Lehrstuhl für Tierzucht der Technischen Universität München-Weihenstephan

Identifizierung von Genomregionen, die für Analatresien des Schweines prädestinieren

Sabine Elisabeth Wiedemann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prüfer der Dissertation: Univ.-Prof. Dr.agr. Dora A. Roth-Maier

- 1. Univ.-Prof. Dr.sc.techn.ETH, Dr.agr.habil. Hans-Rudolf Fries
- 2. Univ.-Prof. Dr.agr.habil. Henner Simianer, Georg-August-Universität Göttingen

Die Dissertation wurde am 29.07.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.09.2004 angenommen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Fries danke ich sehr für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können, für die stets gewährte Gesprächsbereitschaft, die fachliche Diskussion und die hilfreichen Ratschläge.

Herrn Dr. Georg Thaller danke ich ganz herzlich für die jederzeit gewährte Unterstützung, die fachlichen Anregungen, die wertvolle Diskussion, Kritik und die Motivation zur Durchführung dieser Arbeit über so manche Durststrecke hinweg.

Bedanken möchte ich mich beim Förderverein für Biotechnologieforschung (FBF) für die finanzielle Unterstützung des Projekts. Ebenso bei den Teilnehmern der FBF-Workshops für die fachlichen Anregungen und Diskussionen zum Thema Kopplungsanalyse und TDT.

Bei den Besamungsstationen Bergheim e.V., der Niederbayerischen Besamungsgenossenschaft Landshut-Pocking e.G. und dem Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch e.V. möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Probensammlung von afterlosen Ferkeln, sowie für die Bereitstellung von Spermaproben bedanken.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei den Landwirten, Besamungstechnikern und Ringassistenten, die das Projekt tatkräftig unterstützt haben.

Ich danke den Tierärzten des Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern (LUA) in Oberschleißheim: Dr. Held, Dr. Schrott, Dr. Ebert und Dr. Raschel für die Diagnose der Ferkel und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Allen Hiwis die im Laufe des Projekts bei der Fertigstellung der Ferkelkisten, Verwaltung der Datenbank und der DNA-Präparation geholfen haben: Herrn Christian Edel, Frau Julia Herzig, Frau Elisabeth Gutmann, Frau Nicole Hinz, Frau Antonia Seitel und Herrn Franz Seefried, sei herzlich gedankt.

Bei Herrn Dr. Ingolf Russ von der Firma Genecontrol GmbH möchte ich mich für die Typisierung der Halbgeschwisterfamilien und die sorgfältige und kritische Überprüfung der Genotypen bedanken.

Meinen besonderer herzlicher Dank gilt allen jetzigen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Tierzucht die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Insbesondere Danke ich dabei Herrn Dr. André Thaler, Herrn Dr. Gregor Durstewitz, Frau Dr. Petra Feichtlbauer-Huber, Herrn Dr. Paul Walser, Herrn Rudi Antes, Frau Anne Keller, Frau Resi Böhm, Frau Carmen Biet und Frau Dr. Sonja Kollers die mir mit Rat und Tat in fachlichen und labortechnischen Belangen des Projekts zur Seite gestanden sind.

Herrn Dr. Felix Habermann und Herrn Stefan Binder danke ich für die kritischen Anmerkungen und Anregungen zum Manuskript.

Nicht zuletzt bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern für Ihre stetige Unterstützung und Ihren Zuspruch. Meiner Schwester Christa danke ich für die wichtige Einsicht, daß alle "vermeintlichen" Probleme wieder in die richtige Relation gesetzt werden, wenn man sie vom Berggipfel betrachtet.

Abkürzungsverzeichnis

ABI	Applied Biosystems
APS	Ammoniumpersulfat
ASP	affected sibling pairs
ATRA	all-trans Retinsäure
α	Signifikanzgrenze
α'	Signifikanzgrenze nach Korrektur auf multiples Testen
BHZP	Bundeshybridzuchtprogramm
BLT-Grub	Bayerische Landesanstalt für Tierzucht Grub
bp	Basenpaare
cM	Centimorgan
DD-RT-PCR	Differential Display Real-time PCR
DE	Deutsches Edelschwein
df	Freiheitsgrade
DL	Deutsche Landrasse
DTT	1.4-Dithiotreitol
Е	Entropie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ЕТОН	Ethanol
f	Anzahl founder
Fo	Parentalgeneration
F ₁	1. Filialgeneration
F ₂	2 Filialgeneration
FBF	Förderverein für Biotechnologieforschung
6-FAM	6-Carboxy-fluorescein
GDP	Genome Database
Н	Heterozygotenfrequenz (engl. heterozygosity)
HCl	Chlorwasserstoff
HEX	6-Carboxy-1 4-dichloro-2' 4' 5' 7' -tetrachlorofluorescein
H	Frequenz der erwarteten Heterozygoten
HG	Halbgeschwister
Haha	Frequenz der zu beobachtenden Heterozygoten
HSA	Homo sapiens
IBD	identical by descent
Info	Informationsgehalt (engl information content)
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
KB	künstliche Besamung
khn	Kilobasennaare
KC1	Kaliumchlorid
KH_PO	Kaliumdihydrogenphosphat
L OD-Score	decadic logarithm of the odds ratio
	I andesuntersuchtsamt für das Gesundheitswesen Südbavern e V
MARC	Meat Animal Research Center
MaCl.	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mpt	Multipoint Kopplungsepelyse
mpi No Acotot	Natriumoototot
INA ACCIAI	mainumacietai

Na ₂ EDTA	Dinatriumethylendiamintetraacetat
Na ₂ HPO4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaĈl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NK	Nachkomme
nm	Nanometer
NPL	non parametric linkage
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen	Wahrscheinlichkeit für die Detektion einer Fehlabstammung
PFIM	Proportion of fully informative matings
PI	Piétrain
PIC	Pig Improvement Company
PIC	Polymorphism Information Content
PiGMap	Pig Gene Mapping Project
pmol	Pikomol
OTL	Ouantitative Trait Loci
r	Frequenz des Nullalleles
RNase	Ribonuclase
rpm	rotations per minute
RT-PCR	Real-time PCR
S ₍₎	scoring funktion
SD-mouse	short tail Danforth Maus
SDS	Natriumdodecylsulfat
spt	Singlepoint Kopplungsanalyse
SSC	Sus scofa chromosome
SST	serum separating tube
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamine
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TDT	Transmission-Disequillibrium-Test
TF	Tris-FDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFT	6-Carboxy-1 4-dichloro-2' 7' -dichlorofluorescein
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	Tris-Natriumethylendiamintetraacetat-Puffer
A	Rekombinationsrate
VACTERI	Vertebraldefekt Analatresie Herzfehler (cardial anomalies)
VACILIAL	tracheoösonhageale Fistel Ösonhagusatresie (esonhagus atresia)
	Nierenfehlbildungen (r enal anomalies) und Anomalien der
	oberen Extremitäten (limb defects)
VG	Vollgeschwister
VTH	Versuchestation Thalhausen
7	normalized score
$\mathcal{L}_{(V)}$	Tentralverband der deutschen Schweinenroduktion e V
	Mikrogramm
μ <u>β</u>	Milerolitor
μι	MIRIOIICI

Inhaltsverzeichnis:	Seite
1 Einleitung	1

2 Literatur
2.1 Definition und allgemeine Beschreibung des komplexen Merkmals Analatresien 3
2.1.1 Analatresie beim Schwein
2.1.2 Bedeutung des Defekts und Vorkommen beim Schwein
2.1.3 Vorkommen bei anderen Spezies
2.1.4 Darmentwicklung in der Embryonalphase des Schweins
2.1.5 Ätiologie von Analatresien
2.1.6 Vererbung von Analatresien beim Schwein
2.2 Positionelle Klonierung komplexer Krankheiten mit genetischen Markern 9
2.2.1 Komplexitätsfaktoren
2.2.2 Genetische Marker und Genomkarten 10
2.2.2 Statistische Matheden zum Kennlungsenaluse
2.2.5 Statistische Methoden zur Kopplungsanaryse
2.2.3 Statistische Verfahren zur Kopplungsanalyse
2.2.3 Statistische Methoden zur Kopplungsanalyse 11 2.2.3.1 Parametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse 12 2.2.3.2 Nichtparametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse 12
2.2.3 Statistische Methoden zur Kopplungsanalyse 11 2.2.3.1 Parametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse 12 2.2.3.2 Nichtparametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse 12 2.2.4 Implementierung von parametrischen und nichtparametrischen Verfahren in 12
2.2.3 Statistische Methoden zur Kopplungsanalyse 11 2.2.3.1 Parametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse 12 2.2.3.2 Nichtparametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse 12 2.2.4 Implementierung von parametrischen und nichtparametrischen Verfahren in 12 Computerprogrammen 13

3 Tiere und Methoden 15

3.1 Tiere	15
3.1.1 Erfassungssystem für Ferkel mit Analatresie	15
3.1.2 Erstellung eines informativen Familienmaterials und Abstammungskontrolle	17
3.1.3 Struktur des Tiermaterials für die genomweite Typisierung	19
3.1.4 Struktur des ergänzenden Tiermaterials	21
3.1.5 Struktur des Familienmaterials für die Kopplungsanalyse auf dem	
Geschlechtschromosom SSC X und in der pseudoautosomalen Region SSC XY	22
3.2 Auswahl der Typisierungsmarker	22
3.2.1 Markerkarte	22
3.2.2 Allelfrequenzschätzung	23
3.2.3 Informativität der Marker	23
3.2.3.1 Heterozygotie	23
3.2.3.2 Polymorphism Information Content (PIC)	24
3.2.3.3 Proportion of fully informative matings (PFIM)	24
3.3 Typisierung der Mikrosatellitenmarker	25

3.5 Auswahl von Kandidatengenen	. 37
3.4.3 Assoziations- und Kopplungsanalyse mit dem TDT	36
3.4.2.2 LOD-Score Analyse zwischen mehreren Markern und dem Krankheitslocus	. 35
vollständiger Penetranz	. 34
3.4.2.1 LOD-Score Analyse zwischen einem Marker und dem Krankheitslocus bei	
3.4.2 Parametrische Kopplungsanalyse	. 34
3.4.1.1.2 Der Informationsgehalt (Info)	. 33
3.4.1.1.1 Berechnung der NPL-Teststatistik an einem informativem Marker	. 29
3.4.1.1 Nichtparametrische Kopplungsanalyse mit ASP (affected sib-pair) Familien	. 29
3.4.1 Genomweite Kopplungsanalyse mit dem Programm Allegro 1.0	. 29
3.4 Statistische Auswertung	. 29
3.3.7 Plausibilitätskontrollen der Markergenotypen	. 27
3.3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese	. 27
3.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	. 26
3.3.4 DNA Quantifizierung mittels Fluoreszenz Emission	. 26
3.3.3 Isolierung von genomischer DNA aus Ohrgewebe	. 26
3.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus Muskelgewebe	. 25
3.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus nativem Schweinesperma	. 25

4 Ergebnisse 39
4.1 Überprüfung der Genotypen auf Konsistenz 39
4.2 Genomweite Kopplungsanalyse 41
4.2.1 Genomweite nichtparametrische Kopplungsanalyse
4.2.1.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse zwischen mehreren Markern und
einem hypothetischen Krankheitslocus
4.2.1.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse zwischen den einzelnen Markern
44 A D C C A A A A A A A A A A A A A A A A
4.2.2 Genomweite parametrische Kopplungsanalyse
hypothetischen Krankheitslocus
4 2 2 2 Parametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und einem
hypothetischen Krankheitslocus
4.3 Kopplungsanalyse mit höherer Markerdichte auf SSC 1
4.3.1 Nichtparametrische Kopplungsanalyse mit höherer Markerdichte auf SSC1
4.3.1.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse zwischen mehreren Markern und
einem hypothetischen Krankheitslocus
4.3.1.2 Der Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Multipoint-Kopplungsanalyse
4.3.1.3 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse zwischen einzelnen Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus 49
4.3.1.4 Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Singlepoint-Kopplungsanalyse 49
4.3.2 Parametrische Kopplungsanalyse mit höherer Markerdichte auf SSC1

4.3.2.1 Parametrische Multipoint-Kopplunganalyse zwischen mehreren Markern und einem
hypothetischen Krankheitslocus
4.3.2.2 Parametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und einem
hypothetischen Krankheitslocus
4.4 Kopplungsanalyse auf SSC 1 mit zusätzlichem Familienmaterial 53
4.4.1 Nichtparametrische Kopplungsanalyse auf SSC 1 mit zusätzlichem Familienmaterial 53
4.4.1.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplunganalyse zwischen mehreren Markern und
einem hypothetischen Krankheitslocus
4.4.1.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und
einem hypothetischen Krankheitslocus
4.4.2 Parametrische Kopplungsanalyse auf SSC 1 mit zusätzlichem Familienmaterial 57
4.4.2.1 Parametrische Multipoint-Kopplunganalyse zwischen mehreren Markern und einem
hypothetischen Krankheitslocus
4.4.2.2 Parametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und einem
hypothetischen Krankheitslocus
4.4.3 Betrachtung der Marker SW1621 und SW2185 auf SSC 1 in den einzelnen Familien . 60
4.5 Genomweite Kopplungsanalyse unter Ausschluß der Atresia recti Ferkel
4.5.1 Nichtparametrische Multipoint Kopplungsanalyse der Atresia ani Ferkel
4.5.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse der Atresia ani Ferkel
4.6 Ergebnisse des Tronsmission disaguillibrium test (TDT) 63
4.6 1 Ergebnisse des TDT auf SSC 1
4.0.1 Eigebilisse des TDT auf SSC 1
4.0.2 Eigebnisse des TDT auf SSC 3
4.0.5 Eigebnisse des TDT auf SSC 0
4.0.4 Eigebnisse des TDT auf SSC 9
4.0.5 Eigebnisse des TDT auf SSC 12
4.0.0 Eigebhisse des TDT auf SSC 15
4.6.8 Ergebnisse des TDT auf SSC 19
4.0.8 Eigebnisse des TDT auf SSC 18
4.0.9 Ergebilisse des TDT auf SSC A
4.7 Ergebnisse der vergleichenden Genomkartierung und Auflistung von positionellen
und funktionellen Kandidatengenen für Analatresien beim Schwein
5 Diskussion
5.1 Merkmalserfassung und Datenstruktur
5.2 Methodischer Ansatz zur Kopplungsanalyse 77
5 3 Bedeutung der Ergebnissse 78
the Deater and Digeomorphic management of the second
5.4 Nutzung der Ergebnisse für weitergehende Untersuchungen 81
5.5 Perspektiven für die Umsetzung der Ergebnisse in die Zuchtpraxis 82

6 Zusammenfassung /	Summary	3
---------------------	---------	---

7 Anhang 87
7.1 Relative Position der Mikrosatellitenmarker 87
7.2 Charakterisierung der Typisierungsmarker 92
7.3 Meldekarte 97
7.4 Diagnosekarte
7.5 Anleitung für den Landwirt 99
7.6 Programmdateien für die Kopplungsanalyse mit Allegro 1.0 100
7.7 Beispiele für die Berechnung der NPL-Statistiken1037.7.1 Der NPL-Wert zwischen zwei informativen Markern1037.7.2 NPL-Wert an einem nicht informativen Marker1057.7.3 LOD-Score Kopplungsanalyse zwischen einem Marker und dem Krankheitslocus bei1067.7.4 LOD-Score Analyse zwischen einem nicht informativen Marker106

7.10 Genomweite parametrische Kopplungsanalyse unter Ausschluß der Atresia recti Tiere 116 7.10.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse mit Atresia ani Tieren 116 7.10.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse mit Atresia ani Tieren 117 7.10.3 Parametrische Multipoint-Kopplungsanalyse 118 7.10.4 Parametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse 119

8 Literatur	Ľ	2	;1	L
-------------	---	---	----	---

AbbildungsverzeichnisSeite
Abbildung 1: Erfassungssystem für Ferkel mit Analatresie 15
Abbildung 2: Anzahl Ferkel mit Analatresie (n=427) nach Rassen der Eber und Muttersauen 17
Abbildung 3: Vorgehensweise bei der Auswahl der Familien für die genomweite Kopplungsanalyse
Abbildung 4: Darstellung eines binär kodierten Vererbungsvektors in einer HG Familie mit zwei erkrankten Nachkommen (NK)
Abbildung 5: Darstellung eines binär kodierten Vererbungsvektors in einer HG Familie mit zwei erkrankten Nachkommen (NK) mit Markergenotypen
Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung von Genotypkonflikten zwischen Nachkomme und Elter in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungen
Abbildung 7: Häufigkeitverteilung von Genotypkonflikten zwischen Nachkomme und Elter bei Vergleich der Genotypen der Nachkommen mit einem zufälligen Elter 40
Abbildung 8: Verlauf der NPL _{all mpt} Statistik nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 148
Abbildung 9: Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Multipoint-Kopplungsanalyse nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1
Abbildung 10: Verlauf der NPL _{all spt} Statistik nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 149
Abbildung 11: Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Singlepoint Kopplungsanalyse nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1
Abbildung 12: Multipoint LOD-Score Analyse (Penetranz 1%) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1
Abbildung 13: Multipoint LOD-Score Analyse (Penetranz 90%) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1
Abbildung 14: Singlepoint LOD-Score Analyse (Penetranz 1%) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1
Abbildung 15: Singlepoint LOD-Score Analyse (Penetranz 90 %) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1
Abbildung 16: Verlauf der NPL _{all mpt} -Statistiken auf SSC 1 basierend auf Kopplungsanalysen mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte
Abbildung 17: Informationsgehalt der Multipoint NPL-Statistik auf SSC 1 bei unterschiedlicher Anzahl an Familien und veränderter Markerdichte

Abbildung 18: Verlauf der NPL _{all spt} -Statistiken auf SSC 1 basierend auf Kopplungsanalysen mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte
Abbildung 19: Informationsgehalt der Singlepoint NPL-Statistik auf SSC 1 bei unterschiedlicher Anzahl an Familien und veränderter Markerdichte
Abbildung 20: Multipoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1% und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1
Abbildung 21: Multipoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1% und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.3
Abbildung 22: Singlepoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1% und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1
Abbildung 23: Singlepoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1% und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.3
Abbildung 24: NPLall _{mpt} -Werte an den Markern SW1621 und SW2185 auf SSC 1 in den einzelnen Familien. Der senkrechte Strich trennt die 27 Familien (F1-F27) der genomweiten Analyse von den 8 Familien (F28-F35) der zusätzlichen Auswertung
Abbildung 25: Informationsgehalt an den Markern SW1621 und SW2185 auf SSC 1 in den einzelnen Familien. Der senkrechte Strich trennt die 27 Familien (F1-F27) der genomweiten Analyse von den 8 Familien (F28-F35) der zusätzlichen Auswertung
Abbildung 26: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen, abgeleitet an den Marker SW1621 und SW1902 auf SSC 1
Abbildung 27: Vergleichende Genomkarte zwischen SSC 1 und den humanen Chromosomen HSA 9, HSA 14, HSA 15 (Quelle: INRA, France (Goureau et al. 2000))
Abbildung 28: Vergleichende Genomkarte zwischen SSC 12 und dem humanen Chromosom HSA 17 (Quelle: INRA, France (Goureau et al. 1996; Shi et al. 2001))
Abbildung 29: File *.pre: Angabe der Familienstruktur, des Geschlechts, des Krankheitsstatus und der Markergenotypen für jedes typisierte Individuum
Abbildung 30: File *.dat: Anzahl typisierter Marker, Markerreihenfolge, Krankheitsallelfrequenz, Penetranzen, Anzahl der Markerallele, Markername, Allelfrequenzen und Abstände zwischen den Marker in cM
Abbildung 31: File *.opt: mit den Namen der einzulesenden Dateien und der Angabe der durchzuführenden Kopplungsanalysen
Abbildung 32: Genotypen einer Halbgeschwisterfamilie an zwei informativen Markern und der Position x zwischen den Markern
Abbildung 33: Position x für die Berrechung der NPL-Statistik zwischen zwei Markern 103

Abbildung 34: Genotypen einer Halbgeschwisterfamilie an einem nicht vollständig	
informativen Marker 1	05
Abbildung 35: Genotypen einer Halbgeschwisterfamilie an einem nicht vollständig	
informativen Marker 1	07

Tabellenverzeichnis:Se	eite
------------------------	------

Tabelle 1: Kontingenztabelle für einen TDT an einem biallelen Marker. Grau markiert sind die relevanten Felder b und c für die TDT-Statistik, die die Allelvererbung der heterozygoten Eltern an die Nachkommen (n) beschreiben
Tabelle 2: Diagnose, Geschlecht und Anzahl der an der LUA untersuchten Ferkel 16
Tabelle 3: Charakterisierung der 20 Mikrosatellitenmarker für die Abstammungskontrolle . 19
Tabelle 4: Ausprägung der Analatresie und Geschlecht der untersuchten Ferkel für die genomweite Typisierung
Tabelle 5: Elternrassen der Ferkel mit Analatresie für die genomweite Untersuchung 20
Tabelle 6: Ausprägung der Analatresie und das Geschlecht der untersuchten Ferkel des ergänzenden Familienmaterials
Tabelle 7: Rasse der Eber und Muttersauen mit afterlosen Tieren des ergänzenden Familienmaterials 21
Tabelle 8: Mögliche Vererbungsvektoren, deren "a priori" Wahrscheinlichkeitsverteilung sowie die "a posteriori" Wahrscheinlichkeitsverteilung in einer Kernfamilie, in der zwei erkrankte HG ein IBD Allel tragen
Tabelle 9: Übertragene und nicht übertragene Markerallele M1 und M2 von einem Elter an n erkrankte Nachkommen
Tabelle 10: Wahrscheinlichkeiten von übertragenen Markerallelen M1 und M2 an erkrankte Nachkommen 36
Tabelle 11: Kombinationen von übertragenen Markerallelen M_n an N/2 Nachkommen 37
Tabelle 12: Geschätzte Allelfrequenz r des Nullallels, Standardfehler s von r und t-Wert an den Mikrosatellitenmarkern mit Inkostistenzen zwischen Elter und NK
Tabelle 13: Die maximalen NPL all mpt und NPL pairs mptWerte der einzelnen Chromosomen für die nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse. Grau markiert sind die Chromosomen mit einem p < 0.1
Tabelle 14: Die maximalen NPL all spt und NPL pairs spt Werte der einzelnen Chromosomen für die nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse. Grau markiert sind die Chromosomen mit einer p < 0.1
Tabelle 15: Die maximalen LOD-Scores _{mpt} der einzelnen Chromosomen für die parametrische Multipoint-Kopplungsanalyse bei verschiedenen genetischen Modellen. Grau markiert die Chromosomen mit signifikanten LOD-Scores _{mpt} > 3.00

Tabelle 16: Die maximalen LOD-Scores _{spt} der einzelnen Chromosomen für die parametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse bei verschiedenen genetischen Modellen
Tabelle 17: Vergleich der Kopplungsanalysen auf SSC 1 mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte, anhand der NPL _{all mpt} Statistik, dem p-Wert und dem Info _{all} . Grau markiert sind jeweils die maximalen NPL _{all mpt} -Werte der betreffenden Auswertung54
Tabelle 18: Vergleich der Kopplungsanalysen auf SSC 1 mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte, anhand der NPL _{all spt} Statistik, dem p-Wert und dem Info _{all} . Grau markiert sind jeweils die maximalen NPL _{all spt} -Werte der betreffenden Auswertung.56
Tabelle 19: Maximale Werte der Multipoint NPL _{all} Statistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Multipoint NPL _{all} Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)
Tabelle 20: Maximale Werte der Singlepoint NPL _{all} Statistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Singlepoint NPL _{all} Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)
Tabelle 21: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 14 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 1 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a'= 0.003)
Tabelle 22: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 3 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a' = 0.007)
Tabelle 23: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 8 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a' = 0.007)
Tabelle 24: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 9 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a' = 0.007)
Tabelle 25: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 12 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a'= 0.007)
Tabelle 26: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 6 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 13 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a'= 0.008)
Tabelle 27: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 15 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a' = 0.007)
Tabelle 28: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 3 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 18 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a' = 0.016)
Tabelle 29: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 8 Mikrosatellitenmarkern auf SSC X (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: a'= 0.006)
Tabelle 30: Kandidatengene für die Ausprägung von Analatresien beim Schwein
Tabelle 31: Bezeichnung, 5'-Markierung des 3'Primers, Allellängen, Typisierungslabor, chromosomale Position und Abstand der Mikrosatellitenmarker zueinander

Tabelle 32: Charakterisierung der Typisierungsmarker mit Kennzahlen für die Informativität:Heterozygotie (H), 'Polymorphism Information Content" (PIC) und 'Proportion of fullyinformative matings" (PFIM)
Tabelle 33: Wahrscheinlichkeiten p für die einzelnen Haplotypen gegeben Phase 1 [(1-x-1)/3-x-3)] trifft zu
Tabelle 34: Wahrscheinlichkeiten p für die einzelnen Haplotypen gegeben Phase 1 [(1-x-3)/3-x-1)] trifft zu
Tabelle 35: Erwartete Genotyphäufigkeiten eines NK bei gegeben Markerallelfrequenzen in der Rasse des Muttertieres
Tabelle 36: Genotypfrequenzen des typisierten Elters am Krankheitslocus bei vollständiger bzw. unvollständiger Penetranz (Allelfrequenz D gleich 0.5) und Wahrscheinlichkeit p(D) für die Übertragung das Krankeitsallel D an einen Nachkommen
Tabelle 37: Erwartete Genotyphäufigkeiten eines NK bei gegeben Markerallelfrequenzen in der Rasse des Muttertieres
Tabelle 38: Maximale Werte der Multipoint NPL _{all} und NPL _{pairs} Statistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Multipoint NPL _{all} Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)
Tabelle 39: Maximale Werte der Singlepoint NPL _{all} und NPL _{pairs} Statistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Singlepoint NPL _{all} Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)
Tabelle 40: Multipoint LOD-Scores _{mpt} bei Ausschluß der Atresia recti Tiere 118
Tabelle 41: Singlepoint LOD-Scores _{spt} bei Ausschluß der Atresia recti Tiere

1 Einleitung

In der Schweineproduktion verursachen Erbdefekte bei neugeborenen Ferkeln erhebliche finanzielle Einbußen durch direkte Tierverluste und tierärztliche Behandlungskosten. Die Zielsetzung in der Schweinezucht besteht daher nicht nur in der Verbesserung wichtiger Leistungsmerkmale, sondern auch in einer möglichst konsequenten Vermeidung von Erbdefekten. Zudem ist der einzelne Tierzüchter in seiner Verantwortung von der Tierschutzgesetzgebung (TierSchG §11b Absatz 1 und 2) gefordert, die Verbreitung von Erbdefekten nach Stand der Technik einzuschränken und damit Leiden und Schmerzen von Tieren zu vermeiden.

Mit den traditionellen Methoden der Tierzucht, d.h. der Selektion von Ebern durch den Anomalienindex, konnte das Auftreten von Erbdefekten zwar eingeschränkt werden, bisher aber nicht zufriedenstellend gelöst werden. Neue Perspektiven ergeben sich durch molekulargenetische Ansätze, die es ermöglichen, die genetische Prädisposition für derartige Anomalien auf Ebene des Genoms zu untersuchen. Vor allem auf dem Gebiet der Humangenetik wurden in den letzten Jahren enorme Fortschritte zur Aufklärung der genetischen Ursachen komplexer Krankheitsbilder wie z.B. der Alzheimer Krankheit oder dem Brustkrebs, erzielt.

Aus diesem Grund hat der Zentralverband der deutschen Schweineproduktion e. V. (ZDS) den Förderverein für Biotechnologieforschung (FBF) initiiert mit dem Ziel, molekulargenetische Methoden in der Schweinezucht zu etablieren und die Vorraussetzungen für die direkte Umsetzung der Forschungsergebnisse in die praktische Tierzucht zu schaffen. Im Rahmen des vom FBF finanzierten Projekts "Defektgenkartierung beim Schwein" wurde in der vorliegenden Arbeit die genetische Prädisposition der Anomalie "Afterlosigkeit" untersucht. Die Erblichkeit von Analatresien beim Schwein wurde bereits in mehreren Untersuchungen nachgewiesen, jedoch ohne den genauen Erbgang des Defekts spezifizieren zu können. Allerdings ergaben sich wiederholt Hinweise auf Einzelgene, die einen bedeutenden Einfluß auf die Ausprägung dieses Defekts haben könnten.

Es wurden daher in dieser Studie folgende Ziele verfolgt:

(1) Die Erstellung eines informativen Familienmaterials mit bestätigter Abstammung, das eine geeignete Ausgangsbasis für eine genomweite Mikrosatellitentypisierung liefert.

(2) Auswahl und Anpassung einer geeigneten statistischen Methodik an die speziellen Bedürfnisse der Schweinezucht, d.h. eine Statistik, welche die in diesem Versuchsansatz unterstellte Halbgeschwisterstruktur berücksichtigt.

(3) Eine genomweite nichtparametrische Kopplungsanalyse mit einer Markerabdeckung von etwa 20 cM zur Identifizierung von Genombereichen die potentielle Kandidatengene für den Erbdefekt Analatresien tragen.

(4) Weitergehende Untersuchungen dieser Genomregionen mit zusätzlichen Familien und weiteren Markern zur Bestätigung und näheren Charakterisierung der Befunde aus der Kopplungsanalyse

(5) Assoziationsanalyse zur weiteren Eingrenzung krankheitsbeeinflussender Loci

(6) Ableitung von merkmalsassoziierten Haplotypen, die nach einer Verifizierung in der Population eine erste Selektionshilfe darstellen könnten.

(7) Erstellung einer Liste von positionellen und funktionalen Kandidatengenen, die in homologen Bereichen beim Menschen bzw. der Maus liegen und einen Einfluß auf die Ausprägung von Analatresien ausüben. Literatur

2 Literatur

2.1 Definition und allgemeine Beschreibung des komplexen Merkmals Analatresien

2.1.1 Analatresie beim Schwein

Unter dem Sammelbegriff Afterlosigkeit werden beim Schwein verschiedene Mißbildungen des Intestinaltraktes zusammengefaßt, die in ihrer Form und Ausprägung den Analatresien beim Menschen entsprechen (van der Putte 1986). Die tiefe Form der Analatresie, auch als Atresia ani bezeichnet, ist dabei die häufigste Krankheitsausprägung beim Schwein. Dabei endet das Rektum blind an der intakten Analmembran, die ein Septum zwischen dem entodermalen und ektodermalen Abschnitt des Analkanals bildet. Die Anusgrube ist dabei meist vollständig angelegt. Bei der hohen Form der Analatresie, Atresia recti, ist eine dickere Bindegewebsschicht zwischen dem blinden Rektum und der Körperoberfläche ausgebildet. In schweren Fällen kann der Enddarm auch vollständig fehlen und blind in der Beckenhöhle enden (Rüsse und Sinowatz 1991). In Verbindung mit beiden Analatresien treten oftmals Rektalfisteln auf. Diese Fisteln, können das Rektum mit der Vagina, der Harnblase oder dem Harnleiter verbinden (Lambrecht und Lierse 1987). Daneben kommen in einigen Fällen auch ano-kutane Fisteln vor, die eine Verbindung des Rektums zur Oberfläche der Haut darstellen und an der Stelle des nicht vorhandenen Afters liegen.

In einer Studie von Lambrecht et al. (1989) wurden 33 neugeborene Ferkel mit Analatresien, 24 männliche und 9 weibliche, histologisch untersucht und bei 30 Tieren konnte eine Fistel diagnostiziert werden. Die Tiere (n = 18) mit der hohen Form der Analatresie (Atresia recti), hatten in allen Fällen eine rekto-urethrale bzw. rekto-vaginale Fistel ausgebildet. Unter den Ferkeln mit der tiefen Form der Analatresie (Atresia ani) ließen sich bei allen weiblichen Tieren (n = 3) eine ano-vestibuläre und bei den männlichen Tieren (n = 15), mit Ausnahme von drei Ferkeln, ano-kutane Fisteln nachweisen. Nach Erstellung von histologischen Präparaten zeigte sich, daß die innere Fistelmündung im Rektumblindsack in allen Fällen die wesentlichen Merkmale eines normalen Anus aufwies. Es war sowohl ein innerer (Sphincter internus) als auch ein äußerer Schließmuskel (Sphincter externus) zu finden, und auch das Epithel der Fistelmündung war identisch mit dem einer Analöffnung. Lambrecht und Lierse (1987) vertritt daher wie van der Putte (1986) die Auffassung, daß diese Fisteln einen ektopen Analkanal, d.h. einen Anus, der sich nicht an richtiger Stelle befindet, darstellen. Die Bezeichnung 'Fistel' sei daher irreführend und nicht korrekt. Diese These wird auch von Gans und Friedman (1961) und Nievelstein et al. (1998) vertreten, die vergleichbare Untersuchungen bei humanen Embryos durchgeführt haben. Hinsichtlich der Krankheitsklassifikation von Analatresien bestehen jedoch unterschiedliche Meinungen. Analatresien lassen sich nach Gans und Friedman (1961) bezüglich der Ursache in drei verschiedene Krankheitskategorien einteilen:

- ektoper Anus (tiefe und hohe Form) mit rekto-urethaler, rekto-vaginaler, ano-vestibulärer oder ano-kutaner Fistel
- membranöser Afterverschluß (Atresia ani ohne Fistel)
- anorekale Atresie (Atresia recti ohne Fistel)

Der membranöse Afterverschluß und die anorekale Atresie ohne 'Fistel' sind nach Gans (1961) jedoch sehr seltene Formen der Analatresie. Van der Putte (1986), der sowohl porcine als auch humane Embryos untersucht hat, konnte bezüglich der Häufigkeit dieser Ausprägungen bei den beiden Spezies ähnliches beobachten. Er kommt jedoch, was die Ursache der unterschiedlichen Ausprägungen von Analatresien betrifft, zu einer anderen Auffassung. Bei den untersuchten Embryos mit Analatresien konnte er im frühen Entwicklungsstadium in allen Fällen sogenannte 'Fisteln" beobachten. Im Laufe der Embryonalentwicklung bilden sich diese in manchen Fällen zurück und sind daher nur noch als Gewebestränge sichtbar. Bei männlichen Embryos findet eine Rückbildung dieser Fisteln häufiger statt als bei weiblichen, wodurch sich Unterschiede bezüglich der Häufigkeit, mit der Fisteln bei männlichen und weiblichen Tieren auftreten, erklären ließen.

2.1.2 Bedeutung des Defekts und Vorkommen beim Schwein

Die Angaben in der Literatur über die Prävalenz von Analatresien beim Schwein sind sehr unterschiedlich und variieren zwischen 0.1-1.0 % innerhalb der Population (Hori *et al.* 2001; Stigler *et al.* 1991; Thaller 1992; Triebler 1984). Alle Autoren konnten dabei deutliche Unterschiede in der Häufigkeit des Defekts zwischen einzelnen Rassen beobachtet. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen der Anomalienprüfung 1999-2001 in Bayern, anhand der sich die Häufigkeit von afterlosen Ferkeln bei KB-Ebern der Rasse DL auf 0.073 % und bei Ebern der Rasse PI auf 0.026 % schätzen läßt (BLT-Grub 2000; BLT-Grub 2001; BLT-Grub 2002) (persönliche Mitteilung von Herrn Kay-Uwe Götz, BLT Grub). Die Dunkelziffer der nicht erfaßten Fälle von Analatresien beim Schwein ist aber unter Umständen beträchtlich, da im Rahmen des Anomalienindexes in Bayern im Mittel nur 30 Würfe pro Eber erfaßt werden und die Rückmeldung einer Anomalie in der Verantwortung des Betriebsleiters bzw. des zuständigen Besamungstechnikers liegt.

Normalerweise verenden die betroffenen Ferkel innerhalb von ein bis drei Tagen. In einigen Fällen kommt es jedoch vor, daß die Tiere zwischen einer und drei Wochen alt werden. Häufigste Todesursache ist dabei Intoxikation aufgrund von Obstipation. Charakteristisch ist dabei der stark aufgetriebene Bauch. Manchmal führt das starke Anschoppen des Darminhaltes aber auch zur Darmruptur. Im weitern verursachen die freigesetzten Futterpartikel eine Entzündung der Bauchhöhle (Peritonitis) mit letalen Folgen (Kinzelbach 1932). Weiblichen Tieren mit rekto-vaginal Fistel können hingegen längere Zeit überlebensfähig sein, da diese in der Lage sind, durch die Scheide abzukoten. So berichten Schweinezüchter von weiblichen Tieren die zur Mast aufgestallt bzw. zur Zucht eingesetzt und erstmalig besamt wurden, ehe der Defekt erkannt wurde.

2.1.3 Vorkommen bei anderen Spezies

In der unterschiedlichen Form und Ausprägung entsprechen die Analatresien beim Ferkel den verschiedenen Formen beim Menschen. Die Prävalenz derartiger Erkrankungen liegt beim Menschen bei 0.048 % (4.8 Erkrankung auf 10000 lebend geborene Kinder) (Stoll *et al.* 1997). Das Spektrum der verschiedenen Formen reicht dabei von ektopem Anus über Atresia ani und recti mit urogenitaler Fistel bis hin zu komplexen Deformationen der Kloake. Dabei ist anzumerken, daß die Krankheitsklassifizierung und -definition in der Literatur sehr unterschiedlich gehandhabt werden. In vielen Fällen werden derartige Erkrankungen nicht in spezielle Krankheitskategorien unterteilt, so daß der Begriff Analatresien einen Sammelbegriff für ursächlich verschiedenen Mißbildungen mit sehr differenzierter Entwicklung in der Embryonalphase darstellt. So werden z.B. Kloaken von verschiedenen Autoren (Kluth und

Lambrecht 1997) als ursächlich andersartiger Defekt angesehen. Schwierig ist eine genaue Differenzierung dieser Erkrankungen auch deshalb, weil die embryologischen und pathologischen Hintergründe dieser Krankheiten bislang nur unzureichend bekannt sind.

Beim Menschen sind Analatresien oftmals in Zusammenhang mit Syndromen zu beobachten (Hassink et al. 1996). So treten Analatresien zusammen mit der Hirschsprung-Erkrankung (angeborenen Erweiterung des Dickdarms) (Mahboubi und Templeton 1984) oder in Zusammenhang mit dem VACTERL-Syndrom (Vertebraldefekt, Analatresie, Herzfehler (cardial anomalies), tracheoösophageale Fistel, Ösophagusatresie (esophagus atresia), Nierenfehlbildungen (renal anomalies) und Anomalien der oberen Extremitäten (limb defects)) (Khoury et al. 1983) auf. In Kombination mit dem Townes-Brocks Syndrom (Analatresie, Fehlbildung der Ohren und der Hände) (Townes und Brocks 1972), dem Pallister-Hall Syndrom hypothalamisches Hamarblastom, Hypopituitarismus, (congenitales Kehlkopfspalte, Analatresie, Fehlbildung der Hände) (Hall et al. 1980) oder einer Os sacrum-Agenesie (Fehlen des Kreuzbeins) (Unluer und Bulut 1991) finden sich bei neugeborenen Kinder oftmals Mißbildungen des Urogenitaltraktes, sowie Defekte des anorektalen Systems.

Außer bei Menschen sind Atresia ani und Atresia recti in zahlreichen anderen Spezies beschrieben worden. Dazu zählen das Rind (Dreyfuss und Tulleners 1989) und der Amerikanische Büffel (Bison Bison) (Marler *et al.* 1977). Ebenfalls liegen Fallstudien beim Schaf (Dennis und Leipold 1972), beim Pferd (Gideon 1977), beim Hund (McAfee und McAfee 1976) und bei der Katze (Suess *et al.* 1992) vor. Es ist also davon auszugehen, daß in den meisten Haustierspezies Analatresien vorkommen, wenn auch mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit.

2.1.4 Darmentwicklung in der Embryonalphase des Schweins

In den ersten Stadien der Fruchtentwicklung, in der Gastrulation (8. - 9. Tag der Gravidität) entsteht eine in ihrer Entwicklung determinierte und in Keimblätter aufgeteilte Keimanlage. Im ersten Schritt entsteht dabei das Entoderm und der Embryonalknoten wandelt sich um zur Keimscheibe. In der zweiten Phase der Gastrulation bildet sich das Mesoderm, die Chorda dorsalis und das Neuralrohr. Ein Keimblatt kann dabei an der Entwicklung mehrerer Organe beteiligt sein bzw. die meisten Organe entstehen aus mehreren Keimblättern. Dennoch lassen sich bestimmte Funktionsgruppen auf einzelne Keimblätter zurückführen. Aus dem Ektoderm entstehen Organe, die den Kontakt des Individuums zur Außenwelt ermöglichen, wie z. B. die Sinnesorgane und das Nervensystem. Aus dem Mesoderm entstehen Muskulatur, Binde- und Stützgewebe und aus dem Entoderm das innere Epithel zur Auskleidung des Verdauungskanals oder des Atmungsapparates.

Im Laufe der weiteren Entwicklung kommt es zur Abfaltung der Keimscheibe und zur Ausbildung des primitiven Darmrohres. Das kraniale Ende ist dabei durch die Rachenmembran, das kaudale Ende des Darms von der Kloakenmembran (etwa 14.-15 Tag der Gravidität) verschlossen. Das primitive Darmrohr differenziert sich im weiteren Verlauf in Vorderdarm, Mitteldarm und Enddarm. Aus dem Vorderdarm entwickelt sich dabei die Speiseröhre und der Magen, aus dem Mitteldarm das Duodenum, das Jejunum, das Ileum, das Caecum und das Kolon. Der terminale Abschnitt des Enddarms mündet zunächst in die durch die Kloakenmembran abgeschlossene Kloake. Diese ist mit Entoderm ausgekleidet. In der Kloakenmembran liegen Entoderm und Ektoderm ohne Zwischenschicht aus Mesenchym direkt aneinander. In der weiteren Entwicklung (28.-32. Tag der Gravidität) wird die Kloake

durch eine Scheidewand, das Septum Urogenitales, daß sich vom Übergangsbereich zwischen Enddarm und Allantois aus entwickelt, in den ventral gelegenen Urogenitaltrakt und in den dorsal gelegenen anorektalen Kanal unterteilt (Rüsse und Sinowatz 1991).

Aus dem anorektalen Kanal entsteht in der Folge das Rektum und der Anus. Im Bereich der späteren Analregion bilden sich dabei zunächst Mesenchympolster unter der Epidermis aus. Das Analfeld mit der Analgrube kommt dadurch am Boden einer kleinen Einsenkung des Ektoderms, dem Proctodeum, zum liegen. Nach dem Einreißen der Kloakenmembran im Bereich des Anus wird das ektodermale Proctodeum dem Enddarm zugefügt. Deshalb wird das letzte Stück des Darmrohres von einem unverhornten Plattenepithel ausgekleidet, das sich vom Ektoderm der Afterbucht ableitet. Um den Zeitpunkt der Geburt bilden sich beim Schwein zudem in der kutanen Schleimhaut des Proctodeums Analdrüsen aus, welche durch apokrine Sekretion ein schleimiges Sekret in den Analkanal abgeben.

2.1.5 Ätiologie von Analatresien

Die Ätiologie von anorektalen Defekten ist bisher nicht vollständig geklärt. Die bisherigen Vorstellungen, wie diese Defekte zustande kommen, basieren meist auf morphologischen und histologischen Untersuchungen an einer kleinen Anzahl von humanen und porcinen Embryos (Kluth *et al.* 1995; Nievelstein *et al.* 1998; van der Putte 1986).

Ein wichtiges Tiermodell für die Entstehung von anorektalen Defekten stellen die Untersuchungen von van der Putte (1986) an porcinen Embryos dar. Er hat 41 Embryos und Föten in der Zeit zwischen dem 24. und 120. Tag der Gravidität untersucht. Seiner Meinung nach ist die Entstehung von Analatresien bedingt durch einen Defekt der dorsalen Kloakenmembran. Diese Kloakenmembran wandert im Laufe der normalen embryonalen Entwicklung des Enddarms, verursacht durch das Wachstum des Geschlechtshöckers, dorsal in Richtung des Schwanzdarmes. Diese Verlagerung ist ein wichtiger Bestandteil für die Teilung der Kloake in Urogenitalsystem und Rectum durch das urogenitale Septum. Bei Tieren mit Analatresien konnte eine Verlagerung der Kloakenmembran zusammen mit den angrenzenden mesenchymalen Komponenten nicht beobachtet werden. Bei Tieren mit hohen Formen von Analatresien (Atresia recti) zeigt sich die Kloakenmembran im dorsalen Bereich zudem stark verkürzt. Die Folge dieser zu kurzen Kloakenmembran ist eine Fehlmündung des Anus, der eine "ektope" Position einnimmt und in den Urogenitaltrakt mündet. Nach den Untersuchungen van der Putte (1986) sind die verschiedenen Formen der Krankheitsausprägung (Atresia ani und Atresia recti) also als ursächlich gleicher Defekt zu betrachten. Die unterschiedlichen Ausprägungen von Analatresien sind seiner Meinung nach bedingt durch den Grad der Deformation der Kloakenmembran in der embryonalen Entwicklung.

Ein weiteres Tiermodell für die Entstehung von Analatresien wurde bei der Maus beschrieben. Eine von Danforth gezüchtete Linie mit einer spontanen Mutation, die sogenannte SD-Maus (short tail **D**anforth mouse) (Danforth 1930), ist gekennzeichnet durch einen verkürzten Schwanz und weist innerhalb der Mäuselinie ein Spektrum von anorektalen und urogenitalen Anomalien auf. Nach Meinung von Gluecksohn-Schoenheimer (1943) beeinflußt das SD-Gen die Entwicklung des axialen Skelettes sowie die Ausbildung des anorektal und des Urogenitalsystems. Das SD-Gen ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht näher charakterisiert und die ursächliche Mutation unbekannt. Durch Kopplungsanalyse konnte die SD-Region auf Chromosom 2 bei der Maus eingegrenzt werden (Alfred *et al.* 1997; Koseki *et al.* 1993). Die pathologischen und anatomischen Untersuchungen die Kluth *et al.* (1995) an heterozygoten (SD/+) Mäusen durchgeführt hat, haben gezeigt, daß das Spektrum der Defekte mit denen bei Mensch und Schwein (Lambrecht und Lierse 1987) vergleichbar ist. Bei alle SD-Mäusen mit anorektalen Defekten war eine Deformation der dorsalen Kloake erkennbar, sowie eine am dorsalen Ende verkürzte Kloakenmembran. Der Aufbau der Membran unterschied sich zudem wesentlich von dem gesunder Embryonen. In der normalen Embryonalentwicklung setzt sich die Kloakenmembran aus dem Entoderm des Enddarms und dem Ektoderm zusammen. Bei einigen anormalen Embryos befand sich mesodermales Gewebe zwischen Entoderm und Ektoderm. Bei anderen, die eine stark verkürzte Kloakenmembran hatten, war die Zone in der Entoderm und Ektoderm zu einander Kontakt haben, wesentlich reduziert. Kluth *et al.* (1995) kommen daher zu dem Schluß, daß eine fehlangelegte Kloakenmembran die Ursache für anorektale Defekte ist. Dies führt im weiteren Verlauf der embryonalen Entwicklung zu einem anormalen Anus der an einer ektopen Position liegt. Die Position der Anusöffung ist dabei korreliert mit dem Ausmaß der Schädigung während der Entwicklung der Kloakenmembran. Dieser Befund wurde von van der Putte (1986) bereits bei Mensch und Schwein ähnlich beschrieben.

Zudem gibt es Knock-out Experimente bei Mäusen (Kimmel *et al.* 2000), welche die Transkriptionsfaktoren *Gli 2* und *Gli 3* des *SHH* (Sonic hedgehog) Gens betreffen. Das Sonic hedgehog spielt eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung des Vorderdarms und der midaxialen Organe bei Säugetieren. Zumindest bei der Maus konnte auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Enddarms nachgewiesen werden. So zeigten homozygote *Gli 3* Mutanten nach Kimmel et al. (2000) einen ektopen Anus, wohingegen die homozygoten *Gli 2* Mutanten eine fehlende Anusöffnung mit recto-urethraler Fistel aufwiesen.

Bei der Ratte und der Maus wurden Fälle beschrieben, in denen Mißbildungen des Urogenitaltrakts mit Analatresien durch erhöhte Gaben von ATRA (all-trans Retinsäure) ausgelöst wurden (Bitoh *et al.* 2001; Kubota *et al.* 2000; Padmanabhan 1998). 98 % der untersuchten Mäuse Embryonen hatten Mißbildungen mit Analatresien, wenn den Müttern hohe Dosen (100 mg/kg) von ATRA in der Trächtigkeit verabreicht wurden. Die häufigsten Formen von Analatresien waren dabei rekto- urethrale und rekto-vaginale Fisteln. Vor allem im End- und Schwanzdarm von Mäusen konnte eine erhöhte Immunreaktion von RARA (Retinoid Rezeptor alpha) nachgewiesen werden (Bitoh *et al.* 2001).

Bei Dickinson (1967); Jamrog-Cendrzak und Cendrzak (1979); Tibboel *et al.* (1980) wurden Fällen beschrieben in denen durch eine nicht ausreichende Blutversorgung der superioren und inferioren rektalen Arterie, Analatresien bei verschiedenen Spezies verursacht wurden. Lambrecht *et al.* (1986) haben mittels einer Angiographie des Beckens das Arteriensystem von Ferkeln mit hohen und niedrigen Formen von anorektalen Defekten genauer untersucht. Keines der Ferkel zeigte eine isolierte Form von rektaler Atresie wie sie bei vaskulären Erkrankungen auftreten kann, alle betroffenen Tiere hatten normale Gefäße bzw. eine ausreichende Blutversorgung der Beckenregion. Lambrecht vertritt daher die Auffassung, daß Analatresien, mit Ausnahme der isolierten rektalen Atresie, nicht durch eine vaskulären Malperfusion während der Embryogenesis verursacht werden.

2.1.6 Vererbung von Analatresien beim Schwein

Eine der ersten Untersuchung über Atresia ani beim Schwein hat Kinzelbach (1932) im Jahre 1932 angefertigt. Dabei wurden Tiere der Rasse Schwäbisch Hällisches Schwein untersucht und erstmals Kreuzungsexperimente mit operierten afterlos geborenen Ebern und Muttersauen

durchgeführt. Ein dominanter Erbgang wurde generell ausgeschlossen, da einzelne Eber zwar gehäuft afterlose Ferkel aufwiesen, aber Würfe mit mehr als einem erkrankten Tier nur sehr selten auftraten. Bei gezielter Paarung von zwei Merkmalsträgern zeigten sich in 2 Würfen insgesamt 7 gesunde und 4 afterlose Tiere. Bei Kreuzung dieser F_1 Tiere untereinander ergaben sich in vier Würfen 37 Ferkel die sowohl gesunde als auch afterlose Tiere in einem Verhältnis von 3:1 aufwiesen. Kinzelbach (1932) vermutete daher einen monogen rezessiven Erbgang mit einer unvollständigen Penetranz von 25 %.

Zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich der Penetranz kam Henricson (1963), der ebenso wie Kinzelbach Kreuzungsexperimente mit operierten Anlageträgern durchführte. Er schätzte die Penetranz anhand von 10 Paarungen mit erkrankten Ebern und Muttersauen auf 0.54. Die Prävalenz innerhalb der schwedischen Landrasse die als Tiermaterial diente, wurde mit 1 % angegeben. Dabei traten männliche und weibliche Atresia ani Ferkel mit gleicher Häufigkeit auf. Henricson (1963) vermutete aufgrund seiner Untersuchungen einen difaktoriellen rezessiven Erbgang mit unvollständiger Penetranz

Beim weißen ungarischen Fleischschwein konnte Hamori (1962) unter 138 lebend geborenen Ferkeln, einen Anteil von 14.4 % afterlose Tieren beobachten. Das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich, betrug bei den erkrankten Tieren 3 : 1. Aufgrund seiner Beobachtungen favorisierte Hamori einen difaktoriellen rezessiven Erbgang.

In den Untersuchungen von Norrish und Rennie (1968) wurde die Prävalenz von Atresia ani anhand von 5531 lebend geborenen Ferkel der Rasse Yorkshire zwischen 0.44-0.63 % geschätzt. In Übereinstimmung mit Kinzelbach (1932) und Berge (1941) berichtet er von einem Verhältnis normaler zu defekten Ferkeln, innerhalb von Würfen aus Anpaarungen mit operierten Merkmalsträgern, von 3:1. Er folgert daraus, daß für die Ausprägung des Defekts eine polygenes Vererbungsmodell oder ein rein monogen rezessiver Genlocus mit geringer Penetranz verantwortlich sein könnte.

In den achtziger Jahren untersuchte Triebler (1984) in ostdeutschen Schweinerassen verschiedene Erbfehler. Als Untersuchungsmaterial wurden dazu Jungsauen und Mastläufer des Hybridzuchtprogramms untersucht. Anhand von 9431 Würfen mit insgesamt 98928 lebend geborenen Ferkeln schätzte er die Frequenz der Afterlosigkeit in diesem Tiermaterial auf 0.23%. Als Vererbungsmodus hält Triebler einen rezessiven Erbgang mit 50 % Penetranz für wahrscheinlich.

Auf Basis der Erhebungen der Anomalienprüfung in Bayern aus den Jahren 1986-1989 schätzte Stigler *et al.* (1991), anhand von 5304 Würfen der Rassen DL, PI und der Kreuzung PI x DL, die Prävalenz der Afterlosigkeit beim Schwein auf 0.10 % über alle untersuchten Rassen, auf 0.20 % bei der Rasse DL und 0.07 % für die Kreuzung PI x DL. Er vermutet anhand seiner Ergebnisse, daß die Afterlosigkeit als quantitative Eigenschaft mit Schwellenwertcharakter vererbt wird. Einen reinen monogen rezessiven Erbgang schließt er aus.

Die Ergebnisse der von Thaller (1991) durchgeführten Segregationsanalyse für das Merkmal Afterlosigkeit ergaben deutliche Hinweise auf den möglichen Einfluß eines Einzelgens. Als wahrscheinlichster Erbgang hatte sich dabei ein gemischtes Modell mit starkem Einfluß eines Hauptlocus zusammen mit polygenen Wirkungen herausgestellt. Ausgewertet wurden dazu 32621 Würfe von 1003 Ebern, die im Rahmen der Anomalienprüfung in Bayern in den Jahren 1986 bis 1991 untersucht wurden. Die Gesamthäufigkeit der Afterlosigkeit in der Schweinepopulation wurde dabei auf 0.10 % geschätzt. Zwischen den Rassen ergaben sich deutliche Unterschiede in der Häufigkeit betroffener Ferkel. So war bei reinrassigen DL Ferkeln die Afterlosigkeit mit einem Anteil von 0.16 % häufiger zu finden, als bei reinen PI Ferkeln mit 0.05 % und Kreuzungsferkeln der Rassen DL x PI mit 0.09 %. Es hatte sich zudem in dieser Studie gezeigt, daß erkrankte Wurfgeschwister nur sehr selten zu finden sind. Von 674 untersuchten PI Eber, hatten nur 2 Eber Würfe mit 4 erkrankten Ferkeln, 8 Eber Würfe mit 3 afterlosen Tieren und 35 Eber Würfe mit 2 erkrankten Vollgeschwistern.

In der Studie von Hori et al. (2001) wurde die Prävalenz von Analatresien bei japanischen Schweinerassen auf 0.18 % geschätzt. Grundlage waren dabei 151 erkrankte Tiere in 85563 lebend geborenen Ferkeln. Ein signifikanter Unterschied im Geschlechterverhältnis der erkrankten Ferkel konnte dabei nicht beobachtet werden. Um Information über den möglichen Erbgang zu erhalten, wurden verschiedene Kreuzungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden drei weibliche operierte Anlageträgern der japanischen Landrasse und der Rasse Large White mit einem Duroc Eber gekreuzt. Durch wiederholte Kreuzung der Nachkommen mit Analatresien über einen Zeitraum von 15 Jahre konnte so die Inzidenz in dieser Schweinelinie von 30.0 % auf 61.9 % gesteigert werden. Für weitere Untersuchungen wurden vier Sauen mit Analatresie aus der Schweinelinie mit einem gesunden Meishan Eber gekreuzt. Alle F₁ Nachkommen dieser Kreuzung waren gesund. Bei Verpaarung der F1 Tiere untereinander waren 1.5 % der Nachkommen an Analatresien erkrankt, während bei der Rückkreuzung von F1 mit der F0 Generation, 8.0 % der Nachkommen von Analatresien betroffen waren. Diese Umstände wurden als deutlicher Hinweis auf einen polygenen bzw. oligogenen Hintergrund der Erkrankung gedeutet. Für eine genomweite Kopplungsanalyse wurden 4 F₀ 11 F₁ sowie 9 erkrankte F₁ und F₀ aus dem Rückkreuzungsexperiment mit ihren 45 erkrankten Nachkommen typisiert. Anhand von 58 informativen Mikrosatellitenmarkern wurde eine parametrische Kopplungsanalyse unter Annahme eines Standardvererbungsmodus mittels der Software Crimap 2.4 durchgeführt. Dabei ergab sich proximal auf SSC 15 an der Position des Markers SW2072 ein LOD-Score von 2.7.

2.2 Positionelle Klonierung komplexer Krankheiten mit genetischen Markern

2.2.1 Komplexitätsfaktoren

Die ersten Kopplungsanalysen in der Humangenetik wurden bei für Krankheiten durchgeführt, die einen einfachen Mendelschen Erbgang, dominant, rezessiv oder geschlechtsgekoppelt mit vollständiger Penetranz aufwiesen. Bei Krankheiten wie der Cystischen Fibrosis (Tsui 1986) oder der Duchenne Muskel Dystrophie (Monaco 1987) war dieser Ansatz, zur Identifizierung des verantwortlichen Krankheitsgens erfolgreich. Für die Analyse war eine Vielzahl an Familien mit mehreren erkrankten Individuen nötig. Im Gegensatz dazu ist es bei komplexen Krankheiten, oftmals schwierig eine Kosegregation von Krankheitslocus und einem Markerlocus festzustellen. Da hier das genetische Modell meist nicht so offensichtlich ist wie bei Merkmalen, die einem streng Mendelschem Vererbungsmuster folgen.

Dabei kann die Komplexität der Erkrankung von mehreren Faktoren herrühren, wie bei Lander und Schork (1994) beschrieben:

• Schwierige Diagnose

Der Schwierigkeit, den Phänotyp genau zu kategorisieren, z.B. bei verschiedenen klinischen Formen der Erkrankung, bei Unsicherheiten bezüglich der Diagnose oder bei quantitativen

Literatur

Merkmalen (z.B. Blutzuckerspiegel), die zur Unterscheidung von gesunden und kranken Individuen herangezogen werden.

• Oligogener bzw. Polygenen Erbgang

Zwei oder mehrere unabhängige Genloci sind für die Ausprägung der Erkrankung verantwortlich. So ist bei vielen Proteinen wie z. B. der Glucose- 6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) bekannt, daß die Interaktion von mehreren unabhängigen Genen notwendig ist um am Ende ein funktionsfähiges Genprodukt zu erhalten (Kanno *et al.* 1989).

• Unvollständige Penetranz

Nur ein bestimmter Anteil der Individuen, die eine genetische Disposition für die Krankheit aufweisen, prägen den Krankheitsphänotyp aus.

• Phänokopien

Nicht erbliche Ursachen, z. B. Umwelteffekte wie Medikamente verursachen die Ausprägung eines nicht unterscheidbaren Krankheitsphänotyps. So kann eine medikamentöse Behandlung mit Warfarin in der Schwangerschaft zu einem ähnlichen Krankheitsbild der Chondrodystrophie führen wie eine Mutation im Gene der Gamma-Glutamyl Carboxylase (*GGCX*) (Brenner *et al.* 1998; Menger *et al.* 1997; Shaul *et al.* 1975).

• Genetische Heterogenität

Zwei oder mehrere Genloci prägen einen ähnlichen Phänotyp mit unterschiedlichem ätiologischem Hintergrund aus. Beispiel dafür sind die Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung (CMT) bei der zwei Loci auf unterschiedlichen Chromosomen für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sein können (Valentijn *et al.* 1992; Vance *et al.* 1989; Zhao *et al.* 2001).

• Imprinting

Für die Genexpression und damit die Ausprägung einer Erkrankung kann entscheidend sein, ob die verantwortliche Genvariante paternal oder maternal vererbt wurde. Durch Modifizierung der DNA, z B. durch Methylierung der DNA während der Reifung der Keimzellen zu Spermatound Oozyten, kann die väterliche oder mütterliche Erbanlage inhibiert werden und zu unterschiedlicher Genexpression im Nachkommen beitragen, je nachdem ob die Genvariante von der Mutter oder vom Vater kommt (Hall 1990; Reik und Walter 2001). Beispiele dafür sind das Beckwith-Wiedemann (Lubinsky und Hall 1991) und das Prader Willi Syndrom (Buiting 1998) beim Menschen.

2.2.2 Genetische Marker und Genomkarten

Mikrosatelliten sind sowohl aufgrund ihrer relativ gleichmäßigen Verteilung im Genom als auch aufgrund ihres hohen Polymorphiegrads die meist verwendeten Marker für genomweite molekulargenetische Untersuchungen. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um Di nucleotidrepeats $(CA)_n$. Innerhalb des Genoms von Säugetieren sind sie zirka alle 10 kbp zu finden und aufgrund der Vielzahl an Allelen oft hochpolymorph. Die geschätzte Zahl der Mikrosatellitenmarker im porcinen Genom beträgt dabei zwischen 65.000 -100.000 (Wintero *et al.* 1992). Die Zahl der bekannten und verfügbaren Mikrosatelliten beim Schwein liegt jedoch nach Gellin *et al.* (2000) bei 1400.

Die porcine Genomkarte der Nordic Pig Gene Mapping Collaboration umfaßt 236 Marker, darunter 150 Mikrosatellitenmarker (Ellegren 1994; Marklund *et al.* 1996). Die Ausgangsbasis für diese Markerkarte ist dabei eine Ressourcenpopulation mit 200 F_2 und 26 F_1 , die auf eine Parentalgeneration von zwei Wildschweine und acht schwedischen Yorkshire Tieren zurückzuführen sind. Die Länge des Schweine Genoms bei dieser über die Geschlechter gemittelt Karte beträgt 2300 cM. Dabei konnte in den meisten Genomregionen unterschiedliche Rekombinationsrate bei weiblichen und männlichen Tieren beobachtet werden. Das Verhältnis der Rekombinationsraten zwischen weiblichen und männlichen Tieren betrug 1.4 : 1. Für das homogametische Geschlecht eine Länge von 1830 cM ermittelt. Eine Ausnahme bilden dabei das SSC 1 zwischen den Markern S0008 und S0302, sowie das SSC 6 im Bereich TAT-S0297 die in diesen Genomregionen signifikant höhere Rekombinationsraten an den distalen Enden der Chromsomen. Besonders hohe Rekombinationsraten in der Telomerregion zeigten dabei die chromosomalen Bereiche 1qter, 4pter, 5qter, 6pter und 6qter (Marklund *et al.* 1996).

Die Genomkarte mit der größten Anzahl von bekannten Mikrosatelliten (ca. 650) beim Schwein wird über das PiGMaP Linkage Consortium (Archibald *et al.* 1995) zur Verfügung gestellt. Die Länge des Schweine Genoms beträgt dabei über die Geschlechter gemittelt 1800 cM. Die bisher detailliertesten Karten stellt das U.S. Meat Animal Research Center (MARC) mit insgesamt 239 Mikrosatelliten (Rohrer *et al.* 1996) zur Verfügung (http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html). Die Ressourcenpopulation basiert auf einer Kreuzung von Meishan Ebern x White Composite Sauen (1/4 Chester White, 1/4 Large White, 1/4 Landrace und 1/4 Yorkshire), die über sechs Generation mit Duroc bzw. chinesischen Rassen (Fengjing, Meishan und Minzhu) rückgekreuzt wurden (Rohrer *et al.* 1994). Die Länge des Schweingenoms wurde dabei, über die Geschlechter gemittelt, auf 2287 cM geschätzt. Nach Geschlechtern getrennte Genomkarten stehen derzeit noch nicht zur Verfügung.

Zusammen stellen alle drei Konsortien etwa 1500 Mikrosatelliten zur Verfügung die die Autosomen und das X-Chromosomem des Schweins abdecken. Sehr spärlich ist dabei die pseudoautosomale Region mit nur 2 Markern abgedeckt. Trotz der relativ großen Anzahl an Markern sind die Genomkarten aufgrund der sehr unterschiedlichen Ausgangspopulationen und der damit verbundenen unterschiedlichen Rekombinationsraten nur unzureichend miteinander kombinierbar. Ebenso besteht bislang ein Mangel an geschlechtsspezifischen Mikrosatellitenkarten, die zum Teil sehr großen Unterschiede bezüglich der Markerdistanzen aufweisen können (Marklund *et al.* 1996).

2.2.3 Statistische Methoden zur Kopplungsanalyse

Das Ziel von statistischen Methoden ist der Nachweis der Kosegregation eines Markerallels mit einem Merkmal in einer Familie. Dabei lassen sich die dafür verwendeten Verfahren die zur Kartierung von Krankheitsgenen eingesetzt werden in zwei Kategorien gliedern:

(1) Parametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse, die auf einem genetischen Model basieren. Diese Verfahren unterstellen die genaue Kenntnis des vorliegenden Erbgangs, sowie der entsprechenden Parameter, die das Auftreten der Krankheit in der Population bedingen. Dazu zählen z. B. die Frequenz des Krankheitsallels, sowie die Penetranz.

Literatur

(2) Nichtparametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse

Methoden die kein spezifisches Vererbungsmodell unterstellen und daher auch oft als modellfreie Verfahren bezeichnet werden.

2.2.3.1 Parametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse

Die parametrische Kopplungsanalyse stellt das klassische Verfahren zur Identifizierung von Genomregionen dar, die mit dem Auftreten der Krankheit in Beziehung stehen. Am häufigsten wird dabei der LOD-Score verwendet (Morton 1955). In der ursprünglichen Form basiert dieses Verfahren auf dem Vergleich von rekombinanten und nicht rekombinanten Nachkommen innerhalb einer Familie, wodurch eine Schätzung der Rekombinationsrate und damit des Abstandes zwischen Marker und dem Phänotyp verursachenden Gens möglich wird. Die Rekombinanten und der Zahl der möglichen Meiosen. Mit Hilfe statistischer Tests wird überprüft, ob die Rekombinationsrate signifikant kleiner ist als 0.5, dem Erwartungswert für ungekoppelte Genorte (Elston 1998; Ott 1999).

2.2.3.2 Nichtparametrische Verfahren zur Kopplungsanalyse

Neben der Schwierigkeit, den Vererbungsmodus komplexer Erkrankungen zu spezifizieren, ist es in der Humangenetik oftmals problematisch, DNA von großen Familien mit mehreren lebenden erkrankten Individuen zu sammeln. Aufgrund dieser Tatsache entwickelte Suarez et al. (1978) als Alternative zur klassischen parametrischen LOD-Score Kopplungsanalyse den "affected sibling pairs" (ASP) Ansatz. Diese Methode basiert auf der Annahme, daß erkrankte Geschwister sowohl am Krankheitslocus als auch an den unmittelbar benachbarten Markern die gleichen Allele vom gemeinsamen Elter geerbt haben. Da diese Allele bezüglich der Abstammung identisch sind bezeichnet man sie als "identical by descent" (IBD). Der statistische Test auf Kopplung zwischen einem beliebigen Krankheitslocus und Marker prüft, ob signifikante Abweichungen von der erwarteten IBD Verteilung bestehen. Bei einem Vollgeschwisterpaar würde man beispielsweise erwarten, daß sie mit einer Wahrscheinlichkeit $p_0 = 1/4$ kein gemeinsames Allel, mit $p_1 = 1/2$ ein Allel und mit $p_2 = 1/4$ zwei identische Allele teilen. Für eine Familie mit einem Halbgeschwisterpaar sind p_0 und $p_1=1/2$ und die Wahrscheinlichkeit p₂=0. Das bedeutet, daß unter der Nullhypothese: keine Kopplung zwischen Krankheitslocus und Markerlocus, der Erwartungswert für das Teilen von Allelen unter Geschwistern gleich 0.5 und bei Kopplung größer als 0.5 ist. Zur Anwendung kommt dabei ein χ^2 -Test (Lander und Schork 1994).

Die ASP Methoden, die zunächst nur eine Kopplungsanalyse zwischen einem Marker und dem Krankheitslocus erlaubten, wurden von Hauser *et al.* (1996); Olson (1995) auf zwei flankierende Marker und später von Risch (1990a); Risch (1990b) mit Hilfe eines Maximum-Likelihood Ansatzes auf mehrere Markerloci erweitert (Kruglyak *et al.* 1996).

Der Vorteil der nichtparametrischen ASP Methode ist, daß sie keine Annahmen bezüglich des spezifischen Vererbungsmodus der Krankheit benötigt. Sie ist daher robuster als die klassische LOD-Score Kopplungsanalyse, da die Teststatistik nicht von unvollständiger Penetranz, Phänokopien, genetischer Heterogenität und komplexen Erbgängen beeinflußt ist.

Kann jedoch, die Kenntnis des Vererbungsmodus einer Krankheit als gesichert vorausgesetzt werden besitzt die LOD-Score Kopplungsanalyse im Vergleich zur nichtparametrischen 'allele sharing' Methode eine deutlich höhere Mächtigkeit (Lander und Schork 1994).

2.2.4 Implementierung von parametrischen und nichtparametrischen Verfahren in Computerprogrammen

Für die Anwendung von nichtparametrischen und parametrischen Verfahren für die Problemstellungen in der Humangenetik wurden mehrere Softwareprogramme entwickelt. Dazu zählt das Programm Genehunter (Kruglyak et al. 1996). Zur genomweiten Kopplungsanalyse im Rahmen dieser Studie wurde das Programm Allegro 1.0 (Gudbjartsson et al. 2000) verwendet, welches ein Nachfolgeprogramm von Genehunter 2.0 ist. Der Vorteil von Allegro 1.0 im Vergleich zu Genehunter 2.0 ist die erhöhte Rechenkapazität und geschwindigkeit. Mit beiden Programmen können auf der Basis des Lander-Green-Algorithmus (Lander und Green 1987), komplexe Pedigreestrukturen unter Einbeziehung der gesamten Markerinformation sowohl mit nichtparametrischen, als auch mit parametrischen Methoden ausgewertet werden. Zur nichtparametrischen Auswertungsmethodik zählen dabei verschiedene "non parametric linkage" (NPL) Statistiken, die sowohl zwischen einzelnen Markern und dem Krankheitslocus, als auch unter Einbeziehung mehrerer Marker berechnet werden können. Bestandteil der parametrischen Auswertung ist die Berechnung einer klassischen LOD-Score Teststatistik. Voraussetzung ist dazu jedoch die genaue Angabe spezieller Parameter, wie Vererbungsmodus, Penetranz der Krankheit, Phänokopienrate und Frequenz des Defektallels in der Population. Bei komplexen Krankheiten ist eine genaue Charakterisierung dieser Parameter aber oftmals nicht eindeutig bestimmbar und damit problematisch.

2.2.5 Feinkartierung/Test auf Assoziation mit dem TDT (Transmission-Disequilibrium Test)

Der Unterschied zwischen Kopplungsanalyse und Assoziationstest besteht darin, daß ein Assoziationstest betrachtet, ob eine Krankheit und ein bestimmtes Allel in der Population gemeinsam auftreten, ohne Berücksichtigung des genetischen Modells. Während man bei Kopplungsanalysen betrachtet, ob Krankheit und Allel in einem Pedigree kosegregieren (Lander und Schork 1994). So ist es ist beispielsweise möglich, daß Kopplung ohne Assoziation auftritt, wenn mehrere unabhängige Chromosomenbereiche für die Merkmalsausprägung verantwortlich sind, und die Assoziation zu den einzelnen Allelen nur schwach ist. Im umgekehrten Fall ist möglich, daß Assoziation ohne Kopplung auftritt, z.B. wenn ein Allel nur zu einem geringen Anteil an der Varianz eines Merkmals hat, aber in erkrankten Individuen sehr häufig auftritt.

Lange Zeit wurden Assoziationsstudien zum Auffinden von allelischer Assoziation als Fall Kontrollstudien durchgeführt. Dabei wird getestet ob bei erkrankten Individuen (Fallgruppe) der Population einzelne Allele häufiger auftreten als bei den gesunden Individuen einer Kontrollgruppe. Dabei kann ein sog. Stratifikationseffekt auftreten, wenn die Kontrollgruppe ungeeignet ausgewählt ist. Um solche künstlichen Assoziationen zu vermeiden ist es wichtig das alle Personen der Untersuchung aus derselben homogenen Population stammen und bezüglich Alter und Geschlecht ähnlich strukturiert sind.

beschriebene Das soeben Stratifikationsproblem gilt nicht für familienbasierte Assoziationsstudien wie dem Transmission Disequilibrium Test (TDT) nach Spielman et al. (1993). Da der TDT innerhalb der Familie die Übertragung von Markerallelen eines gesunden Elters auf einen erkrankten Nachkommen testet gibt es immer eine Familien interne Kontrolle. Sie erlaubt es die Allele, die der Elter an die Nachkommen übertragen hat, den Allelen die nicht übertragen wurden gegenüberzustellen. Ein weiterer Vorteil des TDT ist die Möglichkeit zugleich auf Assoziation und Kopplung von Markerallelen mit dem Krankheitslocus zu testen. Der Test unterstellt, daß ein heterozygoter Elter A1A2 das mit der Krankheit assoziierte Allel A1 öfter an seine kranken Nachkommen weitergibt als das nicht assoziierte Allel A2. Ermittelt wird dies für den Fall eines biallelen Markers in einer 2 x 2 Kontingenztabelle (siehe Tabelle 1), wobei für jedes Paar aus gesundem Elter und krankem Nachkommen ein Eintrag in der Tabelle mit b = Allele A_1 übertragen und Allel A_2 nicht und c = Allel A_2 übertragen und Allel A1 nicht, gemacht wird. Die Tabelleneinträge b und c zeigen nun wie viele heterozygote Eltern das Allele A1 und wie viele heterozygote Eltern das Allel A2 weitergegeben haben. Nicht relevant sind dabei die Tabelleneinträge a und d da sie die Allelvererbung der homozygoten Eltern beschreiben. Die TDT Teststatistik basiert auf der von Mc Nemar (1947) eingeführten Testgröße $\chi^2 = (b-c)^2/(b+c)$ zur Prüfung auf eine nichtzufällige Abweichung von b und c in der Vierfeldertafel. Diese Testgröße ist dabei χ^2 verteilt mit m-1 Freiheitsgraden (wobei m= Anzahl der Markerallele).

Tabelle 1: Kontingenztabelle für einen TDT an einem biallelen Marker. Grau markiert sind die relevanten Felder b und c für die TDT-Statistik, die die Allelvererbung der heterozygoten Eltern an die Nachkommen (n) beschreiben

	nicht übertragende		
übertragene Allele	A ₁	A ₂	Gesamt
A ₁	a	b	a+b
A ₂	c	d	c+d
Gesamt	a+c	b+d	2n

3 Tiere und Methoden

3.1 Tiere

3.1.1 Erfassungssystem für Ferkel mit Analatresie

Die geringe Inzidenz von Analatresien beim Schwein und der Umstand, daß ein Großteil der Ferkel nach wenigen Tagen verendet, stellt für die Sammlung von geeignetem Probenmaterial ein besonderes Problem dar. In Zusammenarbeit mit der Besamungsstation Bergheim e.V., der Besamungsgenossenschaft Landshut-Pocking Niederbayerischen e.G. und dem Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch e.V. wurde daher ein bayernweites System zur Erfassung von Ferkeln mit Analatresie entwickelt. Die Landwirte wurden durch Anschreiben der Besamungstationen und durch mehrere Anzeigen im Bayerischen Landwirtschaftlichen Wochenblatt über das Projekt informiert. Die Stationen erhielten vorbereitete und frankierte Versandboxen, die von einem Besamungstechniker bei Meldung eines Wurfes mit einem defekten Ferkel auf den landwirtschaftlichen Betrieb gebracht wurden (siehe Abbildung 1). Die Versandbox enthielt Verpackungspackungsmaterial für das tote Ferkel, ein kleine Plastiktüte für die Ohrprobe des Muttertieres und eine Meldekarte (siehe Anhang 7.3), die vom Landwirt mit den Abstammungsdaten des Ferkels auszufüllen war (siehe Anhang 7.5).



Abbildung 1: Erfassungssystem für Ferkel mit Analatresie

Um die verschiedenen Ausprägungen der Analatresie (Atresia ani/Atresia recti) unterscheiden zu können, und die Rate der Fehldiagnosen gering zu halten, wurde eine pathologische Untersuchung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die toten Ferkel in der Versandbox an das Landesuntersuchungsamt für Gesundheitswesen Südbayern e.V. (LUA) nach Oberschleißheim geschickt. Dort wurde von den Tierärzten die beiliegende Diagnosekarte (siehe Anhang 7.4) ausgefüllt und bei einem positiven Befund wurde eine Probe aus dem Muskelgewebe des Oberschenkels entnommen. Das Probenmaterial des Ferkels wurde zusammen mit der Ohrprobe des Muttertieres und der Diagnosekarte bei der LUA gelagert und von dort in regelmäßigen Abständen abgeholt.

Die Besamungstationen stellten zudem von allen KB-Ebern Sperma- bzw. Ohrgewebeproben zur Verfügung. Diese Proben ermöglichten es, die Väter zusammen mit den betroffenen Nachkommen zu genotypisieren.

Über einen Zeitraum von drei Jahren wurden 439 Ferkel am LUA diagnostiziert (siehe Tabelle 2). Neben den Befunden Atresia ani und Atresia recti wurde bei 12 Ferkeln die Diagnose "keine Afterlosigkeit" gestellt. Darunter fielen zwei Tiere mit Bauchfellentzündung, ein Ferkel mit Atresia coli, ein Zwitter, zwei weibliche Tiere mit einer Kloake, d.h. einem gemeinsamen Ausführungsgang des Darms und Urogenitaltrakts, sowie sechs Ferkel ohne erkennbaren Befund.

Bezüglich des Geschlechterverhältnisses der defekten Tiere waren Unterschiede zu beobachten. Unter den Ferkeln mit der Diagnose "Atresia ani" befanden sich nur etwa 10 % und bei den Ferkeln mit "Atresia recti" 17 % weibliche Tiere. Eine mögliche Erklärung für diese Ungleichverteilung ist, daß bei weiblichen Tieren, die eine rekto-vaginal Fistel ausprägen, das Erkennen einer Analatresie erschwert sein kann. Diese Tiere koten durch die Vagina ab und können sich, je nach Grad der Krankheitsausprägung, relativ normal entwickeln. Neben dieser Möglichkeit könnte aber auch eine Abhängigkeit der Erkrankungen vom Geschlecht des Ferkels in Frage kommen. Daher wurde das SSC X sowie die pseudoautosomale Region SSC XY mit in die genomweite Kopplungsanalyse einbezogen.

	männlich	weiblich	Geschlecht unbekannt	Gesamt
Atresia ani	342	39	5	386
Atresia recti	34	7	0	41
afterlos	376	46	5	427
nicht afterlos	4	3	5	12
Tiere mit Diagnose	380	49	10	439

Tabelle 2: Diagnose, Geschlecht und Anzahl der an der LUA untersuchten Ferkel

In Abbildung 2 sind die Ferkel mit Analatresie (n = 427) getrennt nach den Rassen der Eber und Muttersauen aufgeführt. Die Kreuzungsferkel mit Piétrain (PI) als Vaterrasse und Deutsche Landrasse (DL) als Mutterrasse sind dabei mit 55.7 % am häufigsten vertreten. Da diese Rassekombinationen mit 70 % (LKV 2002) die in Bayern am häufigsten verwendeten Gebrauchskreuzungen für die Ferkelerzeugung darstellen, ist es nicht außergewöhnlich, daß diese Gruppe von Tieren auch in dieser Untersuchung zahlenmäßig sehr stark vertreten ist. Die Dreirassenkreuzung PI x (DLxDE) die in Bayern zu 15 % eingesetzt wird, liegt hier bei einem Anteil von 19.6 %. Die Kombination aus PI x Hybridsau tritt zu 7.5 % auf. Reinzuchttiere der Rasse DL sind unter den defekten Ferkeln mit 9.3 % und bei der Rasse PI mit 0.8 % vertreten.



DL = Deutsche Landrasse, DE = Deutsches Edelschwein, DU =Duroc, PI = Piétrain, PIC = PIC Hybrideber, CAM= Camborough 26 (PIC Hybridsau), BHZP= Bundeshybridzucht Programm, SCHM=Schaumann

Abbildung 2: Anzahl Ferkel mit Analatresie (n=427) nach Rassen der Eber und Muttersauen

3.1.2 Erstellung eines informativen Familienmaterials und Abstammungskontrolle

Die genomweite Typisierung und Kopplungsanalyse ist abhängig von der Verfügbarkeit eines möglichst informativen Familienmaterials. Die geringe Inzidenz von Analatresien in Verbindung mit dem verbreiteten Einsatz von KB-Ebern führt dazu, daß väterliche Halbgeschwister (HG)-Familien mit betroffenen Ferkeln als geeignete Datenstruktur in Betracht gezogen wurden. Simulationsstudien ergaben für diese Versuchsanlage einen notwendigen Umfang von 30 - 40 HG Familien.

Mögliche HG-Familien wurden in einem ersten Schritt anhand der Abstammungsdaten auf den Meldekarten zusammengestellt. Durch den Einsatz von Mischsperma und die Mehrfachbelegung der Muttersauen kamen zum Teil mehrere Eber als Vater einzelner Ferkel in Frage. Dadurch ergaben sich zunächst 123 potentielle Geschwistergruppen, deren Verwandtschaft zu überprüfen war. Insgesamt wurden über die gesamte Laufzeit des Projekts 403 Tieren in Abstammungsuntersuchungen einbezogen, davon 287 afterlose Ferkel, 108 Eber und 8 Muttersauen.

Die Abstammungsuntersuchung wurde in zwei Phasen durchgeführt. Zuerst wurden 88 mögliche Geschwistergruppen auf ihre verwandtschaftlichen Beziehungen untersucht (siehe Abbildung 3). Daraus ergaben sich 27 Familien mit gesicherter Abstammung, die das Tiermaterial für die genomweite Typisierung bildeten (Kapitel 3.1.3). In der zweiten Phase, zeitlich parallel zur bereits laufenden Typisierung, wurden nochmals 35 potentielle Geschwistergruppen untersucht. Dabei konnten bei weiteren 8 Familien und 4 einzelnen Ferkel, die bereits bestehende Familien ergänzten, die Verwandtschaft bestätigt werden. Dieses Familienmaterial wurde jedoch nicht an allen Markern genotypisiert, sondern gezielt in bereits untersuchten Chromosomenregionen für eine Bestätigungsstudie eingesetzt (Kapitel 3.1.4).



Abbildung 3: Vorgehensweise bei der Auswahl der Familien für die genomweite Kopplungsanalyse

Die Abstammungsuntersuchung erfolgte mit zehn über das Genom verteilten Mikrosatellitenmarkern, die zugleich das erste Markerset der genomweiten Typisierung darstellten. Zum Zeitpunkt der Typisierung war für diese Marker keine Information über die Anzahl der Allele und die in den Populationen bestehenden Allelfrequenzen vorhanden. Für jeden Marker wurde nach Garber und Morris (1983) die Wahrscheinlichkeit P_{En} für die Detektion einer Fehlabstammung ermittelt (siehe *F1*). Diese Berechnung berücksichtigt, daß im Tiermaterial nur ein typisierter Elter für die Abstammungskontrolle zur Verfügung steht. Die dazu benötigten Allelfrequenzen wurden basierend auf den Genotypen der typisierten Eber und der Ferkel geschätzt (siehe Kapitel 3.2.2.). Von den Muttertieren stand keine Typisierungsinformation zur Verfügung.

$$P_{En} = \sum_{i=1}^{n} p_i^2 (1-p_i)^2 + \sum_{i>j=1}^{n} 2p_i p_j (1-p_i-p_j)^2$$
(F1)

Die Gesamtausschlußwahrscheinlichkeit P_G (siehe F2) der zehn Marker wurde nach Jamieson und Taylor (1997) berechnet und betrug 97.44 %. Zur Absicherung wurde auch das nächste Set mit zehn weiteren Markern zur Abstammungskontrolle herangezogen, wodurch sich P_G auf 99.99 % erhöhte.

$$P_G = 1 - \prod_{i=1}^{k} (1 - P_{En(i)})$$
(F2)

(E2)

In Tabelle 3 sind die 20 verwendeten Mikrosatellitenmarker näher charakterisiert. Aufgeführt sind für jeden Marker die Anzahl der Allele, das Chromosom (SSC), die Heterozygotie, der
Polymorphism Information Content (PIC) (siehe Abschnitt 3.2.3) und die Wahrscheinlichkeit P_{En} für den Nachweis einer Fehlabstammung.

Marker	Allele	SSC	Heterozygotie	PIC	P _{En}
S0002	7	3	0.79	0.753	0.396
S0036	7	2	0.76	0.727	0.368
S0090	5	12	0.62	0.581	0.216
S0111	8	16	0.80	0.775	0.433
S0230	10	11	0.67	0.618	0.260
S0298	3	16	0.52	0.462	0.132
S0355	10	15	0.64	0.614	0.251
SW122	10	6	0.82	0.794	0.461
SW1515	5	1	0.66	0.606	0.241
SW173	5	10	0.45	0.423	0.108
SW1897	4	16	0.22	0.212	0.024
SW344	10	13	0.79	0.769	0.434
SW349	8	3	0.75	0.717	0.355
SW352	6	7	0.74	0.695	0.328
SW742	10	16	0.77	0.740	0.389
SW749	3	9	0.42	0.358	0.089
SW81	6	16	0.54	0.489	0.155
SW911	6	9	0.60	0.537	0.192
SW964	9	15	0.76	0.728	0.372
SWR414	8	18	0.76	0.725	0.361
				P _G	99.989 %

Tabelle 3: Charakterisierung der 20 Mikrosatellitenmarker für die Abstammungskontrolle

3.1.3 Struktur des Tiermaterials für die genomweite Typisierung

Nach der Abstammungskontrolle verblieben folgende 27 Halb- bzw. Vollgeschwisterfamilien für die genomweite Typisierung:

- 15 Familien mit 2 Halbgeschwistern (HG)
- 5 Familien mit 3 HG
- 2 Familien mit 2 Vollgeschwistern (VG)
- 3 Familien mit 2 VG und 1 zusätzlichem HG
- 1 Familie mit 2 VG und 2 zusätzlichen HG
- 1 Familie mit Verwandtschaft der Eber (Väter der afterlosen Ferkel sind selbst HG)

Die Gesamtzahl von 106 Tiere teilt sich auf in 72 Ferkel mit Analatresie, 31 Eber und 3 Muttersauen. In Tabelle 4 sind das Geschlecht und die Ausprägung der Analatresie dieser Ferkel dargestellt.

Tabelle 4: Ausprägung der Analatresie und Geschlecht der untersuchten Ferkel für die genomweite Typisierung

Anzahl Ferkel	weiblich	männlich	Gesamt	
Atresia ani	8	56	64	
Atresia recti	1	7	8	
Gesamt	9	63	72	

Im Rahmen der Kopplungsanalyse wurden Ferkel mit Atresia ani bzw. Atresia recti in eine Krankheitskategorie eingestuft und somit die beiden Ausprägungen der Analatresie als ursächlich gleicher Defekt betrachtet. Zusätzlich wurde in einem weiteren Schritt das Tiermaterial ohne Atresia recti Tiere ausgewertet, wodurch sich die Anzahl der auswertbaren Familien geringfügig wie folgt änderte:

- 17 Familien mit 2 HG
- 1 Familien mit 3 HG
- 2 Familien mit 2 Vollgeschwistern VG
- 3 Familien mit 2 VG und 1 zusätzlichem HG
- 1 Familie mit 2 VG und 2 zusätzlichen HG
- 1 Familie mit Verwandschaft der Eber (Väter der afterlosen Ferkel sind selbst HG)

In Tabelle 5 sind die Rassen aller 72 Ferkel mit Analatresie im Typisierungsset dargestellt. Am häufigsten sind auch hier mit 51.4 % Kreuzungsferkel der Rassen PI x DL zu finden.

Rasse des Ebers	Rasse der Muttersau	Anzahl Ferkel	relativer Anteil (%)	
PI	DL	37	51.4	
DL	DL	3	4.1	
PI	DExDL	11	15.3	
DL	DExDL	2	2.8	
PI	DExPI	1	1.4	
PI	PI DE		2.8	
PI	PI	1	1.4	
PI	CAM	8	11.1	
PIC	CAM	2	2.8	
PI	BHZP	3	4.1	
PI	-	2	2.8	
Gesamt		72	100.0	

Tabelle 5:	Elternrassen	der Ferkel	mit Ana	latresie für	r die ge	enomweite U	Untersuchung
					8-		00

DL = Deutsche Landrasse, DE = Deutsches Edelschwein, PI = Piétrain, PIC = PIC Hybrideber, CAM= Camborough 26 (PIC Hybridsau), BHZP= Bundeshybridzucht Programm 3.1.4 Struktur des ergänzenden Tiermaterials

Im Verlauf der genomweiten Typisierung wurde das eingehende Probenmaterial weiter gesichtet. Nach der Abstammungskontrolle konnten bestehende Familien ergänzt bzw. neue Familien erstellt werden. Diese Familien wurden gezielt in interessanten Chromosomenregionen typisiert und zur Bestätigung der Ergebnisse eingesetzt. Dieses zusätzliche Probenmaterial bestand aus 4 einzelnen afterlosen Ferkeln, die bereits existierende HG Familien ergänzten und aus 8 weiteren neuen Familien.

Diese setzen sich zusammen aus:

- 4 Familien mit 2 HG
- 3 Familien mit 3 HG
- 1 Familie mit 2 VG

Insgesamt bestand das ergänzende Familienmaterial somit aus 31 Tieren, davon 23 afterlose Ferkel, 7 Eber und 1 Muttersau. In Tabelle 6 ist das Geschlecht und die Ausprägung des Defekts bei diesen Ferkeln dargestellt

Tabelle 6: Ausprägung der Analatresie und das Geschlecht der untersuchten Ferkel des ergänzenden Familienmaterials

Anzahl Ferkel	weiblich	männlich	Gesamt	
Atresia ani	2	18	20	
Atresia recti	1	2	3	
Gesamt	3	20	23	

In Tabelle 7 findet sich eine Übersicht über die Rassen der Eber und Muttersauen der 23 afterlosen Tiere.

Tabelle 7: Rasse der Eber und Muttersauen mit afterlosen Tieren des ergänzenden Familienmaterials

Rasse des Ebers	Rasse der Muttersau	Anzahl Ferkel	relativer Anteil (%)
PI	DL	13	56.5
DL	DL DL		8.7
PI	DExDL	7	30.4
PI	-	1	4.4
		23	100.0

Tiere und Methoden

3.1.5 Struktur des Familienmaterials für die Kopplungsanalyse auf dem Geschlechtschromosom SSC X und in der pseudoautosomalen Region SSC XY

Für die Kopplungsanalyse auf dem X-Chromosom (SSC X) wurden Vollgeschwister mit Analatresie zusammen mit den jeweiligen Müttern typisiert. Dazu wurden sowohl VG-Familien aus dem Tiermaterial der genomweiten Typisierung (Kapitel 3.1.3), als auch VG-Familien aus dem ergänzenden Familienmaterial (Kapitel 3.1.4) verwendet. Insgesamt waren dies 9 Familien mit je zwei VG. Darunter befanden sich 7 männliche VG Paare, ein weibliches VG Paar und ein VG Paar mit einem weiblichen und einem männlichen Ferkel.

Die Kopplungsanalyse in der pseudoautosomalen Region (SSC XY) erfolgte anhand des in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Familienmaterials.

3.2 Auswahl der Typisierungsmarker

3.2.1 Markerkarte

Bei der Verteilung der Mikrosatellitenmarker über das Genom wurde ein Markerabstand von 20 cM angestrebt. Zur Auswahl stand dabei ein Set von 219 Mikrosatellitenmarkern, deren Primer im Rahmen des FBF-Projekts synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurden. Als Kriterien für die Zusammenstellung des Primersets galten qualitativ gut auswertbare PCR Amplifikate, sowie eine Mindestanzahl von drei darstellbaren Allelen. Die Information dazu stammt aus einer Mangalitza x Piétrain Ressourcenpopulation, die für QTL-Kartierungsstudien, auf der dem Lehrstuhl für Tierzucht angeschlossenen Versuchsstation Thalhausen (VTH) gehalten wurde. Genaue Informationen bezüglich der Allelfrequenzen und des Heterozygotiegrades der Mikrosatellitenmarker standen zum Zeitpunkt der Markerauswahl noch nicht zur Verfügung. Für die genomweite Defektgenkartierung von Analatresien wurden 130 Mikrosatelliten, einschließlich der Marker aus der Abstammungskontrolle, aus diesem Set ausgewählt (siehe Anhang Kapitel 7.1) und zu Multiplexgruppen von 10-12 Markern zusammengestellt. Die Abstände auf der genetischen Karte des Schweinegenoms und die Reihenfolge der Marker wurden der Datenbank des U.S. Meat Animal Research Center (http://www.marc.usda.gov/ genome/genome.html) (Rohrer et al. 1996) entnommen. Bei dieser Karte sind die Abstände zwischen den Markerloci anhand von über beide Geschlechter gemittelten Rekombinationsraten geschätzt worden. Die Erstellung einer eigenen Markerkarte war vom Umfang und von der Datenstruktur des vorliegenden Familienmaterials nicht möglich.

Tabelle 31 in Kapitel 7.1 (siehe Anhang) gibt die Reihenfolge der typisierten Mikrosatellitenmarker und deren relative Position auf den Chromosomen wieder. Die von uns ausgewählten Marker decken die 18 autosomalen Chromosomen, das X-Chromosom und die pseudoautosomale Region in einer Länge von 1963.7 cM ab. Die durchschnittliche Markerdistanz betrug 19.6 cM, wobei 78 % der Abstände kleiner waren als 25 cM. Die wenigen Ausnahmen, mit größeren Markerintervallen als 25 cM wurden verursacht durch Markerausfälle. Auf dem Geschlechtschromosom (SSC X) wurden insgesamt acht Marker typisiert, deren relative Positionen in cM ebenfalls in Kapitel 7.1 aufgeführt ist. Innerhalb der pseudoautosomalen Region der Geschlechtschromosomen (SSC XY) stehen generell nur wenige Mikrosatellitenmarker mit bekannter Position zu Verfügung. Daraus wurden zwei Marker für die Typisierung ausgewählt. Dabei konnten jedoch nur für den Marker SW949 PCR-Amplifikate und Typisierungsergebnisse erhalten werden. Die Auswertung in der

pseudoautosomalen Region konnte deshalb nur als Singlepoint-Kopplungsanalyse zwischen dem Mikrosatellitenmarker SW949 und dem hypothetischen Krankheitslocus durchgeführt werden.

3.2.2 Allelfrequenzschätzung

Für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit P_{En} (Detektion einer Fehlabstammung) in Kapitel 3.1.2, sowie für die Berechnung des Informativität der Marker (Kapitel 3.2.3), wurden die Allelfrequenzen aus dem gesamten typisierten Familienmaterial (Elter und Ferkel) geschätzt. Da nur für einen Elter, meist das Vatertier, Markergenotypen ermittelt wurden, war es nicht möglich die Allelfrequenzen direkt in der parentalen Population zu berechnen.

Wie den Kapiteln 7.7.2 / 7.7.4 (Anhang) dargestellt, können die Allelfrequenzen in der Population des nicht typisierten Elters, die Ergebnisse der Kopplungsanalyse beeinflussen, wenn der Marker nicht informativ ist. Für die parametrische und nichtparametrische Kopplungsanalyse wurden daher die übertragenen mütterlichen Allele anhand der Genotypen der Ferkel und Eber abgeleitet und daraus die Frequenzen der Markerallele in der mütterlichen Population geschätzt.

3.2.3 Informativität der Marker

Um Information über eine mögliche Kopplung des Markers mit dem Krankheitslocus zu erhalten, muß zumindest ein Elternteil doppelt heterozygot, sowohl für den Markerlocus, als auch für den Krankheitslocus sein. Nur so kann unterschieden werden, welches der beiden Markerallele der Nachkomme von der mütterlichen und welches er von der väterlichen Seite erhalten hat. Der Informativität eines Markers ist zudem abhängig von der Anzahl an Allelen und deren Frequenz innerhalb der Population. Je polymorpher ein Marker ist und je gleichmäßiger die Verteilung der Allelfrequenzen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein Individuum heterozygot ist.

Im folgenden werden Maße beschrieben, die Auskunft über den Informativität von polymorphen Markerloci geben und die gegebenenfalls auch die Informativität des Markers innerhalb einer Paarung berücksichtigen. Ein weiteres Informationsmaß, der 'Informationsgehalt (Info)'' an einem Markerslocus (Gudbjartsson *et al.* 2000; Kruglyak *et al.* 1996) wird in Kapitel 3.4.1.1.2 beschrieben. Er beschreibt den Anteil der Markerinformation der innerhalb eines Pedigrees an einem bestimmten Punkt des Genoms genutzt werden kann. Zudem gibt er an, in welchen Regionen die Verwendung von zusätzlichen Markern sinnvoll ist.

Die Informativität der verwendeten Mikrosatellitenmarker ist in Tabelle 32 im Anhang Kapitel 7.2 angegeben. Die Marker werden dort näher charakterisiert durch die Anzahl der vorhanden Allele, die Heterozygotie, den Polymorphism Information Content (PIC) und die Proportion of fully informative matings (PFIM).

3.2.3.1 Heterozygotie

Eines der am häufigsten verwendeten Maße für die Informativität eines Markers ist die Heterozygotenfrequenz H (engl. 'heterozygosity'), sie entspricht dem Anteil an heterozygoten Individuen in der Population (siehe F3) Die Allelfrequenz des i-ten Allels wird dabei beschrieben durch p_i. Eine genaue Aufstellung der Heterozygotie der verwendeten Marker gibt die Tabelle 32 (Kapitel 7.2).

(F4)

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

3.2.3.2 Polymorphism Information Content (PIC)

Ein weitere Kennzahl für die Informativität eines Markers ist der von Botstein *et al.* (1980) beschriebene PIC (siehe *F4*). Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der zumindest ein Elter heterozygot für den Markerlocus ist und der andere Elter nicht den gleichen Genotyp aufweist.

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

Bei der Gegenüberstellung der Gleichungen zeigt sich, daß der PIC-Wert stets kleiner ist als die Heterozygotenfrequenz. Bei sehr polymorphen Loci mit einer Vielzahl von Allelen nähern sich der PIC-Wert und die Heterozygotie einander an. Die einzelnen PIC-Werte der typisierten Mikrosatellitenmarker finden sich in Tabelle 32 (Kapitel 7.2).

3.2.3.3 Proportion of fully informative matings (PFIM)

Die PFIM (Götz und Ollivier 1992) gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß alle vier Markerallele der Eltern in den Nachkommen unterschieden werden können d.h., daß der Markergenotyp des Nachkommen vollständig informativ ist (siehe *F5*).

$$PFIM = \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2p_i p_j \cdot \left[\left(\sum_{k=1}^{n-1} \sum_{l=k+1}^{n} 2p_k p_l \right) - 2p_i p_j \right]$$
(F5)

Eine Zusammenstellung der PFIM-Werte aller verwendeten Marker findet sich im Anhang Kapitel 7.2 in der Tabelle 32 wieder.

3.3 Typisierung der Mikrosatellitenmarker

3.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus nativem Schweinesperma

Erster Schritt der Präparation war das Waschen der Spermazellen mit 1 x PBS zum vollständigen Entfernen des Seminalplasmas. Dazu wurden 500 μ l natives Schweinesperma in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml 1 x PBS (pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) versetzt. Zentrifugiert wurde 3 min und mit geringer Drehzahl (3.000 rpm), um ein starkes Verkleben der Spermazellen zu verhindern. Anschließend wurde der Überstand abgegossen. Dieser Waschschritt wurde mindestens 2 x wiederholt bis der Überstand nicht mehr viskös war. Das Pellet aus Spermazellen wurde jeweils nach dem Zentrifugieren vollständig mit 1 ml 1 x PBS resuspendiert.

Nach dem Waschschritt wurde das Spermapellet in 1 ml Lysispuffer (pH 7.4, 1 % SDS, 20 mM Tris, 4 mM Na₂EDTA, 100 mM NaCl) suspendiert und 150 μ l ProteinaseK (20 mg/ml in bidest. H₂O) und 50 μ l DTT (1,4-Dithiothreitol, pH 5.2, 1M in 0.01 M NaAcetat) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 55°C. Nach der Inkubation sollte die Lösung klar und durchsichtig sein. War dies nicht der Fall, so wurde mit 150 μ l ProteinaseK (20 mg/ml) nochmals inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung in ein Vacutainer SST 9.5 ml Röhrchen (368510, Becton Dickinson) überführt. Es folgte eine Extraktion mit je 1000 µl Phenol (pH 7.9; gepuffert mit Tris) und einem Gemisch aus Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 24 : 1. Die DNA-Fällung wurde in einem 15 ml Sarstedt-Röhrchen mit 0.8 Volumenprozent Isopropanol durchgeführt.

Nach zweimaligem Waschen mit 70 % ETOH und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm wurde die DNA luftgetrocknet und in 150 μ l TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Ausbeute variierte je nach Spermaqualität zwischen 10-22 μ g pro 500 μ l nativem Schweinesperma.

3.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus Muskelgewebe

Zur Präparation von DNA aus Muskelgewebe wurde 30 - 40 mg gefrorenes Gewebe mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml Lysispuffer (pH 8.0, 1 % SDS, 50 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl) versetzt. Nach der Zugabe von 100 μ l ProteinaseK (20 mg/ml in bidest. H₂O) wurde die Probe auf dem Vortex gemischt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Das stark RNA-haltige Muskelgewebe der Ferkel wurde vor der Phenol/Chloroform Extraktion mit 400 μ g RNase (pH 7.4, 20 mg/ml in 10 mM NaAcetat (pH 5.2)) 30 min. bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung zusammen mit 200 μ l TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) in ein Vacutainer SST 9.5 ml Röhrchen (368510, Becton Dickinson) überführt. Die Phenol/Chloroform Extraktion und die Fällung der DNA erfolgte wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Im Anschluß an die Lufttrocknung wurde die DNA in 200 μ l TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Ausbeute variierte zwischen 30-60 μ g pro 30-40 mg Muskelgewebe.

3.3.3 Isolierung von genomischer DNA aus Ohrgewebe

Für die DNA Extraktion aus Ohrgewebe wurde der DNeasy Kit von Qiagen (Kat.-Nr.29308) verwendet. Es wurde dabei nach dem "Animal Tissue" Protokoll vorgegangen.

3.3.4 DNA Quantifizierung mittels Fluoreszenz Emission

Vor Beginn der Messung wurde das Fluorometer (Hoefer DyNA Quant 200, Amersham Pharmacia Biotech) kalibriert. Dazu wurden 200 ng Calf Thymus DNA (100 μ g/ml in bidest. H₂O) als Referenz DNA verwendet

Zur Quantifizierung wurden je 2 μ l DNA in 2 ml TNE Meßlösung (pH 7.4, 10 mM Tris, 1 mM EDTA Na₂ · 2H₂O, 0.2 mM NaCl, 0.1 μ g/ml Hoechst H 33258 (Bisbenzimide)) in einer Küvette gemischt. Gemessen wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm. Im Konzentrationsbereich von 10 - 500 ng/ μ l DNA, war für die oben beschriebene TNE-Meßlösung, die gemessene DNA Konzentration proportional zur gebundenen Hoechst H 33258 Menge im DNA Doppelstrang.

Nach der DNA Messung wurden die Proben auf eine Konzentration von 25 ng/µl mit TE (pH 8.0) eingestellt und zur Kontrolle auf ein 0.8 % Agarosegel (Ethidiumbromid) aufgetragen.

3.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR-Reaktionen wurden je 200 μ l DNA (25 ng/ μ l) in 96-Loch Mikrotiterplatten vorgelegt und zum Schutz vor Verdunstung mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Das Mischen des Standardmastermix (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 200 μ M je dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol je Primer und 0.5 Units Perkin-Elmer AmpliTaq Polymerase) für die PCR-Reaktionen mit 20 μ l Gesamtvolumen erfolgte in zwei Eppendorftubes (1.5 ml) für je 52 Ansätze.

Für das Pipettieren der PCR wurde ein Biomek 2000 (Laboratory Automation Workstation, Beckmann) verwendet. Von der Robotic Station wurden je 18 μl Mastermix in 96-Loch Mikrotiterplatten vorgelegt und anschließend mit 2 μl DNA aus der DNA-Platte gemischt. Zur Durchführung der PCR-Zyklen wurden zwei T -Gradienten, ein T1 Thermocycler, zwei UNO-Thermoblocks der Firma Biometra Whatman und zwei PTC-100 Maschinen der Firma MJ-Research verwendet. Die Standard PCR-Bedingungen, waren dabei: 4 min Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 30 sec bei 94°C, 45 sec bei primerspezifischer Annealingtemperatur, 1 min 30 sec Extension bei 72°C und abschließender Kühlung auf 4°C. Zur Kontrolle wurden stichprobenartig PCR-Amplifikate auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen.

Anhand der Fluorochrommarkierung ergab sich der Verdünnungsfaktor für die Genotypisierung: 6-FAM markierte PCR-Produkte wurden generell 1:30, TET markierte PCR-Produkte 1:20 und HEX markierte Produkte 1:10 verdünnt. Eine Korrektur des Standard Verdünnungsfaktors ergab sich aus der Intensität der PCR-Banden auf dem Agarosegel. Je nach Fragmentlänge und Fluorochrommarkierung wurden PCR-Mischungen mit bis zu 12 verschiedenen Markern je Tier erstellt und mit bidest. H₂0 auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

3.3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde eine 5 %ige Acrylamidgelmischung (21 g Harnstoff, 8.4 ml Acrylamidlösung 30 %, 6.0 ml 10 x TBE, 10.0 ml bidest. H₂O) hergestellt, filtriert und mit Hilfe einer Membran -Vakuumpumpe 20 min. entgast. Anschließend wurden 20 μ l TEMED (Tetramethylethylendiamin, amresco 0761) und 300 μ l APS (Ammonium Persulfat, amresco 0486) zugemischt, die Gelmischung zwischen Glasplatten gegossen und 1 Stunde in waagrechter Lage polymerisiert.

Aus der PCR-Mischung wurden jeweils 1.8 μ l entnommen und mit 2.0 μ l ABI-Dye (pH 8.0, 25 mM EDTA : Formamid = 1 : 5, versetzt mit einer Pipettenspitze Dextran Blue (Fluka, 31393)) und 0.3 μ l internem Längenstandard TAMRA 500 (ABI Prism, Längenstandard) in einer Mikrotiterplatte gemischt. Vor dem Gelauftrag in einem ABI Prism ® 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer) wurden die Proben für 3 min in einer PCR-Maschine bei 94°C denaturiert und anschließend auf 4°C gekühlt. 2.0 μ l der denaturierten Proben wurden auf das Acrylamidgel aufgetragen. Bei einer Betriebstemperatur von 51°C und einer Spannung von 2500 V betrug die Laufzeit, je nach Fragmentlänge der Mikrosatelliten, zwischen 2 und 3 Stunden. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1 x TBE (90 mM Trisborat (pH 8.3), 2 mM Na₂EDTA) verwendet. Analysiert wurden die Fragmentlängen mit den Computerprogrammen ABI Prism 377 Collection und der GeneScan 3.1 von Perkin Elmer. Die Festlegung und Bestimmung der Markerallele ("allele calling") wurde mit dem Programm Genotyper 2.5 durchgeführt. Die Genotypisierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma GeneControl GmbH (siehe Anhang Kapitel 7.1, Tabelle 31).

3.3.7 Plausibilitätskontrollen der Markergenotypen

Während der Typisierung wurden die Markergenotypen der Familien fortlaufend auf ihre Konsistenz überprüft. Auf diese Weise konnten Fehler beim "allele calling", Übertragungsfehler in die Genotypen-Datenbank und unzureichende PCR Amplifikation aufgedeckt und bei Bedarf korrigiert werden.

Bei Inkonsistenzen, die nicht eindeutig zu klären waren, wurden die fraglichen Tiere nochmals typisiert. An bestimmten Mikrosatellitenmarkern blieben trotz Wiederholung Unstimmigkeiten zwischen dem Genotyp des Elters und dem Genotyp des Nachkommen bestehen. Da aufgrund der zuvor durchgeführten Abstammungsüberprüfung und der Konsistenz der Genotypen der übrigen Mikrosatellitenmarker eine Fehlabstammung ausgeschlossen werden konnte, kommen als mögliche Ursachen Mutation oder das Auftreten von Nullallelen an bestimmten Markerloci in Betracht. Bei einer geschätzten Mutationsrate der porcinen Mikrosatelliten von 7 x 10⁻⁵ pro Generation und Gamete (Ellegren 1995) würde man bei 95 typisierten Tieren und 130 Markern nur etwa zwei Mutationen erwarten. Daraus läßt sich folgern, daß nur ein geringer Anteil der Genotypinkonsistenzen durch Mutation erklärt werden kann.

Generell kann ein hoher Anteil homozygoter Individuen als Hinweis auf das Vorhandensein von Nullallelen gewertet werden. Um die Existenz von Nullallelen nachzuweisen, wurde daher getestet, ob der Anteil der beobachteten heterozygoten Individuen signifikant vom Anteil der erwarteten heterozygoten Individuen unter dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht abweicht. Chakraborty *et al.* (1992) haben dazu eine Methode vorgestellt, bei der zugleich die Frequenz des potentiellen Nullalleles r geschätzt werden kann. Die geschätzte Frequenz p_i ' (siehe F6) eines amplifizierbaren Alleles i ergibt sich aus:

$$p_i' = p_i/(1-r)$$

Dabei gibt p_i die wahre Frequenz des Alleles i und r die Frequenz des Nullalleles an. Die Frequenz H_{obs} der zu beobachteten Heterozygoten (siehe *F7*) berechnet sich aus :

(F7)

$$H_{obs} = \sum_{i \neq j} p_i \cdot p_j / (1 - r^2)$$

Die Frequenz H_{exp} der erwarteten Heterozygoten (siehe F8) unter dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht ergibt sich aus:

$$H_{exp} = \sum_{i \neq j} p_i \cdot p_j / (1 - r)^2$$

Daraus berechnet sich die Frequenz r des nicht amplifizierten Nullallels (siehe F9) als:

(F9)

$$r = \frac{(H_{exp} - H_{obs})/H_{exp}}{2 - ((H_{exp} - H_{obs})/H_{exp})}$$

Mit einem t-Test (siehe *F10*) wurde anschließend untersucht ob der Erwartungswert Frequenz r (Frequenz des Nullallels) von hypothetischen Wert $r_0 = 0$ abweicht. Die Größe s gibt dabei den Standardfehler von r an.

(F10)

$$t_{\alpha-1} \sim \frac{\hat{r} - r_0}{s}$$

Tiere und Methoden

3.4 Statistische Auswertung

3.4.1 Genomweite Kopplungsanalyse mit dem Programm Allegro 1.0

Die statistische Auswertung, die genomweite Kopplungsanalyse wurde mit dem Programm Allegro 1.0 (Gudbjartsson *et al.* 2000) durchgeführt. Zur nichtparametrischen Auswertungsmethodik von Allegro 1.0 zählen verschiedene NPL-Statistiken, sowie ein nichtparametrischer 'allele sharing'' LOD-Score, der auf der Herkunftsgleichheit von Allelen beruht. Bestandteil der parametrischen Auswertung ist die Berechung von klassischen LOD-Scores. Dabei können sowohl 'singlepoint'' LOD-Scores (LOD-Score _{spt}) zwischen einem bekannten Marker und dem Krankheitslocus, als auch 'multipoint'' LOD-Scores (LOD-Score_{mpt}) zwischen einer Gruppe von Markern und dem Krankheitslocus berechnet werden.

3.4.1.1 Nichtparametrische Kopplungsanalyse mit ASP (affected sib-pair) Familien

Das Prinzip zur Berechnung der NPL-Teststatistik mit Allegro 1.0 wird im folgenden Kapitel anhand einer Kernfamilie mit erkrankten Halbgeschwistern dargestellt. Analog zum Familienmaterial, das für die vorliegende Untersuchung verwendet wurde, besteht die Beispielfamilie aus einem typisierten Elter₁ und zwei erkrankten Halbgeschwistern. Der typisierte Elter₁ ist in den meisten Fällen der Eber, von den Sauen, die als Elter₂/Elter₃ bezeichnet werden, lag in der Regel keine Markerinformation vor.

3.4.1.1.1 Berechnung der NPL-Teststatistik an einem informativem Marker

Die Berechnung der nichtparametrischen NPL-Teststatistik läßt sich in drei Schritte gliedern:

(1) Exakte Beschreibung aller möglichen Meiosen der Elterntiere durch einen Vererbungsvektor, sowie die Ermittlung von 'identical by descent''IBD Allelen der erkrankten Geschwister.

(2) Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Vererbungsvektoren

(3) Bewertung aller Vererbungsvektoren hinsichtlich der IBD Verteilung und Berechung der NPL Teststatistik

zu (1): Die Tiere in einem Pedigree werden unterteilt in "founder" Tiere (f) ohne bekannte Vorfahren und "non founder" Tiere (n) mit bekannten Eltern. Jeder founder besitzt zwei unterscheidbare Allele, ein paternales und ein maternales, von denen er je eines an die Nachkommen (NK) weitergibt. Mit Hilfe eines binär kodierten "Vererbungsvektors" kann dargestellt werden, welches Allel in der Meiose vom Elter auf die Nachkommen weitergegeben wurde. Dabei kodiert '0" für die Weitergabe eines paternalen und "1" für die Vererbung eines maternalen Allels (siehe Abbildung 4). Aus der Abbildung geht hervor, daß bei zwei NK insgesamt vier Meiosen zu betrachten sind und der Vererbungsvektor somit aus vier Positionen besteht, die als 'bits" bezeichnet werden. In den Meiosen 2 und 3 haben beide NK vom Elter ₁ das paternale Allel p₂ IBD erhalten. Da in diesem Beispiel für die Ableitung des Vererbungsvektors die paternalen und maternalen Allele der founder als bekannt vorausgesetzt wurden, gibt es nur einen möglichen Vererbungsvektor (1 0 0 0).



Vererbungsvektor = 1 0 0 0 Kodierung: 0 = paternal / 1 = maternal Abbildung 4: Darstellung eines binär kodierten Vererbungsvektors in einer HG Familie mit zwei erkrankten Nachkommen (NK)

zu (2): Sind die maternalen und paternalen Allele der 'founder" nicht bekannt, können theoretisch 2²ⁿ, d.h. im vorliegenden Beispiel 16 Vererbungsvektoren erstellt werden, die das Ergebnis aller möglichen elterlichen Meiosen darstellen. Die Anzahl der Nachkommen ohne bekannte Vorfahren wird dabei mit n (non founder) angegeben. Die 16 möglichen Vererbungsvektoren sind 'a priori" gleich wahrscheinlich mit p₀ gleich 1/16 (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Mögliche Vererbungsvektoren, deren "a priori" Wahrscheinlichkeitsverteilung sowie die "a posteriori" Wahrscheinlichkeitsverteilung in einer Kernfamilie, in der zwei erkrankte HG ein IBD Allel tragen

mögliche Vektoren	a priori p ₀	a posteriori p ₁	S _{pairs}	Z _(v)
0000	1/16	1/8	1	1
0001	1/16	1/8	1	1
0010	1/16	0	0	-1
0011	1/16	0	0	-1
0100	1/16	0	0	-1
0101	1/16	0	0	-1
0110	1/16	1/8	1	1
0111	1/16	1/8	1	1
1000	1/16	1/8	1	1
1001	1/16	1/8	1	1
1010	1/16	0	0	-1
1011	1/16	0	0	-1
1100	1/16	0	0	-1
1101	1/16	0	0	-1
1110	1/16	1/8	1	1
1111	1/16	1/8	1	1

Mit Hilfe von informativen Markergenotypen (siehe Abbildung 5) können acht Vererbungsvektoren ausgeschlossen werden. In den Meiosen 2 und 3 wird das Allel 1 an beide Nachkommen vom Elter₁ weitergeben. An den Positionen 2 und 3 des Vererbungsvektors befinden sich daher entweder zwei paternale Allele (0) mit der Kodierung x 0 0 x oder zwei maternale Allel (1) mit der Kodierung x 1 1 x. Die Vererbungsvektoren, bei denen ein Nachkomme vom selben Elter₁ ein maternales Allel erhält und der andere ein paternales Allel, haben daher die 'a posteriori' Wahrscheinlichkeit p₁ von 0 (siehe Tabelle 8). Die nicht ausgeschlossenen Vererbungsvektoren werden als gleich wahrscheinlich betrachtet und weisen eine 'a posteriori' Wahrscheinlichkeit p₁ von 1/8 auf.



Abbildung 5: Darstellung eines binär kodierten Vererbungsvektors in einer HG Familie mit zwei erkrankten Nachkommen (NK) mit Markergenotypen

zu (3): Nach der Festlegung der Wahrscheinlichkeitsverteilung wird jeder Vererbungsvektor hinsichtlich der Abstammungsgleichheit der Allele in kranken Individuen mittels einer 'scoring' Funktion S _(v) bewertet. In Allegro 1.0 sind die 'scoring' Funktionen S _{(v)pairs} und S_{(v)all} (Whittemore und Halpern 1994) implementiert, die beide für die statistischen Auswertung in dieser Untersuchung verwendet wurden.

 $S_{(v)pairs}$ stellt die Anzahl der Allele dar, die bei einem spezifischen Vererbungsvektor und beim paarweisen Vergleich der kranken Nachkommen IBD sind (siehe Tabelle 8). $S_{(v)pairs}$ wird dabei durch direktes Abzählen der Paare mit IBD Allelen ermittelt.

Die Funktion $S_{(v)all}$ (siehe *F11*) wird auf Grund der Anzahl an Allelen ermittelt, die bei erkrankten Tieren und bei einem spezifischen Vererbungsvektor, innerhalb einer Familie, IBD sind. Dabei erhalten diejenigen Vererbungsvektoren ein höherers Gewicht, die anzeigen, daß mehr als zwei kranke NK einer Familie dasselbe Allel IBD vom gemeinsamen Vorfahren bekommen haben. Bei Familien mit nur zwei erkrankten Nachkommen lieferen die beiden Funktionen S_{(v)pairs} und S_{(v)all} das gleiche Ergebnis. Die Funktion S_{(v)all} wird berechnet als:

(F11)

$$S_{(v)all} = 2^{-n} \sum_{h} \left[\prod_{i=1}^{2f} b_i(h)! \right]$$

Dabei steht n für die Anzahl der erkrankten Individuen, f für die Anzahl der 'founder" in einem Pedigree und 2f für die Anzahl der 'founder" Allele. Die Größe h stellt eine Auswahl von Allelen der erkrankten Tiere dar, wobei jedes Individuum mit je einem Allel vertreten ist. Insgesamt werden dabei alle 2^n Varianten von h betrachtet. Der Ausdruck $b_i(h)$ steht für die Anzahl des jeweiligen founder Alleles i in der Auswahl h. Im folgenden wird das Produkt der Häufigkeiten der Allele i in dieser Auswahl gebildet und mit der Fakultät gewichtet.

Im nächsten Schritt erfolgt eine Standardisierung der jeweils verwendeten "scoring" Funktion S_{pairs} bzw. S_{all}. Diese standardisierte Funktion (siehe *F12*) wird als "normalized score" Z_(v) (Kruglyak *et al.* 1996) bezeichnet und wird für jeden Vererbungsvektor berechnet. Dabei steht S_(v) für die "scoring" Funktion eines bestimmten Vererbungsvektors, µ für den Mittelwert und σ für die Standardabweichung der "scoring" Funktion. Unter der Nullhypothese H₀: keine Kopplung zwischen Krankheitslocus und Marker, hat Z_(v) einen Mittelwert von 0 und eine Varianz von 1.

(*F12*)

$$Z_{(v)} = \left[\frac{S_{(v)} - \mu}{\sigma}\right]$$

Zur Berechnung der unter der Nullhypothese standardnormalverteilten Teststatistik NPL wird der standardisierte Wert $Z_{(v)}$ jedes einzelnen Vererbungsvektors mit der 'a posteriori' Wahrscheinlichkeit p₁ multipliziert und über alle Vererbungsvektoren hinweg aufsummiert (siehe *F13*).

(F13)

$$NPL_i = \sum Z_{(v)} \cdot p_1$$

Für die NPL-Statistik NPL_{Gesamt} für mehrere Familien, werden die NPL Teststatistiken der einzelnen Familien mit einem Wichtungsfaktor γ i multipliziert und über alle Familien m summiert (siehe *F14*). Im Rahmen der nichtparametrischen Auswertung des Familienmaterials wurden in dieser Untersuchung alle Familien gleich gewichtet, d.h. mit γ i gleich 1.

(*F*14)

$$NPL_{Gesamt} = \sum_{i=1}^{m} \gamma_i (NPL_i)$$

Die statistische Signifikanz der NPL Statistik wird im Programmpaket Allegro 1.0 in Form eines exakten p-Wertes angegeben. Für die Bestimmung des p-Wertes wird die Verteilung der Teststatistik unter der Nullhypothese H_0 = keine Kopplung zwischen Krankheitslocus und Marker berechnet und die Wahrscheinlichkeit NPL_{H0} > NPL_{Gesamt} ermittelt (Kruglyak *et al.* 1996).

Tiere und Methoden

Die Berechnung der NPL-Teststatistik an einer beliebigen Position zwischen zwei informativen Markern wird im Anhang (Kapitel 7.7.1) dargestellt. Im weiteren wird die Vorgehensweise für die Ermittlung der NPL Teststatistik an einem nicht vollständig informativem Marker beschrieben (siehe Kapitel 7.7.2.). Das Beispiel zeigt den Einfluß der Markerallelfrequenzen in der Population des nicht typisierten Elters, auf die nichtparametrische Kopplungsanalyse.

Die für die Durchführung der statistischen Auswertung mit Allegro 1.0 benötigten Parameter, wie Tiernummer, Familienstruktur, Markergenotypen oder Programmoptionen werden in drei Dateien file.pre, file.dat und file.opt eingelesen. Der Inhalt, die Struktur sowie das Format dieser Dateien werden im Anhang Kapitel 7.6 exemplarisch dargestellt.

3.4.1.1.2 Der Informationsgehalt (Info)

Das Programm Allegro 1.0 ermöglicht es, im Rahmen der nichtparametrischen Auswertung an jedem beliebigen Punkt des untersuchten Chromosoms den sogenannten Informationsgehalt (Info) zu berechnen. Diese Kennzahl gibt an, welcher relative Anteil der im Pedigree enthaltenen Erbinformation mit Hilfe der Marker, an einem bestimmten Punkt des Genoms für die Kopplungsanalyse genutzt werden kann. Damit gibt der Informationsgehalt (Info) einen Überblick, in welchen Regionen des Chromosoms es sinnvoll ist, zusätzliche Marker in die Untersuchung einzubeziehen. Der Informationsgehalt Info_(x) an einem beliebigen Punkt x des Genoms ist nach Kruglyak *et al.* (1996) definiert als:

(F15)

$$Info_{(x)} = 1 - (E_{(x)}/E_0)$$

Wobei die Entropie E, eine der Informationstheorie entliehene Größe bezeichnet (Shannon 1948), die in diesem Zusammenhang für die Beschreibung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Vererbungsvektoren verwendet wird. Die Entropie mit der Einheit 'bits" wird dabei berechnet als:

(F16)

$$E = -\sum P_i \log 2P_i$$

mit P_i als jeweilige Wahrscheinlichkeit des i-ten Vererbungsvektors. E_0 gibt die Entropie an, wenn keine Markerinformation zur Verfügung steht (alle Vererbungsvektoren sind gleichwahrscheinlich), während $E_{(x)}$ die Entropie an einem beliebigen Punkt x bei vorliegender Markerinformation darstellt. Der Informationsgehalt kann einen Wert zwischen 0 (ohne Markerinformation) und 1 annehmen. Der Wert von 1 wird jedoch nur an einem vollständig informativen Marker erreicht, der für alle Individuen des Pedigrees und für jede Meiose eine eindeutige Aussage erlaubt, ob jeweils das paternale oder das maternale Allel vom Elter an die Nachkommen weitergegeben wurde.

Tiere und Methoden

3.4.2 Parametrische Kopplungsanalyse

Ebenso wie für die nichtparametrische Kopplungsanalyse wurde das Programm ALLEGRO 1.0 auch für die parametrische Auswertung des Familienmaterials verwendet. Dabei wurden einerseits sogenannte 'Singlepoint LOD-Scores' LOD-Score _{spt} zwischen einem Marker und dem Krankheitslocus berechnet und andererseits Mehrpunkt Analysen zwischen mehreren Markern und dem Krankheitslocus durchgeführt. Diese Mehrpunktanalysen werden als 'Multipoint LOD-Scores' LOD-Score _{mpt} bezeichnet. Ähnlich wie für die Berechnung der NPL-Statistik wird im Folgenden das Prinzip der Single- und Multipoint LOD-Score Ermittlung am Beispiel einer HG Familie dargestellt.

3.4.2.1 LOD-Score Analyse zwischen einem Marker und dem Krankheitslocus bei vollständiger Penetranz



Bei vollständiger Penetranz wird unterstellt, daß der gesunde Elter heterozygoter Träger des Krankheitsallels D ist. Die Wahrscheinlichkeit $L(H_1)_{Dd}$ daß das Allel D an den Nachkommen weitergeben wird, ist bei vollständiger Kopplung ($\theta = 0$) zwischen Marker und Krankheitslocus gleich 0.5 und unter der Annahme, daß keine Kopplung ($\theta = 0.5$) auftritt ist die Wahrscheinlichkeit $L(H_0)_{Dd}$ gleich 0.25. Der LOD-Score wird berechnet als dekadischen Logarithmus des Quotienten aus $L(H_1)_{Dd}$ und $L(H_0)_{Dd}$ (siehe *F17*).

Für ein Halbgeschwisterpedigree mit zwei erkrankten Nachkommen an einem informativen Markerlocus, wie im Beispiel oben zu sehen, ergibt sich daher ein 'Singlepoint' LOD-Score $Z(\theta)$ von $\log_{10} 2$.

(*F17*)

$$Z(\theta) = \log_{10} \left[\frac{L(H_1)_{Dd}}{L(H_0)_{Dd}} \right] = \log_{10} \frac{\frac{1}{2}((1-\theta)^2 + \theta^2)}{\frac{1}{2}((1-\frac{1}{2})^2 + \frac{1}{2}^2)}$$

Der signifikante LOD-Score der parametrischen Kopplungsanalyse liegt nach Morton (1955) bei einem Wert von 3. Ein Hinweis auf Kopplung zwischen einem Marker und einem Krankheitslocus ab einem LOD-Score > 2.

3.4.2.2 LOD-Score Analyse zwischen mehreren Markern und dem Krankheitslocus



Betrachtet man einen Elter der an zwei Markerloci doppelt heterozygot mit dem Genotyp 12 ist und der einem heterozygoten Genotyp Dd am Krankheitslocus trägt. Die beiden Nachkommen sind doppelt heterozygot 1 3 und haben somit an beiden Markern das Allel 1 IBD vom Elter geerbt.

Dann sind für den Elter bezüglich der beiden Marker zwei Kopplungsphasen möglich. Entweder liegen die Allele 1 der beiden Marker auf demselben Chromosom mit den Haplotypen (1 - 1/2 - 2) oder auf verschiedenen Chromosomen (1 - 2/2 - 1).

Unter der Annahme Phase 1 (1 - 1 /2 - 2) trifft zu und der Haplotyp 1 - 1 wurde an den Nachkommen weitergegeben, berechnet sich die Wahrscheinlichkeit L_1 , daß das Krankheitsallel D dabei vererbt wurde als:

(F18)

$$L_1 = \left[\frac{(1-\theta_1)(1-\theta_2)}{1-\theta}\right]^2 + \left[\frac{\theta_1\theta_2}{1-\theta}\right]^2$$

wobei θ = Rekombinationsrate zwischen Marker 1 und Marker 2 θ_1 = Rekomintionsrate zwischen Marker 1 und Krankheitslocus θ_2 = Rekombinationrate zwischen Marker 2 und Krankheitslocus

Unter der Annahme Phase 2 (1 - 2 /2 - 1) trifft zu und der Haplotyp 1 - 2 wurde an den Nachkommen weitergegeben, berechnet sich die Wahrscheinlichkeit L_2 daß das Krankheitsallel D dabei vererbt wurde als:

(F19)

$$L_2 = \left[\frac{(1-\theta_1)\theta_2}{\theta}\right]^2 + \left[\frac{\theta_1(1-\theta_2)}{\theta}\right]^2$$

Die Wahrscheinlichkeit L_{Gesamt} das beide Nachkommen bei gegebenen Markergenotypen das Allel D vom Elter bekommen haben als L_{Gesamt}= w₁ 0.5 L₁ + w₂ 0.5 L₂, wobei w₁ = $(1-\theta)^2/[(1-\theta)^2 + \theta]$ und w₂ = 1-w₁. Der LOD-Score Z(θ) ist daher als dekadischer Logarithmus aus dem Quotienten vom L_{Gesamt} (H₁) und L(H₀).

Die Berechnung des LOD-Scores bei unvollständiger Penetranz der Krankheit ist im Anhang (Kapitel 7.7.3) näher beschrieben. Ebenso die Ermittlung LOD-Score Teststatistik zwischen einem nicht vollständig informativen Marker und dem Krankheitslocus (siehe Kapitel 7.7.4)

3.4.3 Assoziations- und Kopplungsanalyse mit dem TDT (Transmission-Disequilibrium-Test)

Der TDT wurde für die statistische Auswertung von Markern verwendet die nach der genomweiten Kopplungsanalyse einen Hinweis auf Kopplung mit dem Krankheitslocus gezeigt hatten bzw. in Genomregion angewendet in denen Kandidatengene für Analatresien beim Schwein vermutet wurden. Betrachtet wurde beim TDT die Weitergabe eines mit der Krankheit assoziierten Allels M_1 von einem heterozygoten Elter auf den erkrankten Nachkommen an einem Marker M. Die an den Nachkommen übertragenen und nicht übertragenen Markerallele des Elters werden dabei in einer Kontingenztabelle eingetragen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Übertragene und nicht übertragene Markerallele M_1 und M_2 von einem Elter an n erkrankte Nachkommen

	nicht übertragende		
übertragene Allele	M ₁	M ₂	Gesamt
M ₁	a	b	a+b
M ₂	с	d	c+d
Gesamt	a+c	b+d	2n

In Tabelle 10 sind die Wahrscheinlichkeiten angegeben mit denen ein Markerallel M von einem Elter an die Nachkommen weitergegeben wird. Dabei wird ersichtlich, daß nur in die Felder b und c der Kontingenztabelle von der Rekombinationsrate θ abhängig sind und damit eine Aussage über die Kopplung des assoziierten Alleles liefern. Unter der Hypothese keine Kopplung zwischen Marker und Krankheitslocus $\theta = 1/2$ würde man erwarten, daß der Erwartungswert von b gleich dem Erwartungswert von c ist, unabhängig davon, wie groß die Frequenz (m) des assoziierten Markeralleles, die Frequenz des Krankheitsalleles (ρ) und das Kopplungsphasenungleichgewicht (δ) sind. Ob signifikante Unterschiede zwischen den beobachteten Werten von b und c bestehen wird mit einem McNemar-Test (Spielman *et al.* 1993) der Form $\chi^2 = (b-c)^2/(b+c)$ getestet.

Tabelle 10: Wahrscheinlichkeiten von übertragenen Markerallelen M_1 und M_2 an erkrankte Nachkommen

	nicht übertragende		
übertragene Allele	M ₁	M ₂	Gesamt
M ₁	$m^2 + (m\delta/\rho)$	$m(1-m)+[(1-\theta-m)\delta/\rho]$	m +[(1-θ)δ/ρ]
M ₂	$m(1-m)+[(\theta-m)\delta/\rho]$	(1-m) ² - [(1-m)δ/ρ)	1-m -[(1-θ)δ/ρ)]
Gesamt	m +(θδ/ρ)	1-m-(θδ/ρ)	1

m = Frequenz des assozierten Markeralleles M_1 ; ρ = Frequenz des Krankheitsalleles; δ = Kopplungsphasenungleichgewicht; θ = Rekombinationsrate

Der zunächst für biallele Marker entwickelte TDT von wurde von Bickeböller und Clerget-Darpoux (1995) auf multiallele Marker erweitert. Die Teststatistik T_m (siehe Formel *F20*) testet auf Gleichheit der Randverteilungen n_{i} und n_{i} (siehe auch Tabelle 11), wobei t die Anzahl an Allelen angibt.

(F 20)

$$T_m = \sum_{i=1}^t \frac{(n_{.i} - n_{i.})^2}{n_{.i} + n_{i.}}$$

Tabelle 11: Kombinationen von übertragenen Markerallelen M_n an N/2 Nachkommen

	nicht	t übertragene A	Casamt	
übertragene Allele	M ₁	M ₂	M ₃	Gesamt
M ₁	n ₁₁	n ₁₂	n ₁₃	n ₁ .
M ₂	n ₂₁	n ₂₂	n ₂₃	n _{2.}
M ₃	n ₃₁	n ₃₂	n ₃₃	n _{3.}
Gesamt	n _{.1}	n.2	n.3	Ν

Bei der Teststatistik T_{mhet} (Spielman und Ewens 1996) werden die homozygoten Eltern in den Diagonalen, repräsentiert durch die Große n_{ii} subtrahiert (siehe Formel *F21*).

(F 21)

$$T_{mHet} = \frac{t-1}{t} \sum_{i=1}^{t} \frac{(n_{.i}-n_{i.})^2}{n_{.i}+n_{i.}-2n_{ii}}$$

Beide Testgrößen sind unter der Nullhypothese (H_0 = keine Assoziation und/oder keine Kopplung vorhanden) χ^2 - verteilt. Die Anzahl Freiheitsgrade ist abhängig von der Anzahl der Allele (t) und beträgt t - 1. Wird in einer Chromosomenregion mehr als ein Marker getestet, ist die Signifikanzgrenze α auf multiples Testen nach Bonferroni (Snedecor und Cochran 1980) zu korrigieren. Dabei ergibt sich die Signifikanzgrenze α ' approximativ als $\alpha' = \alpha/n$, wobei n die Anzahl der durchgeführten Tests bezeichnet.

3.5 Auswahl von Kandidatengenen

Neben den bereits in der Literatur beschrieben Kandidatengenen wurden in den porcinen Genombereichen mit signifikanten Ergebnissen, Vergleiche mit den homologen humanen Chromosomenbereichen durchgeführt. Da beim Menschen eine weitaus größere Anzahl von Genen, ca. 14014 (Stand: 01.01.2003; The Genome Database GDB; http://gdbwww.gdb.org/)

im Vergleich zu 997 Genen beim Schwein (Stand: 08.09.2003; ArkDB Roslin Institute; http:// www.thearkdb.org/browser?species=pig&objtype=stats) kartiert sind, bietet die humane Genomkarte derzeit bessere Möglichkeiten positionelle Kandidatengene in interessanten Genomregionen zu identifizieren als die porcine. Grundlage für die vergleichende Genomkartierung war dabei neben der Publikation von Chowdhary *et al.* (1998) die vergleichende Genomkarte des Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Auf der Web-Seite des INRA (http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.ht.) findet sich neben einer Auflistung der porcinen Genen die bereits kartiert sind, auch eine Übersicht über die homologen Chromosomenbereiche beim Menschen.

Neben den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information NCBI (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov), wie PubMed, LocusLink und OMIM wurden für die Kandidatengenrecherche auch die GeneCardsTM des Weizmann Insitute of science, (http:// bioinfo.weizmann.ac.il/cards/) benutzt. Auf den GeneCards befinden sich neben der offiziellen Nomenklatur des Gens auch eventuell vorhandene Synonyme sowie zusätzliche Information zu Genprodukten, posttranslationeller Modifikation und Interaktionen mit weiteren Genen bzw. anderen Genprodukten.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Genotypen auf Konsistenz

Zur Aufdeckung von Genotypinkonsistenzen wurden alle Genotypen zwischen Elter und Nachkomme auf korrekte Abstammung überprüft. Die Ergebnisse dieser Überprüfung sind in Abbildung 6 dargestellt. Nach der ersten Auswertung der Genotypen wurden an 43 unterschiedlichen Markern 134 Inkonsistenzen zwischen Nachkommen und dem betreffenden Elter festgestellt. Die meisten der Nachkomme-Elter-Paare mit Konflikten wiesen Unstimmigkeiten an einem oder zwei Markerloci auf. Eine Familie mit drei Halbgeschwistern, deren Genotypen an acht, neun und elf Markern nicht mit dem des Vater übereinstimmten, wurde aus der weiteren Typisierung und statistischen Auswertung genommen. Bei allen anderen Konflikten wurde die Auswertung der Allele nochmals überprüft, Übertragungsfehler in die Datenbank korrigiert und gegebenenfalls die Mikrosatellitenmarker nochmals amplifiziert, um mögliche Verwechslungen der PCR-Proben ausschließen zu können.



Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung von Genotypkonflikten zwischen Nachkomme und Elter in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungen

Nach dieser Wiederholung reduzierte sich die Gesamtzahl auf 52 Inkonsistenzen, die an 12 unterschiedlichen Markern auftraten. Es konnte kein Nachkomme-Elter Paar mit mehr als vier Markerkonflikten beobachtet werden. In den meisten Fällen zeigte sich, daß bei heterozygoten Tieren Allele mit unterschiedlicher Intensität der PCR-Amplifikate zu Problemen bei der Detektion geführt hatten.

Eine weitere Wiederholung reduzierte die Konflikte erneut. Schließlich verblieben 25 Unstimmigkeiten an 6 verschiedenen Markern, die auch durch eine erneute Typisierung nicht geklärt werden konnten.

Mit Hilfe einer Permutationsstudie konnte gezeigt werden, daß diese Inkonsistenzen nicht auf fehlerhafte Abstammung zurückzuführen sind. Im ungünstigsten Fall ergaben sich mindestens 12 Konflikte pro Nachkomme-Elter-Paar, wenn die Genotypen der Nachkommen zufällig mit

Ergebnisse

dem Genotyp eines beliebigen Elters verglichen wurden (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung von Genotypkonflikten zwischen Nachkomme und Elter bei Vergleich der Genotypen der Nachkommen mit einem zufälligen Elter

Die sechs Mikrosatellitenmarkern, an denen trotz wiederholter Genotypisierung Inkonsistenzen auftraten, wurden auf die Existenz von nicht amplifizierbaren Allelen (Nullallelen) getestet. In Tabelle 12 sind die ermittelten Allelfrequenzen r für die vermeintlichen Nullallele zusammen mit den Standardfehlern s von r dargestellt. Bei zwei Markern, SW497 und SW1881 (grau unterlegt) zeigte der t-Test hoch signifikante Hinweise auf die Existenz von Nullallelen. Auch an den anderen Markern konnte das Auftreten von derartigen Allelen auf dem nominalen Signifikanzniveau von 1 % bzw. 5 % bestätigen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die nicht konsistenten Genotypen an den betreffenden Markern im Rahmen der Kopplungsanalyse als nicht typisiert (Genotyp = 0) gesetzt. Die Ursache, die für das Auftreten derartiger Nullallele in Frage kommt, beispielsweise eine Punktmutation an der Primerbindungsstelle, läßt sich jedoch nur durch Sequenzierung der entsprechenden Region abklären.

Marker	SSC	Frequenz r des Nullallels	Standardfehler s von r	t-Wert	Anzahl Elter- NK Konflikte
SW497	10	0.288	0.031	9.29***	14
SW1881	6	0.146	0.024	6.08***	2
SW1894	10	0.058	0.016	3.63**	1
SW355	17	0.054	0.015	3.60**	4
SWR1533	15	0.020	0.010	2.00*	2
S0010	2	0.015	0.008	1.88*	4

Tabelle 12: Geschätzte Allelfrequenz r des Nullallels, Standardfehler s von r und t-Wert an den Mikrosatellitenmarkern mit Inkostistenzen zwischen Elter und NK

***Signifikanzniveau 0.1% (p < 0.001); **Signifikanzniveau 1.0% (p < 0.01); *Signifikanzniveau 5% (p < 0.05)

4.2 Genomweite Kopplungsanalyse

Im folgenden werden die Ergebnisse der genomweiten nichtparametrischen und parametrischen Kopplungsanalyse anhand von 130 Mikrosatellitenmarkern und dem in Kapitel 3.1.3 vorgestellten Familienmaterial beschrieben.

Als unabhängige Bestätigungsstudie wurde in einem zweiten Schritt der Auswertungen die Markerdichte in interessanten Chromosomenregionen erhöht und zudem das in Kapitel 3.1.4 beschriebene "ergänzende Familienmaterial" genotypisiert. Die Ergebnisse dieser Kopplungsanalysen werden in Kapitel 4.3 und in Kapitel 4.4 dargestellt.

4.2.1 Genomweite nichtparametrische Kopplungsanalyse

Die nichtparametrische Auswertung wurde mit den NPL-Statistiken, NPL_{pairs} und NPL_{all}, durchgeführt. Dabei wurden für beide Teststatistiken sog. "Multipoint-Kopplungsanalysen" zwischen mehreren Markern und dem Krankheitslocus durchgeführt, welche als NPL_{pairs mpt} und NPL_{all mpt} bezeichnet wurden. Die Multipoint-Analyse erlaubt dabei die simultane Einbeziehung der gesamten zur Verfügung stehenden Markerinformation. Ebenso wurde für beide NPL-Statistiken eine "Singlepoint-Kopplungsanalyse" zwischen den einzelnen Markern und dem Krankheitslocus durchgeführt. Diese Teststatistiken werden als NPL_{pairs spt} und NPL_{all spt} bezeichnet. Die Singlepoint-Analyse ist im wesentlichen als zusätzliche Bestätigung von signifikanten Ergebnissen der Multipoint-Auswertung an einzelnen Markern zu betrachten. Dies kann vor allem dann von Bedeutung sein, wenn Unklarheiten bezüglich der Reihenfolge der Marker oder der Markerdistanzen auf dem Chromosom bestehen.

In den folgenden Kapiteln sind die maximalen NPL-Werte für jedes Chromosom und der Informationsgehalt (Info) des Familienmaterials an dieser Markerposition, für die Multipointund Singlepointanalyse angeführt. Im Anhang finden sich zusätzlich Abbildungen für jedes Chromosom die den Verlauf der NPL_{all mpt} (Kapitel 7.8) und den Verlauf der NPL_{all spt} Statistik (Kapitel 7.9) sowie der Informationsgehalte (Info) an den einzelnen Positionen der Chromosomen wiedergeben.

4.2.1.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse zwischen mehreren Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

Die Ergebnisse der genomweiten Multipoint-Kopplungsanalyse sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. Neben den höchsten NPL_{pairs mpt} und NPL_{all mpt} Werten für jedes Chromosom (SSC) sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) und die Informationsgehalte an den Positionen der NPL-Maxima dargestellt. Die graue Markierung hebt die Chromosomen hervor, deren p-Werte an der Stelle der maximalen NPL-Werte kleiner sind als 0.1 und die deshalb in die weitere Kopplungs- und Assoziationsanalyse mit dem TDT einbezogen wurden.

Den höchsten Wert erreichte die NPL-Statistik auf SSC 1 am Marker SW1621. Dort lagen der NPL_{all mpt} bei 2.57 (p=0.006) bzw. der NPL_{pairs mpt} bei 2.59 (p= 0.006). Die entsprechenden Informationsgehalte waren mit 0.47 bzw. 0.46 im mittleren Bereich. Auf dem SSC 12 zeigten sich am Marker S0229 ebenfalls hohe NPL-Werte. Der NPL_{all mpt} und der NPL_{pairs mpt} lagen bei 1.94 (p=0.028) bzw. bei 1.90 (p=0.030). Zudem ergab sich an dieser Markerposition mit

Ergebnisse

0.88 ein hoher Informationsgehalt für die untersuchten Familien. An der Position des Markers S0002 auf SSC 3 konnte für den NPL_{all mpt} ein Wert von 1.90 (p=0.031) und für den NPL_{pairs mpt} ein Wert von 1.86 (p=0.030) gefunden werden. Der Informationsgehalt lag hier bei 0.45 bzw. 0.47. Daneben ergaben sich Hinweise auf mögliche Defektgene auf SSC 13 (NPL_{all mpt} = 1.57; NPL_{pairs mpt}=1.66) und auf SSC 8 (NPL_{all mpt}=1.37; NPL_{pairs mpt}=1.31).

Tabelle 13: Die maximalen NPL_{all mpt} und NPL_{pairs mpt} Werte der einzelnen Chromosomen für die nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse. Grau markiert sind die Chromosomen mit einem p < 0.1

SSC	Marker	NPLall	p-Wert	Info _{all}	NPL _{pairs}	p-Wert	Info _{pairs}
1	SW1621	2.57	0.006	0.47	2.59	0.006	0.46
2	SW1026	0.49	0.346	0.51	0.56	0.285	0.51
3	S0002	1.90	0.031	0.45	1.86	0.033	0.47
4	S0097	0.04	0.477	0.68	-0.06	0.519	0.68
5	SW1463	0.88	0.190	0.57	0.82	0.205	0.56
6	S0099	0.33	0.367	0.66	0.41	0.337	0.66
7	SW352	0.27	0.388	0.38	0.20	0.418	0.37
8	S0069	1.37	0.087	0.48	1.31 ¹	0.096	0.73
9	SW2401	1.13	0.130	0.60	1.11	0.135	0.59
10	SW1894	0.68	0.245	0.47	0.71	0.237	0.45
11	SW1135	0.79	0.213	0.33	0.73	0.229	0.34
12	S0229	1.94	0.028	0.88	1.90	0.030	0.88
13	S0068	1.57	0.060	0.89	1.66	0.050	0.90
14	SW295	0.39	0.346	0.49	0.33	0.367	0.50
15	SW1119	0.05	0.473	0.55	0.01	0.494	0.59
16	SW742	0.31	0.371	0.69	0.24	0.400	0.68
17	SW335	0.56	0.283	0.46	0.57	0.282	0.47
18	SW787	0.72	0.235	0.40	0.67	0.249	0.40
X	SW1943	1.17	0.129	0.82	1.17	0.129	0.82

¹Maximum der NPL_{pairs} -Statistik auf SSC 8 am Marker SWR1101

4.2.1.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse zwischen den einzelnen Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

Im folgenden werden die Ergebnisse der Kopplungsanalyse zwischen den einzelnen Markern und dem Krankheitslocus dargestellt. Dabei wurde für jeden Marker der genomweiten Typisierung die NPL_{all spt} und die NPL_{all spt} Statistik berechnet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 14 wiedergegeben. Analog zur Multipoint-Kopplungsanalyse sind die maximalen NPL_{pairs spt} und NPL_{all spt} Werte für jedes Chromosom (SSC) mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) und den Informationsgehalten an den Positionen der NPL-Maxima angeführt. Die graue Markierung hebt die Chromosomen hervor, deren p-Werte an der Stelle der maximalen NPL-Werte kleiner sind als 0.1 und die deshalb in die weitere Kopplungs- und Assoziationsanalyse mit dem TDT einbezogen wurden.

Die höchsten Werte der NPL-Statistik ergaben sich auch in dieser Auswertung auf dem SSC 1 am Marker SW1621. Der NPL_{all spt} betrug dabei 2.14 (p=0.019) und der NPL_{pairs spt} 2.13 (p=0.018). Der Informationsgehalt an dieser Markerposition lag mit 0.38 im unteren Bereich. Für das SSC 12 (S0229) wurde ein NPL_{all spt} von 1.61 (p=0.056) und ein NPL_{pairs spt} von 1.57 (p=0.060) ermittelt. Dort betrug der Informationsgehalt 0.80 bzw. 0.79. Die NPL-Werte auf SSC 8 hatten einen Wert von 1.49 (p=0.069) und von 1.54 (p=0.063). Auf dem SSC 3 betrug der NPL_{all spt} 1.33 (p=0.095) und der NPL_{pairs spt} 1.36 (p=0.089). Das SSC 13, das in der nichtparametrischen Multipoint-Kopplungsanalyse p-Werte kleiner als 0.1 hatte, zeigte in dieser Auswertung keine signifikante NPL_{all spt} bzw. NPL_{pairs spt} Statistik.

SSC	Marker	NPL _{all}	p-Wert	Info _{all}	NPL _{pairs} p-Wert		Info _{pairs}
1	SW1621	2.14	0.019	0.38	2.13	0.018	0.38
2	SW1026	0.67	0.249	0.37	0.71	0.233	0.36
3	S0002	1.33	0.095	0.37	1.36	0.089	0.39
4	S0097	0.28	0.384	0.66	0.16	0.431	0.65
5	SW2	0.41	0.336	0.58	0.36 ¹	0.633	0.39
6	S0099	0.65	0.257	0.62	0.72	0.234	0.62
7	SW472	0.32	0.369	0.11	0.29	0.381	0.10
8	SWR1101	1.49	0.069	0.77	1.54	0.063	0.77
9	SW2401	0.75	0.226	0.47	0.75	0.226	0.47
10	SW1894	0.81	0.208	0.37	0.85	0.197	0.36
11	SW1135	0.62	0.264	0.13	0.58	0.281	0.14
12	S0229	1.61	0.056	0.80	1.57	0.060	0.79
13	SW1864	0.85	0.197	0.38	0.90	0.184	0.38

Tabelle 14: Die maximalen NPL_{all spt} und NPL_{pairs spt} Werte der einzelnen Chromosomen für die nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse. Grau markiert sind die Chromosomen mit einem p < 0.1

Ergebnisse

SSC	Marker	NPLall	p-Wert	Info _{all}	NPL _{pairs}	p-Wert	Info _{pairs}
14	SW295	0.61	0.270	0.34	0.57	0.283	0.35
15	SW964	0.34	0.353	0.22	0.36	0.354	0.21
16	SW742	0.20	0.415	0.64	0.13	0.444	0.65
17	SW335	0.56	0.285	0.46	0.57	0.282	0.47
18	SW787	0.81	0.209	0.37	0.75	0.225	0.37
XY	SW949	-0.45	0.668	0.68	-0.38	0.643	0.68
Х	SW2470	0.93	0.177	0.45	0.93	0.177	0.45

Tabelle 14: Die maximalen NPL_{all spt} und NPL_{pairs spt} Werte der einzelnen Chromosomen für die nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse. Grau markiert sind die Chromosomen mit einem p < 0.1

¹Maximum der NPL_{pairs} -Statistik auf SSC 5 am Marker SW1463

4.2.2 Genomweite parametrische Kopplungsanalyse

Für die parametrische Kopplungsanalyse ist das genetische Modell des Defekts, d.h. der Vererbungsmodus, die Krankheitsallelfrequenz und die Penetranz der Erkrankung in der Population näher zu spezifizieren. Hinsichtlich der Analatresien beim Schwein liegen keine zuverlässigen Angaben über den Vererbungsmodus, die Prävalenz und die Penetranz vor. Die Parameter wurden daher aus Literaturangaben und dem vorliegenden Datenmaterial abgeleitet und über einen größeren Bereich variiert. Es wurde ein monogen rezessiver Erbgang mit einer sehr niedrigen Penetranz von 1 % angenommen. Die Krankheitsallelfrequenz wurde in der statistischen Auswertung zwischen 0.10 und 0.30 verändert. Als Vergleich dazu wurden LOD-Score Berechnungen auf Basis eines monogen rezessiven Erbgangs, mit einer nahezu vollständigen Penetranz von 90 %, bei Krankheitsallelfrequenzen von 0.10 bzw. 0.30 durchgeführt. Analog zur nichtparametrischen Auswertung wurden Multipoint LOD-Scores (LOD-Score_{spt}) zwischen einzelnen Markern und dem Krankheitslocus berechnet.

4.2.2.1 Parametrische Multipoint-Kopplunganalyse zwischen mehreren Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der genomweiten parametrischen Auswertung dargestellt. Angegeben sind dabei das Chromosom, der Marker bzw. die Position zwischen zwei Markern, die unter den vorgegebenen Parametern den höchsten LOD-Score_{mpt} erreicht hat. Grau unterlegt ist dabei das Chromosom, die in der nichtparametrischen Kopplungsanalyse signifikante Ergebnisse gezeigt hatten. Die Signifikanzgrenze der parametrischen Kopplungsanalyse, die bei einem LOD-Score_{mpt} von 3 liegt, wurde nur auf SSC 1 überschritten.

Für das SSC 1 wurden am Marker SW1621 bei einer Penetranz von 1 % ein LOD-Score_{mpt} von 2.38 bei einer Frequenz des Krankheitsallels von 0.3 berechnet. Ein höherer LOD-Score_{mpt} von

2.72 wird bei einer Frequenz des Krankheitsallels von 0.1 erreicht. Bei einer Penetranz von 90% lagen die höchsten LOD-Score_{mpt} Werte zwischen den Markern SW781 und SW1621 mit 3.02 und 2.88.

Tabelle 15: Die maximalen LOD-Scores_{mpt} der einzelnen Chromosomen für die parametrische Multipoint-Kopplungsanalyse bei verschiedenen genetischen Modellen. Grau markiert die Chromosomen mit signifikanten LOD-Scores_{mpt} > 3.00

SSC	Marker	LOD-Score 0.3; 0.90	LOD-Score 0.1; 0.90	Marker	LOD-Score 0.3; 0.01	LOD-Score 0.1; 0.01
1	SW781/SW1621	3.02	2.88	SW1621	2.38	2.72
2	SW1408/S0036	-1.11	-1.26	SW1026/S0010	0.12	-0.87
3	S0002/SW349	0.41	-0.75	S0002	1.41	1.21
4	S0217/S0067	-2.21	-2.53	S0217/S0067	-0.80	-1.67
5	SW1463/SW1200	-2.00	-0.85 ¹	SW1463	-0.22	-0.59^2
6	SW1881/SW2419	-1.99	-2.43	SW1881SW2419	-0.55	-1.46
7	SW472/SW352	-1.15	-1.59	SW472/SW352	-0.29	-0.91
8	S0069/S0144	-0.22	-0.54	SW2521/SWR1101	0.55	0.17 ³
9	SW2401/S0081	-1.76	-2.88	SW911/SW2401	0.53	-0.27
10	S0038/SW1894	-2.67	-4.05	SW1894	0.01	-1.62
11	SW703/SW1135	-2.11	-2.89	SW1135	0.02	-1.06
12	SW957/SW874	-0.68	-1.80	SW957	1.07	-0.26
13	SW398/S0289	-1.08	-1.95	S0068/SW398	0.57	-0.41 ⁴
14	SW1557/SWC27	-2.59	-3.17	SW1557/SWC27	-0.54	-1.62
15	SWR1533/SW1983	-4.57	-5.28	SW1119	-1.14	-3.37 ⁵
16	SW81/SW1897	-0.82	-0.61	SW81/SW1897	-0.27	-0.61
17	SW335/SW1031	-0.32	-0.35	SW335/SW1031	-0.05	-0.18
18	SW787/SWR414	-1.67	-2.12	SW787/SWR414	-0.17	-0.97
Х	SW2470/SW2476	-0.20	-0.08	SW2470/SW2476	0.33 ⁶	0.06

LOD-Score 0.3; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.90

LOD-Score 0.1; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.90

LOD-Score 0.3; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.01

LOD-Score 0.1; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.01

¹² Maximum LOD-Score 0.1; 0.90 und Maximum LOD-Score 0.1; 0.01 auf SSC 5 zwischen SW413 und SWR453

³ Maximum LOD-Score 0.1; 0.01 auf SSC 8 zwischen S0069 und S0144

⁴ Maximum LOD-Score 0.1; 0.01 auf SSC 13 zwischen SW398 und S0289

⁵ Maximum LOD-Score 0.1; 0.01 auf SSC 15 zwischen SW964 und SWR1533

6 Maximum LOD-Score 0.3; 0.01 auf SSC X am Marker SW1943

4.2.2.2 Parametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Singlepoint LOD-Score Analyse an einzelnen Markern dargestellt. Die Auswertung wurde mit denselben variierenden Parametern durchgeführt, wie bei der Untersuchung mit mehreren Markern. Die Signifikanzgrenze, die bei einem LOD-Score_{spt} von 3 liegt, wurde auf keinem Chromosom überschritten.

Die höchsten LOD-Score Werte lagen bei dieser Analyse ebenfalls auf dem SSC 1. Dabei wurde bei einer Penetranz von 1 % und einer Frequenz des Krankheitsallels von 0.3 ein LOD-Score_{spt} von 2.05 am Mikrosatellitenmarker SW1621 berechnet. Ein höherer LOD-Score_{spt} von 2.40 wird mit gleicher Penetranz und mit einer Frequenz des Krankheitsallels von 0.1 erreicht. Bei einer Penetranz von 90 % liegen die maximalen LOD-Score_{spt} bei 2.00 und 1.28.

SSC	Marker	LOD-Score 0.3; 0.90	LOD-Score 0.1; 0.90	Marker	LOD-Score 0.3; 0.01	LOD-Score 0.1; 0.01
1	SW1621	2.00	1.28	SW1621	2.05	2.40
2	SW1026	-1.97	-4.04	SW1026	0.42	-0.54
3	S0002	-0.68	-2.70	S0002	1.04	0.47
4	SW752	-5.63	-8.61	SW752	-1.00	-3.24
5	SWR453	-2.15	-3.77	SWR453	-0.31	-1.19
6	SW1881	-5.33	-9.55	SW1881	-0.57^{1}	-2.84
7	SW472	-1.14	-2.62	SW472	0.09	-0.38
8	S0144	-1.47	-3.50	SWR1101	0.57	-0.39^2
9	SW749	-3.73	-6.04	SW911	-0.07	-1.82
10	SW1894	-2.11	-3.95 ³	SW1894	0.40	-0.66
11	SW1135	-0.83	-1.87	SW1135	0.91	-0.23
12	SW957	-1.38	-3.84	SW957	1.13	0.25
13	SW1864	-1.12	-3.51	SW1864	0.71	-0.12
14	SW295	-3.74	-6.17 ⁴	SW295	-0.23	-1.87
15	SW964	-3.31	-5.76	SW964	-0.27	-1.55
16	SW81	-1.47	-0.80	SW81	-0.16	-0.79
17	SW1031	-3.70	-5.89	SW335	-0.33	-2.17
18	SW787	-4.57	-8.11	SW787	-0.38	-2.23
XY	SW949	-8.03	-13.55	SW949	-1.41	-4.63

Tabelle 16: Die maximalen LOD-Scores_{spt} der einzelnen Chromosomen für die parametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse bei verschiedenen genetischen Modellen

SSC	Marker	LOD-Score 0.3; 0.90	LOD-Score 0.1; 0.90	Marker	LOD-Score 0.3; 0.01	LOD-Score 0.1; 0.01
Х	SW2470	-0.41	-1.45	SW2470	0.47	0.14

Tabelle 16: Die maximalen LOD-Scores_{spt} der einzelnen Chromosomen für die parametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse bei verschiedenen genetischen Modellen

LOD-Score 0.3; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.90 LOD-Score 0.1; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.90 LOD-Score 0.3; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.01 LOD-Score 0.1; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.01

¹ Maximum LOD-Score 0.3; 0.01 auf SSC 6 S0099

² Maximum LOD-Score 0.1; 0.01 auf SSC 8 S0144

³ Maximum LOD-Score 0.1; 0.90 auf SSC 10 SW920

⁴ Maximum LOD-Score 0.1; 0.90 auf SSC 14 SWC27

4.3 Kopplungsanalyse mit höherer Markerdichte auf SSC 1

Die genomweite Kopplungsanalyse ergab ein signifikantes "allele sharing" zwischen den erkrankten Geschwistern auf SSC 1 am Marker SW1621. Im distalen Bereich des Chromosoms wurde bei der nichtparametrischen Auswertung ein NPL_{all mpt} von 2.57 (p = 0.006) und bei der parametrischen Kopplungsanalyse LOD-Score_{mpt} Werte zwischen 2.38 und 3.02 ermittelt. Der Informationsgehalt lag am SW1621 mit 0.47 im mittleren Bereich. In der proximalen und distalen Region des Chromosoms, d.h. an den Markern SW781 und S0320, zeigte der Informationsgehalt sehr niedrige Werte von 0.07 und 0.30. Nach der statistischen Auswertung von SSC 1 wurde daher entschieden, die Markerdichte in dieser Region gezielt zu erhöhen und zudem den Bereich um den Mikrosatellitenmarker SW1621 mit zusätzlichen Markern abzudecken.

4.3.1 Nichtparametrische Kopplungsanalyse mit höherer Markerdichte auf SSC1

Wie bei der genomweiten nichtparametrischen Kopplungsanalyse wurde auch in dieser Auswertung eine Multipoint- und Singlepoint-Statistik berechnet. Im Unterschied zur genomweiten Untersuchung wurde jedoch auf die separate Berechnung der NPL_{pairs}-Statistik verzichtet und nur die NPL_{all} -Statistik in den Ergebnissen angeführt.

4.3.1.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse zwischen mehreren Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

Zur weiteren Untersuchung der Ergebnisse aus Kapitel 4.2 wurden 8 zusätzliche Mikrosatellitenmarker auf dem SSC 1 genotypisiert. Somit konnte die nichtparametrische Kopplungsanalyse an 14 Markern durchgeführt werden. Dabei ergab sich am Marker SW1621 ein NPL_{all mpt} von 2.39 (p = 0.009), bei einem Informationsgehalt von 0.74. In Abbildung 8 ist der Verlauf der NPL_{all mpt} Statistik basierend auf 14 Markern, der ursprünglichen NPL_{all mpt} Statistik mit 6 Markern gegenübergestellt. Der maximale NPL-Wert lag nach dieser erweiterten Auswertung etwas niedriger als in der ersten Analyse.



Abbildung 8: Verlauf der NPL_{all mpt} Statistik nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

4.3.1.2 Der Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Multipoint-Kopplungsanalyse

Durch die zusätzlich typisierten Marker konnte der Informationsgehalt nicht nur an der Position des NPL-Maximums, sondern auch im proximalen Bereich von SSC 1 (siehe Abbildung 9) erhöht werden. Gegenüber der ersten genomweiten Analyse liegt der Informationsgehalt im interessanten Chromosomenbereich (70-90 cM) nun zwischen 0.74 und 0.88. Im distalen Bereich des Chromosoms beträgt der Informationsgehalt 0.40. Die Typisierung von weiteren Mikrosatellitenmarkern in dieser Region könnte den Informationsgehalt nochmals wesentlich erhöhen.



Abbildung 9: Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Multipoint-Kopplungsanalyse nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

4.3.1.3 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse zwischen einzelnen Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

In Abbildung 10 ist der Verlauf der NPL_{all spt}-Statistik basierend auf 14 Markern, der ursprünglichen NPL_{all spt}-Statistik mit 6 Markern gegenübergestellt. Für die NPL_{all spt}-Statistik ergab sich am SW1621 nach Erhöhung der Markerdichte ein maximaler Wert von 1.95 (p=0.028), der niedriger war als in der ersten Auswertung (NPL_{all spt} = 2.14). Auch am Mikrosatellitenmarker S0155 zeigte sich mit 1.83 (p=0.036) ein hoher NPL_{all spt} -Wert, der nahezu unverändert war.



Abbildung 10: Verlauf der NPLall spt Statistik nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

4.3.1.4 Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Singlepoint-Kopplungsanalyse

Der Informationsgehalt an den einzelnen Markerpositionen der Kopplungsanalyse ist in Abbildung 11 wiedergegeben. Dabei wird ersichtlich, daß die Erhöhung der Markerdichte vor allem im proximalen Bereich des SSC 1 den Informationsgehalt deutlich steigern konnte. Die höchsten Werte wurde an den Mikrosatellitenmarkern S0316 und S0155 erreicht und betrugen jeweils 0.61. An der Position SW1621 ergab sich ein vergleichsweise niedriger Wert von 0.35. Damit lag der Infogehalt an diesem Punkt auf ähnlichem Niveau wie in der ersten Kopplungsanalyse mit 6 Markern.



Abbildung 11: Informationsgehalt (Info) der nichtparametrischen Singlepoint Kopplungsanalyse nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

4.3.2 Parametrische Kopplungsanalyse mit höherer Markerdichte auf SSC1

Die parametrische Kopplungsanalyse auf SSC 1 wurde nach Erhöhung der Markerdichte auf 14 Mikrosatellitenmarker unter denselben Voraussetzungen bezüglich des Vererbungsmodus, der Krankheitsallelfrequenz und der Penetranz durchgeführt wie die genomweite Kopplungsanalyse.

4.3.2.1 Parametrische Multipoint-Kopplunganalyse zwischen mehreren Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der LOD-Score_{mpt} Kopplungsanalyse bei unterschiedlicher Markerdichte dargestellt. Es wurde eine Penetranz von 1 % unterstellt und die Frequenz des Krankheitsallels variiert. Am Marker SW1621 betrugen die LOD-Score_{mpt} - Werte in der Auswertung mit 14 Mikrosatellitenmarkern 1.78 bzw. 0.70 bei einer postulierten Krankheitsallelfrequenz von 0.3 bzw. 0.1.



Abbildung 12: Multipoint LOD-Score Analyse (Penetranz 1 %) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

Unter der Annahme einer Penetranz von 90 % ergaben sich deutlich niedrigere LOD-Score_{mpt} Werte, die durchwegs im negativen Bereich lagen (siehe Abbildung 13). So betrug der LOD-Score_{mpt} am Marker SW1621, -1.40 (Krankheitsallelfrequenz von 0.3) und -4.20 (Krankheitsallelfrequenz von 0.1).



Abbildung 13: Multipoint LOD-Score Analyse (Penetranz 90 %) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

4.3.2.2 Parametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

In Abbildung 14 ist der Verlauf der LOD-Score_{spt} -Statistik bei einer Penetranz von 1 % auf SSC 1 dargestellt. Wie bei der Multipoint-Analyse wurden die Ergebnisse bei unterschiedlicher Frequenz des Krankheitsallels und unterschiedlicher Markerdichte miteinander verglichen. Die maximalen LOD-Scores_{spt} wurden auch hier an der Position SW1621 erreicht und hatten Werte von 2.14 bzw. 1.86 bei einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1 bzw. 0.3. Nach der Einbeziehung der zusätzlichen Markern, lagen die LOD-Score_{spt} somit auf gleichem Niveau wie in der ursprünglichen Analyse mit 6 Markern.



Abbildung 14: Singlepoint LOD-Score Analyse (Penetranz 1 %) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

Bei einer Penetranz der Analatresie von 90 % ergaben sich nach Erhöhung der Markerdichte ähnliche maximale LOD-Score_{spt}Werte am SW1621 wie bei der Auswertung mit 6 Markern (siehe Abbildung 15). Die maximalen LOD-Score_{spt} -Werte betrugen 1.23 und 1.99 bei einer Frequenz des Krankheitsallels von 0.1 und 0.3.



Abbildung 15: Singlepoint LOD-Score Analyse (Penetranz 90 %) nach Erhöhung der Markerdichte auf SSC 1

4.4 Kopplungsanalyse auf SSC 1 mit zusätzlichem Familienmaterial

4.4.1 Nichtparametrische Kopplungsanalyse auf SSC 1 mit zusätzlichem Familienmaterial

4.4.1.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplunganalyse zwischen mehreren Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

Zur Bestätigung der Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse auf SSC 1 wurde das erweiterte Familienmaterial (Kapitel 3.1.4) verwendet. Bei getrennter Auswertung dieser 8 zusätzlichen Familien ergab sich am Marker SW2185 ein maximaler NPL_{all mpt}-Wert von 2.61 (p=0.007), wie aus Abbildung 16 hervorgeht. Im nächsten Schritt wurden alle Familien gemeinsam an 14 Markern ausgewertet, wobei sich drei NPL-Maximas ergaben. Ein Maximum lag wie bei der vorhergehenden Auswertung am Marker SW2185 und hatte einem NPL_{all mpt} von 2.05 (p = 0.022). Zwei weitere Maxima mit einem NPL_{all mpt} von jeweils 2.00 (p = 0.025) wurden an den Positionen SW1621 und SWR982 ermittelt.



Abbildung 16: Verlauf der NPL_{all mpt} -Statistiken auf SSC 1 basierend auf Kopplungsanalysen mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte

In Tabelle 17 sind für die einzelnen Auswertungen die höchsten NPL_{all} Teststatistiken an den jeweiligen Markern, die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte), sowie die Informationsgehalte zusammengefaßt. Die maximalen NPL_{all mpt} -Werte an den betreffenden Markerpositionen sind jeweils grau unterlegt.

Ergebnisse

		I			
Kopplungsanalyse	сM	Marker	NPLall	p-Wert	Info _{all}
6 Marker / 27 Familien	79.6	SW1621	2.57	0.006	0.47
	93.9	S0155	1.97	0.027	0.65
14 Marker / 27 Familien	67.6	SW2185	1.13	0.131	0.66
	79.6	SW1621	2.39	0.010	0.74
	86.4	SWR982	1.72	0.046	0.88
	91.1	S0155	1.72	0.046	0.83
14 Marker / ergänzende Familien (n=8)	67.6	SW2185	2.61	0.006	0.91
	79.6	SW1621	0.44	0.363	0.54
	86.4	SWR982	1.43	0.086	0.85
	93.9	S0155	1.01	0.156	0.68
14 Marker / gesamtes Familienmaterial (n=35)	67.6	SW2185	2.05	0.022	0.71
	79.6	SW1621	2.00	0.025	0.73
	86.4	SWR982	2.00	0.025	0.88
	93.9	S0155	1.79	0.039	0.80

Tabelle 17: Vergleich der Kopplungsanalysen auf SSC 1 mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte, anhand der NPL _{all mpt} Statistik, dem p-Wert und dem Info_{all}. Grau markiert sind jeweils die maximalen NPL_{all mpt} -Werte der betreffenden Auswertung

Die Abbildung 17 zeigt den Verlauf des Informationsgehalts für unterschiedliche Anzahl ausgewerteter Familien. Bei der getrennten Analyse der 8 Zusatzfamilien wurde über einen weiten Bereich von SSC 1 ein hoher Informationsgehalt erreicht, der mit 0.91 den höchsten Wert am Maximum des NPL-Wertes (SW2185) hatte. Der Informationsgehalt des gesamten Familienmaterials (n = 35) lag mit Werten zwischen 0.71 und 0.88 ebenfalls auf hohem Niveau. Im distalen Bereich des Chromosoms (90-130 cM) könnte durch zusätzliche Marker noch eine Verbesserung erzielt werden.


Abbildung 17: Informationsgehalt der Multipoint NPL-Statistik auf SSC 1 bei unterschiedlicher Anzahl an Familien und veränderter Markerdichte

4.4.1.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

Die Abbildung 18 zeigt eine vergleichende Darstellung der Singlepoint-NPL-Statistiken bei unterschiedlichem Familienmaterial. Die separate Auswertung der zusätzlichen Familien (n=8) ergab am Marker SW2185 den maximalen NPL_{all spt} von 1.68 (p = 0.044) und am Marker SW1621 einen NPL_{all spt} von -0.15 (p = 0.586). Bei der Auswertung aller Familien (n=35) wurde an diesen Markern ein Wert von 0.71 (p = 0.240) bzw. von 1.40 (p = 0.083) erreicht. Das Maximum der NPL_{all spt} Statistik lag jedoch am Marker S0155 bei 1.44 (p = 0.077).



Abbildung 18: Verlauf der NPL_{all spt}-Statistiken auf SSC 1 basierend auf Kopplungsanalysen mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 18 die wichtigsten Ergebnisse der verschiedenen Singlepoint-Kopplungsanalysen auf SSC 1 zusammengefaßt. Die maximalen Werte der NPL-Statistik sind in der Tabelle grau hervorgehoben.

Tabelle 18: Vergleich der Kopplungsanalysen auf SSC 1 mit unterschiedlicher Familienzahl und veränderter Markerdichte, anhand der NPL _{all spt} Statistik, dem p-Wert und dem Info_{all}. Grau markiert sind jeweils die maximalen NPL_{all spt}-Werte der betreffenden Auswertung.

Kopplungsanalyse	cM	Marker	NPL _{all}	p-Wert	Info _{all}
6 Marker / 27 Familien	79.6	SW1621	2.14	0.018	0.38
	93.9	S0155	1.71	0.046	0.61
14 Marker / 27 Familien	67.6	SW2185	-0.14	0.548	0.31
	79.6	SW1621	1.95	0.028	0.35
	86.4	SWR982	0.47	0.316	0.50
	91.1	S0155	1.83	0.036	0.61
14 Marker / ergänzende Familien (n=8)	67.6	SW2185	1.68	0.044	0.62
	79.6	SW1621	-0.15	0.586	0.45
	86.4	SWR982	0.81	0.185	0.56
	93.9	S0155	0.16	0.402	0.22
14 Marker / gesamtes Familienmaterial (n=35)	67.6	SW2185	0.71	0.236	0.36
	79.6	SW1621	1.40	0.083	0.35
	86.4	SWR982	0.78	0.287	0.50
	93.9	S0155	1.44	0.077	0.51

Die Abbildung 19 zeigt den Verlauf des Informationsgehalts für unterschiedliche Anzahl ausgewerteter Familien. Im Vergleich zur initialen Kopplungsanalyse, bei der am Marker SW1621 eine Informationsgehalt von 0.38 erreicht wurde, lag der Info_{spt} Wert bei der Auswertung der 8 zusätzlichen Familien bei 0.45 und bei der Auswertung aller Familien (n=35) bei 0.35. An der Position des Marker SW2185 zeigte sich in der Auswertung der ergänzenden Familien ein Informationsgehalt von 0.62 und bei der Gesamtauswertung ein Wert von 0.36.



Abbildung 19: Informationsgehalt der Singlepoint NPL-Statistik auf SSC 1 bei unterschiedlicher Anzahl an Familien und veränderter Markerdichte

4.4.2 Parametrische Kopplungsanalyse auf SSC 1 mit zusätzlichem Familienmaterial

Die parametrische Kopplungsanalyse mit dem erweiterten Familienmaterial wurde unter den gleichen Voraussetzungen bezüglich des Vererbungsmodus, der Krankheitsallelfrequenz und der Penetranz durchgeführt wie die genomweite Kopplungsanalyse.

4.4.2.1 Parametrische Multipoint-Kopplunganalyse zwischen mehreren Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

In den Abbildungen 20 und 21 sind die Ergebnisse der LOD-Score_{mpt} Kopplungsanalyse bei unterschiedlicher Markerdichte und unterschiedlicher Anzahl von Familien auf SSC 1 dargestellt. Es wurde jeweils eine Penetranz von 1 % unterstellt. Bei einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1 (siehe Abbildung 20) und bei Einbeziehung aller Familien (n=35) lag der maximale LOD-Score_{mpt} von -0.59 zwischen den Marker SW2185 und SW80.



Abbildung 20: Multipoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1 % und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1

Bei einer Krankheitsallelfrequenz von 0.3 (siehe Abbildung 21) ergaben sich für die Auswertung aller Familien höhere LOD-Score_{mpt} Werte als bei einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1. So betrugen die LOD-Scores am Mikrosatellitenmarker SW2185 1.35 und am Marker SW1621 1.14.



Abbildung 21: Multipoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1 % und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.3

Unter Annahme einer Penetranz des Defekts von 90 % lagen die LOD-Score_{mpt}Werte durchwegs im negativen Bereich. Die maximalen LOD-Score_{mpt} ergaben sich zwischen den Markern SW781 und SW2185 und hatten bei einer Frequenz des Krankheitsallels von 0.1 einen Wert von -1.44 und bei einer Frequenz von 0.3 einen Wert von -0.32.

4.4.2.2 Parametrische Singlepoint-Kopplunganalyse zwischen einzelnen Markern und einem hypothetischen Krankheitslocus

In den Abbildungen 22 und 23 zeigt sich der Verlauf der LOD-Score_{spt} Statistik bei einer Penetranz von 1 %. Wie bei der Multipoint-Analyse wurden die Ergebnisse bei Frequenz Krankheitsallels, veränderter unterschiedlicher des Markerdichte und unterschiedlicher Anzahl ausgewerteter Familien einander gegenüber gestellt. Der maximale LOD-Score_{spt} wurde sowohl bei einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1 als auch bei einer Mikrosatellitenmarker Frequenz von 0.3 am SW1621 erreicht. Bei einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1 lag der LOD-Score_{spt} bei 0.52 (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: Singlepoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1 % und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.1

Unter Annahme einer Krankheitsallelfrequenz von 0.3 betrug der maximale LOD-Score_{spt} am Marker SW1621 1.15 (siehe Abbildung 23).



Abbildung 23: Singlepoint LOD-Score mit erweitertem Familienmaterial bei einer Pentranz von 1 % und einer Krankheitsallelfrequenz von 0.3

Unterstellt man eine Penetranz der Analatresie von 90 % liegen die maximalen LOD-Score_{spt}Werte am Marker SW1621 im negativen Bereich. So hatte der LOD-Score_{spt} bei einer Frequenz des Krankheitsallels von 0.1 einen Wert von -2.22 und bei einer Frequenz von 0.3 den Wert -0.62.

4.4.3 Betrachtung der Marker SW1621 und SW2185 auf SSC 1 in den einzelnen Familien

Die NPL_{all mpt}-Statistiken an den Markern SW1621 und SW2185 der einzelnen Familien sind in Abbildung 24 illustriert. Die Familien 1-27 (F1-F27) stellen das Tiermaterial der genomweiten Typisierung dar, die Familien 28-35 (F28-F35) das ergänzende Familienmaterial. Die höchsten NPL-Werte an beiden Mikrosatellitenmarkern wurden dabei in F5, einer Familie mit 2 VG und 2 zusätzlichen HG, erreicht. Die maximalen NPL-Werte betrugen am Marker SW1621 2.19 und am Marker SW2185 1.89. Deutlich ist hier zu sehen, daß im ergänzenden Tiermaterial (F28-F35) höhere NPL_{all mpt} am Marker SW2185 zu beobachten sind, als am Mikrosatellitenmarker SW1621.

Ergebnisse



Abbildung 24: NPL_{all mpt}-Werte an den Markern SW1621 und SW2185 auf SSC 1 in den einzelnen Familien. Der senkrechte Strich trennt die 27 Familien (F1-F27) der genomweiten Analyse von den 8 Familien (F28-F35) der zusätzlichen Auswertung

Wird in diesem Zusammenhang der Informationsgehalt (siehe Abbildung 25) betrachtet, so läßt sich feststellen, daß in den zusätzlichen Familien (F28-F35) der Informationsgehalt am Marker SW1621 z. T. niedriger ist als am Marker SW2185. Im Gegensatz dazu ist in den Familien der genomweiten Untersuchung (F1-F27) der Informationsgehalt am Marker SW1621 meist höher oder auf ähnlichem Niveau wie am Marker SW2185. Bei der Einbeziehung der Familien F28-F35 in die Kopplungsanalyse, könnten diese Unterschiede im Informationsgehalt für die Verschiebung des NPL-Maximums zum Marker SW2185 sein, da der Mikrosatellit SW1621 weniger nutzbare Information für die Kopplungsanalyse liefert.



Abbildung 25: Informationsgehalt an den Markern SW1621 und SW2185 auf SSC 1 in den einzelnen Familien. Der senkrechte Strich trennt die 27 Familien (F1-F27) der genomweiten Analyse von den 8 Familien (F28-F35) der zusätzlichen Auswertung

4.5 Genomweite Kopplungsanalyse unter Ausschluß der Atresia recti Ferkel

In dieser Studie wurde eine pathologische Untersuchung der defekten Ferkel vorgenommen. Die dabei gestellte Diagnose ermöglichte eine Differenzierung in die zwei verschiedenen Ausprägungen der Analatresie, Atresia ani und Atresia recti. Um zu vermeiden, daß genetische Heterogenität bezüglich der Defektausprägung die Ergebnisse der Kopplungsanalyse beinträchtigt, wurde eine separate genomweite Auswertung nur mit Atresia ani Tieren durchgeführt.

In den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 sind die wichtigsten Resultate der nichtparametrischen Multipoint- und Singlepointanalyse zusammengefaßt. Alle weiteren Ergebnisse der nichtparametrischen und parametrischen genomweiten Kopplungsanalyse ohne Atresia recti Tiere finden sich im Anhang (Kapitel 7.10.1, 7.10.2, 7.10.3 und 7.10.4).

4.5.1 Nichtparametrische Multipoint Kopplungsanalyse der Atresia ani Ferkel

Bei der Auswertung ohne Atresia recti Tiere ergaben sich tendenziell niedrigere Werte für die NPL-Statistiken. Dies dürfte zum größten Teil auf die verringerte Mächtigkeit der Kopplungsanalyse infolge der Reduzierung der Familien zurückzuführen sein. Die wichtigsten Resultate dieser Analyse, die ein nominales Signifikanzniveau von 5 % bzw. knapp darüber aufweisen, sind in Tabelle 19 aufgeführt. Auf SSC 1 wurden drei unterschiedliche Auswertungen (A, B, C) vorgenommen. Die Analyse A mit 25 Familien und 6 Markern, B mit zusätzlichen Familien (n = 5) an 14 Markern und C mit allen Familien (n = 30) an 14 Markern.

Den höchsten NPL_{all mpt} mit 2.22 (p = 0.014) zeigte das SSC 1 in der Auswertung A. In der Kopplungsanalyse C reduzierte sich der NPL_{all mpt} auf 1.62 (p = 0.054). Der maximale NPL-Wert lag bei C am Marker SW1621, während er sich im Gegensatz dazu in der ursprünglichen Auswertung mit allen Tieren am Marker SW2185 befand. Die Genomregion, die als einzige einen höheren NPL-Wert zeigte als in der gemeinsamen Auswertung von Atresia ani und Atresia recti Ferkeln war das SSC 3 mit einem NPL_{all mpt} von 2.05 (p = 0.020) am Marker S0002. Auf SSC 12 waren die beiden NPL_{all mpt}-Werte auf vergleichbaren Niveau.

Tabelle 19: Maximale Werte der Multipoint NPL_{all} Statistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Multipoint NPL_{all} Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)

SSC	Marker	NPL _{all}	p-Wert	Info _{all}	NPLall	p-Wert	Info _{all}
1 ^A	SW1621	2.22	0.014	0.48	2.57	0.006	0.47
1 ^B	SW2185	2.06	0.019	0.89	2.61	0.006	0.91
1 ^C	SW1621	1.62	0.054	0.74	2.05 ¹	0.022	0.71
3	S0002	2.05	0.020	0.48	1.90	0.031	0.45
12	S0229	1.98	0.025	0.88	1.94	0.028	0.88

^A 25 Familien 6 Marker ^B zusätzliche Familien (n = 5) an 14 Marker ^C gesamte Familien (n = 30) an 14 Marker ¹NPL_{all} am Marker SW2185

4.5.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse der Atresia ani Ferkel

Die wichtigsten Ergebnisse der Singlepoint-Statistik ohne Atresia recti Tiere sind in Tabelle 19 dargestellt. Der höchste NPL_{all spt} wurde auch hier auf SSC 1 in der Auswertung A mit 1.88 (p = 0.031) erreicht. In der Analyse C lag der NPL_{all spt} von 1.34 (p = 0.091) deutlich niedriger. Die Genomregionen SSC 12 und SSC 3 zeigten in der Auswertung ohne Atresia recti Ferkel höhere NPL-Singlepoint-Statistiken, als in der ursprünglichen Kopplungsanalyse mit allen Tieren. So lag der NPL_{all spt} auf SSC 12 bei 1.74 (p = 0.042) und auf SSC 3 bei 1.58 (p = 0.058).

Tabelle 20: Maximale Werte der Singlepoint NPL_{all} Statistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Singlepoint NPL_{all} Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)

SSC	Marker	NPLall	p-Wert	Info _{all}	NPLall	p-Wert	Info _{all}
1^{A}	SW1621	1.88	0.031	0.37	2.14	0.019	0.38
1 ^B	SW781	1.23	0.113	0.80	1.68 ¹	0.044	0.62
1 ^C	SW1621	1.34	0.091	0.38	1.44 ²	0.077	0.51
3	S0002	1.58	0.058	0.42	1.33	0.095	0.37
12	SW957	1.74	0.042	0.53	1.61	0.056	0.80

^A 25 Familien 6 Marker ^B zusätzliche Familien (n = 5) an 14 Marker ^C gesamte Familien (n = 30) an 14 Marker ¹ NPL_{all} am Marker SW2185 ² NPL_{all} am Marker S0155

Zusammenfassend betrachtet ergaben sich für die getrennte Auswertung der Atresia ani Ferkel im Vergleich zu den Resultaten in Kapitel 4.2 keine wesentlich abweichenden Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, daß die Einstufung von Atresia ani und Atresia recti Tieren in dieselbe Defektkategorie, wie sie in dieser Studie vorgenommen wurde, sich nicht negativ auf den Nachweis von Kopplung ausgewirkt hat. Um abschließend klären zu können, ob genetische Heterogenität zwischen Atresia ani und Atresia recti Tieren besteht, müßte eine vergleichbare separate Kopplungsanalyse mit Atresia recti Halbgeschwistern durchgeführt werden. Das sehr seltene Auftreten dieser Defektausprägung erschwert eine derartige Untersuchung.

4.6 Ergebnisse des Transmission-disequillibrium-test (TDT)

Für die Genomregionen, in denen möglicherweise Kandidatengene liegen (siehe Kapitel 4.7) oder die bei der nichtparametrischen Kopplungsanalyse eine NPL Statistik mit einem p-Wert < 0.1 gezeigt hatten, wurde ein Transmission-disequillibrium-test (TDT) durchgeführt. Mit diesem Test wurden die Chromosomen SSC 1, SSC 3, SSC 8, SSC 9, SSC 12, SSC 13, SSC 15, SSC 18 und SSC X auf Kopplung und Assoziation zwischen den einzelnen Markerallelen und dem Krankheitslocus untersucht. Auf SSC 1 wurde zudem an den Markern SW1621 und SW1902 die Kopplungsphase der Markerallele abgeleitet und ein TDT mit Haplotypen durchgeführt. Dabei wurden für den TDT jeweils zwei Teststatistiken, T_m und T_m Het berechnet (Kapitel 2.2.3). Bei Berücksichtigung von multiplem Testen ist das Signifikanzniveau abhängig von der Anzahl der Mikrosatellitenmarker an denen ein TDT durchgeführt wurde. Daher ist neben den Irrtumswahrscheinlichkeiten der Einzeltests, auch die erforderliche nominale

Irrtumswahrscheinlichkeit für ein chromosomenweites Signifikanzniveau von 5 % zusammen mit den Ergebnissen aufgeführt.

4.6.1 Ergebnisse des TDT auf SSC 1

Auf dem SSC 1 wurde an allen 14 Markern ein TDT durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt. Die Reihenfolge der Marker in der Tabelle spiegelt die Anordnung der Mikrosatelliten auf dem Chromosom wieder. Angegeben sind neben den Markern, die X² - Testgrößen für die beiden Teststatistiken T_m und T_mHet, die Anzahl Freiheitsgrade (df) und die Irrtumswahrscheinlichkeiten der Einzeltests, sowie die erforderliche nominale Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha' = 0.003$ für ein chromosomenweites Signifikanzniveau von 5 %.

Der Marker SW2185 der in der Bestätigungsstudie mit 14 Markern das NPL_{all} Maximum von war 2.05 gezeigt hatte. für die Teststatistik signifikant T_{mHet} mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.015. Für den Marker SW1621 und den 6.0 cM distal gelegenen SW1902 konnten jedoch hoch signifikante X^2 -Werte für die Teststatistiken T_m und T_m Het ermittelt werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug dabei für $T_m 2 \ge 10^{-6}$ (SW1621) und 0.002 (SW1902) und für T_m Het 7 x 10⁻⁷ (SW1621) und 2 x 10⁻⁴ (SW1902). An der Position des Markers SW1621 befand sich auch das Maximum der NPL_{all mpt}-Statistik mit 14 Markern und vergrößertem Familienmaterial von 2.00 (p=0.025). Wohingegen an der Position des Marker SW1902 der NPL_{all mpt}-Wert der nichtparametrischen Auswertung nur 1.56 (p=0.064) betrug.

Im weiteren wurden für die Marker S0155 und S0320 signifikante Ergebnisse für beide TDT-Statistiken ermittelt, dabei lagen die Irrtumswahrscheinlichkeiten bei 0.016 bzw. 0.028 für T_m und bei 0.006 bzw. 0.002 für T_m Het.

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit vonT _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW1824	9	3.96	0.914	3.75	0.927
SW1515	7	12.50	0.085	14.89	0.037
S0316	8	9.51	0.301	9.83	0.277
SW1851	7	8.11	0.323	9.49	0.219
SW781	9	8.33	0.501	10.11	0.342
SW2185	8	12.25	0.140	18.99	0.015
SW80	7	1.80	0.970	1.61	0.978
SW1621	2	25.80	2 x 10 ⁻⁶ ***	28.23	7 x 10 ⁻⁷ ***
SW1902	6	20.80	0.002**	26.47	2 x 10 ⁻⁴ ***
SWR982	9	3.92	0.917	4.07	0.907
S0155	7	17.16	0.016*	19.84	0.006*

Tabelle 21: Ergebnisse der TDT -Statistiken T_m und T_m Het an 14 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 1 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha = 0.003$)

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit vonT _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
S0320	5	12.56	0.028*	19.37	0.002**
S0056	11	5.09	0.927	9.92	0.538
SW1301	6	4.19	0.651	4.08	0.666

Tabelle 21: Ergebnisse der TDT -Statistiken T_m und T_m Het an 14 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 1 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: α '= 0.003)

* nominales Signifikanzniveau von 5 %

** chromosomenweites Signifikanzniveau von 5 % (α '< 0.003)

*** chromosomenweites Signifikanzniveau von 1 % (α '< 7.1 x 10⁻⁴)

Aufgrund der signifikanten Ergebnisse an den Markern SW1621 und SW1902 wurden mit Hilfe von Allegro 1.0, basierend auf der verfügbaren Familienstruktur, die Kopplungsphasen der Markerallele bzw. Haplotypen abgeleitet. In Abbildung 26 sind die relativen Häufigkeiten der Haplotypen der betroffenen Ferkel und der typisierten Eber dargestellt. Die erste Position des Haplotyps gibt das Markerallel am Marker SW1621 an, die zweite Position zeigt das jeweilige Allel am Mikrosatellitenmarker SW1902 an. Die Allele sind von 1 bis 3 am Marker SW1621 und von 1 bis 7 beim Marker SW1902 fortlaufend numeriert. Insgesamt konnten bei den betroffenen Ferkeln 14 und bei den Ebern 11 verschiedene Haplotypen abgeleitet werden. Der Haplotyp **1-2** war sowohl bei den erkrankten Ferkeln mit 60.4 %, als auch bei den Ebern mit 50.7 % der häufigste Haplotyp (siehe Abbildung 26). Der TDT mit der Teststatistik T_mHet zeigte mit einer nominalen Irrtumswahrscheinlichkeit von p gleich 1 x 10⁻⁴, daß der Haplotyp **1-2** bevorzugt an die defekten Ferkel übertragen wurde.



Abbildung 26: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen, abgeleitet an den Marker SW1621 und SW1902 auf SSC 1.

4.6.2 Ergebnisse des TDT auf SSC 3

Die Ergebnisse des TDT auf SSC 3 sind in Tabelle 22 dargestellt. Der TDT-Test war an keinem der Mikrosatellitenmarker auf SSC 3 signifikant. Am Marker S0002, an dem bei der Kopplungsanalyse das NPL_{all mpt} Maximums bei 1.90 (p=0.031) war, lagen die Irrtumswahrscheinlichkeiten der T_m- und der T_mHet-Teststatistik bei 0.349 bei 0.225.

Tabelle 22: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 3 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha' = 0.007$)

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW274	5	2.06	0.840	1.83	0.872
SW72	4	4.49	0.344	3.64	0.457
S0206	7	5.74	0.570	5.37	0.615
SW902	7	9.70	0.206	10.07	0.185
SW2570	6	5.07	0.535	5.79	0.447
S0002	6	6.70	0.349	8.18	0.225
SW349	4	1.88	0.758	1.82	0.769

4.6.3 Ergebnisse des TDT auf SSC 8

Auf SSC 8 wurden am Marker S0069 signifikante Ergebnisse der T_m und T_{mHet} Teststatistiken mit Irrtumswahrscheinlichkeiten von 0.043 und 0.024 ermittelt (siehe Tabelle 23). Die nichtparametrische Auswertung hatte an dieser Position einen maximalen NPL_{all mpt} von 1.37 (p=0.087) ergeben. Nach Korrektur auf multiples Testen wird das erforderliche Signifikanzniveau von $\alpha' = 0.007$ bei beiden Teststatistiken jedoch nicht mehr erreicht. Für alle weiteren Marker auf SSC 8 konnten keine signifikante Ergebnisse für den TDT ermittelt werden.

Tabelle 23: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 8 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha' = 0.007$)

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit von T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW2410	5	5.55	0.352	6.30	0.278
SW2521	5	1.80	0.876	1.72	0.886
SWR1101	13	11.54	0.566	11.82	0.542
SW29	7	5.63	0.583	9.72	0.205
S0069	7	14.50	0.043*	16.15	0.024*
S0144	6	7.19	0.304	7.57	0.271

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit von T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
S0178	7	8.35	0.303	7.66	0.363

Tabelle 23: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 8 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha' = 0.007$)

* nominales Signifikanzniveau von 5 %

4.6.4 Ergebnisse des TDT auf SSC 9

Die Ergebnisse des TDT auf SSC 9 sind in Tabelle 24 dargestellt. Dabei wurde nur am Marker S0081 signifikante Ergebnisse für die beide Teststatistiken erreicht. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten betrugen 0.023 für die T_m und 0.001 für die T_{mHet} Testgröße. Auch nach Korrektur auf multiples Testen ergab die Teststatistik T_{mHet} am Marker S0081 ein signifikantes Resultat. An der Position des Markers S0081 wurde bei der nichtparametrischen Auswertung nur ein NPL_{all mpt} von 0.67 (p=0.251) ermittelt. Das Maximum der NPL Statistik lag jedoch an der Position des Markers SW2401, der etwa 19.9 cM vor dem Marker S0081 liegt.

Tabelle 24: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern au
SSC 9 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha' = 0.007$)

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW21	5	1.77	0.879	2.29	0.808
SW911	7	3.45	0.840	3.40	0.846
SW2401	5	1.23	0.942	1.62	0.899
S0081	5	13.08	0.023*	20.47	0.001***
S0295	7	7.26	0.402	8.37	0.301
S0114	4	3.81	0.432	3.8	0.434
SW749	3	4.43	0.219	7	0.072

* nominales Signifikanzniveau von 5 %

*** chromosomenweites Signifikanzniveau von 1 % (α '< 0.001)

4.6.5 Ergebnisse des TDT auf SSC 12

Die Ergebnisse des TDT an den sieben Markern des SSC 12 sind in Tabelle 25 wiedergegeben. Am Marker SW957 zeigten sich signifikante Testwerte mit Irrtumswahrscheinlichkeiten von 0.013 für T_m bzw. 0.003 für T_{mHet}. An dieser Position wurde auch eine signifikantes NPL_{all mpt} Statistik von 1.78 (p=0.040) gefunden. Der maximale NPL_{all mpt} der nichtparametrischen

Ergebnisse

Auswertung von 1.94 (p=0.028) lag allerdings nicht am Marker SW957 sondern 14.1 cM proximal zu dieser Position, am Marker S0229.

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW2490	7	10.68	0.153	9.59	0.213
S0229	8	3.61	0.890	3.52	0.898
SW957	4	12.73	0.013*	16.06	0.003**
SW874	6	2.94	0.816	4.27	0.640
S0090	4	8.06	0.089	10.04	0.040*
S0106	9	5.20	0.816	5.91	0.750
SWR1021	6	7.09	0.313	9.33	0.156

Tabelle 25: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 12 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: α '= 0.007)

* nominales Signifikanzniveau von 5 %

** chromosomenweites Signifikanzniveau von 5 % (α'< 0.007)

4.6.6 Ergebnisse des TDT auf SSC 13

Die Ergebnisse des TDT auf SSC 13 sind in Tabelle 26 dargestellt. Dabei zeigte sich an keinem der sechs Mikrosatellitenmarkern ein signifikantes Ergebnis auch nicht am Marker S0068 der einen maximalen NPL_{all mpt} von 1.57 (p=0.061) gezeigt hatte.

Tabelle 26: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 6 Mikrosatellitenmarkern auf SSC13 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha = 0.008$)

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW344	9	3.82	0.923	3.80	0.924
SW864	4	2.56	0.634	4.03	0.402
SW1864	3	2.17	0.538	1.91	0.591
S0068	8	9.58	0.296	9.18	0.327
SW398	8	4.39	0.820	4.05	0.853
S0289	6	6.33	0.387	7.95	0.242

4.6.7 Ergebnisse des TDT auf SSC 15

Die Ergebnisse des TDT für Chromosoms 15 sind in Tabelle 27 aufgeführt. Obwohl die Ergebnisse der nichtparametrischen Kopplungsanalyse in dieser Untersuchung keinen Hinweis auf eine Kopplung der Marker mit dem Krankheitslocus zeigten wurde auf diesem Chromosom ein TDT im Hinblick auf die von Hori *et al.* (2001) gefundene Kopplung zwischen dem Marker SW2072 und Analatresien beim Schwein sowie aufgrund möglicher Kandidatengene *IHH*, *HIP*, *GLI2* und *HOXD13* durchgeführt. Am Marker SW2072 ergab sich kein signifikanter Testwert (p=0.933) für den TDT. Der Marker S0148, der etwa 22.1 cM distal des Markers SW2072 liegt, zeigte jedoch ein signifikantes Testergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.011 bzw. 0.025 für die T_m und die T_mHet Statistik. Am Marker S0355, der 3.1 cM distal von SW2072 liegt, wies die T_mHet Statistik einen Wert von 9.21, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p=0.056, auf. Wird jedoch auf multiples Testen korrigiert, so ist an keinem der Marker ein signifikantes Ergebnis zu beobachten.

Tabelle 27: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 7 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 15 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha' = 0.007$)

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW2072	5	1.35	0.930	1.32	0.933
S0355	4	6.68	0.154	9.21	0.056
S0148	6	16.54	0.011*	14.41	0.025*
SW964	8	4.01	0.856	5.01	0.756
SWR1533	4	3.67	0.452	5.38	0.250
SW1983	8	2.34	0.969	2.18	0.975
SW1119	7	6.53	0.479	7.31	0.397

* nominales Signifikanzniveau von 5 %

4.6.8 Ergebnisse des TDT auf SSC 18

Obwohl auch auf SSC 18 keine signifikanten Ergebnisse in der nichtparametrischen Kopplungsanalyse ermittelt werden konnten, wurde dieses Chromosoms aufgrund von Kandidatengenen die sich nach der vergleichenden Genomanalyse zwischen Mensch und Schwein auf SSC 18 befinden könnten, z.B. *SHH*, *SMOH* und *GLI3* in den TDT einbezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 wiedergegeben. Dabei konnte an keinem der drei typisierten Markern ein signifikantes Ergebnis der T_m und T_m Het Teststatistik ermittelt werden.

Ergebnisse

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW1808	10	4.06	0.945	4.76	0.907
SW787	6	7.39	0.286	6.37	0.383
SWR414	7	1.26	0.989	2.81	0.902

Tabelle 28: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 3 Mikrosatellitenmarkern auf SSC 18 (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha' = 0.016$)

4.6.9 Ergebnisse des TDT auf SSC X

In Tabelle 29 sind die Ergebnisse des TDT auf SSC X zusammengefaßt. Die Teststatistik am Marker lag unter der nominalen Signifikanzgrenze von 5 %. Nach Korrektur auf multiples Testen wurden an keinem der Marker ein signifikantes Ergebnis erzielt. Damit zeigte sowohl die genomweite Kopplungsanalyse, als auch der TDT keinen signifikanten Hinweis, daß sich in dieser Region ein Genlocus mit einer geschlechtsgebundenen Wirkung auf die Ausprägung von Analatresien befindet.

Tabelle 29: Ergebnisse der TDT-Statistiken T_m und T_m Het an 8 Mikrosatellitenmarkern auf SSC X (Signifikanzgrenze bei multiplem Testen: $\alpha = 0.006$)

Marker	Freiheitsgrade df	T _m	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m	T _m Het	Irrtums- wahrscheinlichkeit T _m Het
SW980	4	0.25	0.993	1.50	0.827
SW2534	2	0.00	-	0.00	-
SW2126	3	4.00	0.262	4.00	0.262
SW2470	1	0.95	0.329	1.33	0.248
SW2476	3	8.00	0.046*	8.00	0.046*
SW1943	4	2.96	0.565	4.34	0.362
SW707	2	0.18	0.914	0.34	0.844
SW2588	3	0.00	-	0.00	-

* nominales Signifikanzniveau von 5 %

4.7 Ergebnisse der vergleichenden Genomkartierung und Auflistung von positionellen und funktionellen Kandidatengenen für Analatresien beim Schwein

In Tabelle 30 befindet sich eine Liste von Kandidatengenen die für eine Prädisposition von Analatresien, sowohl beim Menschen, als auch beim Schwein in Frage kommen. Angegeben sind dabei die Positionen im humanen Genom unter Angabe des Chromosoms (HSA) sowie die aufgrund vergleichender Genomanalyse wahrscheinliche Position im porcinen Genom (SSC). Soweit diese Position durch physische Kartierung beim Schwein bestätigt und publiziert ist wurden die Position in der Spalte SSC blau markiert. Alle nicht Blau markierten sind Ergebnisse In der Tabelle wurden die Kandidatengene grau unterlegt, die in Genomregionen mit einem signifikanten Ergebnis der Kopplungs- bzw. Assoziationsanalyse liegen. Die wichtigsten Literaturangaben die eine Relevanz des betreffenden Gens als Kandidatengen belegen sind in der Tabellenspalte 'Literatur' gesondert angeführt.

Die wichtigste Gruppe der Kandidatengenen sind dabei die Gene der Hedgehog Genfamilie, das Sonic hedgehog (*SHH*), Indian hedgehog (*IHH*) und das Desert hedgehog (*DHH*). Diese paralogen Gene zählen neben der *HOX*-Genfamilie (*HOXcluster A, B,* und *D*) zu den wichtigen Entwicklungsgenen des Säugerembryos. Bei der Maus konnte für das *SHH* eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Enddarms und der midaxialen Organe nachgewiesen werden (Kimmel *et al.* 2000). Dabei zählen aber auch Gene die mit dem Sonic Hedgehog eine direkte Verbindung eingehen zu den potentiellen Kandidatengenen für Analatresien, wie z.B. die Rezeptoren (*PTCH1, PTCH2*), die Transkriptionsfaktoren (Aktivator *GLI1, GLI2* und Repressor *GLI3*) oder Genprodukte die über einen physiologische Signal-Transduktions-Kaskade mit dem SHH-Protein in Beziehung treten (*HIP, SMOH, CKTSF1B1, FMN, HOXB9, PAX1, NOG,* Fibroblast growth factor *FGF*- und Bone morphogenetic protein *BMP*-Genfamilie).

Bei der Maus konnte in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden das erhöhte Gaben von Retinoid acid (RA) zu Mißbildungen mit Analatresien führen können (Bitoh *et al.* 2001; Kubota *et al.* 2000; Mesrobian *et al.* 1994; Padmanabhan 1998). Zu den weiteren Kandidaten zählen daher Gene bzw. Genprodukte die am Retinoid Stoffwechsel beteiligt sind oder die im weiteren die Expression von anderen wichtigen Entwicklungsgenen transkriptional oder posttranskriptional beeinflussen wie z.B der Retinoid acid Rezeptor (*RARA*), Cytochrome der Gruppe P450 die RA oxidieren und hydroxylieren (*CYP19A1*) und die Retinaldehyd Dehydrogenasen (*ALDH1A1, ALDH1A2* und *ALDH1A3*). Ebenso, zählt dazu aber auch das Gen *PML* von dem beim Menschen bekannt ist, daß eine Translokation und Fusion im Bereich des *PML* auf HSA 15q22 mit dem *RARA* auf HSA 17q12 zur Exprimierung von verschiedenen oligogenen Proteinen führt die unter anderem an der Ausprägung von promyelozytische Leukämie beteiligt sind (de The *et al.* 1990).

Gen	Name	HSA	SSC	Literatur
SHH	Sonic hedgehog	7q36	18	(Kimmel <i>et al.</i> 2000; Oldak <i>et al.</i> 2001; Ramalho-Santos <i>et al.</i> 2000; Roberts <i>et al.</i> 1995; Roberts <i>et al.</i> 1998)
IHH	Indian hedgehog	2q33-q35	15q24-q26	(Ramalho-Santos <i>et al.</i> 2000)
DHH	Desert hedgehog	12q12-13	5p11-p12	(Ramalho-Santos <i>et al.</i> 2000)
PTCH1	Patched homolog 1	9q22.3	1q28-q29	(Oldak <i>et al.</i> 2001; Rob- erts <i>et al.</i> 1998)
PTCH2	Patched homolog 2	1р33-р34	6q22-q26	(Ramalho-Santos <i>et al.</i> 2000)
HIP	Hedgehog-interact- ing protein	4q28-q32	15 oder 8p11-p21	(Chuang und McMahon 1999)
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	20p12	17	(Zuniga <i>et al.</i> 1999)
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	14q22-q23	1q23-q27	(Roberts <i>et al.</i> 1995) (Roberts <i>et al.</i> 1998) (Dunn <i>et al.</i> 1997; Ramalho-Santos <i>et al.</i> 2000)
GLI1	GLI-Kruppel family member GLI 1	12q13.2- q13.3	5p11-p12	(Ramalho-Santos <i>et al.</i> 2000)
GLI2	GLI-Kruppel family member GLI 2	2q14	3q oder 15	(Kimmel <i>et al.</i> 2000)
GLI3	GLI-Kruppel family member GLI 3	7p13	18q24 (Campbell <i>et al.</i> 2001; Kim- mel <i>et al.</i> 2000)	
SMOH	Smoothened	7q32.3	18	(Oldak et al. 2001)
CKTSF1B1	Cysteine Knot Super- family 1 (Gremlin)	15q13-q15	1q18	(Zuniga <i>et al.</i> 1999)
FGF4	Fibroblast growth factor 4	11q13.3	9p	(Zuniga <i>et al.</i> 1999)
FMN	Formin	15q13-q14	1q18	(Zeller <i>et al.</i> 1999; Zuniga <i>et al.</i> 1999)
ALDH1A1	Aldehyde dehydroge- nase 1 family mem- ber A1	9q21	1q23-q27	(Kubota <i>et al.</i> 2000; Marill <i>et al.</i> 2003; Nied- erreither <i>et al.</i> 2002a)

Tabelle 30: Kandidatengene für die Ausprägung von Analatresien beim Schwein

Gen	Name	HSA	SSC	Literatur
ALDH1A2	Aldehyde dehydroge- nase 1 family mem- ber A2	15q21.2	1q21	(Kubota <i>et al.</i> 2000; Marill <i>et al.</i> 2003; Nied- erreither <i>et al.</i> 2002a)
ALDH1A3	Aldehyde dehydroge- nase 1 family mem- ber A3	15q26.3	1q21	(Marill <i>et al.</i> 2003; Niederreither <i>et al.</i> 2002b)
CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide1	15q21.1	1q14-q17 (Lahbib-Mansais <i>et al.</i> 1997; Marill <i>et al.</i> 2003)	
PML	Promyelocytic leuke- mia	15q22	1q21	(de The <i>et al.</i> 1990)
HOXA11	Homeobox A11 (Homeo box A clus- ter)	7p15-p14	18q21-q24 (Lahbib-Mansais <i>et al.</i> 1996; Sakiyama <i>et al.</i> 2001)	
HOXA13	Homeobox A13 (Homeo box A clus- ter)	7p15-p14	18q21-q24 (Lahbib-Mansais <i>et al.</i> 1996; Sakiyama <i>et al.</i> 2001)	
НОХВ9	Homeobox B9 (Homeo box cluster B)	17q21.3	12p11-p12 (Lahbib-Mansais <i>et al.</i> 1996; Sakiyama <i>et al.</i> 2001; Thomsen und Zhdanova 1995)	
HOXB5	Homeobox B9 (Homeo box cluster B)	17q21.3	12p11-p12 (Lahbib-Mansais <i>et al.</i> 1996; Pitera <i>et al.</i> 2001; Thomsen und Zhdanova 1995)	
HOXD13	Homeobox D13 (Homeobox D clus- ter)	2q31-q37	15q22-q23 (Lahbib-Mansais <i>et al.</i> 1996; Roberts <i>et al.</i> 1995)	(Kondo <i>et al.</i> 1996; Roberts <i>et al.</i> 1998)
RARA	Retinoid Acid Rezep- tor Alpha	17q12	12p	(Mendelsohn <i>et al.</i> 1994) (Padmanabhan 1998) (Bitoh <i>et al.</i> 2001; Mesrobian <i>et al.</i> 1994)
NOG	Noggin	17q22	12p	(Zuniga et al. 1999)

Dem SD-Locus (short tail **D**anforth) der Maus (Danforth 1930), dem ein entscheidender Einfluß auf die Ausprägung von Analatresien zugeschrieben wird und der bislang noch nicht näher charakterisiert ist, wurde anhand von Kopplungsstudien bei Alfred *et al.* (1997; Koseki *et al.* (1993); Lane und Birkenmeier (1993) eine Genomregion in unmittelbarer Nähe der Gene *PAX* 8 (Paired box gene 8/ Chr 2 13.5 cM) und *SPTAN 1* (Spectrin alpha non-erythrocytic 1/ Chr 2 18.0 cM) zugewiesen. In der Datenbank des Mouse Genome Informatics (MGI: http://www.informatics.jax.org/) wird die Position von SD bei der Maus auf Chromosom 2 bei 9.5 cM angegeben. Im Gegensatz zur Maus, werden die Nachbargene von SD, *PAX 8* und *SPTAN 1* sowohl beim Menschen, als auch beim Schwein nicht in derselben Genomregion, sondern auf

Ergebnisse

unterschiedlichen Chromosomen kartiert. So liegt das *PAX 8* beim Menschen auf HSA 2q12q14 und das *SPTAN 1* auf HSA 9q33-q34. Beim Schwein befinden sich *PAX 8* auf SSC 12q11q15 (Marklund *et al.* 1998) und *SPTAN 1* auf SSC 1q21 (Lee *et al.* 2001). Beide Genomregionen hatten in dieser Untersuchung,, sowohl bei der NPL-Statistik, als auch beim TDT, signifikante Hinweise auf mögliche Defektgene für Analatresien beim Schwein gezeigt.

Die Abbildung 27 zeigt die mögliche Position von Kandidatengenen auf SSC 1. In der Region SSC 1q21, in der nach der Markerkarte des MARC USDA die Mikrosatelliten SW2185, SW1621 und SW1902 kartiert sind, liegen dabei nach Vergleich mit der humanen Genkarte der Sonic Hedgehog-Rezeptor *PTCH1*, das *BMP4*, das *FMN*, das *CKTSF1B1*, das *PML* und *ALDH1A1/2/3*. Das beim Schwein bereits kartierte Markergen für die SD-Region (*SPANT1*), liegt in der Nähe des Markers SW1621.



Abbildung 27: Vergleichende Genomkarte zwischen SSC 1 und den humanen Chromosomen HSA 9, HSA 14, HSA 15 (Quelle: INRA, France (Goureau *et al.* 2000))

Die Abbildung 28 zeigt die mögliche Position von Kandidatengenen auf SSC 12. In der Region SSC 12, in der nach der Markerkarte des MARC USDA die Mikrosatelliten S0229, SW957 und kartiert sind, liegen nach Vergleich mit der humanen Genkarte das *NOG* und der Retinoid

Rezeptor *RARA*. Das *HOXB9* (Homeobox cluster B), sowie das Markergen (*PAX8*) für die SD-Region sind bereits auf SSC 12 physisch kartiert.



SSC 12

Abbildung 28: Vergleichende Genomkarte zwischen SSC 12 und dem humanen Chromosom HSA 17 (Quelle: INRA, France (Goureau *et al.* 1996; Shi *et al.* 2001))

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Genombereiche beim Schwein zu finden, die einen maßgeblichen Einfluß auf die Prädisposition für Analatresien zeigen. Mit Hilfe einer nichtparametrischen genomweiten Kopplungsanalyse von Familien mit betroffenen Halbgeschwistern konnten für den kongenitalen Erbdefekt potentiell verantwortliche Chromomenregionen auf SSC 1, SSC 3 und SSC 12 erfolgreich identifiziert werden. Nachfolgende Assoziationsanalysen mit dem TDT ermöglichten es, den Bereich auf SSC 1q auf ca. 15 cM einzugrenzen und die Befunde auf SSC 12 zu bestätigen. Damit wurden die Voraussetzungen für weiterführende Studien zur Untersuchung potentieller Kandidatengene und erste Ansätze für die Selektion dieses Erbdefekts geschaffen.

Im folgenden wird die Problematik der genomischen Analyse des komplexen Merkmals Analatresien dargelegt und die verwendeten Lösungsansätze erörtert. Des weiteren werden mögliche Strategien zur Aufklärung der molekulargenetischen Mechanismen, die zur Ausprägung des Defekts beim Schwein führen, sowie die mögliche züchterische Verwertbarkeit der gefundenen Ergebnisse diskutiert.

5.1 Merkmalserfassung und Datenstruktur

Die Untersuchung der genetischen Determination von Analatresien wurde erschwert durch die geringe Prävalenz des Defekts und die mangelnde Verfügbarkeit von betroffenen Tieren. Mit dem bayernweit implementierten Erfassungssystem konnte eine große Anzahl von Proben mit afterlosen Ferkeln gesammelt werden. Es erwies sich jedoch als schwierig, die für die Kopplungsanalysen notwendigen Familien aus dem vorliegenden Material zu erstellen. Betroffene Wurfgeschwister mit Analatresie treten nur selten auf (Thaller 1992), so daß Halbgeschwisterfamilien, die durch den Einsatz der Eber in der künstlichen Besamung leichter verfügbar sind, die Grundlage für die Kopplungsanalysen darstellten. Selbst für dieses Versuchsdesign konnte nur ein kleiner Anteil der betroffenen Ferkel verwendet werden, was sich auch darauf zurückführen läßt. daß sich Vaterschaftsangaben bei der Abstammungskontrolle zu 35 % als falsch erwiesen.

Eine prinzipielle Alternative zu der in dieser Studie verwendeten Vorgehensweise ist die gezielte Anpaarung von operierten Defektträgern oder von Elterntieren mit defekten Nachkommen. Die Würfe aus entsprechenden Verpaarungen zeigten bei den Versuchen von Kinzelbach (1932); Henricson (1963); Stigler *et al.* (1991) nur einen geringen Anstieg in der Häufigkeit afterloser Ferkel. Die Erstellung einer Ressourcenpopulation wie bei Hori *et al.* (2001) ist damit sehr zeit- und kostenaufwendig und wurde für die vorliegende Arbeit nicht in Erwägung gezogen.

Analatresien kamen bei den betroffenen Tieren in den unterschiedlichen Ausprägungen Atresia ani und Atresia recti vor und wurden in den Kopplungsanalysen, soweit möglich, auch getrennt ausgewertet. Damit wurde dem Umstand Rechnung getragen, daß die Einstufung in dieselbe Krankheitskategorie möglicherweise zu genetischer Heterogenität im Tiermaterial führt, zumal die systematische Einteilung der unterschiedlichen Formen von Analatresien in der Literatur kontrovers diskutiert werden. Die auf diesem Gebiet umfangreichsten histologischen Studien bei humanen und porcinen Embryos von van der Putte (1986) liefern jedoch deutliche Anhaltspunkte, daß beide Ausprägungen auf den gleichen ätiologischen Hintergrund, d.h. eine in unterschiedlichem Maße gestörte Entwicklung der Kloakenmembran in der Embryonalphase zurückzuführen sind.

Für zukünftige Studien wäre neben der pathologischen Untersuchung der Ferkel eine genauere Charakterisierung des Phänotyps mit histologischen Schnitten wünschenswert. Auf diese Weise könnte eine Aussage über die Häufigkeit und die Ausprägung von Fisteln, die nach Kluth *et al.* (1995); Lambrecht *et al.* (1989) alle morphologischen Merkmale eines ektopen Analkanals tragen, getroffen werden. Grundsätzlich wäre dabei zu untersuchen, ob alle Tiere mit Analatresien Fisteln ausprägen, die sich im Laufe der embryonalen Entwicklung zurückbilden können und deren Rudimente in histologischen Präparaten nicht immer erkannt werden, wie von van der Putte (1986) beschrieben, oder ob Analatresien ohne Fistel zwischen Rektum und der perianalen Haut bzw. dem urogenitial System ein äußerst seltene Variante des Defekts darstellen und eine eigene Krankheitskategorie bilden (Gans und Friedman 1961; Nievelstein *et al.* 1998).

5.2 Methodischer Ansatz zur Kopplungsanalyse

In den meisten Studien in der Humangenetik und der Tierzucht ist das klassische Standardverfahren zum Nachweis von Kopplung zwischen Krankheitslocus und Markern die parametrische LOD-Score Analyse. Für die Anwendung dieser Methodik ist die genaue Kenntnis des Erbgangs, der Penetranz, der Phänokopienrate, sowie das Wissen um die Häufigkeit des Defekt verursachenden Allels erforderlich. Für die Analatresien beim Schwein ist eine sichere Aussage bezüglich dieser Parameter jedoch nicht möglich. In dieser Untersuchung konnte beispielsweise beobachtet werden, daß sich unter insgesamt 427 afterlosen Ferkeln nur 7 Vollgeschwister befanden. Ein rein monogen rezessiver Erbgang mit vollständiger Penetranz ist anhand dieser Beobachtungen sehr unwahrscheinlich und gibt einen Hinweis auf einen komplexeren Vererbungsmodus mit möglicherweise unvollständiger Penetranz. Dies steht im Einklang mit zahlreiche Untersuchungen die sich mit der Erblichkeit von Analatresien beim Schwein beschäftigt haben und die dabei zum Teil zu sehr widersprüchlichen Aussagen bezüglich des genauen Vererbungsmodus kommen. Neben dem monogen rezessivem Erbgang mit unvollständiger Penetranz (Kinzelbach 1932) (Norrish und Rennie 1968) (Triebler 1984), dem difaktoriell rezessiven Erbgang mit vollständiger Penetranz (Hamori 1962), dem difaktoriell rezessiven mit unvollständiger Penetranz (Henricson 1963) wird dabei auch ein Zweilocus-Modell mit einem rezessiven und einem dominanten Locus favorisiert (Hori et al. 2001). In den Segregationsstudien von Thaller (1992), die dieser Untersuchung vorangingen, zeigten sich Hinweise auf einen polygenen Vererbungsmodus mit starkem Einfluß eines Hauptgens.

Auf Grundlage dieser Befunde ist die Verwendung der parametrischen LOD-Score Analyse zum Nachweis von Kopplung nicht sinnvoll. Die Ergebnisse dieser Studie sowie anderer Arbeiten (Clerget-Darpoux *et al.* 1986) haben gezeigt, daß der LOD-Score sehr sensitiv auf jede Änderung der genetischen Parameter, wie z.B. dem unterstellten Dominanzgrad oder der angenommenen Penetranz des Defektalleles, reagiert. Für die Auswertung des vorliegenden Datenmaterials wurde daher eine nichtparametrische "allele sharing" Methode der parametrischen vorgezogen. Diese besitzt unter den gegebenen Bedingungen, d.h. Unkenntnis des Vererbungsmodus, eine deutlich höhere Mächtigkeit, um Kopplung zwischen einem Marker und dem Defektlocus nachzuweisen (Whittemore und Halpern 1994). Andererseits besitzt die LOD-Score Kopplungsanalyse bei Kenntnis des Vererbungsmodus im Vergleich zur nichtparametrischen eine deutlich höhere Mächtigkeit (Lander und Schork 1994; Whittemore und Halpern 1994). In dieser Untersuchung wurde jedoch die mögliche Einbuße an Mächtigkeit zugunsten der robusteren Methode zum Nachweis von Kopplung hingenommen. Unter den Gegebenheiten, die dem tatsächlichen Vererbungsmodus entsprechen könnten, wurden jedoch zum Vergleich zusätzlich parametrische LOD-Score Kopplungsanalysen durchgeführt

Genomweite Untersuchungen sind mit einem hohen Labor- bzw. Genotypisierungsaufwand verbunden. Um arbeits- und kostenintensive Markertypisierungen zu reduzieren, wurde wie in anderen Arbeiten (Guo und Elston 2001; Hauser *et al.* 1996) der 'Genome scan'' in mehreren Stufen durchgeführt. Der zunächst lockeren Abdeckung der Chromsomen mit Markern im Abstand von 20 cM folgte eine erste statistische Auswertung. In der Genomregion auf SSC 1q, die nach dieser nichtparametrischen Kopplungsanalyse signifikante Ergebnisse (p < 0.01) gezeigt hatte, wurde im zweiten Schritt die Markerdichte erhöht und zusätzliche Familien genotypisiert. Um diesen Ansatz konsequent weiterzuführen sollten in zukünftigen Arbeiten, auch die Genomregionen auf SSC 12 und SSC 3, die eine NPL-Statistik mit einem nominalen Signifikanzniveau von 5 % aufwiesen, mit weiteren Markern und Familien untersucht werden. Nur nach einer Eingrenzung von prädestinierenden Genomregionen können sinnvolle Kandidatengenhypothesen aufgestellt werden.

5.3 Bedeutung der Ergebnisse

Die nichtparametrische Kopplungsanalyse sowie die Assoziations- und Kopplungsstudien mit dem TDT zeigten nominal signifikante Test-Statistiken auf SSC 1 und SSC 12. Die gefundenen NPL-Statistiken lagen dabei auf einem ähnlichem Niveau wie bei vergleichbaren genomweiten nichtparametrischen Kopplungsstudien, die zur Aufklärung komplexer Krankheiten wie Asthma, Diabetes (Typ II) und Multiple Sklerose beim Menschen durchgeführt wurden (Kuokkanen et al. 1997; Laitinen et al. 2001; Lindgren et al. 2002). In diesen Untersuchungen hatte sich auch gezeigt, daß die von Lander und Kruglyak (1995) postulierte genomweite Signifikanzgrenze von p = 0.0007 nur unter der Annahme einer sehr hohen Markerdichte (< 1cM), vollständig informativen Markern und einer relativ großen Anzahl untersuchter Familien gilt. So wurden bei Laitinen et al. (2001) im Zuge der Kopplungsanalysen auch Simulationstudien zur Schätzung des genomweit signifikanten NPL-Wertes auf Basis der verwendeten Familien durchgeführt. Dabei ergab sich für die initiale Kopplungsanalyse, bei gegebener Markerdichte und Informationsgehalt der Marker, eine genomweite Signifikanz für NPL-Werte größer als 1.85. Die Autoren der angesprochenen Studie führten dann weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Markern und Familien in den Genomregionen mit einen NPL > 1.85 durch.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine Vorgehensweise gewählt, bei der mit einer vergleichsweise geringen Markerabdeckung und einer begrenzten Anzahl von Familien Hinweise auf interessante Regionen über das gesamte Genom festgestellt werden sollten. Simulationsstudien zur Bestimmung des genomweiten Signifikanzniveaus im Zusammenhang mit der Auswahl der Bereiche, die weiter untersucht werden sollten, wurden als nicht notwendig erachtet. Die Ergebnisse zeigen, daß das verfügbare Familienmaterial eine ausreichende Mächtigkeit für den Nachweis von Kopplung zwischen Markern und dem vermeintlichen Krankheitslocus aufwies, wenn als Auswahlkriterium für die entsprechenden Genomregionen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p < 0.01 für die NPL-Statistik gewählt wurde. Allerdings wurde dabei in Kauf genommen, daß bei der Vielzahl der untersuchten Chromosomen und Marker vermehrt mit dem Fehler 1. Art, d.h. falsch positiven Ergebnissen, zu rechnen ist. Daher wurde in einem zweiten Schritt versucht, durch zusätzliche Familien und durch zusätzliche

Marker die Befunde der Kopplungsanalyse zu bestätigen. Eine ähnliche Strategie, d.h. Genotypisierung von weiteren Marker in Regionen mit NPL > 1 (p < 0.16) findet sich auch bei Kuokkanen *et al.* (1997) in einer Studie zur Ausprägung von Multipler Sklerose und bei Lindgren *et al.* (2002).

Die Ergebnisse der nachfolgenden Kopplungsanalysen, die zum einen separat für die zusätzlichen Familien und zum anderen für das Gesamtmaterial mit jeweils 14 Markern durchgeführt wurden, wichen zum Teil von den ersten Befunden ab. Der maximale NPL-Wert für die Zusatzfamilien wurde am Marker SW2185 in einer ähnlichen Größenordung ermittelt, wie am ursprünglich signifikanten Marker SW1621, der 12 cM entfernt liegt. Die gemeinsame Auswertung aller Familien ergab etwa gleich große NPL-Werte über einen Bereich von 20 cM, der beide Mikrosatelliten einschloß. Mögliche Gründe sind neben zufälligen Stichprobeneinflüssen eventuell die unterschiedlichen Informationsgehalte beider Marker im jeweiligen Teilmaterial. In den bereits erwähnten Untersuchungen bezüglich Asthma beim Menschen (Laitinen et al. 2001) wurde ebenfalls von lokal unterschiedlichen Maxima der NPL-Werte auf dem gleichen Chromosom in verschiedenen Populationen berichtet. Die Autoren geben als mögliche Erklärung unter anderem genetische Heterogenität zwischen Ethnien an. Die Frage, in wieweit in den eigenen Studien genetische Heterogenität auftritt, zumal vor allem auf der Mutterseite unterschiedliche Rassen vorkommen, läßt sich nicht abschließend beantworten.

Die simultanen Tests auf Kopplung und Assoziation mit dem TDT ermöglichten in dieser Studie eine unabhängige Bestätigung der Kopplungsbefunde auf SSC 1 bzw. SSC 12 und gaben Hinweise auf spezifische Allele bzw. Haplotypen, die mit dem Defektallel assoziiert sein könnten. TDT-Statistiken sind im Gegensatz zu herkömmlichen Assoziationsstudien robust Stratifikationen innerhalb des untersuchten gegenüber Tiermaterials, die bei Nutztierpopulationen zu erwarten sind. Allerdings können auch andere Einflüsse bezüglich der Segregation zu nicht zufälligen Abweichungen von der Mendelschen Erwartung führen ("segregation distortion") und falsch positive Ergebnisse vortäuschen (Hernandez-Sanchez et al. 2002). Dazu zählen unter anderem unterschiedliche Allelfrequenzen an untersuchten Markern. Selbst bei zufälliger Segregation wird das häufigere Allel in diesem Fall scheinbar bevorzugt weitergegeben. Der Grund dafür ist, daß der Anteil informativer Eltern-NK Paaren bei der Weitergabe des häufigeren Allels höher ist. Eine analoge Untersuchung und ein Vergleich der Ergebnisse von Elter-NK Paaren mit phänotypisch gesunden Ferkeln könnte diese Bedenken beseitigen. Um TDT-Statistiken in einer Größenordung wie in der vorliegenden Arbeit zu erhalten, wären Segregationsstörungen in einem Umfang nötig, der als äußerst unwahrscheinlich zu betrachten ist.

Die Arbeit von Hori *et al.* (2001) hat sich ebenfalls mit der Aufklärung der genetischen Prädisposition der Afterlosigkeit beim Schwein beschäftigt. Die 'Singlepoint LOD-Score''-Analyse mit defekten Ferkeln einer Ressourcenfamilie, die an drei bzw. einem Mikrosatellitenmarker auf SSC 1 und SSC 12 durchgeführt wurde, zeigte im Vergleich zu der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Ergebnisse. Gleiches gilt für SSC 3 und SSC 9, auf denen je zwei Marker in die Analyse einbezogen wurden. Die signifikanten Resultate von Hori et al. (2001) auf SSC 15 am Marker SW2072 mit einem Singlepoint-LOD-Score von 2.7 konnten hingegen am eigenen Material nicht bestätigt werden. Weder die NPL-Statistik am Marker SW 2072 (NPL = -0.63, p = 0.732, Info = 0.53) noch der TDT zeigten signifikante Hinweise auf ein Defektgen in dieser Region. Das Gen *GLI 2*, das nach Hori *et al.* (2001) möglicherweise auf SSC 15 kartiert und als Kandidatengen postuliert wurde, scheidet nach den vorliegenden Ergebnissen als mögliches Defektgen aus. Ebenso das *HOXD13*, das auf SSC

Diskussion

15q22-q23 kartiert wurde. Es besteht aufgrund der Resultate der Kandidatengenrecherche in dieser Arbeit aber auch Möglichkeit, daß *GLI 2* beim Schwein in der Region SSC 3q liegen könnte, die am Marker S0002 eine signifikante NPL-Statistik gezeigt hatte. Grundsätzlich ist zu der Untersuchung von Hori *et al.* (2001) anzumerken, daß die Markerabdeckung mit Ausnahme des SSC 15 nicht mit derjenigen in dieser Studie vergleichbar ist. So haben beispielsweise die Marker auf SSC 1 einen 48 cM Abstand zueinander und auf SSC 9 beträgt die Distanz zwischen den Mikrosatelliten 103 cM. Eine differenzierte Diagnose, die die verschiedenen Ausprägungen der Analatresie in der Ressourcenfamilie berücksichtigt, wurde zwar durchgeführt, blieb aber ohne Konsequenz für die Defektklassifizierung in der Kopplungsanalyse. Weit problematischer ist die Tatsache zu betrachten, daß die Ergebnisse der parametrische Auswertungsmethodik nur unter der Annahme des postulierten Vererbungsmodus, nämlich ein Zweilocusmodell mit einem rezessiven und einem dominanten Locus, gültig sind. Wie bereits erwähnt und fallweise in der eigenen Arbeit dargestellt, können falsche Annahmen zu verzerrten LOD-Scores und damit zu falschen Schlußfolgerungen führen.

Beim Menschen gibt es keine vergleichbaren genetischen Studien, die sich mit Analatresien beschäftigen. Da der Defekt hier in den meisten Fällen durch einen operativen Eingriff behoben werden kann (Husberg et al. 1992; Lin 1998), beschränken sich die meisten Untersuchungen auf die Verbesserung der Diagnose und zur Entwicklung besserer operativer Techniken. Es gibt jedoch Arbeiten, die bei Analatresien, die gemeinsam mit anderen Syndromen auftreten, Chromosomendeletionen feststellen konnten. So sind beispielsweise Deletionen auf HSA 1q (Takano et al. 1997), auf HSA 7q36 (Lynch et al. 1995; Seri et al. 1999) und auf HSA 13q (Bartsch et al. 1996; Kuhnle et al. 2000) bekannt, sowie eine Tetrasomie von HSA 12p (Steinbach und Rehder 1987) die gemeinsam mit Syndromen und Analatresie zu beobachten sind. Problematisch an diesen Studien ist jedoch, daß hier Analatresien immer nur zusammen mit anderen Erbdefekten, Mißbildung der Geschlechtorgane, der Nieren, des Herzens oder anderer Organe betrachtet werden. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, daß die untersuchten Individuen bezüglich des Phänotyps identisch sind, und daß wahrscheinlich unterschiedliche Loci an der Ausprägung der Defekte beteiligt sind. In diesen Untersuchungen beim Schwein zeigten sich keine Hinweise, daß sich in den entsprechenden homologen Genomregionen (SSC 4q, SSC 18, SSC 11 und SSC 5p) mögliche Kandidatengene für Analatresien befinden. Bestätigt wird dies auch durch die Untersuchungen von Vogt (1967), der beim Karyotypenvergleich von gesunden und afterlosen Ferkeln keinerlei Unterschiede hinsichtlich Chromosomenaberrationen feststellen konnte.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Kandidatengenrecherche haben gezeigt, daß eine Reihe von funktionellen und positionellen Genen, die für die Ausprägung von Analatresien beim Schwein ein Rolle spielen könnten, möglicherweise in den interessanten Genomregionen auf SSC 1q2.1 und SSC 12 liegen. Daß es sich bei diesen Chromosomenbereichen um potentielle Defektgenregionen handelt, wird unterstützt durch die Untersuchungen bei der SD-Maus (Alfred *et al.* 1997; Koseki *et al.* 1993; Lane und Birkenmeier 1993), deren Markergene (*SPANT* und *PAX8*) für die SD-Region beim Schwein an diesen Positionen kartiert wurden. Die *SHH* Signal-Kaskade spielt eine wichtige Rolle für die embryonale Ausbildung des Enddarms (Kimmel *et al.* 2000; Ramalho-Santos *et al.* 2000; Roberts *et al.* 1995; Roberts *et al.* 1998). Zu den potentiellen Kandidatengenen auf SSC 1 zählt dabei der *SHH*-Rezeptor *PTCH 1*, das *BMP4*, das *CKTSF1b1* und das *FMN*, die direkt bzw. indirekt im Zusammenspiel mit dem Sonic Hedgehog Protein reagieren. Ebenso wie das *NOG*, das möglicherweise auf SSC 12 kartiert. Expressionsstudien bei der Maus belegen, daß sowohl das *PTCH1* als auch das *BMP4* im Mesenchym des Enddarm beim Mäuseembryo exprimiert werden (Ramalho-Santos *et al.* 2000). Das *BMP 4* wirkt zudem gemeinsam mit dem SHH auf die Ausbildung des Mesoderms

(Roberts *et al.* 1998). Der von Kluth *et al.* (1995) beobachtete Unterschied im Aufbau der Kloakenmembran bei SD Mäusen, bei denen im Gegensatz zu gesunden Mäusen eine Mesodermschicht zwischen dem Endoderm und Ektoderm zu finden ist, könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, daß *BMP4* ein potentielles Kandidatengen für Analatresien darstellt.

In der Genomregion auf SSC 12 kommen als mögliche Defektgene die bereits kartierten Gene des *HOXB*clusters in Frage, wobei für das *HOXB* durch Expressionsstudien nachgewiesen werden konnte, daß dieses Gen beim Hühnerembryo (Sakiyama *et al.* 2001) an der Darmentwicklung beteiligt ist und im Enddarm exprimiert wird. Weitere wichtige Kandidaten für die Ausprägung von Analatresien sind Gene, die am Retinoidstoffwechsel beteiligt sind. Dazu zählen neben dem Rezeptor für RA (Retinoid Acid) *RARA*, der nach der homologen Karte zwischen Mensch und Schwein auf SSC 12 liegt, interessanterweise auch Gene wie das *ALDH1A2*, das *ALDH1A3* und das *CYP19A1*, die im Bereich SSC 1q2.1 liegen könnten bzw. dort kartiert wurden. Auch die beim Menschen bekannte Translokation und Fusion des *RARA* mit dem *PML* Gen (de The *et al.* 1990) könnte ein möglicher Hinweis auf den gemeinsamen Einfluß von zwei im Zusammenspiel wirkenden Loci auf SSC 1 und SSC 12 sein, die eine Prädisposition für Afterlosigkeit beim Schwein bedingen.

5.4 Nutzung der Ergebnisse für weitergehende Untersuchungen

Die Ergebnisse dieser Studie bieten konkrete Ansatzpunkte für die Untersuchung von potentiellen Kandidatengenen für Analatresien. Das Ziel ist letztlich die positionelle Klonierung der Defektgene und die funktionale Aufklärung der Ätiologie von Analatresien. Dazu ist es zuerst nötig, die Chromosomenregion weiter einzugrenzen. Für diesen Schritt der Feinkartierung eignen sich SNP-Marker, mit denen die betreffenden Genomregionen sehr dicht abgedeckt und im Hochdurchsatzverfahren ausgewertet werden können. Für entsprechende Assoziationsstudien ist es vergleichsweise einfach, Trios bestehend aus den Eltern und einem betroffenen Nachkommen im Feld zu erfassen. Die genetische Feinkartierung könnte dabei einhergehen mit einer intensiven Nutzung der Bioinformatik zur fortwährenden Aktualisierung der bereits bestehenden Kandidatengenliste und zur Verknüpfung der Vielzahl an biologischen Daten z.B aus Expressionsstudien oder genomischen Sequenzdatenbanken.

In diesem Zusammenhang könnten mit dem eigenen Material Expressionsstudien zur Identifikation von biologisch relevanten Kandidatengenen an embryonalem Gewebe durchgeführt werden. Damit könnte die Vielzahl von Genen in den interessanten Genomregionen entscheidend eingeschränkt werden. Zur Analyse der Expressionsunterschiede zwischen Geweben von gesunden und defekten Tieren bieten sich z.B. das 'screenen'' von cDNA Mikroarrays mit vergleichenden Sonden (Schena 1996) oder 'Diffential Display'' Techniken wie RT-PCR und DD-RT-PCR an, bei der alle mRNAs, die in einer bestimmten Gewebeart vorkommen, mittels PCR amplifiziert und quantifiziert werden (Liang und Pardee 1992). Im speziellen Fall von Analatresien ist die erforderliche Kenntnis des genauen Zeitpunkts während der embryonalen Entwicklung, der für die Ausprägung des Defekts maßgeblich ist, nur unzureichend vorhanden. Ebenso kritisch ist die Auswahl und Gewinnung der zu untersuchenden Gewebeart, die die Isolierung von nicht degradierter mRNA ermöglicht. Besonders problematisch ist die Unkenntnis über die phänotypische Ausprägung zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme, so daß die Erfassung geeigneter Tiere nur anhand prädisponierender Haplotypen erfolgen kann.

Zusätzlich wäre es möglich, Genprodukte auf der Ebene des Proteoms zu untersuchen. Dabei sollte es möglich sein, die Funktionsweise genauer zu erforschen und eventuell physiologische Pfade zu beschreiben, die für die Ausprägung der Analatresie verantwortlich sind.

Besonders interessant sind die geschilderten Hinweise, daß zwei Loci auf SSC 1 und SSC 12, die kausal zueinander in Beziehung stehen könnten, maßgeblich an der Ausprägung von Analatresien beteiligt sind. Unterstützt wird diese Hypothese sowohl durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als auch durch die Kopplungsstudien bei der SD-Maus. Durch eine Beteiligung von zwei rezessiven Loci auf unterschiedlichen Chromosomen könnte beispielsweise auch das relativ seltene Auftreten von Wurfgeschwistern erklärt werden. Um diesen Zusammenhang genauer untersuchen zu können, wird jedoch eine geeignete Auswertungsmethodik für Zwei-Locus Kopplungsanalysen benötigt. Parametrische LOD-Score Analysen für zwei Krankheitsloci können z.B. mit dem Programm TMLINK (Lathrop und Ott 1990), einer Erweiterung von LINKAGE (Lathrop et al. 1984) durchgeführt werden. Allerdings ist auch hier zu beachten, daß der Erbgang und die Penetranzen für zwei Loci a priori festzulegen sind, mit den bereits erwähnten Konsequenzen möglicher falscher Ergebnisse. Die bessere Alternative für die vorliegende Problemstellung wäre im Vergleich dazu die Verwendung einer Erweiterung des Software Paketes Genehunter, GENEHUNTER-TWOLOCUS (Strauch et al. 2000). Diese Programm ermöglicht eine simultane nichtparametrische Kopplungsanalyse an zwei Loci auf Basis von Vererbungsvektoren, vergleichbar der Software GENEHUNTER und ALLEGRO 1.0.

5.5 Perspektiven für die Umsetzung der Ergebnisse in die Zuchtpraxis

Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichen noch keine praktische Umsetzung in Form eines unmittelbaren Gentests. Sie stellen aber eine solide Grundlage für Folgeprojekte dar, die als Ziel die Selektion von Tieren mittels eines direkten oder indirekten Gentests haben. Die gefundenen deutlichen Assoziationen zwischen einzelnen Haplotypen und dem Auftreten der Afterlosigkeit bieten Anhaltspunkte, die nach eingehender Bestätigung gegebenenfalls bereits zum jetzigen Zeitpunkt in Zuchtentscheidung einbezogen werden könnten. Aufgrund der vermutlich geringen Penetranz ist jedoch zu hinterfragen, welches Gewicht dieser Markerinformation beigemessen werden sollte. Die gefundenen Assoziationen zwischen einzelnen Markerallelen und dem Auftreten der Afterlosigkeit sollten vor einer tierzüchterischen Nutzung in einem unabhängigen Feldmaterial bestätigt werden. Eine Einbindung in ein konservatives Selektionsverfahren, bei dem die Auswahl von Zuchttieren aus ansonsten vergleichbaren Tieren (z.B. Vollgeschwister) aufgrund günstiger Markerallele getroffen würde, wäre dann bereits beim vorliegenden Kenntnisstand möglich.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, mit Hilfe einer systematischen Untersuchung des Schweinegenoms Chromosomenregionen aufzufinden und zu charakterisieren, in denen mit hoher Wahrscheinlichkeit Gene liegen, die hinsichtlich der Entwicklung von Analatresien beim Schwein eine Rolle spielen.

Die geringe Prävalenz des Erbdefekts beim Schwein erforderte die Etablierung eines bayernweiten Erfassungssystems, welches über einen Zeitraum von 3 Jahren die Verfügbarkeit von 427 Ferkeln mit eindeutig pathologischer Diagnose einer Analatresie ermöglichte. Nach einer Abstammungsuntersuchung und der Zusammenstellung eines informativen Familienmaterials ("affected half sib pair" Familien) verblieben insgesamt 106 Tiere, davon 72 afterlose Ferkel, die in eine genomweite Kopplungsanalyse eingingen. Diese Tiere wurden zusammen mit einem Elter, Eber bzw. Muttersau, an insgesamt 130 Mikrosatellitenmarkern typisiert. Im ersten Schritt der Untersuchung wurde versucht das Genom möglichst gleichmäßig mit Markern abzudecken. Danach erfolgte eine genauere Analyse einzelner Regionen mit zusätzlichen Markern. Die verwendete nichtparametrische Auswertungsmethodik für die Kopplungsanalyse beruhte auf der Überlegung, daß defekte Nachkommen des gleichen Ebers sich in Chromosomenbereichen, die für das Auftreten von Analatresien verantwortlich sind ähnlicher sein müssen (IBD identical by descent), als in Bereichen, die nicht in Beziehung zum Defekt stehen. Für die Auswertung wurde das Computerprogramm Allegro 1.0 verwendet. Diese Software wurde für ähnliche Fragestellungen d.h. Merkmale mit komplexem Erbgang beim Menschen konzipiert und sie erlaubt die vorhandene Familienstruktur beim Schwein (Halbgeschwisterfamilien), sowie die gesamte Markerinformation in die Analyse mit einzubeziehen. Dabei werden zwei unterschiedliche Teststatistiken berechnet, die sich vor allem hinsichtlich der Annahmen des vorliegenden Erbgangs voneinander unterscheiden. Während der LOD-Score als traditionelles Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung zwischen Marker- und Krankheitsgenorten vergleichsweise genaue Kenntnisse über die genetischen Hintergründe voraussetzt, erweist sich die nicht parametrische Teststatistik NPL als sehr robust bei Unkenntnis der Gegebenheiten am Krankheitslocus, z.B. der Penetranz und der Krankheitsallelfrequenz. Da bei Analatresien von einem komplexen Erbgang, d.h. dem Zusammenwirken mehrerer Gene in Verbindung mit Umwelteinflüssen, ausgegangen werden muß, erscheint der NPL-Wert für die Interpretation der vorliegenden Untersuchung besser geeignet. Diese Einschätzung stützt sich auf Literaturhinweise und wurde durch eigene Studien bekräftigt, bei denen sich ein merklicher Einfluß auf den LOD-Score, in Abhängigkeit der vorzugebenden Penetranz zeigte.

Das Ziel der initialen Kopplungsanalyse war es, Hinweise auf interessante Chromosomenregionen zu erhalten bzw. Genombereiche, die bei ausreichender Markerdichte keine signifikanten Ergebnisse in der NPL Teststatistik zeigten, auszuschließen. Dabei ergaben sich am Marker SW1621 auf SSC 1 signifikante Resultate mit einem NPL_{all mpt} von 2.57 (p=0.006). Anschließend konnten durch zusätzliche acht Marker die ersten Befunde abgesichert und der Informationsgehalt in dieser Region beträchtlich erhöht werden. In einem weiteren Schritt wurde unabhängiges Familienmaterial, im Sinne einer Bestätigungsstudie analysiert. Auch hier wurden hohe NPL-Werte von 2.61 gefunden, deren Maximum am 12 cM proximal zu SW1621 gelegen Marker SW2185 lag. Die zusammenfassende Auswertung des Gesamtmaterials ergab einen Bereich von etwa 25 cM, für den sich die NPL-Statistik bei zugleich hohem Informationsgehalt, signifikant zeigte. Es kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Kopplung eines Defektgens mit diesem Chromosomenbereich ausgegangen werden kann.

Zusammenfassung

Im folgenden wurde an den einzelnen Markern in dieser Region der Transmission-Disequillibrium-Test (TDT) durchgeführt. Dieser Test erlaubt eine gleichzeitige Prüfung auf Kopplung zwischen Marker und Defektlocus sowie auf Assoziation bestimmter Markerallele mit dem Defektlocus. Die Ergebnisse des TDT für den Marker SW1621 ($p=7x10^{-7}$) zeigen deutlich, daß nicht nur Kopplung vorliegt, sondern auch, daß die von den unterschiedlichen Ebern an die afterlosen Nachkommen übertragenen Markerallele identisch sind und bevorzugt an die erkrankten Ferkel weitergegeben wurden. Die Tatsache, daß die der Teststatistik zugrundeliegenden Kopplungsungleichgewichte sich nur über kleine Chromosomenregionen (SW1621 und SW1902) erstrecken, und die sehr niedrigen Irrtumswahrscheinlichkeiten geben einen Hinweis, daß sich im unmittelbaren Bereich des Markers SW1621 ein Genort mit Einfluß auf die Ausprägung von Analatresien befindet. Ein Vergleich der homologen Bereiche von SSC 1q21 mit den Genomkarten des Menschen und der Maus führte zu mehreren möglichen funktionellen Kandidatengenen in dieser Region. Dazu zählen das PTCH1 (patched homolog 1) und das BMP4 (bone morphogenic protein 4), die in einer funktionellen Kaskade mit dem SHH (sonic hedgehog) wirksam sind. Eine genaue Positionierung dieser Gene innerhalb des porcinen Genoms ist jedoch nur durch eine zukünftige physische Kartierung möglich.

Die genomweite Analyse ergab zudem Hinweise auf eine mögliche Kopplung von Defektgenen auf SSC 3, 12. Die Signifikanzniveaus lagen aber in einer Größenordnung, die nicht mit den gefundenen Ergebnissen auf SSC 1 vergleichbar waren. Für diese Chromosomen und für die Markern im Bereich möglicher Kandidatengene auf den Chromosomen 8, 9, 13, 15, 18 und X wurde ebenfalls der TDT durchgeführt. Hierbei ergaben sich signifikante Ergebnisse für Chromosom 9 (p=0.001) und 12 (p=0.003).

Die gefundenen deutlichen Assoziationen zwischen einzelnen Haplotypen und dem Auftreten der Afterlosigkeit bieten Anhaltspunkte, die nach eingehender Bestätigung bereits zum jetzigen Zeitpunkt in Zuchtentscheidung einbezogen werden könnten. Aufgrund der vermutlich geringen Penetranz ist jedoch zu hinterfragen, welches Gewicht dieser Markerinformation beigemessen werden sollte. Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichen noch keine praktische Umsetzung in Form eines unmittelbaren Gentests. Sie stellen aber eine solide Grundlage für Folgeprojekte dar, die als Ziel die Selektion von Tieren mittels eines indirekten oder direkten Gentests haben.

Summary

The objective of this study was a systematic identification and characterization of the porcine genome to find chromosome regions with a significant impact on Anal Atresia in swine.

The low prevalence of the disease required the establishment of an afflicted piglet collection system in Bavaria. Over a period of three years, a total of 427 piglets with pathogenic verified diagnoses of Anal Atresia were assembled. After paternity testing, 106 animals, consisting of 72 affected half-sib piglets together with boars, were used for a genome-wide linkage analysis. The animals were screened with 130 microsatellite markers in a two-step procedure. In the first stage, the genome was covered with markers roughly every 20 cM followed by an initial linkage analysis. The second stage was focused more tightly on interesting chromosome regions, with more markers and additional families used for genotyping. Genome regions with reasonable marker density, but no significant linkage result were excluded from further analysis. For linkage analysis, a nonparametric approach was performed based on identical by descent (IBD) allele sharing among affected individuals. We used the applied statistical computer package Allegro 1.0, which was developed for similar disorders in humans and allows the complete pedigree and marker information to be include. Two different test statistics can be used: the classical LOD score linkage analysis and a nonparametric linkage (NPL) statistic. In the former case, several detailed assumptions about the genetic model were required, whereas the NPL statistic is much more robust even in the case of unknown penetrances and disease allele frequencies. Because Anal Atresias are disorders with a complex genetic model, a impact of single genes acting in addition to possibly environmental factors makes use of the nonparametric NPL score more suitable. These prospect is based on references and through own studies which demonstrate the sensible influence of assumed parameters to the LOD score.

In the first step of this study interesting genome regions were detected by linkage analysis. On SSC 1, the initial nonparametric linkage analysis showed significant results with an NPL_{allmpt} of 2.57 (p=0.006) at the marker SW1621. To confirm these significant results, additional markers were used to increase the information content in that region considerably. During the course of project, additional independent families were sampled and included in the linkage analysis. In these families, a high NPL score of 2.61 was found 12 cM proximal of SW1621 at marker SW2185. The combined linkage analysis of all families with 14 markers on SSC 1 revealed a high information content in a region of approximately 25 cM with a significant NPL score. A linkage between disease gene and the region on SSC 1 is therefore highly probable.

A Transmission Disequilibrium Test (TDT) was performed in the interesting chromosome region on SSC 1. This statistic analysis tests simultaneously for linkage between markers and the disease locus and for association between marker alleles and the disease locus. The results of the TDT at marker SW1621 showed clearly ($p=7x10^{-7}$), that association exists in addition to linkage with different boars transmitting the same marker alleles to affected offspring. The fact that linkage disequilibrium was observed only over small distances (between markers SW1621 and SW1902), together with very low p-values, supports the evidence indicating a disease locus with an influence on the development of Anal Atresia close to marker SW1621. Comparative mapping between swine SSC 1q21, human and mouse suggests that several potential functional candidate genes lie in this region. For instance, *PTCH1 (patched homolog 1)* and *BMP4 (bone morphogenic protein 4)*, which are both active in a functional cascade with *SHH (sonic hedgehog)*. However, most porcine genes are not yet physically mapped and lists of gene content of specific porcine genome regions are far from being complete.

Zusammenfassung

Furthermore, the genome-wide scan showed evidence for possible linkage between markers and disease loci on SSC 3 and SSC 12, but the p-values were much weaker as the results on SSC 1. For those chromosomes and for markers in regions with potential candidate genes as suggested in the literature, on SSC 8, SSC 9, SSC 15, SSC 13, SSC 18 and SSC X a TDT was performed. Significant results were obtained for SSC 9 (p=0.001) and SSC 12 (p=0.003) only.

The obvious association between specific haplotypes on SSC 1 and the phenotype of Anal Atresia allows the inclusion of the haplotype information in current breeding considerations. However, an important consideration is that of marker information in the context of a possible low penetrance. The issues are not yet resolved for implementation in the form of a genetic test. But the current results represent a solid base for a follow-up project, with the goal of selecting animals by an indirect or direct gene test.

7 Anhang

7.1 Relative Position der Mikrosatellitenmarker

Tabelle 31: Bezeichnung, 5'-Markierung des 3'Primers, Allellängen, Typisierungslabor, chromosomale Position und Abstand der Mikrosatellitenmarker zueinander

Marker	SSC	Dye	Allelänge	Labor	Position	relative Position	Abstand cM
SW949	XY	Tet	178-204	Tierzucht	1	pseudoautosomal	
SW980	X	Fam	116-132	GeneControl	2	11,9	18,3
SW2534	Х	Hex	142-164	GeneControl	3	30,2	5,0
SW2126	Х	Tet	140-164	Tierzucht	4	35,2	10,6
SW2470	Х	Hex	152-170	GeneControl	5	45,8	31,8
SW2476	Х	Hex	88-106	GeneControl	6	77,6	9,8
SW1943	Х	Hex	103-109	Tierzucht	7	87,4	21,2
SW707	Х	Fam	91-101	GeneControl	8	108,6	19,8
SW2588	Х	Fam	114-124	Tierzucht	9	128,4	
SW1824	1	Tet	77-97	GeneControl	1	3	13,4
SW1515	1	Hex	128-141	Tierzucht	2	16,4	17,0
S0316	1	Tet	127-145	Tierzucht	3	33,4	11,2
SW1851	1	Tet	81-97	Tierzucht	4	44,6	11,2
SW781	1	Hex	123-198	GeneControl	5	55,8	11,8
SW2185	1	Fam	145-175	Tierzucht	6	67,6	7,5
SW80	1	Tet	162-176	Tierzucht	7	75,1	4,5
SW1621	1	Tet	146-150	GeneControl	8	79.6	3,8
SW1902	1	Fam	144-150	Tierzucht	9	83,4	2,8
SWR982	1	Fam	189-211	Tierzucht	10	86,2	7,7
S0155	1	Fam	148-164	GeneControl	11	93,9	18,6
S0320	1	Tet	162-168	GeneControl	12	112,5	14,6
S0056	1	Hex	79-117	Tierzucht	13	127,1	13,4

Marker	SSC	Dye	Allelänge	Labor	Position	relative Position	Abstand cM
SW1301	1	Fam	144-176	GeneControl	14	140,5	
SW2443	2	Hex	200-214	GeneControl	1	0	23,7
SWR783	2	Tet	166-186	GeneControl	2	23,7	21,1
SW1201	2	Tet	200-212	GeneControl	3	44,8	15,8
SW1026	2	Tet	97-118	GeneControl	4	60,6	17,3
S0010	2	Hex	102-124	GeneControl	5	77,9	10,6
SW1408	2	Fam	179-185	GeneControl	6	88,5	43,6
S0036	2	Hex	114-128	GeneControl	7	132,1	
SW274	3	Fam	107-145	GeneControl	1	0	17,8
SW72	3	Tet	101-113	GeneControl	2	17,8	24,5
S0206	3	Hex	175-201	GeneControl	3	42,3	16,1
SW902	3	Fam	195-203	GeneControl	4	58,4	13,9
SW2570	3	Tet	152-178	GeneControl	5	72,3	29,9
S0002	3	Hex	189-209	Tierzucht	6	102,2	10,4
SW349	3	Hex	149-177	Tierzucht	7	112,6	
SW2404	4	Hex	132-174	GeneControl	1	0	27,1
S0301	4	Fam	251-261	GeneControl	2	27,1	24,1
SW752	4	Fam	108-124	GeneControl	3	51,2	18,4
S0217	4	Tet	145-165	GeneControl	4	69,6	33,2
S0067	4	Hex	87-113	GeneControl	5	102,8	17,2
S0097	4	Fam	208-244	GeneControl	6	120,0	
SW413	5	Fam	160-187	GeneControl	1	8,4	23,1
SW491	5	Tet	154-174	Tierzucht	2	31,5	26,4
SWR453	5	Fam	173-189	GeneControl	3	57,9	20,8
SW2	5	Fam	88-126	GeneControl	4	78,7	18,8
SW1468	5	Tet	138-154	GeneControl	5	97,5	16,8
SW1200	5	Fam	130-158	GeneControl	6	114,3	20,1

Marker	SSC	Dye	Allelänge	Labor	Position	relative Position	Abstand cM
SW378	5	Tet	123-127	GeneControl	7	134,4	
S0099	6	Fam	159-177	GeneControl	1	0	21,4
SW2406	6	Fam	220-256	GeneControl	2	21,4	20,1
SW1841	6	Hex	175-236	GeneControl	3	41,5	21,3
S0087	6	Tet	161-201	GeneControl	4	62,8	20,5
SW122	6	Fam	111-122	Tierzucht	5	83,3	18,7
S0003	6	Hex	131-162	GeneControl	6	102,0	19,1
SW1881	6	Fam	151-183	GeneControl	7	121,1	40,3
SW2419	6	Tet	115-135	GeneControl	8	161,4	
SW1354	7	Tet	106-152	GeneControl	2	22,3	36,6
SW472	7	Tet	95-111	GeneControl	3	58,9	28,8
SW352	7	Tet	104-121	Tierzucht	4	87,7	29,6
SWR773	7	Hex	134-141	GeneControl	5	117,3	23,9
S0212	7	Hex	229-249	GeneControl	6	141,2	14,8
SW764	7	Tet	112-128	GeneControl	7	156,0	
SW2410	8	Hex	108-124	GeneControl	1	0	23,1
SW2521	8	Fam	113-117	GeneControl	2	23,1	15,2
SWR1101	8	Tet	122-170	GeneControl	3	38,3	18,4
SW29	8	Hex	131-173	GeneControl	4	56,7	17,3
S0069	8	Tet	149-171	GeneControl	5	74,0	22,3
S0144	8	Fam	208-218	GeneControl	6	96,3	31,4
S0178	8	Tet	110-126	GeneControl	7	127,7	
SW21	9	Hex	123-139	GeneControl	1	15,1	21,7
SW911	9	Fam	157-169	Tierzucht	2	36,8	20,3
SW2401	9	Fam	148-170	GeneControl	3	57,1	19,3
S0081	9	Fam	172-184	GeneControl	4	77,0	23,5
S0295	9	Fam	228-256	GeneControl	5	100,5	22,4

Marker	SSC	Dye	Allelänge	Labor	Position	relative Position	Abstand cM
S0114	9	Tet	129-139	GeneControl	6	122,9	16,5
SW749	9	Tet	102-114	Tierzucht	7	139,4	
S0038	10	Hex	117-149	GeneControl	1	4,3	18,9
SW1894	10	Fam	196-208	GeneControl	2	23,2	16,1
SW497	10	Tet	94-116	GeneControl	3	39,3	16,8
SW173	10	Tet	213-218	Tierzucht	4	56,1	6,2
S0070	10	Hex	266-284	Tierzucht	5	62,3	24
SW920	10	Tet	142-150	GeneControl	6	86,3	17,9
SW1626	10	Tet	133-170	GeneControl	7	104,2	
SW1460	11	Fam	84-134	Genecontrol	1	9	5,1
SW2008	11	Hex	91-101	GeneControl	2	14,1	29,6
S0071	11	Fam	168-200	GeneControl	3	43,7	12,7
S0230	11	Fam	307-315	Tierzucht	4	56,4	19,8
SW703	11	Hex	126-140	GeneControl	5	76,2	7,5
SW1135	11	Fam	180-192	GeneControl	6	83,7	
SW2490	12	Tet	121-176	GeneControl	1	0	19,4
S0229	12	Fam	137-155	GeneControl	2	19,4	14
SW957	12	Hex	113-157	GeneControl	3	33,4	31,3
SW874	12	Hex	191-219	GeneControl	4	64,7	15,5
S0090	12	Fam	241-247	Tierzucht	5	80,2	15,6
S0106	12	Hex	135-143	GeneControl	6	95,8	17,3
SWR1021	12	Hex	93-115	GeneControl	7	113,1	
SW344	13	Tet	158-185	Tierzucht	1	35,4	7,7
SW864	13	Tet	168-178	GeneControl	2	43,1	18,0
SW1864	13	Hex	150-184	Genecontrol	3	61,1	1,1
S0068	13	Tet	229-261	Tierzucht	4	62,2	17,1
SW398	13	Hex	166-188	GeneControl	5	79,3	32,8
Marker	SSC	Dye	Allelänge	Labor	Position	relative Position	Abstand cM
---------	-----	-----	-----------	-------------	----------	----------------------	---------------
S0289	13	Fam	126-178	GeneControl	6	112,1	
SW857	14	Hex	145-159	GeneControl	1	7,4	28,3
SW295	14	Tet	121-137	Tierzucht	2	35,7	19,3
SW342	14	Tet	91-127	GeneControl	3	53,2	17,5
SW1557	14	Tet	86-98	GeneControl	4	87,9	23,6
SWC27	14	Fam	148-164	GeneControl	5	111,5	
SW2072	15	Fam	169-189	Tierzucht	1	12,5	1,3
S0355	15	Fam	245-271	Tierzucht	2	13,8	20,8
S0148	15	Tet	147-173	GeneControl	3	34,6	16,1
SW964	15	Hex	220-248	Tierzucht	4	50,7	19,7
SWR1533	15	Tet	89-101	GeneControl	5	70,4	31,1
SW1983	15	Hex	165-191	GeneControl	6	101,5	18,4
SW1119	15	Hex	144-160	GeneControl	7	119,9	
SW742	16	Hex	206-228	Tierzucht	2	9,3	23,9
S0298	16	Tet	172-176	Tierzucht	3	33,2	6,9
SW81	16	Fam	127-142	Tierzucht	4	40,1	46,1
SW1897	16	Fam	156-180	Tierzucht	5	86,2	
SW335	17	Hex	100-112	GeneControl	1	0	63,4
SW1031	17	Fam	93-117	GeneControl	2	63,4	30,6
SW2431	17	Fam	151-169	Tierzucht		94,0	
SW1808	18	Hex	107-153	Tierzucht	1	0	31,6
SW787	18	Hex	153-161	GeneControl	2	31,6	26,0
SWR414	18	Tet	138-162	Tierzucht	3	57,6	

Die Primersequenzen für die PCR-Amplifikation der Mikrosatellitenmarker finden sich auf den Webseiten des U.S. PIG GENE MAPPING Coordination Programs:

http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmap.html (MARC-USDA)

7.2 Charakterisierung der Typisierungsmarker

Tabelle 32: Charakterisierung der Typisierungsmarker mit Kennzahlen für die Informativität: Heterozygotie (H), 'Polymorphism Information Content" (PIC) und 'Proportion of fully informative matings" (PFIM)

Marker	Chr	Position	Anzahl Allele	Н	PIC	PFIM
SW949	XY	1	10	0.754	0.727	0.352
SW980	Х	2	12	0.855	0.840	0.488
SW2534	Х	3	8	0.632	0.603	0.228
SW2126	X	4	9	0.775	0.743	0.421
SW2470	X	5	4	0.562	0.475	0.080
SW2476	X	6	7	0.741	0.700	0.357
SW1943	X	7	5	0.734	0.690	0.395
SW707	X	8	6	0.608	0.569	0.223
SW2588	X	9	5	0.515	0.482	0.159
SW1824	1	1	10	0.701	0.675	0.336
SW1515	1	2	8	0.671	0.620	0.273
S0316	1	3	9	0.809	0.786	0.517
SW1851	1	4	8	0.642	0.614	0.261
SW781	1	5	10	0.514	0.469	0.084
SW2185	1	6	9	0.544	0.526	0.181
SW80	1	7	8	0.708	0.686	0.329
SW1621	1	8	3	0.354	0.327	0.057
SW1902	1	9	7	0.595	0.570	0.217
SWR982	1	10	10	0.795	0.765	0.426
S0155	1	11	8	0.829	0.806	0.490
S0320	1	12	6	0.336	0.325	0.055
S0056	1	13	12	0.853	0.839	0.543
SW1301	1	14	7	0.786	0.755	0.438
SW2443	2	1	8	0.550	0.526	0.175
SWR783	2	2	4	0.410	0.379	0.075
SW1201	2	3	7	0.692	0.642	0.275

Tabelle 32: Charakterisierung der Typisierungsmarker mit Kennzahlen für die Informativität:
Heterozygotie (H), 'Polymorphism Information Content'' (PIC) und 'Proportion of fully
informative matings" (PFIM)

Marker	Chr	Position	Anzahl Allele	Н	H PIC	
SW1026	2	4	6	0.464	0.446	0.144
S0010	2	5	7	0.656	0.630	0.282
SW1408	2	6	9	0.801	0.780	0.480
S0036	2	7	8	0.803	0.778	0.504
SW274	3	1	6	0.621	0.551	0.154
SW72	3	2	5	0.527	0.495	0.136
S0206	3	3	8	0.743	0.708	0.348
SW902	3	4	8	0.748	0.718	0.389
SW2570	3	5	9	0.823	0.801	0.510
S0002	3	6	7	0.799	0.769	0.460
SW349	3	7	5	0.744	0.704	0.389
SW2404	4	1	10	0.760	0.741	0.426
S0301	4	2	6	0.686	0.640	0.300
SW752	4	3	5	0.647	0.579	0.210
S0217	4	4	5	0.523	0.424	0.017
S0067	4	5	6	0.536	0.490	0.135
S0097	4	6	9	0.798	0.772	0.389
SW413	5	1	5	0.642	0.597	0.250
SW491	5	2	7	0.515	0.494	0.165
SWR453	5	3	4	0.428	0.373	0.026
SW2	5	4	8	0.806	0.781	0.537
SW1468	5	5	5	0.525	0.490	0.147
SW1200	5	6	9	0.765	0.740	0.396
SW378	5	7	3	0.583	0.501	0.152
S0099	6	1	9	0.830	0.808	0.521
SW2406	6	2	11	0.639	0.621	0.238
SW1841	6	3	24	0.907	0.900	0.362

Tabelle 32: Charakterisierung der Typisierungsmarker mit Kennzahlen für die Informativität:
Heterozygotie (H), 'Polymorphism Information Content'' (PIC) und 'Proportion of fully
informative matings" (PFIM)

Marker	Chr	Position	Anzahl Allele	Н	PIC	PFIM
S0087	6	4	4	0.646	0.575	0.203
SW122	6	5	9	0.822	0.804	0.516
S0003	6	6	9	0.746	0.717	0.338
SW1881	6	7	9	0.754	0.729	0.380
SW2419	6	8	8	0.795	0.771	0.493
SW1354	7	2	5	0.704	0.659	0.327
SW472	7	3	3	0.546	0.443	0.071
SW352	7	4	6	0.717	0.666	0.330
SWR773	7	5	3	0.349	0.315	0.040
S0212	7	6	8	0.632	0.577	0.198
SW764	7	7	5	0.710	0.657	0.344
SW2410	8	1	6	0.332	0.317	0.034
SW2521	8	2	6	0.633	0.570	0.203
SWR1101	8	3	14	0.821	0.805	0.413
SW29	8	4	8	0.440	0.426	0.089
S0069	8	5	8	0.546	0.529	0.203
S0144	8	6	7	0.565	0.493	0.093
S0178	8	7	8	0.609	0.586	0.215
SW21	9	1	6	0.713	0.661	0.299
SW911	9	2	8	0.676	0.619	0.244
SW2401	9	3	6	0.724	0.683	0.334
S0081	9	4	6	0.519	0.444	0.044
S0295	9	5	8	0.738	0.698	0.356
S0114	9	6	5	0.726	0.682	0.358
SW749	9	7	4	0.395	0.363	0.062
S0038	10	1	13	0.765	0.736	0.363
SW1894	10	2	4	0.688	0.645	0.311

Tabelle 32: Charakterisierung der Typisierungsmarker mit Kennzahlen für die Informativität:
Heterozygotie (H), 'Polymorphism Information Content'' (PIC) und 'Proportion of fully
informative matings" (PFIM)

Marker	Chr	Position	Anzahl Allele	Н	PIC	PFIM
SW497	10	3	7	0.785	0.756	0.441
SW173	10	4	5	0.413	0.386	0.100
S0070	10	5	10	0.821	0.800	0.454
SW920	10	6	2	0.390	0.321	0.000
SW1626	10	7	15	0.825	0.808	0.369
SW1460	11	1	5	0.612	0.564	0.208
SW2008	11	2	7	0.575	0.542	0.163
S0071	11	3	7	0.785	0.752	0.461
S0230	11	4	9	0.769	0.736	0.386
SW703	11	5	8	0.725	0.682	0.358
SW1135	11	6	5	0.169	0.165	0.004
SW2490	12	1	8	0.757	0.723	0.419
S0229	12	2	9	0.782	0.753	0.411
SW957	12	3	5	0.488	0.467	0.176
SW874	12	4	7	0.649	0.618	0.264
S0090	12	5	5	0.662	0.623	0.285
S0106	12	6	10	0.793	0.774	0.473
SWR1021	12	7	7	0.494	0.478	0.125
SW344	13	1	10	0.758	0.735	0.416
SW864	13	2	5	0.516	0.483	0.162
SW1864	13	3	4	0.613	0.536	0.197
S0068	13	4	9	0.771	0.743	0.397
SW398	13	5	9	0.807	0.781	0.451
S0289	13	6	7	0.628	0.603	0.252
SW857	14	1	9	0.802	0.775	0.469
SW295	14	2	5	0.599	0.560	0.235
SW342	14	3	10	0.744	0.724	0.331

Marker	Chr	Position	Anzahl Allele	Н	PIC	PFIM
SW1557	14	4	4	0.553	0.503	0.144
SWC27	14	5	7	0.306	0.298	0.045
SW2072	15	1	6	0.699	0.656	0.324
S0355	15	2	5	0.685	0.638	0.323
S0148	15	3	7	0.771	0.742	0.422
SW964	15	4	9	0.802	0.779	0.477
SWR1533	15	5	5	0.588	0.501	0.127
SW1983	15	6	9	0.863	0.848	0.616
SW1119	15	7	8	0.736	0.702	0.365
SW742	16	2	12	0.695	0.675	0.317
S0298	16	3	3	0.446	0.409	0.090
SW81	16	4	7	0.466	0.436	0.105
SW1897	16	5	6	0.431	0.408	0.091
SW2431	17		8	0.497	0.484	0.149
SW335	17	1	5	0.637	0.578	0.216
SW1031	17	2	3	0.216	0.200	0.000
SW1808	18		11	0.725	0.697	0.362
SW787	18	1	7	0.692	0.661	0.338
SWR414	18	2	8	0.743	0.700	0.382

Tabelle 32: Charakterisierung der Typisierungsmarker mit Kennzahlen für die Informativität: Heterozygotie (H), 'Polymorphism Information Content'' (PIC) und 'Proportion of fully informative matings'' (PFIM)

7.3 Meldekarte

Meldekarte ' Afterloses Ferkel'

gefaxt an Lehrstuhl für Tierzucht:

•••••							
		Datum, Untersch	rift				
Ifd. Nummer:Besamungsstation: Bergheim Landshut Neustadt / Aisch BHZP							
Besamungstechnik	er:						
Betrieb:							
Angaben zum Ferk	el:						
Geburtsdatum:			KB Datum:				
Nummer der Mutter:			Gewebeprobe der Mutter □				
Rasse der Mutter:							
Wurfnummer:							
Name der Väter:		•••••	HB-Nummer				
			HB-Nummer				
Rasse des Vaters:							
Untersuchungsdatu	m:						
Unterschrift Techn	iker:						

.....

7.4 Diagnosekarte

Diagnosekarte ' Afterloses Ferkel' -LUA

lfd. Nummer:	
Institution / Ort der Untersuchung:	
Tierarzt:	
Datum der Untersuchung:	
Diagnosa	
Atresia ani	
Sonstiges:	
Geschlecht: männlich□	weiblich□
Art des entnommenen Gewebes:	
Gewebeprobe der Sau vorhanden:	ja 🗖 nein 🗖
Unterschrift Tierarzt:	

.....

7.5 Anleitung für den Landwirt Anleitung Erfassung ' Afterloses Ferkel'

- 1 Anruf Landwirt Mitteilung ob und wann Techniker auf Betrieb kommt (evtl. Ferkel kühl lagern)
- 2 Mitteilung an zuständigen Techniker Versandbox mit Formularen aushändigen
- 3 Techniker auf Betrieb
 - -Untersuchung verdächtiges Ferkel
 - -Ohrprobe Sau
 - -Ferkel und Ohrprobe in Behälter fachgerecht verpacken
 - (kleine Plastiktüte ist für die Ohrprobe)
 - -Eiswürfelbeutel mit Wasser füllen, fest verschließen
 - (verknoten), einfrieren und in den Karton legen
 - -Diagnosekarte an LUA schicken
 - -Meldekarte ausfüllen und an der Besamungsstation abgeben
 - -Prämie (Verrechnungsscheck)
 - -Sicherstellung Transport zum LUA (Postweg),
 - die Versandbox kann dem Paketzusteller auch direkt mitgegeben werden
- 4 Besamungsstation
 - -Meldekarte an Lehrstuhl für Tierzucht faxen Fax. : 08161/713107 -Originale aufbewahren
- 5 Untersuchungsanstalt
 - -Diagnose stellen
 - -Gewebeprobe (Muskel) entnehmen
 - -Gewebeproben mit Diagnosekarte an Lehrstuhl für Tierzucht

7.6 Programmdateien für die Kopplungsanalyse mit dem Allegro 1.0

Drei Dateien werden für Kopplungsanalysen mit dem Programm Allegro 1.0 benötigt. Die Datei *.pre (Abbildung 29) enthält Angaben über die Verwandtschaftsstruktur, das Geschlecht, den Krankheitsstatus und die Markergenotypen der einzelnen Individuen. In der Datei *.dat (Abbildung 30) werden die Krankheitsallelfrequenz, die Penetranz, die Reihenfolge der Marker, die Markerallelfrequenzen und die Markerdistanzen angegeben. Die durchzuführenden Analysen, z.B. verschiedene NPL-Statistiken oder Single-und Multipoint LOD-Score Berechnungen werden in der Datei *.opt (Abbildung 31) festgelegt.

Datei*.pre: *.pre

fam	tier_ID	vat_ID	mut_ID	sex	krank	GT	_M1	GT.	_M2	GT	_M3	GT	_M4	GT	_M5
F1	NA0125	CAMPARI	m11	1	2	4	3	1	1	1	1	4	3	1	1
F1	NA0175	CAMPARI	m12	2	2	4	4	1	1	1	1	3	8	1	1
F1	CAMPARI	0	0	1	1	4	4	1	1	1	1	3	3	1	1
F1	m11	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F1	m12	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	BE0023	CIGAR	m21	1	2	2	3	2	2	1	2	2	2	1	1
F 2	LA0055	CITRON	m 2 2	1	2	2	2	3	3	1	1	4	4	1	1
F 2	CIGAR	CITRON	m 2 3	1	1	4	2	0	0	1	2	2	2	1	1
F 2	LA0014	CITRON	m 2 4	1	2	5	2	1	3	1	1	4	1	1	1
F2	CITRON	CITY	m 2 5	1	1	4	2	3	3	1	2	4	2	1	1
F 2	CITRUS	CITY	m 2 6	1	1	4	4	4	3	1	2	5	2	1	1
F2	CITY	0	0	1	1	4	2	0	0	1	2	4	2	1	1
F2	m21	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	m 2 2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	m23	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	m24	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	m25	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	m26	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FЗ	NA0124	MACHT	m31	1	2	4	4	1	1	1	1	4	1	1	1
FЗ	NA0258	MACHT	m 3 2	1	2	4	4	1	1	1	1	5	1	3	1
FЗ	NA0219	MACHT	m 3 3	1	2	4	3	0	0	1	1	5	1	2	1
FЗ	MACHT	0	0	1	1	4	4	1	1	1	1	5	1	2	1
FЗ	m 3 1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FЗ	m 3 2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FЗ	m 3 3	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F 4	NA0126	FENSTER	m 4 1	1	2	4	4	1	1	1	1	2	8	1	1
F 4	NA0188	FENSTER	m 4 2	1	2	4	4	1	1	1	1	5	2	4	1
F 4	FENSTER	0	0	1	1	4	4	1	1	1	1	2	2	1	1
F 4	m41	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F 4	m 4 2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbildung 29: File *.pre: Angabe der Familienstruktur, des Geschlechts, des Krankheitsstatus und der Markergenotypen für jedes typisierte Individuum

Angabe der Familiennummer F*, der Tiernummer (tier_ID), dem Vater (vat_ID), der Mutter (mut_ID), dem Geschlecht (sex; wobei 1 = männlich / 2 = weiblich), dem Krankheitsstatus (krank; wobei 2 = krank / 1 = gesund/ 0 = nicht bekannt) und den Markergenotypen (GT_M*; bestehend aus zwei Spalten für Allel 1 und Allel 2).

Datei *.dat

*.dat 7005 1 0 0.0 0.0 0 2 3 234567 4 1 2 0.7 0.3 5 6 0.00 0.00 0.90 7 8 3 10 # SW1824 0.001 0.487 0.103 0.244 0.026 0.064 0.001 0.051 0.013 0.013 9 10 3 10 # SW781 0.614 0.024 0.277 0.001 0.036 0.024 0.012 0.012 0.001 0.001 11 12 3 3 # SW1621 13 0.820 0.038 0.141 14 3 8 # S0155 0.342 0.165 0.051 0.013 0.291 0.001 0.038 0.101 15 16 3 6 # S0320 0.728 0.099 0.049 0.074 0.049 0.001 17 3 7 # SW1301 18 0.280 0.107 0.173 0.147 0.227 0.027 0.040 19 20 0 0 21 52.8 23.6 14.5 18.6 25.0 22 1 0.10000 0.450000

Abbildung 30: File *.dat: Anzahl typisierter Marker, Markerreihenfolge, Krankheitsallelfrequenz, Penetranzen, Anzahl der Markerallele, Markername, Allelfrequenzen und Abstände zwischen den Marker in cM

Anmerkung nicht alle Stellen des Files *.dat werden von Allegro berücksichtigt, im folgenden werden nur die Angaben aufgeführt die für die Analyse von Bedeutung sind.

Zeile 1: Anzahl typisierter Marker einschließlich Krankheitslocus (7), dritte Ziffer in Zeile 1 gibt an ob der Krankheitslocus geschlechtsgekoppelt ist (wobei 0 = nicht geschlechtsgekoppelt / 1 = geschlechtsgekoppelte Marker)

Zeile 3: Markerreihenfolge (wobei 1 = Krankheitslocus)

Zeile 4: Anzahl Allele am Krankheitslocus

Zeile 5: Krankheitsallelfrequenz (im Bsp. 0.3)

Zeile 6: Anzahl Krankheitskategorien

Zeile 7: Phänokopienrate, Penetranz für Individuen die am Krankheitslocus heterozygot sind, Penetranz für homozygote Krankheitsallelträger (im Beispiel oben 90 % - rezessiver Erbgang) bei geschlechtsgekoppeltem Krankheitslocus vor der Zeile 7 eine zusätzliche Zeile mit 2 Penetranzen für das männliche Geschlecht / Zeile 7 enthält dann die Penetranzen für die weiblichen Individuen

Zeilen 8/10/12/14/16/18: erste Zahl nicht besetzt (3), Anzahl der Allele, Markername (# SW...) Zeilen 9/11/13/15/17/19: Allelfrequenzen

Zeile 21: Markerabstände in cM oder als Rekombinationsfrequenzen (Festlegung der Einheit im File *.opt mit dem Befehl UNIT.

Datei *.opt:

```
Zeile*.opt
    % Read input in LINKAGE format from pre-file pre and dat-file dat
1 PREFILE chr1.pre
2 DATFILE chrl.dat
    % Linkage analysis to be performed
3 MODEL mpt par het param.mpt
4 MODEL spt par het param.spt
5 MODEL mpt exp pairs equal exppairs.mpt
6 MODEL spt exp pairs equal exppairs.spt
7 MODEL mpt exp all equal expall.mpt
8 MODEL spt exp all equal expall.spt
9 NPLEXACTP ON
    % Other statistical analysis to be performed
10 HAPLOTYPE
11 CROSSOVERFILE xover.out
    % Maximum amount of memory to be allocated by Allegro set to 1Gb
12 MAXMEMORY 1000
```

Abbildung 31: File *.opt: mit den Namen der einzulesenden Dateien und der Angabe der durchzuführenden Kopplungsanalysen

Zeile 1: Name der einzulesenden *.pre Datei

Zeile 2: Name der einzulesenden *.dat Datei

Zeile 3: Befehlszeile für die Multipoint LOD-Score Kopplungsanalyse mpt /Name der output Datei: param.mpt

Zeile 4: Befehlszeile für die Singlepoint LOD-Score Kopplungsanalyse spt /Name der output Datei: param.spt

Zeile 5: Befehlszeile für die nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse; NPL-Statistik pairs / Name der output Datei: exppairs.mpt (equal = alle Familien werden gleich gewichtet) Zeile 6: Befehlszeile für die nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse; NPL-Statistik pairs / Name der output Datei: exppairs.spt (equal = alle Familien werden gleich gewichtet) Zeile 7: Befehlszeile für die nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse; NPL-Statistik all / Name der output Datei: expall.mpt (equal = alle Familien werden gleich gewichtet) Zeile 8: Befehlszeile für die nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse; NPL-Statistik all / Name der output Datei: expall.mpt (equal = alle Familien werden gleich gewichtet) Zeile 9: Befehlszeile für die nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse; NPL-Statistik all / Name der output Datei: expall.spt (equal = alle Familien werden gleich gewichtet) Zeile 9: Befehlszeile für die Berechnung des exakten p-Werts der NPL-Statistik Zeile 10: Befehlszeile für die Ableitung von Haplotypen

Zeile 11: Befehlszeile für die Schätzung von Crossing over Ereignissen

Zeile 12: Angabe des maximalen zur Verfügung stehenden Speichers für das Programm Allegro

7.7 Beispiele für die Berechnung der NPL-Statistiken

7.7.1 Der NPL-Wert zwischen zwei informativen Markern



Abbildung 32: Genotypen einer Halbgeschwisterfamilie an zwei informativen Markern und der Position x zwischen den Markern

Das Programm Allegro berechnet nicht nur NPL-Werte direkt am Marker sondern auch sog. "Multipoint NPL-Werte" (NPL _{mpt}) zwischen zwei Markern. Dieser NPL_{mpt} ist abhängig von der Rekombinationsrate θ zwischen Marker 1 und Marker 2 und von den Rekombinationsraten θ_1 und θ_2 zwischen Marker und Position x (siehe Abbildung 33).



Abbildung 33: Position x für die Berrechung der NPL-Statistik zwischen zwei Markern

Die Rekombinationsrate θ zwischen Marker 1 und Marker 2 ergibt sich aus dem Abstand a (in Morgan), nach der Funktion von Haldane (1919) (siehe *F22*)

(F22)

$$\theta = 0.5 \cdot (1 - \exp(-2 \cdot a))$$

Die beiden Rekombinationsraten θ_1 und θ_2 errechnen sich ebenso aus dem Abstand a_1 und a_2 zwischen Marker und Position x. Unter der Annahme, daß beide Marker vollständig informativ sind (siehe Abbildung 32), können in den Nachkommen zwei Phasen auftreten. In Phase 1 treten die Haplotypen 1 - x - 1 und 3 - x - 3 und in Phase 2 die Haplotypen 1 - x - 3 und 3 - x - 1 auf. Die Wahrscheinlichkeit w der Phasen ist abhängig vom Abstand bzw. der Rekombinationrate θ zwischen Marker 1 und Marker 2. Sie errechnet sich für die Phase 1 als $w_1 = (1-\theta)^2/[(1-\theta)^2 + \theta^2]$ und für die Phase 2 als $w_2 = \theta^2/(1-\theta)^2 + \theta^2$.

In Tabelle 33 sind die Wahrscheinlichkeiten p für die einzelnen Haplotypen in Phase 1 angegeben. Die Wahrscheinlichkeit L_{Phase1a}, daß beide Nachkommen mit dem Markergenotyp (1 x 1) den gleichen Haplotyp tragen ist die Summe aus L₁₁ und L₃₃ = $(1-\theta_1)(1-\theta_2)^2 + (\theta_1\theta_2)^2$.

Die Wahrscheinlichkeit L_{Phase1b} das beide Nachkommen einen unterschiedlichen Haplotypen tragen ist L₁₃ und L₃₁ = $2[\theta_1\theta_2(1-\theta_1)(1-\theta_2)]$.

p Haplotyp		$(1-\theta_1) (1-\theta_2)$	$(1-\theta_1)\theta_2$	$\theta_1 \theta_2$	$\theta_1(1-\theta_2)$	$\theta_1(1-\theta_2)$	$\theta_1 \theta_2$	$(1-\theta_1)\theta_2$	$(1-\theta_1) (1-\theta_2)$
	NK2 NK1	1-1-1	1-1-3	1-3-1	1-3-3	3-1-1	3-1-3	3- 3 -1	3- 3 -3
$(1-\theta_1) (1-\theta_2)$	1- 1 -1	L ₁₁	L ₁₂	L ₁₃	L ₁₄	L ₁₄	L ₁₃	L ₁₂	L ₁₁
$(1-\theta_1)\theta_2$	1- 1 -3	L ₂₁	L ₂₂	L ₂₃	L ₂₄	L ₂₄	L ₂₃	L ₂₂	L ₂₁
$\theta_1 \theta_2$	1-3-1	L ₃₁	L ₃₂	L ₃₃	L ₃₄	L ₃₄	L ₃₃	L ₃₂	L ₃₁
$\theta_1(1-\theta_2)$	1- 3 -3	L ₄₁	L ₄₂	L ₄₃	L ₄₄	L ₄₄	L ₄₃	L ₄₂	L ₄₁
$\theta_1(1-\theta_2)$	3- 1 -1	L ₄₁	L ₄₂	L ₄₃	L ₄₄	L ₄₄	L ₄₃	L ₄₂	L ₄₁
$\theta_1 \theta_2$	3-1-3	L ₃₁	L ₃₂	L ₃₃	L ₃₄	L ₃₄	L ₃₃	L ₃₂	L ₃₁
$(1-\theta_1)\theta_2$	3- 3 -1	L ₂₁	L ₂₂	L ₂₃	L ₂₄	L ₂₄	L ₂₃	L ₂₂	L ₂₁
$(1-\theta_1)(1-\theta_2)$	3-3-3	L ₁₁	L ₁₂	L ₁₃	L ₁₄	L ₁₄	L ₁₃	L ₁₂	L ₁₁

Tabelle 33: Wahrscheinlichkeiten p
 für die einzelnen Haplotypen gegeben Phase 1 [(1-x-1)/3-x-3)] trifft zu

In Tabelle 34 sind die Wahrscheinlichkeiten p für die einzelnen Haplotypen in Phase 2 angegeben. Die Wahrscheinlichkeit L_{Phase2a}, daß beide Nachkommen mit dem Markergenotyp (1 x 1) den gleichen Haplotyp tragen ist die Summe aus L₁₁ und L₃₃ = $[(1-\theta_1)\theta_2]^2 + [\theta_1(1-\theta_2)]^2$. Die Wahrscheinlichkeit L_{Phase2b}, daß beide Nachkommen einen unterschiedlichen Haplotypen tragen ist die Summe aus L₁₃ und L₃₁ = $2[(1-\theta_1)\theta_2 \theta_1(1-\theta_2)]$.

Tabelle 34: Wahrscheinlichkeiten p
 für die einzelnen Haplotypen gegeben Phase 1 [(1-x-3)/3-x-1)] trifft z

p Haplotyp		(1-θ ₁) θ ₂	$(1-\theta_1)(1-\theta_2)$	$\theta_1(1-\theta_2)$	$\theta_1 \theta_2$	$\theta_1 \theta_2$	$\theta_1(1-\theta_2)$	$(1-\theta_1)(1-\theta_2)$	$(1-\theta_1)\theta_2$
	NK2 NK1	1-1-1	1-1-3	1-3-1	1-3-3	3-1-1	3-1-3	3- 3 -1	3 -3 -3
$(1-\theta_1) \theta_2$	1- 1 -1	L ₁₁	L ₁₂	L ₁₃	L ₁₄	L ₁₄	L ₁₃	L ₁₂	L ₁₁
$(1-\theta_1)(1-\theta_2)$	1-1-3	L ₂₁	L ₂₂	L ₂₃	L ₂₄	L ₂₄	L ₂₃	L ₂₂	L ₂₁
$\theta_1(1-\theta_2)$	1 -3- 1	L ₃₁	L ₃₂	L ₃₃	L ₃₄	L ₃₄	L ₃₃	L ₃₂	L ₃₁

p Haplotyp		(1-θ ₁) θ ₂	$(1-\theta_1)(1-\theta_2)$	$\theta_1(1-\theta_2)$	$\theta_1 \theta_2$	$\theta_1 \theta_2$	$\theta_1(1-\theta_2)$	$(1-\theta_1)(1-\theta_2)$	$(1-\theta_1)\theta_2$
	NK2 NK1	1-1-1	1-1-3	1-3-1	1- 3 -3	3-1-1	3-1-3	3- 3 -1	3- 3 -3
$\theta_1 \theta_2$	1 -3- 3	L ₄₁	L ₄₂	L ₄₃	L ₄₄	L ₄₄	L ₄₃	L ₄₂	L ₄₁
$\theta_1 \theta_2$	3- 1 -1	L ₄₁	L ₄₂	L ₄₃	L ₄₄	L ₄₄	L ₄₃	L ₄₂	L ₄₁
$\theta_1(1-\theta_2)$	3-1-3	L ₃₁	L ₃₂	L ₃₃	L ₃₄	L ₃₄	L ₃₃	L ₃₂	L ₃₁
$(1-\theta_1)(1-\theta_2)$	3 -3- 1	L ₂₁	L ₂₂	L ₂₃	L ₂₄	L ₂₄	L ₂₃	L ₂₂	L ₂₁
$(1-\theta_1) \theta_2$	3-3-3	L ₁₁	L ₁₂	L ₁₃	L ₁₄	L ₁₄	L ₁₃	L ₁₂	L ₁₁

Die posteriori Wahrscheinlichkeit P_{equal} der Vererbungsvektoren bei der die beiden Nachkommen den gleichen Haplotypen tragen errechnet sich als:

(F23)

$$P_{equal} = (w_1 \cdot L_{Phase1a}) + (w_2 \cdot L_{Phase2a})$$

Die posteriori Wahrscheinlichkeit P_{unequal} der Vererbungsvektoren bei der die beiden Nachkommen einen unterschiedlichen Haplotypen tragen errechnet sich als:

(*F24*)

$$P_{unequal} = (w_1 \cdot L_{Phase1b}) + (w_2 \cdot L_{Phase2b})$$

Anschließend erfolgt wie in Kapitel 3.4.1.1.1 beschrieben die Berechnung der NPL-Statistik. Für das Beispiel das Abbildung 32 dargestellt ist, würde man für eine Position x (θ_1 gleich θ_2) zwischen zwei vollständig informativen Markern einen NPL_{mpt}-Wert von 0.93 erhalten.

7.7.2 NPL-Wert an einem nicht informativen Marker

Tritt an einem Marker der Fall auf, daß ein Nachkomme den selben heterozygoten Genotyp trägt wie der Eber (siehe Abbildung 34) dann ist der Marker nicht mehr vollständig informativ.

12Genotyp des Elters1213Genotyp der Halbgeschwister

Abbildung 34: Genotypen einer Halbgeschwisterfamilie an einem nicht vollständig informativen Marker

In diesem Fall haben die Allelfrequenzen der Allele 1, 2 und 3 in der Mutterrasse einen Einfluß auf den NPL-Wert, denn sie bestimmen wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, daß der Nachkomme mit dem Genotyp (GT) 1 2 das Allel 1 vom Vater oder der Mutter geerbt hat. Unter der Annahme, daß die Allelfrequenzen in der Mutterrasse wie in Tabelle 35 verteilt sind erhält man als gewichtete Wahrscheinlichkeit w1 (gegeben Nachkomme GT 12 / Allel 1 vom Eber erhalten) 0.25 und als Wahrscheinlichkeit w2 (gegeben Nachkomme GT 12 / Allel 2 vom Eber erhalten) 0.75 Bei allen Vererbungsvektoren, die davon ausgehen, daß die beiden Nachkommen ein Allel IBD gemeinsam haben, wird die a priori Wahrscheinlichkeit mit der die Posteriori Wahrscheinlichkeit P = 0.25 multipliziert. Die Wahrscheinlichkeit der übrigen Vektoren wird mit 0.75 multipliziert. Anschließend erfolgt wie in Kapitel 3.4.1.1.1 die Berechnung der NPL - Statistik. Im oben dargestellte Beispiel (Abbildung 34) ergibt sich dabei ein NPL-Wert von -0.5.

Tabelle 35: Erwartete Genotyphäufigkeiten eines NK bei gegeben Markerallelfrequenzen in der Rasse des Muttertieres

Mutter	Vater				
Frequenzen in der Mutterrasse	Allel 1 (p = 0.5)	Allel 2 (p = 0.5)			
Allel 1 (p = 0.6)	0.3	<u>0.3</u>			
Allel 2 (p = 0.2)	<u>0.1</u>	0.1			
Allel 3 (p = 0.2)	0.1	0.1			

7.7.3 LOD-Score Kopplungsanalyse zwischen einem Marker und dem Krankheitslocus bei unvollständiger Penetranz

Bei unvollständiger Penetranz ist nicht ausgeschlossen, daß der gesunde Elter heterozyoter Träger des Krankheitsallels Dd und abhängig von der Penetranz auch homozygoter Träger DD sein kann. In Tabelle 36 sind gegenübergestellt, wobei eine Allelfrequenz des Krankheitsallels D von 0.5 unterstellt wurde.

Tabelle 36: Genotypfrequenzen des typisierten Elters am Krankheitslocus bei vollständiger bzw. unvollständiger Penetranz (Allelfrequenz D gleich 0.5) und Wahrscheinlichkeit p_D für die Übertragung das Krankeitsallel D an einen Nachkommen

Genotyp (GT) des typisierten Elters	DD	Dd	dd
GT Frequenz p ₀ bei vollständiger Penetranz (1.0)	0.25	0.50	0.25
pg Elter gesund bei Penetranz von 0.8	0.20	1	1
GT Frequenz p ₁ bei Penetranz von 0.8	0.05	0.50	0.25
p _D Elter vererbt Allel D bei Penetranz (0.8)	1	1	0
p _D Allel D vererbt gegeben GT Elter	0.05	0.50	0

Die gewichtete Wahrscheinlichkeit w_{DD} , daß der Elter mit GT (DD) das Allel D an die Nachkommen weitergibt ist bei einer Penetranz von 80 % gleich 1/11. Ein Elter mit dem GT (Dd) hingegen vererbt mit einer Wahrscheinlichkeit w_{Dd} gleich 10/11 das Allel D an seine Nachkommen. Für die Berechnung des LOD-Scores Z(θ) werden die Wahrscheinlichkeiten

 w_{DD} und w_{Dd} mit den Wahrscheinlichkeiten $L(H_{1/0})_{DD}$ und $L(H_{1/0})_{Dd}$ bei vollständiger Penetranz multipliziert (siehe Formel *F25*).

(F25)

$$Z(\theta) = \log_{10} \frac{L(H_1)}{L(H_0)} = \log_{10} \frac{w_{DD} \cdot L(H_1)_{DD} + w_{Dd} \cdot L(H_1)_{Dd}}{w_{DD} \cdot L(H_0)_{DD} + w_{Dd} \cdot L(H_0)_{Dd}}$$

wobei unter: $H_1 : \underline{vollständig}$ gekoppelt ($\theta = 0$), Penetranz 1.0 $L(H_1)_{Dd}$ Vater Dd : 0,5 $L(H_1)_{DD}$ Vater DD : 1.0

 $\begin{array}{l} H_0 : \text{ungekoppelt } H_0, \, (\theta=0.5), \, \text{Penetranz 1.0} \\ L(H_0)_{\text{Dd}} \, \, \text{Vater Dd}: 0.25 \\ L(H_0)_{\text{DD}} \, \text{Vater DD}: 1.0 \end{array}$

7.7.4 LOD-Score Analyse zwischen einem nicht informativen Marker und dem Krankheitslocus



Abbildung 35: Genotypen einer Halbgeschwisterfamilie an einem nicht vollständig informativen Marker

An einem nicht vollständig informativen Marker kommt der Einfluß der Markerallelfrequenzen in der Population des Elters₂ zum Tragen. In unseren Familienmaterial ist der Elter₂ in den meisten Fällen die nicht typisierte Muttersau. Bei gegebenen Allelfrequenzen in der Mutterrasse siehe Tabelle 37 ergeben sich für die einzelnen Genotypen die folgenden Wahrscheinlichkeiten:

Tabelle 37: Erwartete Genotyphäufigkeiten eines NK bei gegeben Markerallelfrequenzen in der Rasse des Muttertieres

Mutter	Vater				
Frequenzen in der Mutterrasse	Allel 1 (p = 0.5)	Allel 2 (p = 0.5)			
Allel 1 (p = 0.98)	0.49	<u>0.49</u>			
Allel 2 (p = 0.01)	<u>0.005</u>	0.005			
Allel 3 (p = 0.01)	0.005	0.005			

Die gewichtete Wahrscheinlichkeit w_1 , gegeben Nachkomme hat Allel 1 vom Elter₁ erhalten und hat selbst Genotyp 1 2 ist gleich 1/99. Während die gewichtete Wahrscheinlichkeit w_2 | Nachkomme hat Allel 2 vom Elter₁ erhalten und hat Genotyp 1 2 ist gleich 98/99. Der LOD-Score berechnet sich bei gegebenen Markergenotypen und Allelfrequenzen in der Elter₂-

Population wie in Formel *F26* beschrieben. Im angeführten Beispiel (Abbildung 35) ergibt sich ein LOD-Score von -1.69.

$$Z(\theta) = \log_{10} \frac{0.5\{(1-\theta)[w_1(1-\theta) + w_2\theta] + [\theta(w_1\theta + w_2(1-\theta))]\}}{(0.5)^2}$$
(F26)

7.8 Genomweite Multipoint NPL_{all} Statistik und Informationsgehalt der NPL-Statistik Die markierten Markerpositionen finden sich im Anhang in Kapitel 7.1 (Tabelle 31)















Legende: NPL mpt
Info mpt

Genomweite Multipoint $\ensuremath{\mathsf{NPL}}_{all}$ Statistik und Informationsgehalt der NPL-Statistik















Legende: NPL mpt
Info mpt

Genomweite Multipoint $\ensuremath{\mathsf{NPL}}_{all}$ Statistik und Informationsgehalt der NPL-Statistik













Legende: NPL mpt
Info mpt





7.9 Genomweite Singlepoint NPL_{all} Statistik und Informationsgehalt

Die markierten Markerpositionen finden sich im Anhang in Kapitel 7.1 (Tabelle 31)







Genomweite Singlepoint $\ensuremath{\text{NPL}}_{all}$ Statistik und Informationsgehalt







сМ









113

Genomweite Singlepoint $\ensuremath{\text{NPL}}_{all}$ Statistik und Informationsgehalt









SSC 12 NPL Info 3.0 r 1.0 2.0 0.8 1.0 0.6 0.4 0.0 -1.0 0.2 0.0 -2.0 ò 140 20 4 8 8 8 120 160 сМ





Legende: NPL spt
Info spt

Genomweite Singlepoint $\ensuremath{\mathsf{NPL}}_{all}$ Statistik und Informationsgehalt







Legende: NPL spt
Info spt

7.10 Genomweite parametrische Kopplungsanalyse unter Ausschluß der Atresia recti Tiere

7.10.1 Nichtparametrische Multipoint-Kopplungsanalyse mit Atresia ani Tieren

Tabelle 38: Maximale Werte der Multipoint NPLall und NPLpairsStatistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Multipoint NPLall Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)

SSC	Marker	NPLall	p-Wert	Info _{all}	NPLpairs	p-Wert	Info _{pairs}	NPLall	p-Wert
1_{A}	SW1621	2.22	0.014	0.48	2.22	0.014	0.48	2.57	0.006
1_{B}	SW2185	2.06	0.019	0.89	2.06	0.019	0.89	2.61	0.006
1 _C	SW1621	1.62	0.054	0.74	1.68	0.048	0.73	2.051	0.022
2	SW1026	1.04	0.150	0.50	1.11	0.135	0.50	0.49	0.346
3	S0002	2.05	0.020	0.48	2.03	0.023	0.48	1.90	0.031
4	S0097	-0.09	0.533	0.67	-0.15	0.559	0.68	0.04	0.477
5	SW378	0.10	0.454	0.37	0.06	0.469	0.37	0.88	0.190
6	SW2419	0.82	0.204	0.65	0.80	0.212	0.65	0.33	0.367
7	S0212	0.88	0.189	0.50	0.84	0.199	0.51	0.27	0.388
8	SWR1101	0.89	0.189	0.81	0.91	0.185	0.80	1.37	0.087
9	SW2401	0.92	0.181	0.58	0.94	0.175	0.58	1.13	0.130
10	SW1894	1.09	0.140	0.49	1.07	0.143	0.49	0.68	0.245
11	SW2008	0.75	0.226	0.57	0.812	0.209	0.51	0.79	0.213
12	S0229	1.98	0.025	0.88	2.043	0.021	0.65	1.94	0.028
13	SW1864	1.16	0.123	0.79	1.23	0.114	0.78	1.57	0.060
14	SW295	0.45	0.322	0.48	0.44	0.334	0.48	0.39	0.346
15	SW1119	0.75	0.229	0.61	0.70	0.242	0.62	0.05	0.473
16	SW742	0.57	0.284	0.67	0.52	0.300	0.67	0.31	0.371
17	SW335	-0.16	0.554	0.42	-0.12	0.536	0.43	0.56	0.283
18	SWR414	0.49	0.312	0.37	0.47	0.317	0.38	0.72	0.235
X	SW1943	0.86	0.164	0.82	0.86	0.164	0.82	1.17	0.129

^A 25 Familien 6 Marker

^B zusätzliches Familien (n = 5) an 14 Marker

^C Gesamte Familien (n= 30) an 14 Marker

¹ Maximum des NPL_{all mpt} SW2185 ² SSC 11 Maximum am Marker SW1460

³ SSC 12 Maximum am Marker SW957

7.10.2 Nichtparametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse mit Atresia ani Tieren

Tabelle 39: Maximale Werte der Singlepoint NPL_{all} und NPL_{pairs} Statistik ohne Atresia recti Ferkel (links) und Maximale Werte der Singlepoint NPL_{all} Statistik mit Atresia recti und Atresia ani Tieren (rechts)

SSC	Marker	NPL _{all}	p-Wert	Info _{all}	NPL _{pairs}	p-Wert	Info _{pairs}	NPLall	p-Wert
1_{A}	SW1621	1.88	0.031	0.37	1.86	0.032	0.37	2.14	0.019
1 _B	SW781	1.23	0.113	0.80	1.23	0.113	0.80	1.68	0.044
1 _C	SW1621	1.34	0.091	0.38	1.68	0.048	0.73	1.441	0.077
2	SW1026	1.08	0.142	0.39	1.13	0.129	0.38	0.67	0.249
3	S0002	1.58	0.058	0.42	1.63	0.055	0.43	1.33	0.095
4	SW752	0.12	0.451	0.24	0.04	0.479	0.24	0.28	0.384
5	SW1463	0.36	0.357	0.48	0.33	0.370	0.46	0.41	0.336
6	S0099	0.36	0.357	0.60	0.38	0.347	0.61	0.65	0.257
7	S0212	0.77	0.222	0.45	0.73	0.232	0.46	0.32	0.369
8	SWR1101	0.97	0.166	0.79	0.99	0.163	0.79	1.49	0.069
9	SW2401	0.68	0.246	0.51	0.72	0.235	0.51	0.75	0.226
10	SW1894	0.95	0.173	0.43	0.97	0.170	0.43	0.81	0.208
11	SW1135	0.65	0.258	0.16	0.59	0.276	0.16	0.62	0.264
12	SW957	1.74	0.042	0.53	1.82	0.036	0.53	1.61	0.056
13	SW1864	0.85	0.195	0.38	0.89	0.190	0.37	0.85	0.197
14	SW295	0.64	0.259	0.33	0.64	0.255	0.34	0.61	0.270
15	SW1119	0.58	0.281	0.48	0.55	0.288	0.49	0.34	0.353
16	SW742	0.46	0.323	0.63	0.42	0.339	0.64	0.20	0.415
17	SW335	-0.16	0.554	0.42	-0.12	0.536	0.43	0.56	0.285
18	SWR414	0.46	0.322	0.31	0.44	0.327	0.32	0.81	0.209
XY	SW949	-0.34	0.627	0.68	-0.26	0.599	0.68	-0.45	0.668
X	SW2470	0.68	0.241	0.42	0.68	0.241	0.42	0.93	0.177

^A 25 Familien 6 Marker
 ^B zusätzliches Familien (n = 5) an 14 Marker
 ^C Gesamte Familien (n= 30) an 14 Marker
 ¹ Maximum am Marker S0155

² Maximum in der ursprünglichen Auswertung am Marker SW2185

7.10.3 Parametrische Multipoint-Kopplungsanalyse

In Tabelle 40 sind die Ergebnisse der genomweiten parametrischen Multipoint Kopplungsanalyse zusammengefaßt. Auch hier wurde für das SSC 1 drei unterschiedliche Auswertungen, 27 Familien 6 Marker^A, 8 zusätzliche Familien 14 Marker^B und gesamtes Familienmaterial 14 Marker^C vorgenommen. Angegeben sind dabei das Chromosom (SSC), der Marker bzw. die Position zwischen zwei Markern, die unter den vorgegebenen Parametern (Penetranz, Krankheitsallelfrequenz) den höchsten LOD-Score_{mpt} erreicht hat. Die Signifikanzgrenze der parametrischen Kopplungsanalyse, die bei einem LOD-Score_{mpt} von 3 liegt, wurde an keiner Markerposition des Genoms erreicht.

Tabelle 40: Multipoint LOD-Scores_{mpt} bei Ausschluß der Atresia recti Tiere

```
LOD-Score 0.3; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.90
LOD-Score 0.1; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.90
LOD-Score 0.3; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.01
LOD-Score 0.1; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.01
```

SSC	Marker	LOD-Score 0.3;0.90	LOD-Score 0.1;0.90	LOD-Score 0.3;0.01	LOD-Score 0.1;0.01
1 ^A	SW781/SW1621	2.26	2.00	1.93 ¹	1.96 ¹
1 ^B	SW2185	0.67	0.42 ²	0.74	0.84
1 ^C	SW781/SW2185	-2.89	-5.20	-1.40 ³	0.67³
2	SW1026/S0010	-0.21	-0.50	0.61	0.23
3	S0002/SW349	1.47	1.00	1.67	1.81
4	S0217/S0067	-2.69	-3.00	-1.11	-2.12
5	SW413/SWR453	-0.67	-0.84	-0.24 ⁴	-0.59
6	SW1881/SW2419	-0.89	-1.17	-0.09	-0.59
7	SW352/SW773	-0.66	-0.93	0.21 ⁵	-0.37 ⁶
8	S0069/S0144	-0.64	-0.92	0.27 ⁷	-0.26
9	SW911/SW2401	-0.88	-1.39	0.42	-0.17
10	SW1894/SW497	-1.24	-2.04	0.38 ⁸	-0.61
11	SW703/SW1135	-1.87	-2.35	0.13 ⁹	-1.12 ¹⁰
12	SW957/SW874	0.36	-0.30	1.51 ¹¹	0.95 ¹¹
13	SW398/S0289	-0.86	-1.44	0.28	-0.38
14	SW857/SW295	-1.72	-2.13	-0.31 ¹²	-1.14
15	SWR1533/SW1983	-3.10	-3.62	-0.44 ¹³	-2.18 ¹⁴
16	SW81/SW1897	-0.38	-0.43	-0.09	-0.27
17	SW335/SW1031	-0.43	-0.43	-0.19	-0.32
18	SW1808/SW787	-2.07	-2.37	-0.43 ¹⁵	-1.37 ¹⁵
Х	SW1943/SW707	-0.27	-0.49	0.23	-0.02

1 SSC1^A SW1621 2 SSC1^B SW781/SW2185 3 SSC1^C SW80/SW1621 4 SSC 5 Maximum zwischen SW1463 und SW1200 5 SSC 7 Maximum am Marker SW764 6 SSC 7 Maximum zwischen SW 773 und S0212 7 SSC 8 Maximum S0144 8 SSC 10 Maximum SW1894 9 SSC 11 Maximum SW1894 9 SSC 11 Maximum SW1460 10 SSC 11 Maximum SW1460 10 SSC 11 Maximum SW1135 11 SSC 12 Maximum SW957 12 SSC 14 zwischen SW1557/SWC27 13 SSC 15 SW119 14 SSC 15 SW1983/SW119 15 SSC 18 SW787/SWR414

7.10.4 Parametrische Singlepoint-Kopplungsanalyse

In Tabelle 41 sind die Ergebnisse der Singlepoint LOD-Score Analyse dargestellt. Die Auswertung wurde unter den selben vergleichenden Parametern, bezüglich der Krankheitsallelfrequenz und der Penetranz durchgeführt, wie die Multipoint Kopplungsanalyse.

Tabelle 41: Singlepoint LOD-Scores_{spt} bei Ausschluß der Atresia recti Tiere

LOD-Score 0.3; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.90

LOD-Score 0.1; 0.90: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.90

LOD-Score 0.3; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.3/ Penetranz 0.01

LOD-Score 0.1; 0.01: Krankheitsallelfrequenz 0.1/ Penetranz 0.01

SSC	Marker	LOD-Score 0.3;0.90	LOD-Score 0.1;0.90	LOD-Score 0.3;0.01	LOD-Score 0.1;0.01
1 ^A	SW1621	1.63	0.94	1.71	1.89
1 ^B	SW2185	0.21 ¹	0.23 ¹	0.26	0.18
1 ^C	SW1621	-0.73	-2.32	0.39	1.03
2	SW1026	-0.90	-2.46	0.77	0.19
3	S0002	0.44	-0.99	1.38	1.21
4	S0217	-4.69	-7.44	-0.99^2	-2.99
5	SWR453	-1.03	-2.08	0.03	-0.44
6	SW1881	-4.21	-7.40	-0.55	-2.28
7	SW472	-1.67	-3.22	0.15 ³	-0.80
8	S0144	-0.99	-2.54	0.41	-0.15
9	SW749	-2.48	-4.19	0.06^{4}	-1.36
10	SW1894	-2.13	-2.94	0.42	-0.67
11	SW1135	-0.85	-1.89	0.18	-0.25
12	SW957	0.43	-1.09	1.66	1.44
13	SW1864	-0.65	-2.54	0.71	0.07

SSC	Marker	LOD-Score 0.3;0.90	LOD-Score 0.1;0.90	LOD-Score 0.3;0.01	LOD-Score 0.1;0.01
14	SW295	-2.07	-4.19	0.17	-0.84
15	SW964	-3.02	-4.99	-0.35	-1.50
16	SW81	-1.61	-2.71	-0.24	-0.92
17	SW2431	-2.99	-4.74	-0.59	-1.81
18	SWR414	-4.38	-7.56	-0.57	-2.37
XY	SW949	-6.79	-11.29	-1.19	-3.95
X	SW2470	-0.78	-1.83	0.24	-0.19

¹ SSC 1^B Maximum am Marker S0155
 ² SSC 4 Maximum am Marker SW752
 ³ SSC 7 Maximum am Marker SW764
 ⁴ SSC 9 Maximum am Marker SW2401

Alfred, J. B., K. Rance, B. A. Taylor, S. J. Phillips, C. M. Abbott *et al.*, 1997 Mapping in the region of Danforth's short tail and the localization of tail length modifiers. Genome Res 7: 108-117.

Archibald, A. L., C. S. Haley, J. F. Brown, S. Couperwhite, H. A. McQueen *et al.*, 1995 The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa). Mamm Genome 6: 157-175.

Bartsch, O., U. Kuhnle, L. L. Wu, E. Schwinger und G. K. Hinkel, 1996 Evidence for a critical region for penoscrotal inversion, hypospadias, and imperforate anus within chromosomal region 13q32.2q34. Am J Med Genet 65: 218-221.

Berge, S., 1941 Three hereditary anomalies in pigs. Hereditas 27: 176-192.

Bickeböller, H., und F. Clerget-Darpoux, 1995 Statistical properties of the allelic and genotypic transmission/disequilibrium test for multiallelic markers. Genet Epidemiol 12: 865-870.

Bitoh, Y., T. Shimotake, Y. Kubota, O. Kimura und N. Iwai, 2001 Impaired distribution of retinoic acid receptors in the hindgut-tailgut region of murine embryos with anorectal malformations. J Pediatr Surg 36: 377-380.

BLT-Grub, 2000 Jahresbericht 1999 über Leistungsprüfungen und Zuchtwertschätzungen beim Schwein in Bayern April 2000, pp., Bayerische Landesanstalt für Tierzucht in Grub.

BLT-Grub, 2001 Jahresbericht 2000 über Leistungsprüfungen und Zuchtwertschätzungen beim Schwein in Bayern März 2001, pp., Bayerische Landesanstalt für Tierzucht in Grub.

BLT-Grub, 2002 Jahresbericht 2001 über Leistungsprüfungen und Zuchtwertschätzungen beim Schwein in Bayern April 2002, pp. BLT-Grub, Grub.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick und R. W. Davis, 1980 Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32: 314-331.

Brenner, B., B. Sanchez-Vega, S. M. Wu, N. Lanir, D. W. Stafford *et al.*, 1998 A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. Blood 92: 4554-4559.

Buiting, K. D., B; Gross, S; Lich C, Farber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Burger J, Nothen MM, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland AM, Halley DJ, Schrander-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalande M, Nicholls RD, Friend K, Horsthemke B, *et al.*, 1998 Sporadic imprinting defects in Prader-Willi-

syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 63: 170-180.

Campbell, E. M., S. C. Fahrenkrug, J. L. Vallet, T. P. Smith und G. A. Rohrer, 2001 An updated linkage and comparative map of porcine chromosome 18. Anim Genet 32: 375-379.

Chakraborty, R., M. De Andrade, S. P. Daiger und B. Budowle, 1992 Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. Ann Hum Genet 56: 45-57.

Chowdhary, B. P., T. Raudsepp, L. Fronicke und H. Scherthan, 1998 Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. Genome Res 8: 577-589.

Chuang, P. T., und A. P. McMahon, 1999 Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog- binding protein. Nature 397: 617-621.

Clerget-Darpoux, F., C. Bonaiti-Pellie und J. Hochez, 1986 Effects of misspecifying genetic parameters in lod score analysis. Biometrics 42: 393-399.

Danforth, C., 1930 Development anomalies in a special strain of mice. Am J Anat 2: 275-287.

de The, H., C. Chomienne, M. Lanotte, L. Degos und A. Dejean, 1990 The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. Nature 347: 558-561.

Dennis, S. M., und H. W. Leipold, 1972 Atresia ani in sheep. Vet Rec 91: 219-222.

Dickinson, S. J., 1967 Agenesis of the descending colon with imperforate anus. Correlation with modern concepts of the origin of intestinal atresia. Am J Surg 113: 279-281.

Dreyfuss, D. J., und E. P. Tulleners, 1989 Intestinal atresia in calves: 22 cases (1978-1988). J Am Vet Med Assoc 195: 508-513.

Dunn, N. R., G. E. Winnier, L. K. Hargett, J. J. Schrick, A. B. Fogo *et al.*, 1997 Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4. Dev Biol 188: 235-247.

Ellegren, H., 1995 Mutation rates at porcine microsatellite loci. Mamm Genome 6: 376-377.

Ellegren, H. C., B. P.; Johansson, M.;, 1994 A primary linkage map of the porcine genome reveals alow rate of genetic recombination. Genetics 137: 1089-1100.

Elston, R. C., 1998 Methods of linkage analysis--and the assumptions underlying them [see comment]. Am J Hum Genet 63: 931-934.

Gans, S. L., und N. B. Friedman, 1961 Some new concepts in the embryology, anatomy, physiology and surgical correction of imperforate anus. West J Surg Obstet Gynec 69: 34-39.

Garber, R. A., und J. W. Morris, 1983 General equation for the average power of exclusion for

genetic systems of n codominant alleles in one-parent and in noparent cases of disputed parentage. American Association of Blood Banks, Arlington, Virginia.

Gellin, J., S. Brown, J. A. Marshall Graves, M. Rothschild, L. Schook *et al.*, 2000 Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals. Mamm Genome 11: 140-144.

Gideon, L., 1977 Anal agenesis with rectourethral fistula in a colt (a case report). Vet Med Small Anim Clin 72: 238-240.

Gluecksohn-Schoenheimer, S., 1943 The morphological manifestation of a dominant mutation in mice affecting tail and urogential systems. Genetics 28: 341-348.

Götz, K. U., und L. Ollivier, 1992 Theoretical aspects of applying sib-pair linkage tests to livestock species. Génétique, Sélection et Évolution 24: 29-42.

Goureau, A., M. Vignoles, P. Pinton, J. Gellin und M. Yerle, 2000 Improvement of comparative map between porcine chromosomes 1 and 7 and human chromosomes 6, 14, and 15 by using human YACs. Mamm Genome 11: 796-799.

Goureau, A., M. Yerle, A. Schmitz, J. Riquet, D. Milan *et al.*, 1996 Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. Genomics 36: 252-262.

Gudbjartsson, D. F., K. Jonasson, M. L. Frigge und A. Kong, 2000 Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis [letter]. Nat Genet 25: 12-13.

Guo, X., und R. C. Elston, 2001 One-stage versus two-stage strategies for genome scans. Adv Genet 42: 459-471.

Hall, J., 1990 Genomic imprinting: review and relevance to human disease. Am J Hum Genet 46: 857-873.

Hall, J. G., P. D. Pallister, S. K. Clarren, J. B. Beckwith, F. W. Wiglesworth *et al.*, 1980 Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus and postaxial polydactyly--a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations. Am J Med Genet 7: 47-74.

Hamori, D., 1962 Über die Anlage für Brüche bei Schweinen. Zuchthygiene 6: 80-84.

Hassink, E. A., P. N. Rieu, B. C. Hamel, R. S. Severijnen, F. H. vd Staak *et al.*, 1996 Additional congenital defects in anorectal malformations. Eur J Pediatr 155: 477-482.

Hauser, E. R., M. Boehnke, S. W. Guo and N. Risch, 1996 Affected-sib-pair interval mapping and exclusion for complex genetic traits: sampling considerations. Genet Epidemiol 13: 117-137.

Henricson, B., 1963 Atresia ani beim Schwein. Acta vet Scand 4: 263-269.

Hernandez-Sanchez, J., D. Waddington, P. Wiener, C. S. Haley and J. L. Williams, 2002 Genome-wide search for markers associated with bovine spongiform encephalopathy. Mamm Genome 13: 164-168.

Hori, T., E. Giuffra, L. Andersson and H. Ohkawa, 2001 Mapping loci causing susceptibility to anal atresia in pigs, using a resource pedigree. J Pediatr Surg 36: 1370-1374.

Husberg, B., H. Lindahl, R. Rintala and B. Frenckner, 1992 High and intermediate imperforate anus: results after surgical correction with special respect to internal sphincter function. J Pediatr Surg 27: 185-188; discussion 188-189.

Jamieson, A., and S. C. Taylor, 1997 Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Anim Genet 28: 397-400.

Jamrog-Cendrzak, A., and E. Cendrzak, 1979 [Acute ischemia of lower extremities in imperforate anus]. Pol Tyg Lek 34: 145-146.

Kanno, H., I. Y. Huang, Y. W. Kan and A. Yoshida, 1989 Two structural genes on different chromosomes are required for encoding the major subunit of human red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase. Cell 58: 595-606.

Khoury, M. J., J. F. Cordero, F. Greenberg, L. M. James and J. D. Erickson, 1983 A population study of the VACTERL association: evidence for its etiologic heterogeneity. Pediatrics 71: 815-820.

Kimmel, S. G., R. Mo, C. C. Hui and P. C. Kim, 2000 New mouse models of congenital anorectal malformations. J Pediatr Surg 35: 227-230; discussion 230-221.

Kinzelbach, W., 1932 Untersuchungen über Atresia ani beim Schweine. Zschr f ind Abst- u Vererbungslehre 60: 84-124.

Kluth, D., M. Hillen and W. Lambrecht, 1995 The principles of normal and abnormal hindgut development. J Pediatr Surg 30: 1143-1147.

Kluth, D., and W. Lambrecht, 1997 Current concepts in the embryology of anorectal malformation. Seminars in Pediatric Surgery 6: 180-186.

Kondo, T., P. Dolle, J. Zakany and D. Duboule, 1996 Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter. Development 122: 2651-2659.

Koseki, H., J. Zachgo, Y. Mizutani, D. Simon-Chazottes, J. L. Guenet *et al.*, 1993 Fine genetic mapping of the proximal part of mouse chromosome 2 excludes Pax-8 as a candidate gene for Danforth' s short tail (Sd). Mamm Genome 4: 324-327.

Kruglyak, L., M. J. Daly, M. P. Reeve-Daly and E. S. Lander, 1996 Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. Am. J. Hum. Genet. 58: 1347-1363.

Kubota, Y., T. Shimotake and N. Iwai, 2000 Congenital anomalies in mice induced by etretinate. Eur J Pediatr Surg 10: 248-251.

Kuhnle, U., O. Bartsch, W. Werner and T. Schuster, 2000 Penoscrotal inversion, hypospadias, imperforate anus, facial anomalies, and developmental delay: definition of a new clinical syndrome. Pediatr Surg Int 16: 396-399.

Kuokkanen, S., M. Gschwend, J. D. Rioux, M. J. Daly, J. D. Terwilliger *et al.*, 1997 Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. Am J Hum Genet 61: 1379-1387.

Lahbib-Mansais, Y., A. Barbosa, M. Yerle, P. Parma, D. Milan *et al.*, 1997 Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19. Cytogenet Cell Genet 76: 109-114.

Lahbib-Mansais, Y., M. Yerle, P. Pinton and J. Gellin, 1996 Chromosomal localization of homeobox genes and associated markers on porcine chromosomes 3, 5, 12, 15, 16 and 18: comparative mapping study with human and mouse. Mamm Genome 7: 174-179.

Laitinen, T., M. J. Daly, J. D. Rioux, P. Kauppi, C. Laprise *et al.*, 2001 A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. Nat Genet 28: 87-91.

Lambrecht, W., D. Kluth and W. Lierse, 1989 [Epithelium and anal glands in rectal pouches and fistula. Histologic studies of swine with congenital anal atresia]. Z Kinderchir 44: 41-46.

Lambrecht, W., and W. Lierse, 1987 [Morphologic studies in swine with anal atresia]. Z Kinderchir 42: 350-351.

Lambrecht, W., T. Riebel and G. Weinland, 1986 [Vascular supply of the rectum in anal atresia. Angiography studies in newborn swine]. Z Kinderchir 41: 340-343.

Lander, E., and L. Kruglyak, 1995 Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genet 11: 241-247.

Lander, E. S., and P. Green, 1987 Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 2363-2367.

Lander, E. S., and N. J. Schork, 1994 Genetic dissection of complex traits [published erratum appears in Science 1994 Oct 21;266(5184):353]. Science 265: 2037-2048.

Lane, P. W., and C. S. Birkenmeier, 1993 Urogenital syndrome (us): a developmental mutation on chromosome 2 of the mouse. Mamm Genome 4: 481-484.

Lathrop, G. M., J. M. Lalouel, C. Julier und J. Ott, 1984 Strategies for multilocus linkage analysis in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 3443-3446.

Lathrop, G. M., und J. Ott, 1990 Analysis of complex diseases under oligogenic models and intrafamilial heterogeneity by the LINKAGE programs. Am J Hum Genet 47: A188.

Lee, J. H., W. Zhang und C. Moran, 2001 Comparative porcine gene mapping relative to human chromosomes 9, 10, 20 and 22. Anim Genet 32: 313-315.

Liang, P., und A. B. Pardee, 1992 Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971.

Lin, J. N., 1998 Anorectal malformations--update 1998. Changgeng Yi Xue Za Zhi 21: 237-250.

Lindgren, C. M., M. M. Mahtani, E. Widen, M. I. McCarthy, M. J. Daly *et al.*, 2002 Genomewide search for type 2 diabetes mellitus susceptibility loci in Finnish families: the Botnia study. Am J Hum Genet 70: 509-516.

LKV, 2002 Fleischleistungsprüfung in Bayern 2002 -Ergebnisse und Auswertung-, pp. 102. Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V., München.

Lubinsky, M., und J. Hall, 1991 Genomic imprinting. Lancet 337: 1288.

Lynch, S. A., P. M. Bond, A. J. Copp, W. O. Kirwan, S. Nour *et al.*, 1995 A gene for autosomal dominant sacral agenesis maps to the holoprosencephaly region at 7q36. Nat Genet 11: 93-95.

Mahboubi, S., und J. M. Templeton, Jr., 1984 Association of Hirschsprung's disease and imperforate anus in a patient with "cat-eye" syndrome. A report of one case and review of the literature. Pediatr Radiol 14: 441-442.

Marill, J., N. Idres, C. C. Capron, E. Nguyen und G. G. Chabot, 2003 Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. Curr Drug Metab 4: 1-10.

Marklund, L., J. T. Jeon und L. Andersson, 1998 Xenoduplex analysis--a method for comparative gene mapping using hybrid panels. Genome Res 8: 399-403.

Marklund, L., M. Johansson Moller, B. Hoyheim, W. Davies, M. Fredholm *et al.*, 1996 A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig-Large White intercross. Anim Genet 27: 255-269.

Marler, R. J., W. Baker, H. W. Leipold, J. E. Cook und S. M. Kruckenberg, 1977 Atresia ani and rectovaginal fistula in buffalo. J Am Vet Med Assoc 171: 988-989.

McAfee, L. T., und J. T. McAfee, 1976 Atresia ani in a dog. Vet Med Small Anim Clin 71: 624-627.

Mendelsohn, C., D. Lohnes, D. Decimo, T. Lufkin, M. LeMeur *et al.*, 1994 Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. Development 120: 2749-2771.

Menger, H., A. E. Lin, H. V. Toriello, G. Bernert und J. W. Spranger, 1997 Vitamin K deficiency embryopathy: a phenocopy of the warfarin embryopathy due to a disorder of embryonic vitamin K metabolism. Am J Med Genet 72: 129-134.

Mesrobian, H. G., R. P. Sessions, R. A. Lloyd und K. K. Sulik, 1994 Cloacal and urogenital abnormalities induced by etretinate in mice. J Urol 152: 675-678.

Monaco, A. P. K., L. M., 1987 A giant locus for the Duchenne and Becker muscular dystrophy
gene. Trends Genet 3: 33-37.

Morton, N. E., 1955 Sequential tests for the detection of linkage. 7: 277-318.

Niederreither, K., S. Abu-Abed, B. Schuhbaur, M. Petkovich, P. Chambon *et al.*, 2002a Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. Nat Genet 31: 84-88.

Niederreither, K., V. Fraulob, J. M. Garnier, P. Chambon und P. Dolle, 2002b Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. Mech Dev 110: 165-171.

Nievelstein, R. A., J. F. van der Werff, F. J. Verbeek, J. Valk und C. Vermeij-Keers, 1998 Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in human embryos. Teratology 57: 70-78.

Norrish, J. G., und J. C. Rennie, 1968 Observations on the inheritance of atresia ani in swine. J Hered 59: 186-187.

Oldak, M., T. Grzela, M. Lazarczyk, J. Malejczyk und P. Skopinski, 2001 Clinical aspects of disrupted Hedgehog signaling (Review). Int J Mol Med 8: 445-452.

Olson, J. M., 1995 Multipoint linkage analysis using sib pairs: an interval mapping approach for dichotomous outcomes. Am J Hum Genet 56: 788-798.

Ott, J., 1999 *Human Genetic Linkage*. The John Hopkins University Press, Baltimore and London.

Padmanabhan, R., 1998 Retinoic acid-induced caudal regression syndrome in the mouse fetus. Reprod Toxicol 12: 139-151.

Pitera, J. E., V. V. Smith, A. S. Woolf und P. J. Milla, 2001 Embryonic gut anomalies in a mouse model of retinoic Acid-induced caudal regression syndrome: delayed gut looping, rudimentary cecum, and anorectal anomalies. Am J Pathol 159: 2321-2329.

Ramalho-Santos, M., D. A. Melton und A. P. McMahon, 2000 Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. Development 127: 2763-2772.

Reik, W., and J. Walter, 2001 Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat Rev Genet 2: 21-32.

Risch, N., 1990a Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. Am J Hum Genet 46: 222-228.

Risch, N., 1990b Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs. Am J Hum Genet 46: 242-253.

Roberts, D. J., R. L. Johnson, A. C. Burke, C. E. Nelson, B. A. Morgan *et al.*, 1995 Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. Development 121: 3163-3174.

Roberts, D. J., D. M. Smith, D. J. Goff und C. J. Tabin, 1998 Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. Development 125: 2791-2801.

Rohrer, G. A., L. J. Alexander, Z. Hu, T. P. Smith, J. W. Keele *et al.*, 1996 A comprehensive map of the porcine genome. Genome Res 6: 371-391.

Rohrer, G. A., L. J. Alexander, J. W. Keele, T. P. Smith und C. W. Beattie, 1994 A microsatellite linkage map of the porcine genome. Genetics 136: 231-245.

Rüsse, I., und F. Sinowatz, 1991 *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Sakiyama, J., Y. Yokouchi und A. Kuroiwa, 2001 HoxA and HoxB cluster genes subdivide the digestive tract into morphological domains during chick development. Mech Dev 101: 233-236.

Schena, M., 1996 Genome analysis with gene expression microarrays. Bioessays 18: 427-431.

Seri, M., G. Martucciello, L. Paleari, A. Bolino, M. Priolo *et al.*, 1999 Exclusion of the Sonic Hedgehog gene as responsible for Currarino syndrome and anorectal malformations with sacral hypodevelopment. Hum Genet 104: 108-110.

Shannon, C. E., 1948 A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal 27: 379-423, 623-656.

Shaul, W. L., H. Emery und J. G. Hall, 1975 Chondrodysplasia punctata and maternal warfarin use during pregnancy. Am J Dis Child 129: 360-362.

Shi, X. W., C. J. Fitzsimmons, C. Genet, R. Prather, K. Whitworth *et al.*, 2001 Radiation hybrid comparative mapping between human chromosome 17 and porcine chromosome 12 demonstrates conservation of gene order. Anim Genet 32: 205-209.

Snedecor, G. W., und W. G. Cochran (Editors), 1980 *Statistical Methodes*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Spielman, R. S., und W. J. Ewens, 1996 The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association [editorial]. Am J Hum Genet 59: 983-989.

Spielman, R. S., R. E. McGinnis und W. J. Ewens, 1993 Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet 52: 506-516.

Steinbach, P., und H. Rehder, 1987 Tetrasomy for the short arm of chromosome 12 with accessory isochromosome (+i(12p] and a marked LDH-B gene dosage effect. Clin Genet 32: 1-4.

Stigler, J., O. Distl, B. Kruff und H. Kräusslich, 1991 Segregationsanalyse von Erbfehlern beim Schwein. Züchtungskunde 63: 294-304.

Stoll, C., Y. Alembik, M. P. Roth und B. Dott, 1997 Risk factors in congenital anal atresias.

Ann Genet 40: 197-204.

Strauch, K., R. Fimmers, T. Kurz, K. A. Deichmann, T. F. Wienker *et al.*, 2000 Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis with imprinting and two-locus-trait models: application to mite sensitization. Am J Hum Genet 66: 1945-1957.

Suarez, B. K., J. Rice und T. Reich, 1978 The generalized sib pair IBD distribution: its use in the detection of linkage. Ann Hum Genet 42: 87-94.

Suess, R. P., Jr., R. A. Martin, M. L. Moon und M. J. Dallman, 1992 Rectovaginal fistula with atresia ani in three kittens. Cornell Vet 82: 141-153.

Takano, T., Y. Yamanouchi, Y. Mori, S. Kudo, T. Nakayama *et al.*, 1997 Interstitial deletion of chromosome 1q [del(1)(q24q25.3)] identified by fluorescence in situ hybridization and gene dosage analysis of apolipoprotein A-II, coagulation factor V, and antithrombin III. Am J Med Genet 68: 207-210.

Thaller, G., 1992 Komplexe Segregationsanalyse zum Nachweis von Hauptgenen bei dichotomen Merkmalen am Beispiel der Anomalien des Schweins, pp. TUM-Weihenstephan, Dissertation.

Thomsen, P. D., und N. S. Zhdanova, 1995 Reverse painting for identification of pig chromosomes in hybrid cell lines: assignment of the HOXB and the TK1 gene to pig chromosome 12p. Mamm Genome 6: 670-672.

Tibboel, D., C. J. van Nie and J. C. Molenaar, 1980 The effects of temporary general hypoxia and local ischemia on the development of the intestines: an experimental study. J Pediatr Surg 15: 57-62.

Townes, P. L., und E. R. Brocks, 1972 Hereditary syndrome of imperforate anus with hand, foot, and ear anomalies. J Pediatr 81: 321-326.

Triebler, G., 1984 Zur Erbfehlerproblematik beim Schwein. Wiss Z Humb Univ 33: 507-510.

Tsui, L.-C. B., K.; Buchwald, M.;, 1986 Genetic analysis of cystic fibrosis using linked DNA markers. Am. J. Hum. Genet. 39: 720-728.

Unluer, E., und F. Bulut, 1991 Sacral agenesis with imperforate anus and its late complication: neuropathic bladder. Int Urol Nephrol 23: 341-343.

Valentijn, L. J., P. A. Bolhuis, I. Zorn, J. E. Hoogendijk, N. van den Bosch *et al.*, 1992 The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie- Tooth disease type 1A. Nat Genet 1: 166-170.

van der Putte, S. C., 1986 Normal and abnormal development of the anorectum. J Pediatr Surg 21: 434-440.

Vance, J. M., G. A. Nicholson, L. H. Yamaoka, J. Stajich, C. S. Stewart *et al.*, 1989 Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a to chromosome 17. Exp Neurol 104: 186-189.

Vogt, D. W., 1967 Chromosome condition of two atresia ani pigs. J Anim Sci 26: 1002-1004.

Whittemore, A. S., und J. Halpern, 1994 A class of tests for linkage using affected pedigree members. Biometrics 50: 118-127.

Wintero, A. K., M. Fredholm und P. D. Thomsen, 1992 Variable (dG-dT)n.(dC-dA)n sequences in the porcine genome. Genomics 12: 281-288.

Zeller, R., A. G. Haramis, A. Zuniga, C. McGuigan, R. Dono *et al.*, 1999 Formin defines a large family of morphoregulatory genes and functions in establishment of the polarising region. Cell Tissue Res 296: 85-93.

Zhao, C., J. Takita, Y. Tanaka, M. Setou, T. Nakagawa *et al.*, 2001 Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. Cell 105: 587-597.

Zuniga, A., A. P. Haramis, A. P. McMahon and R. Zeller, 1999 Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. Nature 401: 598-602.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Sabine Elisabeth Wiedemann
Geburtsdatum:	11.06.1971 in München
SCHULAUSBILDUNG	
1977-81	Grundschule an der Rothpletzstraße in München
1981-91	Lion–Feuchtwanger-Gymnasium
1991	Schulabschluß: Abitur
STUDIUM UND PRAKTIK	XA:
1991-1998	TU-München Weihenstephan Freising
	Studienfach: Agrarwissenschaften
	Hauptfach:Tierwissenschaften
05/1994-11/1994	landwirtschaftliches Praktikum
	auf dem Betrieb von Herrn Martin Wiesheu in München
11/1994-05/1995	landwirtschaftliches Praktikum
	auf dem Lehr – und Versuchsgut der LMU-München
	in Oberschleißheim
08/1996-12/1996	Auslandspraktika in den USA:
	landwirtschaftliches Praktikum auf dem Betrieb der Familie Dawley in Red Bluff Kalifornien
08/1998	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Tierzucht der TU-München
	in Weihenstephan
	Thema: Darstellung verschiedener Varianten des <i>PITT</i> - Gens bei bayerischen Rinderrassen
	Abschluß: Diplom-Agraringenieurin Univ.
BERUFSTÄTIGKEIT:	
09/1998-02/2002	Doktorandin am Lehrstuhl für Tierzucht der TU-München
	Thema: Identifizierung von Genomregionen, die für Analatresien des Schweines prädestinieren
seit 03/2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Tierzucht der
	TU-München Projekt: BSE genomics-Extended candidate gene analysis
	j oz Benomies znenesa canarance gene analysis