

FUGATO-Verbundprojekt »IRAS«



**Entwicklung von genetischen Markern zur Infektabwehr
und Resistenz im Atemtrakt des Schweins**

Thomas Rehm und Gerald-F. Gerlach

Atemwegserkrankungen beim Schwein – nicht nur ein Haltungproblem

Atemwegserkrankungen stellen ein erhebliches wirtschaftliches Problem in der Schweineproduktion dar; sie zählen zu den häufigsten Erkrankungen beim Schwein und sind ursächlich für einen erheblichen Anteil der antibiotischen Behandlungen von Mastschweinen. Somit sind Atemwegserkrankungen des Schweins mit Hinblick auf die Problematik bakterieller Antibiotikaresistenz (Ungemach *et al.* 2006) auch unter Gesichtspunkten des gesundheitlichen Verbraucherschutzes von erheblicher Bedeutung.

Die bedeutsamsten Erreger von Atemwegsinfektionen sind *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* und Influenzaviren. Alle diese Erreger sind in der Schweinepopulation weit verbreitet; sie werden durch asymptomatisch infizierte Trägartiere von Bestand zu Bestand verschleppt und innerhalb des Bestandes aerogen von Tier zu Tier übertragen; dadurch ist die Schaffung spezifiziert pathogenfreier (SPF)-Bestände nur bei strikter Isolierung zu erreichen und in der Praxis nur sehr vereinzelt durchführbar. Auch ein Schutz der Tiere durch Vakzination ist nur teilweise möglich, da

die Impfstoffe zwar die klinischen Erscheinungen mildern aber eine Besiedlung der Tiere (und damit das Entstehen von Trägartieren) nicht verhindern (Fenwick 2004). Außerdem führen regelmäßige Impfungen zu einer Erhöhung der Produktionskosten.

Eine züchterische Selektion auf eine verminderte Anfälligkeit gegenüber Erregern von Atemwegserkrankungen wird bisher nicht durchgeführt. Der Hauptgrund dafür ist im Fehlen von genetischen Markern begründet, die eine gezielte Selektion auf verbesserte Infektabwehr und Resistenz ermöglichen (Visscher *et al.* 2002).

Experimenteller Ansatz in IRAS

Das IRAS-Konsortium (Abb. 1) hat sich zum Ziel gesetzt, genetische Marker zu identifizieren, die eine Selektion von Schweinen auf eine erhöhte Resistenz hin ermöglichen. Dabei wird die experimentelle Infektion von Schweinen mit *A. pleuropneumoniae* als relevantes Modell benutzt, um mit zwei komplementären Ansätzen Kandidatengene zu identifizieren, die die Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen des Atemtraktes verbessern (Abb. 2).

1. „Phänotypisch-genetischer“ Ansatz: Sechs bis acht Wochen alte Tiere einer definier-

ten Schweinelinie (Deutsche Landrasse) werden in einem etablierten Modell experimentell mit einem *A. pleuropneumoniae*-haltigen Aero-

Beteiligte Forschungseinrichtungen Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover <ul style="list-style-type: none">• Institut für Mikrobiologie (Gerlach, Valentin-Weigand)• Klinik für Kleine Käuertiere (Waldmann)• Institut für Physiologische Chemie (Naim)• Institut für Tierzucht (Leob) Medizinische Hochschule Hannover <ul style="list-style-type: none">• Institut für Anatomie (Fabel)• Kinderklinik (Tummler) Universität Magdeburg <ul style="list-style-type: none">• Institut für Anatomie (Rothkötter) Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung <ul style="list-style-type: none">• Sektion für Genomanalyse (Singh, Blocker) Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik <ul style="list-style-type: none">• Abteilung für Vertebraten Genomic (Herwig)
Beteiligte Unternehmen RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Radefo) IVD Gesellschaft für Innovative Veterinärmedizin mbH (Strutzberg-Minder) LIONEX Diagnostics & Therapeutics GmbH (Spatek)
Wirtschaftspartner FBF Förderverein Biotechnologieforschung e.V.
<small>© Tasso Leob hat einen Ruf an die Universität Bonn angenommen, ist aber weiterhin an IRAS beteiligt.</small>

Abb. 1: Das IRAS-Konsortium

sol infiziert (Hennig-Pauka *et al.* 2006). In der Woche vor sowie bis zu drei Wochen nach der Infektion erfolgt bei allen Tieren eine umfangreiche klinische Diagnostik (Abb. 3A) unter Einbeziehung der Entnahme von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF; Abb. 3B) eine Woche vor der Infektion sowie vor der Euthanasie sowie von Ultraschall- und Röntgen- daten. Nach Infektion in der Aerosolkammer (Abb. 3C) wird die eine Hälfte der Tiere am Ende der akuten Infektionsphase (Tag 4 nach Infektion), die andere Hälfte in der Rekonvaleszenz (Tag 21 nach Infektion; Trägartiere) euthanasiert und sezziert, um eine detaillierte Erhebung des Umfangs der Lungenveränderungen (Abb. 3D) und der bakteriellen Besiedlung vorzunehmen. Bei der Sektion wird Gewebe aus Lunge, Lungenlymphknoten und Leber für eine nachfolgende RNA-Präparation entnommen. Von jeweils vier Tieren in den extremen Quartilen werden Microarray-Analysen (Affymetrix Chip) durchgeführt. Aus der BALF werden die für die Immunantwort wichtigen Zellen (Alveolarmakrophagen, dendritische Zellen) isoliert und vergleichend funktionell charakterisiert. Die zellfreie BALF wird in der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht; differentiell exprimierte Proteine werden aus dem Gel extrahiert und massenspektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der klinischen und pathologischen Untersuchung führen zusammen mit den Ergebnissen der RNA-, Protein-, und immunologischen Untersuchungen zu einer sehr detaillierten Beschreibung des Phänotyps.

2. „Homolog-genetischer“ Ansatz: Etwa 100 Gene, die bei Maus und Mensch bedeutsam für die angeborene oder erworbene Immunantwort sind, werden nach ihrer potentiellen Bedeutung gereiht. Abschnitte des Schweinegenoms, die diese Gene enthalten, werden in Form von sogenannten „bacterial artificial chromosomes“ (BACs) über Datenbankrecherchen und bioinformatische Analysen identifiziert. Die BACs werden sequenziert, um sicherzustellen, dass sie das fragliche Gen enthalten und um geeignete genetische Marker (Mikrosatelliten und „single nucleotide polymorphisms“ (SNP)) zu identifizieren. Parallel wird ein Schweine-DNA-Archiv aufgebaut, welches DNA-Proben verschiedener Rassen enthält. Dieses Archiv wird in Bezug auf die den identifizierten genetischen Markern untersucht, um unterschiedliche Allele und ihre Verteilung zu bestimmen. Anschließend werden die Versuchstiere mit Bezug auf die Allelverteilung der

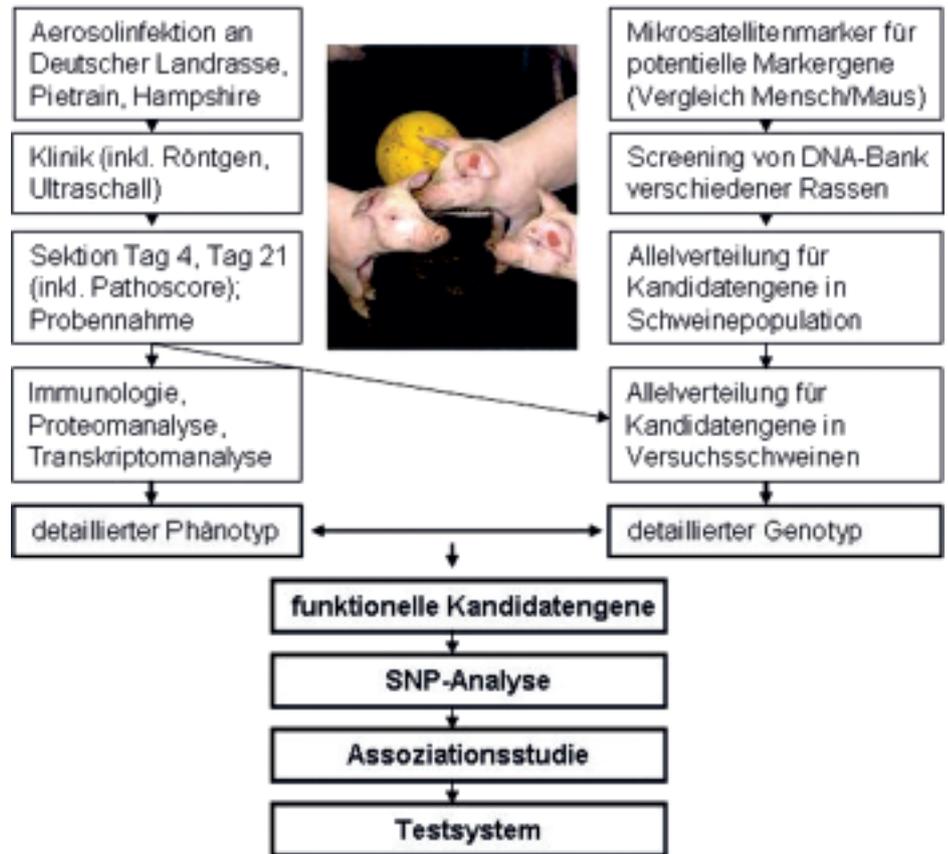


Abb. 2: Experimenteller Ansatz in IRAS

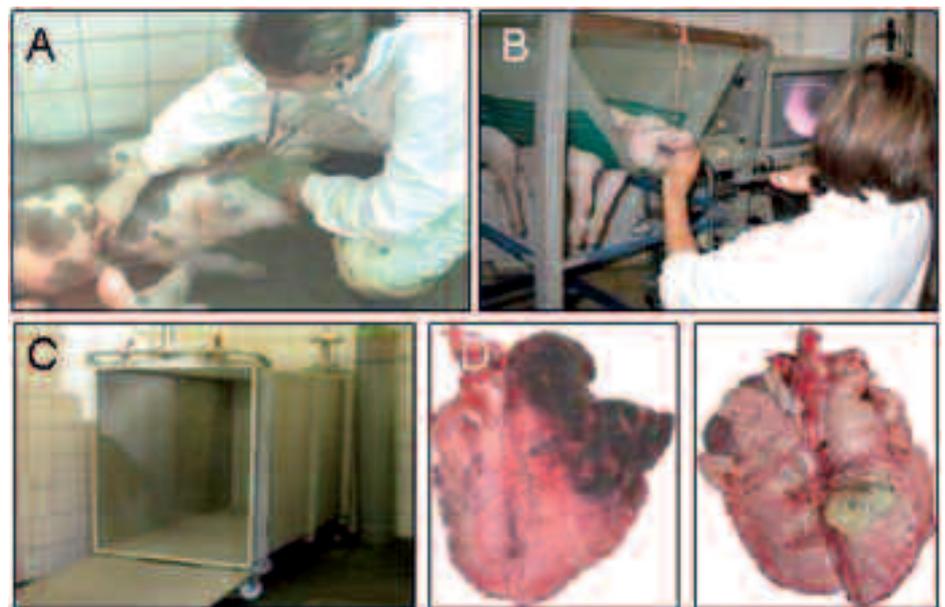


Abb. 3: Versuchsablauf mit (A) täglicher klinischer Untersuchung der Schweine nach Konditionierung über 3 Wochen (B), Entnahme von BALF, (C) Aerosolkammer für die Belastung, (D) Lungenveränderungen bei der Sektion 4 Tage (li) und 21 Tage nach Belastung (re)

Kandidatengene untersucht.

Identifizierung funktioneller Kandidatengene und zukünftige Nutzung

Gene, deren Allelverteilung mit dem Schweregrad der klinischen Erkrankung korreliert, stellen funktionelle Kandidatengene dar. Diese Gene sollen nachfolgend einer SNP-Analyse unterzogen werden und es sollen zusätzliche Assoziationsstudien durchgeführt werden. Ein vergleichbarer Ansatz mit wenigen eng verwandten Individuen mit hoch konkordantem oder diskordantem Phänotyp ist in der Vergangenheit erfolgreich zur Identifizierung von Genen eingesetzt worden, die den klinischen Schweregrad der Zystischen Fibrose modulieren (Mekus *et al.* 2003).

Identifizierte SNPs, die mit dem klinischen Bild der Atemwegsinfektion korreliert sind,

können dann zur Entwicklung von einfachen DNA-basierten Testsystemen genutzt werden, die erstmals eine auf erhöhte Resistenz gegen Atemwegsinfektionen ausgerichtete züchterische Selektion ermöglichen würden.

Referenzen

- Fenwick B. Relationship between vaccination and management in assuring profitable pork production. *Anim Health Res Rev* 2004, 5:267-269
- Hennig-Pauka I, Jacobsen ID, Blecha F, Waldmann KH, Gerlach GF. Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vet Res* 2006, 37:75-87
- Mekus F, Laabs U, Veeze H, Tümmler B. Genes in the vicinity of CFTR modulate the cystic fibrosis phenotype in highly concordant or discordant F508del homozygous sib pairs. *Hum Genet* 2003,

112:1-11

- Ungemach FR, Müller-Bahr D, Abraham G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2006, 296:33-38
- Visscher AH, Janss LL, Niewold TA, de Greef KH. Disease incidence and immunological traits for the selection of healthy pigs. A review. *Vet Q* 2002, 24:28-34

Kontakt

Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach
Institut für Mikrobiologie, Stiftung
Tierärztliche Hochschule Hannover
E-Mail: gfgerlach@gmx.de