale in der Deutschen Landrasse

	FVW	TZ	FLAN	BAFL	RMFL	FFV	SKL	IMF	pH1	TSV	STZ	VR	LGF	AGF	ABG
FVW	1	-0,58	-0,68	-0,68	-0,47	0,68	-0,02	0,25	-0,07	0,06	-0,08	-0,24	-0,02	0,00	-0,10
TZ		1	0,16	0,16	0,05	-0,18	-0,03	0,00	0,11	-0,09	-0,03	0,33	0,06	-0,00	0,11
FLAN			1	0,93	0,70	-0,95	0,14	-0,19	-0,05	0,03	0,09	0,07	0,03	0,06	0,12
BAFL				1	0,53	-0,92	0,24	-0,18	-0,00	0,01	0,10	0,10	-0,02	0,02	0,08
RMFL					1	-0,70	-0,20	-0,20	-0,15	0,10	0,06	0,07	-0,05	0,01	0,01
FFV						1	-0,08	0,19	0,05	-0,02	-0,10	-0,08	-0,02	-0,05	-0,11
SKL							1	0,00	0,14	-0,03	-0,11	0,13	0,10	0,08	0,00
IMF								1	0,06	0,02	-0,06	-0,05	0,08	0,04	0,06
pH1									1	-0,67	0,17	0,03	0,06	0,05	0,10
TSV										1	-0,10	0,07	-0,03	-0,08	-0,13
STZ											1	0,08	0,02	0,06	-0,08
VR												1	-0,03	-0,03	0,14
LGF													1	0,90	0,70
AGF														1	0,70
ABG															1

FVW: Futtermittelverwertung; TZ: tägliche Zunahmen; FLAN: Fleischanteil; BAFL: Bauchfleischanteil; RMFL: Rückenmuskelfläche; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; SKL: Schlachtkörperlänge; IMF: intramuskulärer Fettgehalt; pH1: pH-Wert nach 1 Stunde im Kotelett; TSV: Tropfsaftverlust; STZ: Stülpzitzen; VR: Verbleiberate; LGF: lebend geborene Ferkel; AGF: aufgezogene Ferkel; ABG: abgesetzte Ferkel; Angaben der Korrelationen wurden auf Nachfrage vom ITZ der Landesanstalt für Landwirtschaft übermittelt;

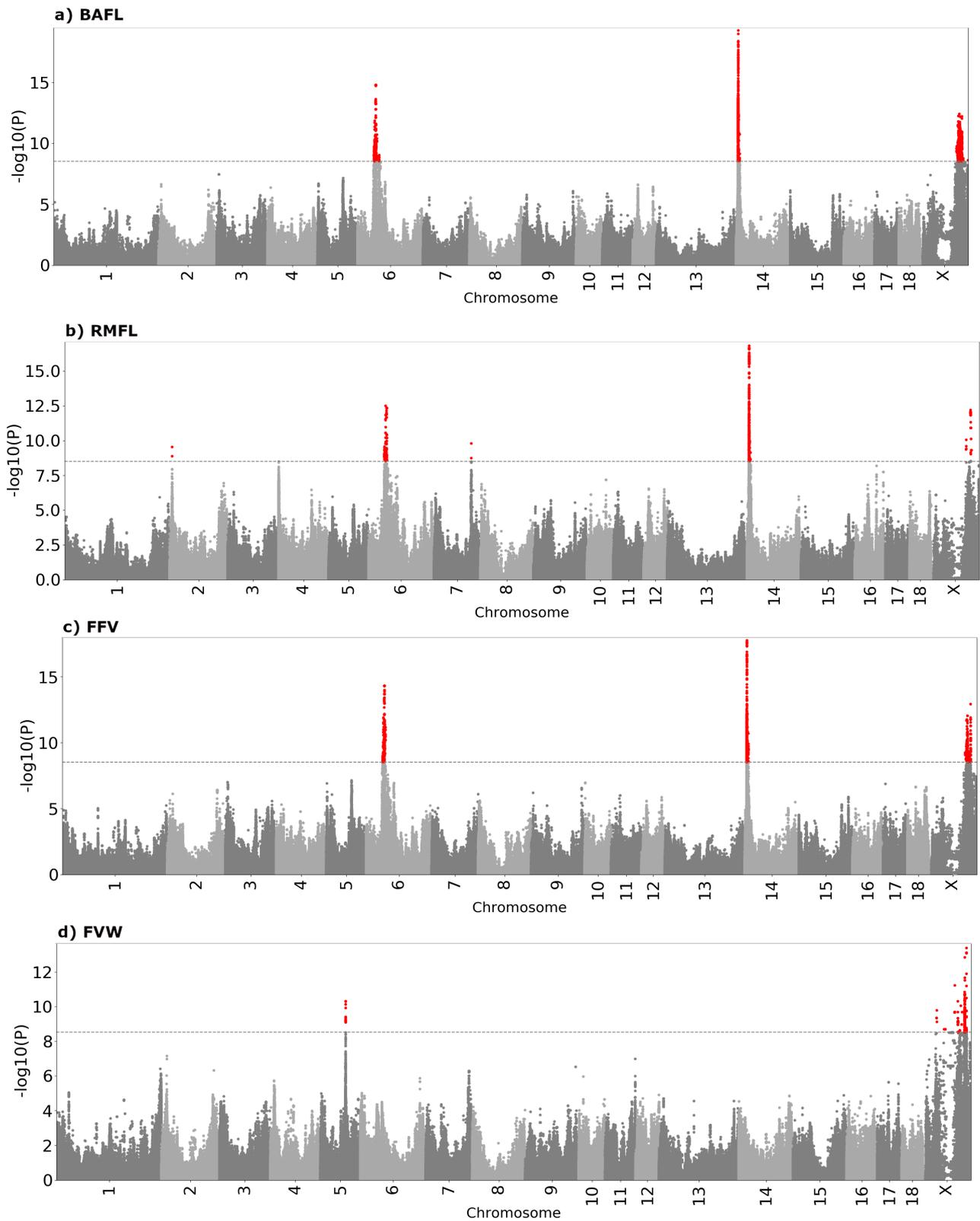
Anhang 9: Signifikante Assoziationen zwischen der *IGF2* intron3-g.3072G>A Variante und vier Merkmalen in der Deutschen Landrasse

Merkmal	Allelfrequenz	Beta	P-Wert (<i>IGF2</i>)	P-Wert Top-SNP
Fleisch:Fett-Verhältnis	0,44	-0,021	$1,99 \times 10^{-15}$	$9,88 \times 10^{-22}$
Bauchfleischanteil	0,44	-0,533	$1,30 \times 10^{-13}$	$9,01 \times 10^{-20}$
Fleischanteil	0,44	-0,547	$7,71 \times 10^{-14}$	$2,81 \times 10^{-20}$
Intramuskulärer Fettgehalt	0,44	-0,044	$1,39 \times 10^{-8}$	$2,44 \times 10^{-15}$

Anhang 10: Übersicht der Merkmale in Piétrains

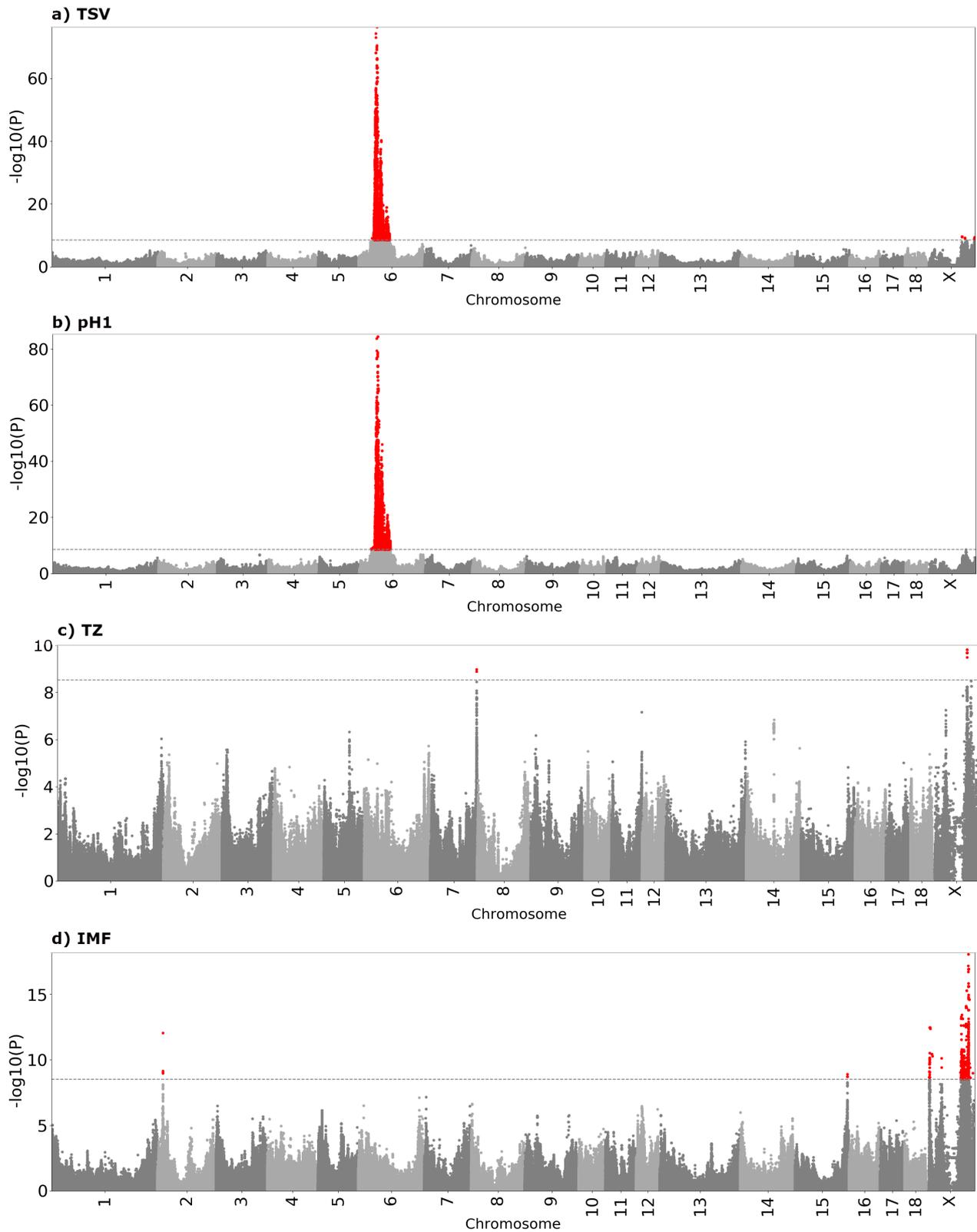
Merkmal	N	Minimum	Maximum	Mittelwert (\pmSD)
Rückenmuskelfläche [cm ²]	28.949	-24,48	10,12	-4,22 (4,01)
Bauchfleischanteil [%]	28.949	-15,00	4,65	-2,91 (2,43)
Schlachtkörperlänge [cm]	28.949	-8,08	4,07	-1,51 (1,48)
Tägliche Zunahmen [g/Tag]	28.949	-303,00	135,00	-87,54 (54,59)
Tropfsaftverlust [%]	28.949	-1,12	0,77	-0,14 (0,25)
Futterverwertung [kg/kg]	28.949	-0,64	0,15	-0,15 (0,10)
Intramuskulärer Fettgehalt [%]	28.949	-0,41	0,40	-0,01 (0,08)
Fleisch-Fett-Verhältnis [cm ² /cm ²]	28.949	-0,32	0,08	-0,06 (0,05)
Fleischanteil [%]	28.949	-12,87	3,63	-2,37 (1,94)
pH1-Wert	28.949	-0,68	0,52	-0,07 (0,14)

N: Anzahl Tiere; SD: Standardabweichung;



Anhang 11: Manhattanplots für die Rasse Piérain (Teil 1)

BAFL: Bauchfleischanteil; RMFL: Rückenmuskelfläche; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FVW: Futterverwertung;

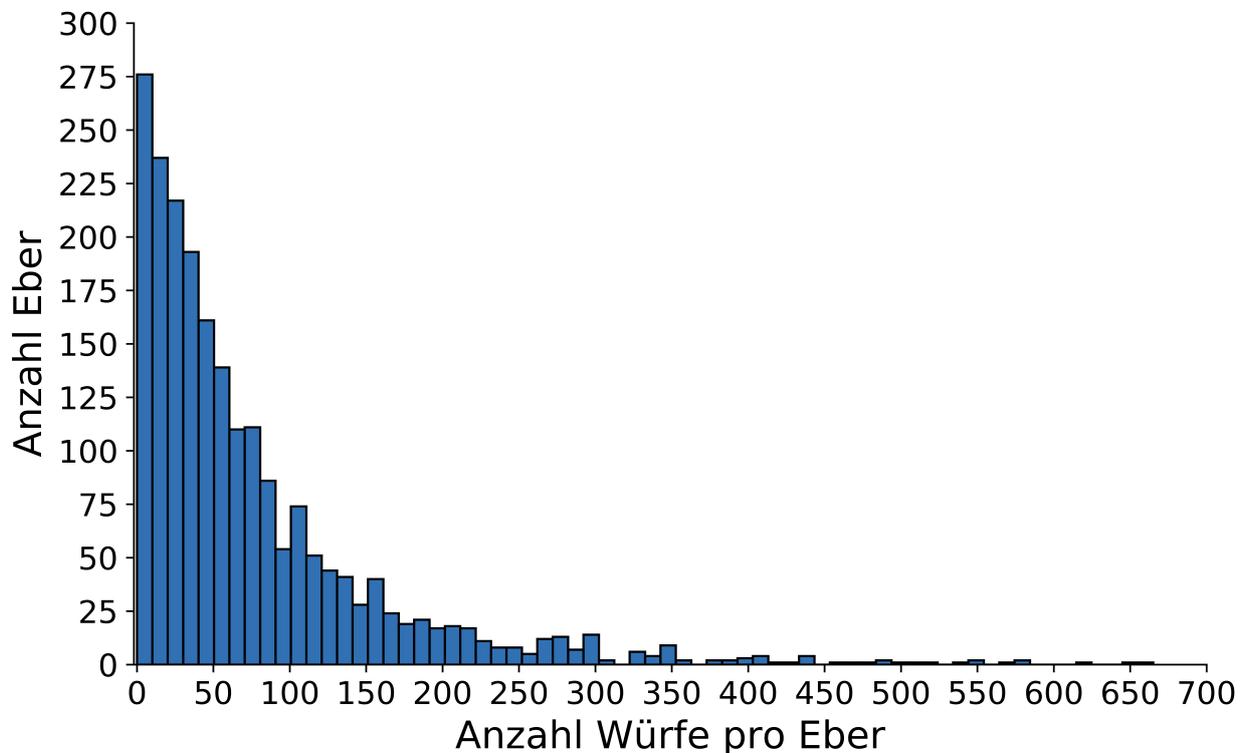
**Anhang 12: Manhattanplots für die Rasse Piérain (Teil 2)**

TSV: Tropfsaftverlust; pH1: pH-Wert nach 1 Stunde im Kotelett; TZ: tägliche Zunahmen; IMF: intramuskulärer Fettgehalt;

Anhang 13: Genetische Korrelationen der Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale in der Rasse Piétrain

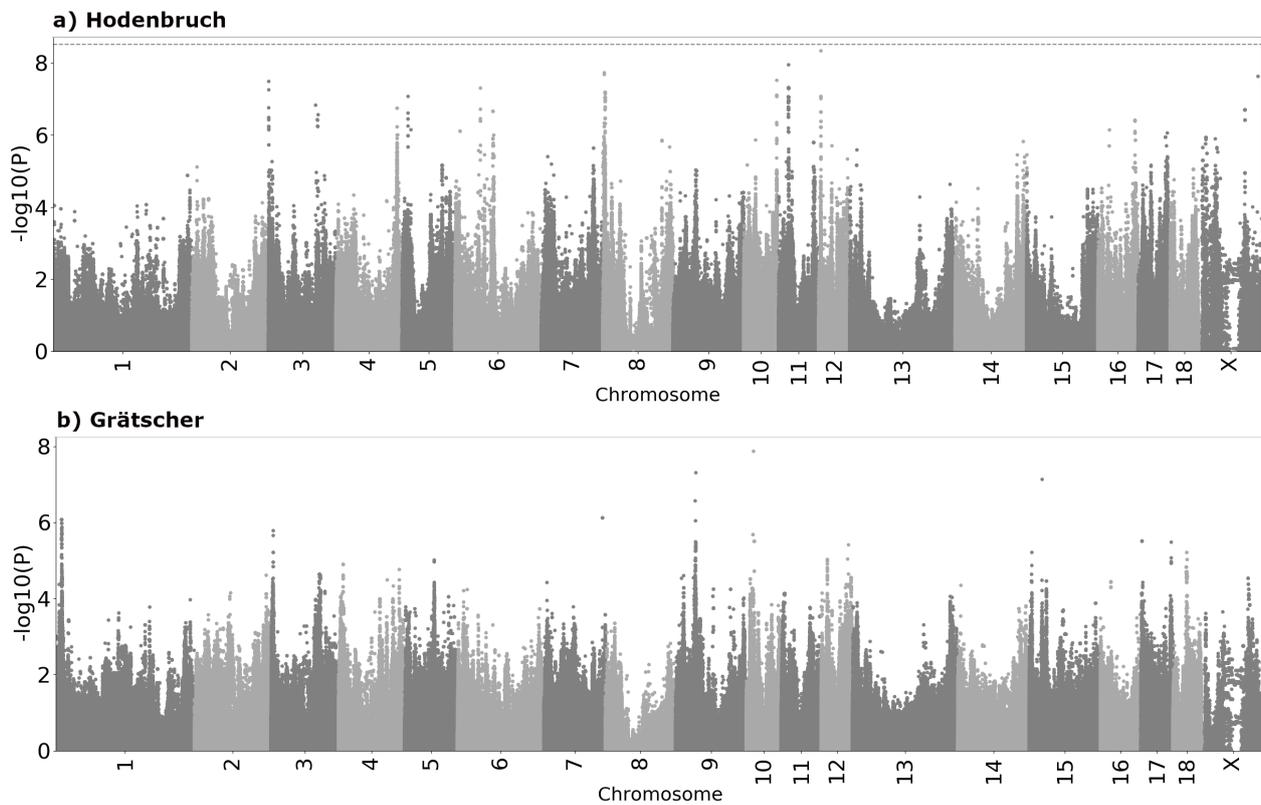
	FVW	TZ	FLAN	BAFL	RMFL	FFV	SKL	IMF	pH1	TSV
FVW	1	-0,32	-0,26	-0,32	-0,07	0,32	0,01	0,41	0,11	-0,18
TZ		1	-0,28	-0,25	-0,24	0,23	0,10	-0,03	0,00	-0,08
FLAN			1	0,77	0,61	-0,77	-0,07	0,13	-0,24	0,31
BAFL				1	0,46	-0,79	0,02	-0,15	-0,24	0,27
RMFL					1	-0,49	-0,31	0,01	-0,23	0,33
FFV						1	0,04	0,18	0,26	-0,28
SKL							1	0,02	0,18	-0,15
IMF								1	0,02	-0,10
pH1									1	-0,71
TSV										1

FVW: Futtermittelverwertung; TZ: tägliche Zunahmen; FLAN: Fleischanteil; BAFL: Bauchfleischanteil; RMFL: Rückenmuskelfläche; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; SKL: Schlachtkörperlänge; IMF: intramuskulärer Fettgehalt; pH1: pH-Wert nach 1 Stunde im Kotelett; TSV: Tropfsaftverlust; Angaben der Korrelationen wurden auf Nachfrage vom ITZ der Landesanstalt für Landwirtschaft übermittelt;


Anhang 14: Anzahl gemeldeter Würfe pro Eber für die Anomalieerfassung

Anhang 15: Übersicht der Anomalienrohdaten (Frequenzen) von 1.972 Eber

Merkmal	Minimum	Maximum	Mittelwert	Varianz
Afterlosigkeit	0,00	0,015625	0,000192	$6,78 \times 10^{-7}$
Hodenbruch	0,00	0,145455	0,007994	$8,32 \times 10^{-5}$
Nabelbruch	0,00	0,009434	0,000151	$5,35 \times 10^{-7}$
Kryptorchismus	0,00	0,066667	0,006345	$4,71 \times 10^{-5}$
Zwitter	0,00	0,020202	0,000290	$1,16 \times 10^{-6}$
Kopfmisbildung	0,00	0,045977	0,000845	$4,67 \times 10^{-6}$
Zitterer	0,00	0,069231	0,000952	$2,08 \times 10^{-5}$
Grätscher	0,00	0,136170	0,004772	$7,62 \times 10^{-5}$

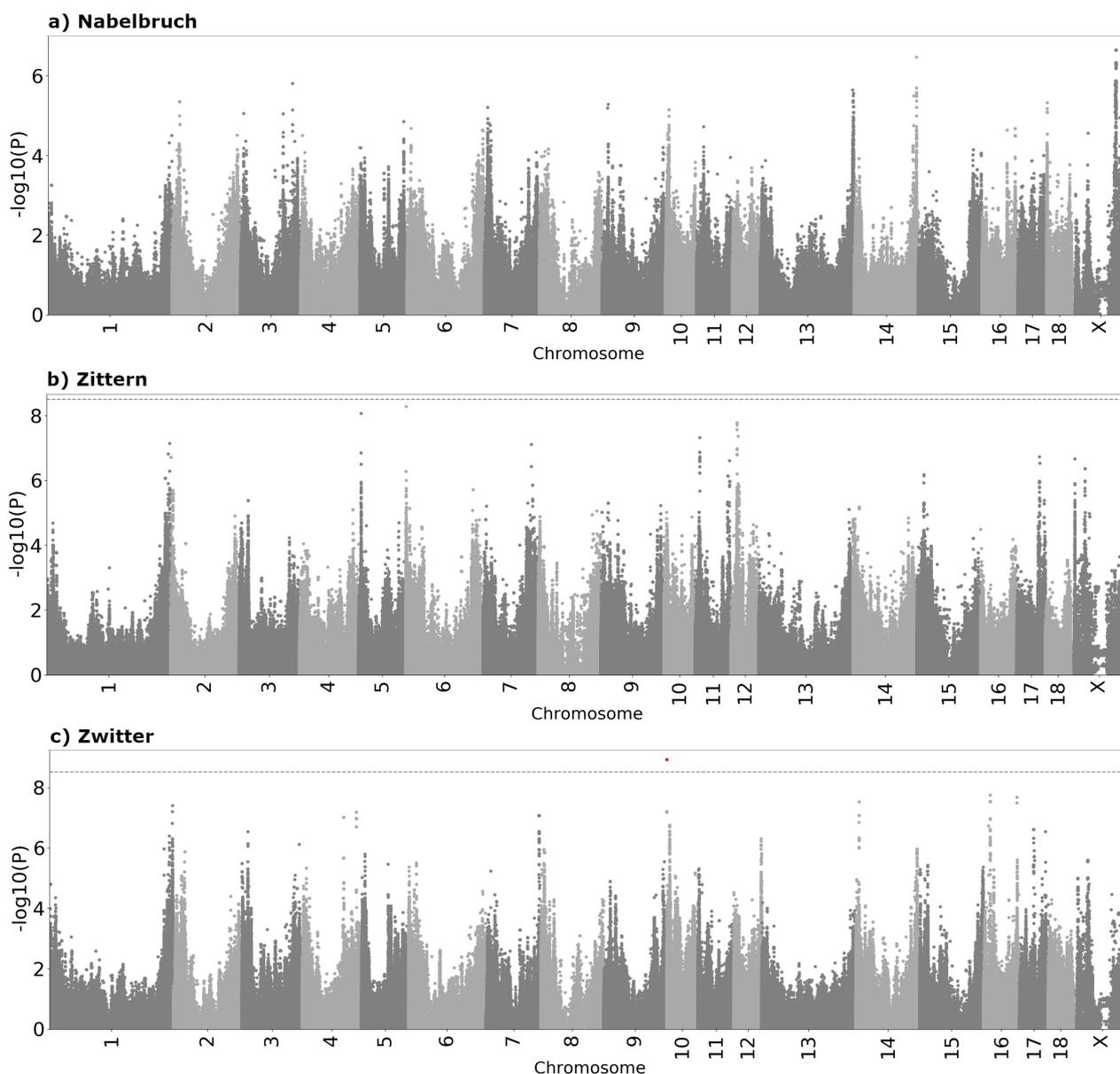


Anhang 16: Manhattanplots für die GWAS mit Anomalienrohdaten

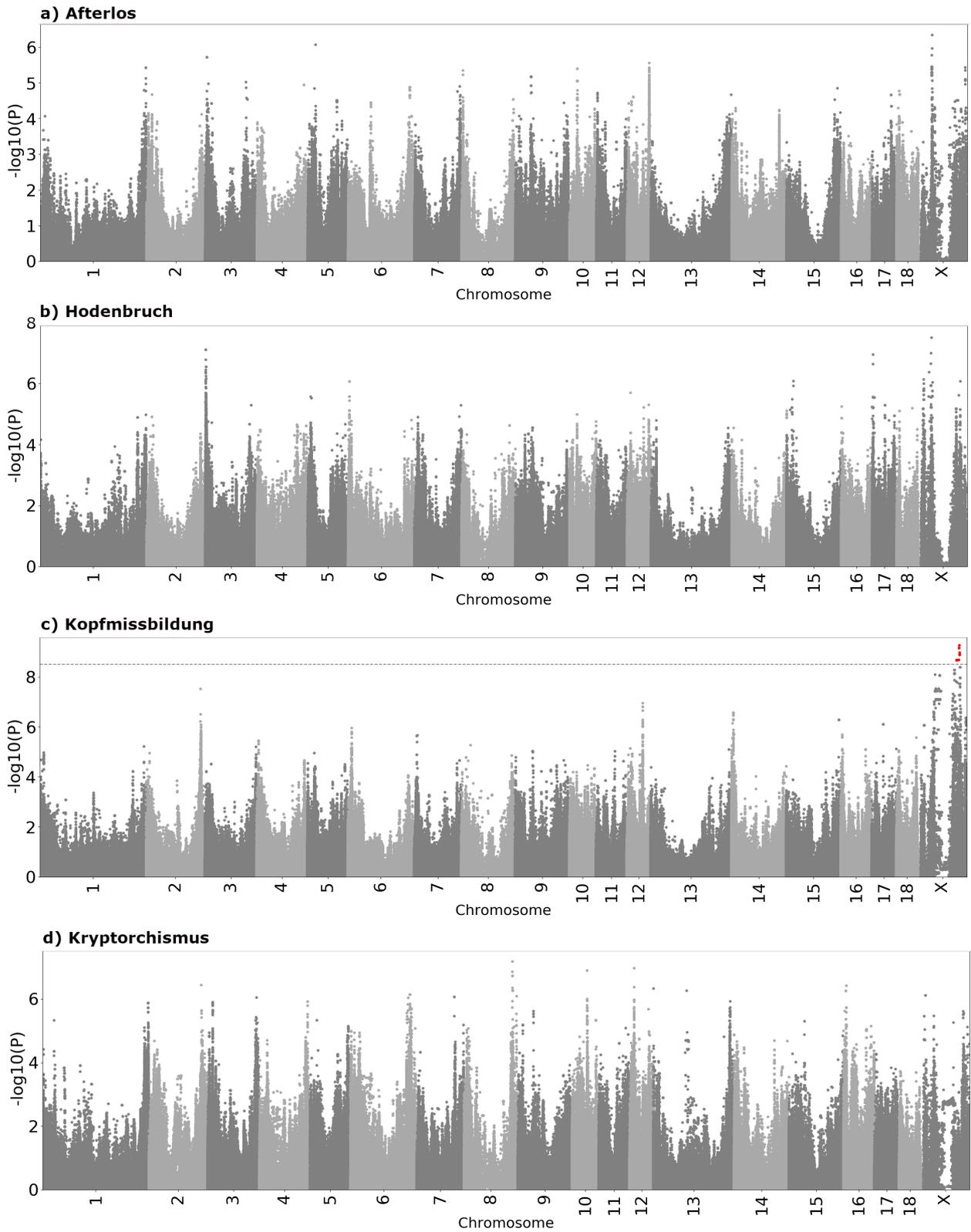
Anhang 17: Übersicht der Anomalienzuchtwerte von 1.590 Ebern

Merkmal	Minimum	Maximum	Mittelwert	Varianz
Afterlosigkeit	-0,601912	-0,414712	-0,495145	0,000649
Hodenbruch	-0,770229	-0,326301	-0,499517	0,005949
Nabelbruch	-0,596412	-0,448940	-0,498850	0,000506

Merkmal	Minimum	Maximum	Mittelwert	Varianz
Kryptorchismus	-0,722817	-0,281622	-0,461407	0,005713
Zwitter	-0,668219	-0,361542	-0,485038	0,001460
Kopfmisbildung	-0,628495	-0,363781	-0,481730	0,001303
Zitterer	-0,741860	-0,396715	-0,475781	0,001419
Grätscher	-0,729447	-0,321815	-0,476792	0,002897



Anhang 18: Manhattanplots der GWAS mit Anomalienzuchtwerten (Teil 1)



Anhang 19: Manhattanplots der GWAS mit Anomalienzuchtwerten (Teil 2)

Anhang 20: Pleiotrope Effekte der Lead-SNPs in der Deutschen Landrasse

SNP	AF	RMFL	BAFL	IMF	FFV	FLAN	SKL	FVW	STZ	VR
2_1253937	0,47	2,22	3,95	4,36	4,95	5,53		2,29		
3_12551512	0,51								1,35	
3_95748786	0,04								1,37	
6_12869238	0,04								1,34	
7_97297122	0,77						1,69			
10_1316786	0,96								1,56	
10_25181328	0,20		2,53		2,37	3,26				
11_76110023	0,08								1,35	
12_40636103	0,18							1,78		
17_15691030	0,04						1,80			
19_49752471	0,07									1,86
19_90993443	0,35			2,83						

AF: Allelfrequenz; RMFL: Rückenmuskelfläche; BAFL: Bauchfleischanteil; IMF: intramuskulärer Fettgehalt; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FLAN: Fleischanteil; SKL: Schlachtkörperlänge; FVW: Futtermittelverwertung; STZ: Stülpzitzen; VR: Verbleiberate;

Anhang 21: Pleiotrope Effekte der Lead-SNPs in Piétraains

SNP	AF	RMFL	BAFL	IMF	FFV	FLAN	TSV	pH1	SKL	FVW	TZ
2_6586058	0,79	1,14									
2_14287644	0,44			3,86							
5_66129589	0,48									1,05	
6_47663320	0,72	1,48	0,89		0,84	1,24	11,06	12,05			
7_97574641	0,61								6,06		
7_120413590	0,42										1,43
14_5938246	0,11	2,17	1,34		1,21	2,05					
15_135892205	0,02			2,91							
17_15299488	0,19								3,32		
19_10356374	0,03			2,13							

9 Anhang

SNP	AF	RMFL	BAFL	IMF	FFV	FLAN	TSV	pH1	SKL	FVW	TZ
19_39933281	0,21			1,66							
19_45182208	0,26								0,86		
19_83352863	0,18									0,58	
19_90717683	0,51										0,82
19_92087433	0,39					0,35	0,66				
19_99632624	0,06						0,59				
19_101092749	0,43		0,30		0,36	0,48					
19_102402929	0,33		0,38	1,45	0,29	0,44					
19_106559176	0,06			1,58							
19_109535138	0,05			3,04						0,48	
19_113869771	0,36			1,57						0,72	
19_124576927	0,22						0,63				

AF: Allelfrequenz; RMFL: Rückenmuskelfläche; BAFL: Bauchfleischanteil; IMF: intramuskulärer Fettgehalt; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FLAN: Fleischanteil; TSV: Tropfsaftverlust; pH1: pH1 Wert; SKL: Schlachtkörperlänge; FVW: Futtermittelverwertung; TZ: tägliche Zunahmen;

Anhang 22: Pleiotrope Effekte der Lead-SNPs der Anomalien in Piétrain

SNP	AF	CRYPT	KOPF	ZWIT	GRÄT	ZIT
1_267003877	0,06				3,21	
4_2206929	0,05					4,45
4_103481426	0,03					6,46
10_260637	0,05			3,14		
11_70069217	0,09	5,57				
13_6344399	0,02					4,93
19_106559176	0,06		1,03			

AF: Allelfrequenz; CRYPT: Kryptorchismus; KOPF: Kopfmissbildung; ZWIT: Zwitter; GRÄT: Grätscher; ZIT: Zittern;

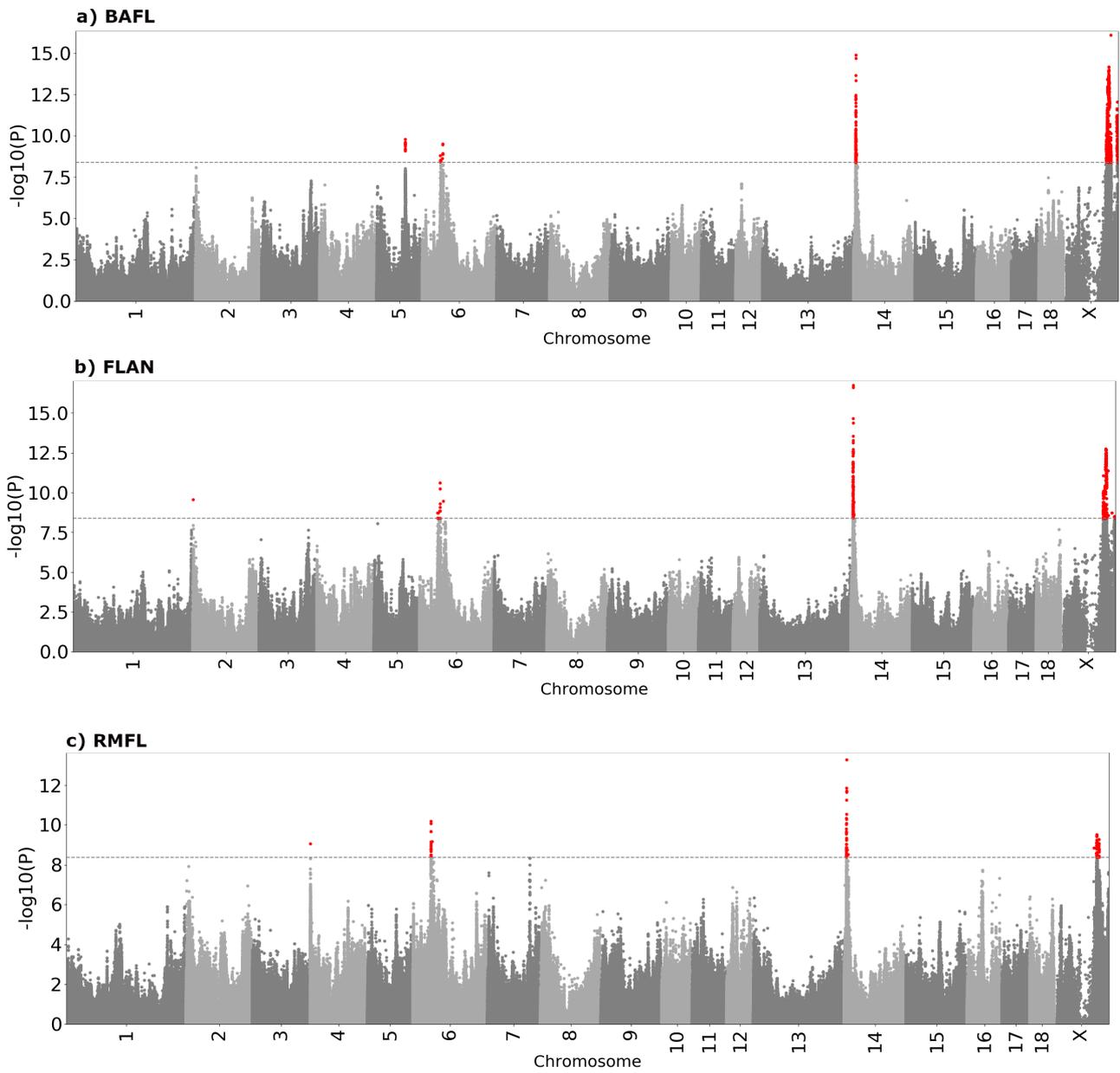
Anhang 23: Übersicht aller QTL aus den Metaanalysen von 10 Merkmalen in der Deutschen Landrasse und Piétrain

SNP	Merkmal	Rasse	AF	Beta	P-Wert GWAS	P-Wert Meta	Gen
2_1213738	FFV	DL PI	0,48 NA	0,03 NA	$3,49 \times 10^{-12}$ NA	$1,28 \times 10^{-9}$	LOC106508288
2_1213738	FLAN	DL PI	0,48 NA	0,64 NA	$8,61 \times 10^{-19}$ NA	$2,84 \times 10^{-10}$	LOC106508288
2_14287630	IMF	DL PI	NA 0,45	NA 0,02	NA $9,66 \times 10^{-10}$	$8,21 \times 10^{-10}$	LOC110259269
4_662948	RMFL	DL PI	NA 0,24	NA -0,65	NA $8,01 \times 10^{-9}$	$9,99 \times 10^{-10}$	SPATC1
5_66021296	FFV	DL PI	NA 0,27	NA -0,00	NA $1,91 \times 10^{-7}$	$1,38 \times 10^{-9}$	
5_66021296	BAFL	DL PI	NA 0,27	NA -0,24	NA $2,50 \times 10^{-7}$	$1,70 \times 10^{-10}$	
5_66109890	TZ	DL PI	NA NA	NA NA	NA NA	$9,12 \times 10^{-10}$	CCND2
5_66129589	FWW	DL PI	NA 0,48	NA 0,01	NA $4,93 \times 10^{-11}$	$1,72 \times 10^{-13}$	LOC106507534
6_41809508	RMFL	DL PI	NA 0,89	NA -0,92	NA $2,24 \times 10^{-9}$	$6,65 \times 10^{-11}$	
6_47556427	FLAN	DL PI	NA 0,92	NA -0,48	NA $1,37 \times 10^{-12}$	$2,53 \times 10^{-11}$	ACTN4
6_47556427	FFV	DL PI	NA 0,92	NA -0,01	NA $3,28 \times 10^{-12}$	$9,15 \times 10^{-11}$	ACTN4
6_47697584	BAFL	DL PI	NA 0,72	NA -0,36	NA $1,75 \times 10^{-15}$	$3,23 \times 10^{-10}$	SIRT2
6_47700655	pH1	DL PI	NA 0,72	NA 0,08	NA $9,94 \times 10^{-87}$	$1,45 \times 10^{-64}$	SIRT2
6_47700655	TSV	DL PI	NA 0,72	NA 0,13	NA $1,24 \times 10^{-77}$	$9,02 \times 10^{-60}$	SIRT2
14_5938246	FFV	DL PI	NA 0,11	NA 0,01	NA $1,84 \times 10^{-18}$	$5,08 \times 10^{-15}$	
14_5938246	FLAN	DL PI	NA 0,11	NA 0,63	NA $3,05 \times 10^{-23}$	$1,88 \times 10^{-17}$	
14_5938246	BAFL	DL PI	NA 0,11	NA 0,64	NA $5,70 \times 10^{-20}$	$1,38 \times 10^{-15}$	
14_5952602	RMFL	DL PI	NA 0,13	NA 1,07	NA $5,93 \times 10^{-13}$	$5,37 \times 10^{-14}$	
15_135872066	IMF	DL PI	NA 0,02	NA -0,06	NA $2,00 \times 10^{-9}$	$4,61 \times 10^{-11}$	AGAP1

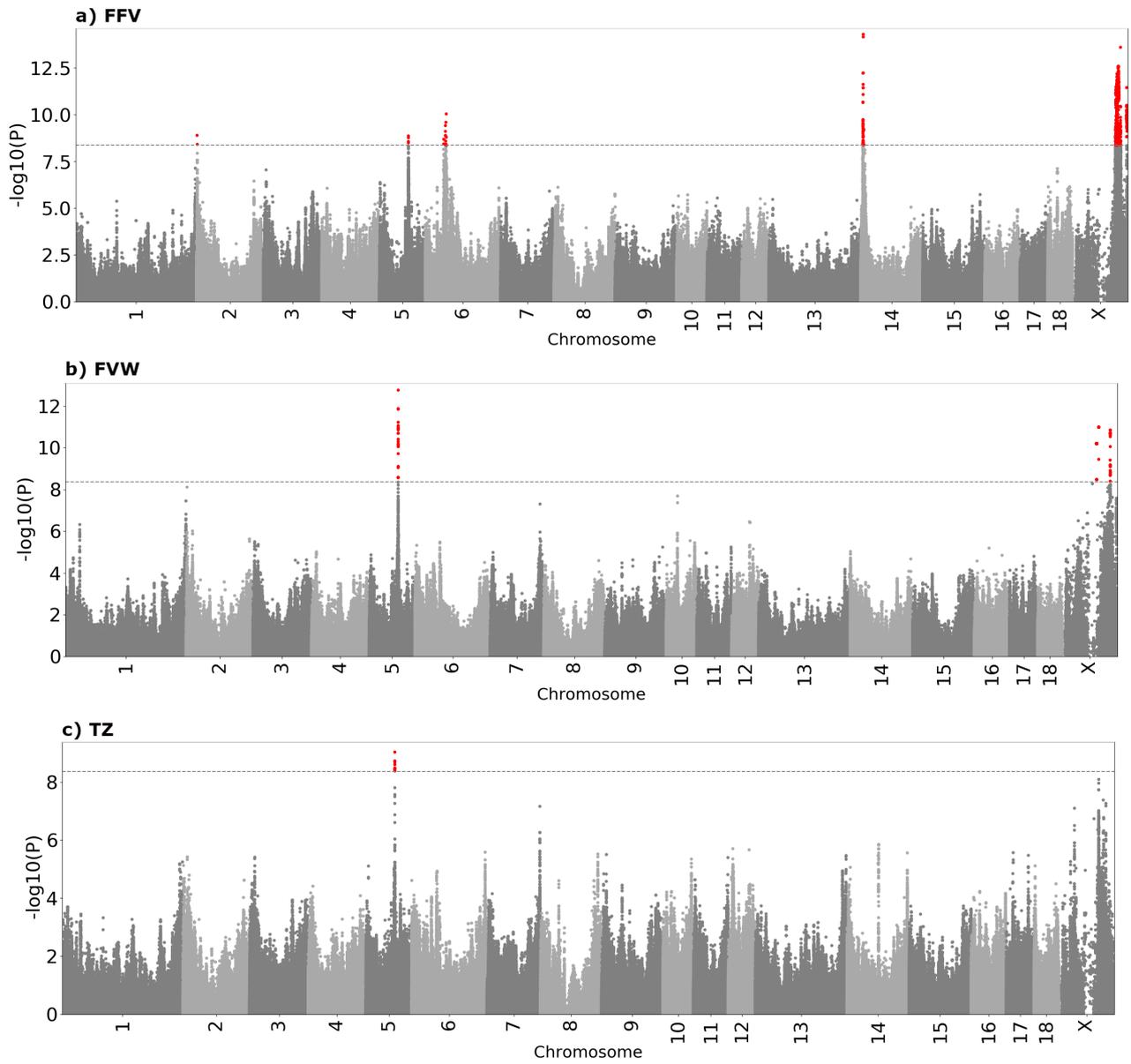
9 Anhang

SNP	Merkmal	Rasse	AF	Beta	P-Wert GWAS	P-Wert Meta	Gen
19_44360778	SKL	DL PI	NA 0,27	NA 0,22	NA $9,20 \times 10^{-11}$	$9,18 \times 10^{-11}$	SHROOM4
19_82976101	FVW	DL PI	NA 0,05	NA -0,02	NA $2,13 \times 10^{-10}$	$1,03 \times 10^{-11}$	TIMM8A
19_91211821	IMF	DL PI	0,33 0,48	-0,04 0,01	$5,29 \times 10^{-9}$ $4,73 \times 10^{-7}$	$4,86 \times 10^{-14}$	PAK3
19_98428289	RMFL	DL PI	NA 0,44	NA 0,39	NA $2,67 \times 10^{-8}$	$3,11 \times 10^{-10}$	TMEM255A
19_99867833	pH1	DL PI	NA 0,32	NA -0,02	NA $3,72 \times 10^{-9}$	$1,08 \times 10^{-9}$	
19_103635660	FLAN	DL PI	NA 0,32	NA 0,00	NA $2,09 \times 10^{-9}$	$1,85 \times 10^{-13}$	
19_103921551	FFV	DL PI	NA 0,32	NA 0,00	NA $2,09 \times 10^{-9}$	$2,65 \times 10^{-13}$	
19_104561991	BAFL	DL PI	NA 0,29	NA 0,23	NA $6,81 \times 10^{-13}$	$7,27 \times 10^{-15}$	
19_109349288	FVW	DL PI	NA 0,42	NA 0,01	NA $4,29 \times 10^{-11}$	$1,42 \times 10^{-11}$	GPC4
19_124173093	BAFL	DL PI	NA 0,33	NA -0,17	NA $6,48 \times 10^{-8}$	$9,51 \times 10^{-13}$	
19_124328185	TSV	DL PI	NA 0,21	NA 0,03	NA $1,14 \times 10^{-8}$	$4,49 \times 10^{-12}$	ATP2B3

AF: Allelfrequenz in der jeweiligen Rasse; P-Wert GWAS: P-Wert des SNPs in der GWAS innerhalb der Rasse; P-Wert Meta: P-Wert des SNPs in der Metaanalyse; DL: Deutsche Landrasse; PI: Piétrain; NA: keine Angabe, da der SNP einen P-Wert $> 1,00 \times 10^{-7}$ hatte; BAFL: Bauchfleischanteil; FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FLAN: Fleischanteil; FVW: Futtermittelverwertung; IMF: intramuskulärer Fettgehalt; pH1: pH-Wert nach 1 Stunde; RMFL: Rückenmuskeloberfläche; SKL: Schlachtkörperlänge; TSV: Tropfsaftverlust; TZ: tägliche Zunahmen;

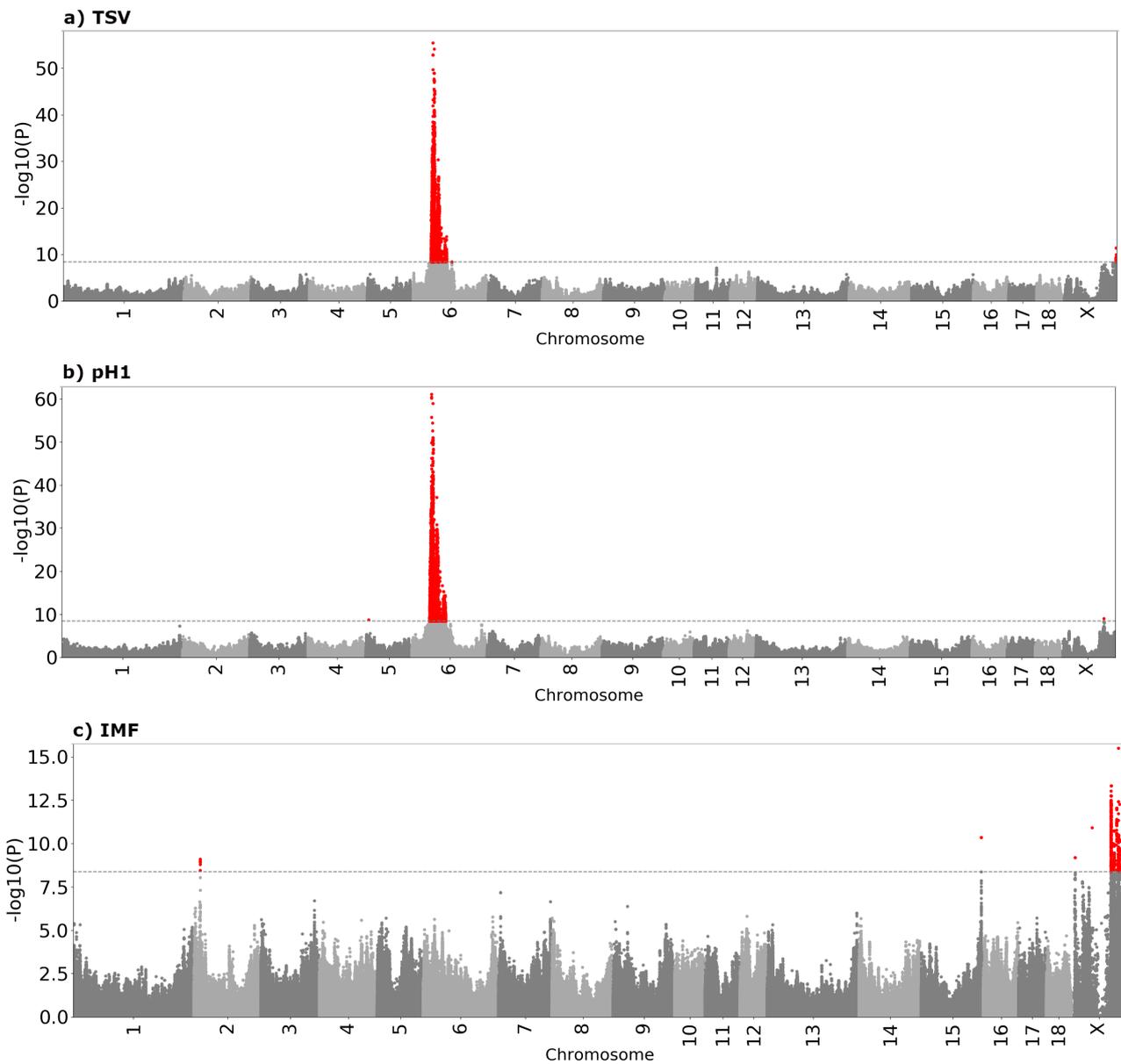


Anhang 24: Manhattanplots der Metaanalysen in der Deutschen Landrasse und Piétrains (Teil 1)
 BAFL: Bauchfleischanteil; FLAN: Fleischanteil; RMFL: Rückenmuskelfläche;



Anhang 25: Manhattanplots der Metaanalysen in der Deutschen Landrasse und Piétrains (Teil 2)

FFV: Fleisch:Fett-Verhältnis; FVW: Futtermittelverwertung; TZ: tägliche Zunahmen;



Anhang 26: Manhattanplots der Metaanalysen in der Deutschen Landrasse und Piétrains (Teil 3)

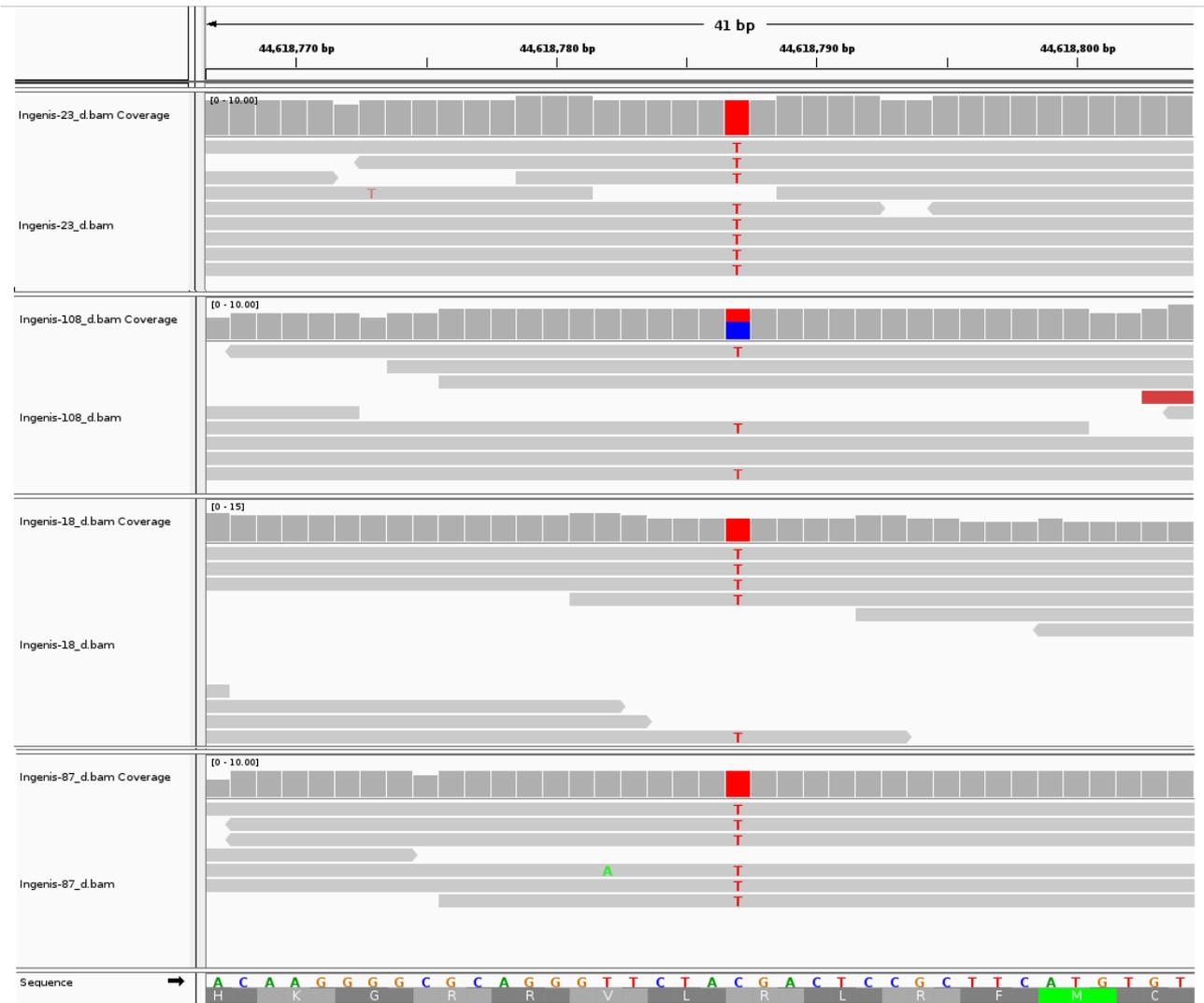
TSV: Tropfsaftverlust; pH1: pH-Wert nach 1 Stunde im Kotelett; IMF: intramuskulärer Fettgehalt;

Anhang 27: Übersicht der gemeldeten Fälle mit "atypisch kleiner Vulva"

Wurf	Betrieb	Mutter ID	Vater ID	Fälle (N)	Kontrollen (N)
1	A	1	40	2	4
2	A	2	40	2	3
3	A	3	40	3	1
4	A	4	40	1	3
5	A	5	41	3	2
6	A	6	41	1	2
7	A	7	46	1	0
8	B	8	9	1	0
9	B	9	9	1	0
10	B	10	22	1	2
11	A	11	22	1	1
12	A	12	33	2	0
13	A	13	43	2	0
14	A	14	43	2	0
15	C	15	42	1	0
16	C	16	44	1	1
17	D	17	?	1	1
18	A	18	45	5	1
19	A	19	45	4	4
20	A	20	45	2	0
21	A	13	45	6	1

Fälle: Sauen mit ungewöhnlich kleiner Vulva; Kontrollen: Vollgeschwister von Fällen mit normal großer Vulva;

9 Anhang



Anhang 28: IGV-Ausschnitt der p.R212X-Mutation tragenden genomsequenzierten Schweine
 Ingenis-23: Tier 2 im Stammbaum; Ingenis-108: Tier 26 im Stammbaum; Ingenis-18: Tier 40 im Stammbaum; Ingenis-87: Tier 20 im Stammbaum; Sequence: Referenzsequenz des Sscrofa11.1 Assemblies und unterhalb die entsprechende Proteinsequenz;

Anhang 29: Stammbaum der 10 bekannten Väter von Sauen mit "atypisch kleiner Vulva"

ID	Geschlecht	Geburtsjahr	Vater	Mutter	NGS Genotyp
1	2	2006	0	0	0
2	1	2006	0	0	T
3	2	2006	0	0	CC
4	2	2006	0	0	0
5	2	2005	0	0	CC
6	1	2006	0	0	C

9 Anhang

ID	Geschlecht	Geburtsjahr	Vater	Mutter	NGS Genotyp
7	2	2009	0	0	CC
8	2	2009	6	5	0
9	1	2012	6	7	0
10	1	2008	0	0	0
11	2	2008	2	1	0
12	1	2009	0	0	0
13	2	2008	2	3	0
14	2	2008	2	3	0
15	1	2008	0	0	C
16	1	2008	0	0	0
17	2	2008	2	4	0
18	2	2008	0	0	0
19	2	2008	0	0	CC
20	1	2009	10	11	T
21	2	2009	0	0	0
22	1	2010	12	13	0
23	1	2009	0	0	C
24	2	2010	15	14	0
25	1	2010	15	14	0
26	2	2009	16	17	CT
27	1	2010	15	18	0
28	1	2010	0	0	C
29	2	2010	15	19	0
30	2	2011	20	8	0
31	2	2011	20	21	0
32	1	2011	20	21	0
33	1	2011	23	24	0
34	1	2011	0	0	0
35	2	2011	25	26	0
36	1	2012	0	0	0
37	2	2011	15	26	0
38	1	2011	28	29	0

9 Anhang

ID	Geschlecht	Geburtsjahr	Vater	Mutter	NGS Genotyp
39	2	2011	47	48	0
40	1	2012	27	30	T
41	1	2012	25	31	0
42	1	2012	32	29	0
43	1	2013	34	35	0
44	1	2012	6	35	0
45	1	2013	36	37	0
46	1	2012	38	39	0
47	1	2010	0	0	C
48	2	2009	49	50	0
49	1	2007	0	0	C
50	2	2007	0	0	CC

Eine „0“ in den Spalten der Eltern (Vater oder Mutter) steht für nicht bekannt; eine „0“ in der Spalte NGS Genotyp bedeutet, dass das Tier nicht mittels NGS sequenziert wurde; die Spalte NGS Genotyp gibt den jeweiligen Genotyp der p.R212X Mutation im BMP15 an; C ist das Referenzallel, T ist das alternative Allel;

Anhang 30: Anzahl Sauen und Allelfrequenzen des T-Allels der p.R212X-Mutation im BMP15 pro Geburtsjahr

Geburtsjahr	Anz. genotypisierter Sauen	Allelfreq. der genotypisierten Sauen	Gesamtanz. Sauen	Allelfreq. Gesamt
2007	75	0,047	3.140	0,077
2008	129	0,062	3.127	0,065
2009	269	0,024	3.092	0,052
2010	342	0,031	2.834	0,050
2011	57	0,044	2.675	0,056
2012	69	0,181	2.681	0,078
2013	107	0,126	2.972	0,102
2014	250	0,100	2.737	0,100
2015	498	0,130	2.619	0,107
2016	876	0,073	3.002	0,070

Geburtsjahr	Anz. genotypisierter Sauen	Allelfrq. der genotypisierten Sauen	Gesamtanz. Sauen	Allelfrq. Gesamt
2017	1.082	0,047	3.654	0,049
2018	1.088	0,039	3.408	0,037
2019	8	0,000	1.091	0,020

Anz. genotypisierter Sauen: Anzahl Sauen, die für die p.R212X Mutation des BMP15 genotypisiert worden sind; Allelfrq. der genotypisierten Sauen: geschätzte Allelfrequenzen auf Basis der genotypisierten Sauen; Gesamtanz. Sauen: Summe der genotypisierten Sauen und der Sauen mit abgeleiteten Genotyp (Wahrscheinlichkeit ein T-Allel zu tragen); Allelfrq. Gesamt: geschätzte Allelfrequenzen auf Basis der Gesamtzahl der Sauen.