

Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim
Fachgebiet Tiergenetik und Züchtung
Prof. Dr. Jörn Bennewitz

**Analyse komplexer Merkmale beim Schwein
mittels SNP-Chip Genotypen,
Darmmikrobiota- und Genexpressionsdaten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades in den Agrarwissenschaften

vorgelegt von

MARIA MAUSHAMMER
aus Dingolfing

Hohenheim, 2017

Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim
Fachgebiet Tiergenetik und Züchtung
Prof. Dr. Jörn Bennewitz

**Analyse komplexer Merkmale beim Schwein
mittels SNP-Chip Genotypen,
Darmmikrobiota- und Genexpressionsdaten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades in den Agrarwissenschaften

vorgelegt von

MARIA MAUSHAMMER
aus Dingolfing

Hohenheim, 2017

Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2017
Leiter der Prüfung:	Prof. Dr. Markus Rodehutscord
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. Jörn Bennewitz
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. Jens Tetens
3. Prüferin:	Jun.-Prof. Dr. Jana Seifert

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Summary	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	8
2 Genetische und mikrobielle Analysen komplexer Leistungsmerkmale	10
2.1 Literatur	10
2.1.1 Struktur und Funktion der Darmmikrobiota	10
2.1.2 Einflussfaktoren auf die mikrobielle Gemeinschaft im Darm.....	12
2.2 Material und Methoden	15
2.2.1 Datenerhebung.....	15
2.2.2 Statistische Auswertung	16
2.3 Ergebnisse	22
2.3.1 Mikrobielle Zusammensetzung des Schweinedarms.....	22
2.3.2 Genomweite Assoziationsanalyse für bakterielle Genera	24
2.3.3 Heritabilitäten bzw. Microbiabilities für Leistungsmerkmale und Ergebnisse der mikrobiellen und genomischen Vorhersagen	26
2.4 Diskussion	28
3 Strukturelle und funktionelle genomische Analysen von Fleischqualitätsmerkmalen.....	32
3.1 Literatur	32
3.1.1 Merkmale der Fleischqualität	32
3.1.2 Funktionelle Genannotation	36
3.2 Material und Methoden	37
3.2.1 Datenerhebung.....	37
3.2.2 Statistische Auswertung	39
3.3 Ergebnisse	41
3.3.1 Differentielle Genexpression und funktionelle Annotation	41
3.3.2 Verknüpfung von funktionellen Annotationen und GWAS	43
3.4 Diskussion	46

4	Allgemeine Diskussion.....	49
	Abbildungsverzeichnis	53
	Tabellenverzeichnis	54
	Literaturverzeichnis.....	56
	Anhang	69
	Danksagung	84
	Curriculum Vitae	85
	Eidesstattliche Erklärung	86

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden SNP-Chip Genotypen, Darmmikrobiota- und Genexpressionsdaten zur Analyse komplexer Merkmale in einer Piétrainpopulation verwendet. Diese Daten wurden von ca. 200 leistungsgeprüften Sauen erhoben und für genetische und mikrobielle Analysen komplexer Merkmale bzw. für strukturelle und funktionelle genomische Analysen von Fleischqualitätsmerkmalen genutzt.

Die Darmmikrobiota sind eine wichtige Komponente der Wirtsphysiologie und sind an der Entwicklung des Immunsystems, dem Gesundheitszustand und der Energieversorgung des Wirtes beteiligt. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung im Darm, Wachstumsmerkmalen (tägliche Zunahme, Futtermittelverwertung, Futtermittelverzehr) und dem Schweinegenom wurden quantitativ-genetische Methoden angewendet. Die Ziele hierbei waren es, die bakterielle Zusammensetzung im Darm zu beschreiben, den Effekt der Wirtsgenetik auf die mikrobielle Zusammensetzung zu analysieren und den Einfluss der Darmmikrobiota auf Wachstumsmerkmale zu untersuchen. Die Tiere wurden mit einem 60K SNP-Chip genotypisiert und die mikrobielle Zusammensetzung im Darm mittels 16S rRNA Amplikon-Sequenzierung analysiert. Zehn von insgesamt 51 untersuchten bakteriellen Genera zeigten eine Heritabilität zwischen 0,32 und 0,57. Mittels genomweiter Assoziationsanalysen wurden Marker auf dem porcinen Genom kartiert, welche eine Assoziation zu einzelnen bakteriellen Genera zeigen. Insgesamt waren 22 SNPs mit 6 bakteriellen Genera assoziiert. Die identifizierten potentiellen Kandidatengene sind vor allem an der Immunabwehr, der Mukosastruktur und an der Sezernierung von Verdauungssäften beteiligt sind. Dies zeigt, dass Teile der mikrobiellen Strukturen erblich sind und die Darmmikroben als quantitatives Merkmal betrachtet werden können. Mikrobielle gemischte lineare Modelle wurden zur Schätzung der mikrobiellen Varianz für die Merkmale tägliche Zunahme, Futtermittelverwertung und Futtermittelverzehr angewendet. Der Anteil der mikrobiellen Varianz an der phänotypischen Varianz für tägliche Zunahme lag bei 0,28, für Futtermittelverwertung bei 0,21 und für Futtermittelverzehr bei 0,16. Zur Vorhersage der komplexen Merkmale wurden „Genomic Best Linear Unbiased Predictions“ (G-BLUP) und „Microbial Best Linear Unbiased Predictions“ (M-BLUP) durchgeführt. Die Genauigkeiten der M-BLUP (bzw. G-BLUP) war 0,41 (bzw. 0,35) für tägliche Zunahme, 0,33 (bzw. 0,23) für Futtermittelverwertung und 0,33 (bzw. 0,20) für Futtermittelverzehr. Die Darmmikroben können somit auch als erklärende Variable für komplexe Merkmale, wie tägliche Zunahme, Futtermittelverwertung und Futtermittelverzehr, betrachtet werden.

Des Weiteren wurden Transkriptspiegel von Muskelgewebe zum Zeitpunkt der Schlachtung in Kombination mit Fleischqualitätsmerkmalen untersucht. Diese Studie sollte einen Einblick in

biologischen Prozesse geben, welche die Fleischqualität beeinflussen. Die Ziele waren es, differentiell exprimierte Gene funktionell zu charakterisieren, die funktionellen und strukturellen Genominformationen zu verknüpfen und basierend auf diesen Ergebnissen potentielle Kandidatengene zu identifizieren. Ein wichtiges Merkmal der Fleischqualität ist der intramuskuläre Fettgehalt, da dieser die Saftigkeit, den Geschmack und die Zartheit des Fleisches beeinflusst, sowie der Tropfsaftverlust, da er nicht nur einen Gewichtsverlust, sondern auch ein Verlust an wertvollen Proteinen darstellt. Beide Merkmale nehmen Einfluss auf die Verbraucherakzeptanz von Frischfleischprodukten. Aus dem vorliegenden Tiermaterial wurden für die Merkmale intramuskulärer Fettgehalt und Tropfsaftverlust je acht diskordante Geschwisterpaare für differentielle Expressionsmessungen ausgewählt. Für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt (bzw. Tropfsaftverlust) wurden 35 (bzw. 114) differentiell exprimierte und merkmalskorrelierte Gene ermittelt. Anhand von funktioneller Annotation wurden insbesondere Gengruppen, welche dem Energiestoffwechsel der Mitochondrien, der Immunantwort und dem Fettstoffwechsel angehören, mit intramuskulärem Fettgehalt assoziiert. Mit dem Merkmal Tropfsaftverlust wurden Gengruppen, welche der Ubiquitinierung von Proteinen, dem mitochondrialen Stoffwechsel und den Strukturproteinen des Muskels angehören, in Verbindung gebracht. Außerdem wurden für diese Merkmale genomweite Assoziationsanalysen durchgeführt und deren Ergebnisse mittels funktioneller Annotation mit den genomweiten Expressionsmessung verknüpft. In diesem Zusammenhang wurden für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt Prozesse der Muskelkontraktion, des Transmembrantransports und der Nukleotidbindungen identifiziert. Das Merkmal Tropfsaftverlust wurde über das Endomembransystem, die Energiegewinnung der Zellen und über Stoffwechselprozesse von Phosphor charakterisiert. Abschließend wurden für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt (bzw. Tropfsaftverlust) drei (bzw. vier) potentielle Kandidatengene identifiziert.

Summary

In the present scientific research, SNP chip genotypes, gut microbiota and gene expression data were used for analysing complex traits in a Piétrain population. These data were collected from around 200 performance tested sows and were used for genetic and microbial analyses of complex trait as well as for structural and functional meat quality traits.

The gut microbiome plays a major role in the immune system development, state of health and energy supply of the host. Quantitative-genetic methods were applied to analyse the interrelationship between pig gut microbiota compositions, complex traits (daily gain, feed conversion and feed intake) and pig genomes. The specific aims were to characterize the gut microbiota of the pigs, to analyse the effects of host genetics on gut microbial composition, and to investigate the role of gut microbial composition on the host's complex traits. The pigs were genotyped with a standard 60K SNP chip. Microbial composition was characterized by 16S rRNA gene amplicon sequencing technology. Ten out of 51 investigated bacterial genera showed a significant host heritability, ranging from 0.32 to 0.57. Conducting genome wide association analysis showed associations of 22 SNPs and six bacterial genera. The potential candidate genes identified are involved in the immune system, mucosa structure and secretion of digestive juice. These results show, that parts of the gut microbiota are heritable and that the gut microbiome can be seen as quantitative trait. Microbial mixed linear models were applied to estimate the microbiota variance for each of the investigated traits. The fraction of phenotypic variance explained by the microbial variance was 0.28, 0.21, and 0.16 for daily gain, feed conversion, and feed intake, respectively. The SNP data and the microbiota data were used to predict the phenotypes of the traits using both, genomic best linear unbiased prediction (G-BLUP) and microbial best linear unbiased prediction (M-BLUP) methods. The prediction accuracies of G-BLUP were 0.35, 0.23, and 0.20 for daily gain, feed conversion, and feed intake, respectively. The corresponding prediction accuracies of M-BLUP were 0.41, 0.33, and 0.33. Thus, the gut microbiota can be seen as an explaining variable for complex traits like daily gain, feed conversion and feed intake.

In addition, in combination with meat quality traits, transcript levels of muscle tissue were analysed at time of slaughtering. This study should give an insight into the biological processes involved in meat quality characteristics. The aims were to functionally characterise differentially expressed genes, to link the functional information with structural information obtained from GWAS, and to identify potential candidate genes based on these results. An important meat quality trait is the intramuscular fat content, since it affects the juiciness, the taste and the tenderness of the meat. Another important trait is drip loss which causes not only a loss of weight but also a loss of important proteins. Both traits have an impact on the consumer

acceptance of fresh meat products. For each of the two traits, eight discordant sibling pairs were selected out of the Piétrain sample and were used for genome-wide gene expression analyses. Thirty five and 114 genes were identified as differentially expressed and trait correlated genes for intramuscular fat content and drip loss, respectively. On the basis of functional annotation, gene groups belonging to the energy metabolism of the mitochondria, the immune response and the metabolism of fat, were associated with intramuscular fat content. Gene groups associated with protein ubiquitination, mitochondrial metabolism, and muscle structural proteins were associated with drip loss. Furthermore, genome-wide association analyses were carried out for these traits and their results were linked to the genome-wide expression analysis by functional annotation. In this context, intramuscular fat was related to muscle contraction, transmembrane transport and nucleotide binding. Drip loss was characterized by the endomembrane system, the energy generation of cells, and phosphorus metabolic processes. Three and four potential candidate genes were identified for intramuscular fat content and drip loss, respectively.

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cM	Centimorgan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDR	False Discovery Rate
FUV	Futtermwertung
FVZ	Futterverzehr in Kilogramm
G-BLUP	Genomic Best Linear Unbiased Prediction
GO	Gen Ontologie
GWAS	genomweite Assoziationsanalysen
IMF	Intramuskulärer Fettgehalt
K	Tausend
LD	Kopplungsungleichgewicht
MB	Megabasenpaare
M-BLUP	Microbial Best Linear Prediction
MHC bzw. SLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHS	Maligne Hyperthermie Syndrom
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QTL	Quantitative Trait Locus
SSC	Sus Scrofa
TSV	Tropfsaftverlust
TZ	tägliche Zunahmen in Gramm
WPPA	Window Posterior Probability of Association

1 Einleitung

In den letzten drei Jahrzehnten wurde in den Schweinezuchtprogrammen eine Verbesserung des Wachstums, der Bemuskulung und der Fleischqualität der Vaterrassen angestrebt. Eine der am häufigsten eingesetzten Vaterrassen in Deutschland ist die aus Belgien stammende Rasse Piétrain. Es wird angenommen, dass diese aus Kreuzungen der französischen Rasse Bayeux und den englischen Rassen Berkshire bzw. Yorkshire entstanden ist. Die Rasse Piétrain zeichnet sich durch ein gutes Wachstum und eine starke Bemuskulung aus. Aufgrund der starken Selektion auf Bemuskulung, kam es in dieser Rasse zu einer Akkumulation von Genvarianten, die sich negativ auf die Fleischqualität auswirken (Fujii *et al.*, 1991). Wachstumsmerkmale besitzen eine hohe wirtschaftliche Relevanz, da durch gute Zunahmen und eine gute Futterverwertung Kosten in der Tierhaltung gesenkt werden können. Auf der Seite der Konsumenten ist die Fleischqualität von großer Bedeutung. Ein wichtiges Merkmal der Fleischqualität ist der intramuskuläre Fettgehalt, da dieser die Saftigkeit, den Geschmack und die Zartheit des Fleisches beeinflusst, genauso wie der Tropfsaftverlust, da dieser nicht nur einen Gewichtsverlust, sondern auch ein Verlust an wertvollen Proteinen darstellt. Beide Merkmale nehmen Einfluss auf die Verbraucherakzeptanz von Frischfleischprodukten.

Mit der Einführung von Next-Generation-Sequenzierungstechnologien kam es zu einem Wandel in der Tierzucht. Als Nebenprodukt der Genomsequenzierungsprojekte wurden dichte Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) -Markerkarten verfügbar. Es wurden kostengünstige SNP-Chip Technologien entwickelt, die eine preiswerte Genotypisierung von mehreren Tausend SNPs in den Nutztierpopulationen ermöglichten. Außerdem wurde eine statistische Methode zur Schätzung von Zuchtwerten, die auf den genannten SNP-Daten basiert, eingeführt (Meuwissen *et al.*, 2001). Diese Entwicklungen bildeten den Grundstein für die Einführung der genomischen Selektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Mittlerweile ist die genomische Selektion in den meisten Nutztierarten, sowie in der Piétrainpopulation etabliert (Stratz *et al.*, 2014a). Die SNP-Chip Genotypisierung ermöglicht zudem, genomweite Assoziationsanalysen (GWAS) durchzuführen. Damit können genomische Varianten, welche Anteile der phänotypischen Varianz erklären, identifiziert werden. Anhand von GWAS war es bereits möglich tausende von merkmalsassoziierten genomischen Varianten bzw. quantitative Merkmalsgenorte (Quantitative Trait Loci, QTL) für komplexe Leistungsmerkmale zu identifizieren. So führten Stratz *et al.* (2014b) eine genomweite Assoziationsanalyse für Wachstums- und Fleischqualitätsmerkmale in einer segregierenden Piétrainpopulation durch, die eine Kartierung einiger merkmalsassoziierte SNPs ermöglichte.

Seit der Einführung von Next-Generation-Sequenzierungsmethoden ist es außerdem möglich das gesamte Mikrobiom eines Ökosystems, unabhängig von Kultivierungsmethoden, zu charakterisieren. Somit bietet sich nun die Möglichkeit, „unkultivierbare“ Mikroorganismen

anhand von DNA-Sequenzinformationen phylogenetisch zu beschreiben und taxonomisch einzuordnen. Die mikrobielle Zusammensetzung des Verdauungstraktes von Schweinen wurde bereits ausführlich beschrieben (Kim und Isaacson, 2015; Looft *et al.*, 2014).

Mit der Entwicklung von genomweiten Expressionsmessungen mittels DNA-Microarrays können mittlerweile über 40 000 Transkripte in verschiedenen Geweben gemessen werden. Seit nun fast 15 Jahren sind porcine Microarrays verfügbar und werden insbesondere zur Identifizierung von biologischen Prozessen, welche die Variation in komplexen Merkmalen erklären, genutzt. Im Bereich der Tierhaltung wird insbesondere das Muskeltranskriptom in Zusammenhang mit dem Muskelwachstum und den Fleischqualitätsmerkmalen untersucht (Ponsuksili, Murani *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Damon *et al.*, 2013; Hamill *et al.*, 2012; Canovas *et al.*, 2010; Wimmers *et al.*, 2010)

In der vorliegenden Arbeit wurden SNP-Chip Genotypen, Darmmikrobiota- und Genexpressionsdaten zur Analyse komplexer Merkmale in einer Piétrainpopulation verwendet. Diese Daten wurden von ca. 200 leistungsgeprüften Sauen erhoben und für „genetische und mikrobielle Analysen komplexer Merkmale“ (siehe Punkt 2) bzw. für „strukturelle und funktionelle genomische Analysen von Fleischqualitätsmerkmalen“ (siehe Punkt 3) genutzt. Unter Punkt 2 wurden quantitativ-genetische Methoden zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung im Darm, Wachstumsmerkmalen und dem Schweinegenom untersucht. Die Ziele hierbei waren es die bakterielle Zusammensetzung im Darm zu beschreiben, den Effekt der Wirtsgenetik auf die mikrobielle Zusammensetzung zu analysieren und den Einfluss der Darmmikrobiota auf Wachstumsmerkmale zu untersuchen. Unter Punkt 3 wurden strukturelle und funktionelle Genominformationen zur Charakterisierung von biologischen Prozessen, welche die Fleischqualität determinieren, genutzt und potentielle Kandidatengene identifiziert. Hierfür wurden differentiell exprimierte Gene funktionell charakterisiert und mit Ergebnissen aus genomweiten Assoziationsanalysen verknüpft.

2 Genetische und mikrobielle Analysen komplexer Leistungsmerkmale

Das Darmmikrobiom ist eine wichtige Komponente der Tierphysiologie. In dem folgendem Kapitel wurden quantitativ-genetische Methoden zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen mikrobieller Zusammensetzung im Darm, komplexen Merkmalen und dem Schweinegenom untersucht. Die Ziele hierbei waren:

- Charakterisierung der bakteriellen Zusammensetzung im Schweinedarm
- Analyse des Effektes der Wirtsgenetik auf die Darmmikrobiota
- Untersuchung des Einflusses der Darmmikrobiota auf komplexe Leistungsmerkmale
- Durchführung von genomischen, sowie mikrobiellen Vorhersagen für komplexe Leistungsmerkmale

Teile des Kapitels wurden bereits in GENETICS, Vol. 206 (2017) mit dem Titel „Host Genome Influence on Gut Microbial Composition and Microbial Prediction of Complex Traits in Pigs“ veröffentlicht (Camarinha-Silva *et al.*, 2017), wobei sich A. Camarinha-Silva und M. Mausehammer die Erstautorenschaft teilen.

2.1 Literatur

2.1.1 Struktur und Funktion der Darmmikrobiota

Struktur der Darmmikrobiota

Ferkel werden keimfrei geboren. Erst während des Geburtsvorganges werden Mikroben von der Mutter und der Umgebung aufgenommen (Thompson *et al.*, 2008). Das Darmmikrobiom ist nicht statisch, es entwickelt sich zusammen mit dem Wirt (Kim und Isaacson, 2015). Generell wird der Darm von Schweinen hauptsächlich von den Phyla Bacteroidetes und Firmicutes besiedelt (Ciobanu *et al.*, 2001; Kim und Isaacson, 2015). Pajarillo *et al.* (2014) beschrieben das fäkale Mikrobiom von säugenden und abgesetzten Ferkeln. In dieser Studie wird eine Veränderung der Mikrobiotastrukturen auf Phylum-Ebene mit ansteigendem Alter der Tiere gezeigt. So ist das am stärksten vertretende Phylum bei säugenden Ferkeln Firmicutes (54 %), während es sich nach dem Absetzen der Tiere Richtung Bacteroidetes (59,6 %) verschiebt. Looft *et al.* (2014) untersuchten die bakterielle Zusammensetzung entlang des Verdauungstraktes von Schweinen. Aus dieser Studie ging hervor, dass das Ileum die geringste bakterielle Diversität aufweist und hauptsächlich mit Firmicutes und Proteobacteria besiedelt ist. Zudem konnte eine unterschiedliche Bakterienzusammensetzung zwischen der Ileummukosa und dem Chymus festgestellt werden. Die mikrobielle Besiedlung im Caecum

und Colon setzt sich vornehmlich aus Bacteroidetes, Firmicutes Proteobacteria und Spirochaetes zusammen. In diesen Darmabschnitten wurden keine Unterschiede zwischen der Mikrobienzusammensetzung im Chymus und der Mukosa nachgewiesen.

Funktion der Darmmikrobiota

Die Symbiose zwischen Wirt und Darmbakterien ist ein perfekt aufeinander abgestimmtes System, welches sich über Jahrtausende entwickelt hat. Das Darmmikrobiom nimmt dabei Einfluss auf verschiedene Teile der Wirtsphysiologie. In keimfrei aufgezogenen Tieren konnte der Einfluss von Darmbakterien auf die Entwicklung des Verdauungstraktes und des Immunsystems nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 2007). Shirkey *et al.* (2006) zeigten, dass Darmbakterien die Ausbildung der Darmzotten und Krypten, sowie die Zellstruktur der *Lamina propria* verändern. Zudem wurde festgestellt, dass das Immunsystem bei keimfrei aufgezogenen Tieren nicht voll entwickelt ist. Die Anzahl an Immunoglobulin A (IgA) sezernierenden Zellen und der Gehalt an T-Zellen des Immunsystems der Mukosa sind reduziert (Macpherson und Harris, 2004). In konventionell aufgezogenen Tieren werden pathogene Keime durch die Darmmikroben unterdrückt (Kolonisationsresistenz; Waaij *et al.*, 1971). Eine der wichtigsten Funktionen der Darmmikroben ist die Fermentation von aufgenommen unverdaulichen Polysacchariden zu Acetat, Propionat und Butyrat. Diese werden über die Darmschleimhaut resorbiert und bilden eine wichtige Energiequelle für das Tier. Diese kurzkettigen Fettsäuren haben auch einen gewissen antimikrobiellen Effekt in Bezug auf bestimmte Pathogene (Dongowski *et al.*, 2002). Turnbaugh *et al.* (2006) zeigten in einem Mäusemodell, dass Darmbakterien einen Einfluss auf den Energieausbeute aus dem aufgenommenen Futter haben und somit die Zunahmen und die Verfettung der Tiere beeinflussen. In diesem Zusammenhang wurde auch das Verhältnis von Firmicutes zu Bacteroidetes untersucht. Studien belegen, dass ein Anstieg des Firmicutes-Bacteroidetes Verhältnisses zu einer stärkeren Verfettung bei Mäusen und Schweinen führt (Ley *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2013). Andere Autoren wiesen jedoch keinen oder einen gegensätzlichen Effekt des Firmicutes-Bacteroidetes Verhältnisses bei Menschen nach (Duncan *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2009, Jumpertz *et al.*, 2011). Neben der Fermentation von unverdaulichen Polysacchariden werden auch Proteine von den Darmbakterien verstoffwechselt. Hierbei stammt der Großteil des durch Darmbakterien verstoffwechselten Proteins, vor allem aus endogenen Substrate, wie z.B. pankreatische Enzyme, Gallenflüssigkeit, abgestoßene Epithelzellen und Muzine (Bernalier-Donadille, 2010). Außerdem sind Darmmikroben wichtige Lieferanten für zahlreiche B-Vitamine, sowie dem Vitamin K und wirken sich positiv auf den Stoffwechsel des Wirtes aus (Hill, 1997). Das

Darmmikrobiom beeinflusst auch das Tierverhalten. In Studien an keimfrei aufgezogenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine reduzierte Bewegungsaktivität und gesteigerte Angst, im Vergleich zu keimfrei aufgezogenen Mäusen, aufweisen (Diaz *et al.*, 2011).

2.1.2 Einflussfaktoren auf die mikrobielle Gemeinschaft im Darm

Umwelteinflüsse

Wie bereits erwähnt, ist die Zusammensetzung der Darmmikroben altersabhängig. Zum einen findet eine Besiedlung mit Mikroben aus der Umgebung und der Mutter direkt nach der Geburt statt, zum anderen ändert sich mit steigendem Alter die Ernährung der Tiere, so wird in den ersten Lebenswochen überwiegend Muttermilch aufgenommen und mit zunehmendem Alter auf Kraftfutter umgestellt. Die Ernährung ist der wichtigste Einflussfaktor auf die mikrobielle Zusammensetzung im Darm (Jandhyala *et al.*, 2015). Dies beruht auf der Tatsache, dass sich die einzelnen bakteriellen Spezies, sowohl in ihrer Fähigkeit Nährstoffe zu verwerten (insbesondere Kohlenhydrate, Proteine und Fette aus dem Futter), als auch in ihrer Fähigkeit sich an die Darmumwelt anzupassen (wie hoher/niedriger pH-Wert, hohe Konzentrationen an Gallensalzen und geringe Konzentration an Mikronährstoffen), stark voneinander unterscheiden (Flint *et al.*, 2015). Im oberen Verdauungstrakt sind vor allem einfache Zucker das wesentliche Wachstumssubstrat der Bakterien. Im Dickdarm, in dem sich die meiste mikrobielle Biomasse befindet, dienen wiederum hauptsächlich Ballaststoffe als Substrat für bakterielles Wachstum. Varel *et al.* (1984) zeigten, dass eine faserreiche im Vergleich zu einer faserarmen Fütterung die Zusammensetzung der Darmbakterien bei Sauen verändert. Auch eine proteinreiche Fütterung führt zu einer Veränderung der Darmmikrobiota und führt außerdem zu einer Anreicherung pathogener Keime (Rist *et al.*, 2013). Bei Mäusen konnte der Einfluss einer fettreichen Fütterung auf die mikrobielle Diversität gezeigt werden (Daniel *et al.*, 2014). Außerdem kann der Zusatz von Präbiotika, Probiotika und Antibiotika im Futter die Darmbakterienzusammensetzung verändern (Sánchez *et al.*, 2017; Nicolucci und Reimer, 2017; Looft *et al.*, 2012).

Genetische Einflüsse

Merkmale, welche starken Umwelteinflüssen unterliegen, werden als quantitative Merkmale bezeichnet. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine große Anzahl an Genorten, sogenannte Quantitative Trait Loci (QTL), mit sehr kleinen Effekten an der phänotypischen Ausprägung von quantitativen Merkmalen beteiligt sind (Bennewitz und Meuwissen, 2010; Goddard und Hayes, 2001). Die Heritabilität beschreibt den Anteil der additiv genetischen Varianz an der phänotypischen Varianz. Da bei der Vererbung Dominanz und Epistasie nicht konsistent sind, wird in der klassischen Tierzucht nur die additiv genetische Varianz genutzt. Die Heritabilität eines Merkmals ist maßgebend für den Zuchterfolg bzw. Zuchtfortschritt. So kann für Merkmale mit hohen Heritabilitäten ein größerer Zuchtfortschritt erreicht werden. Um den genetischen Wert einzelner Tiere schätzen zu können, werden in der Tierzucht Zuchtwerte berechnet. Derzeitiges Standardverfahren zur Zuchtwertschätzung mit SNP-Daten ist Genomic Best Linear Unbiased Prediction (G-BLUP, Harris und Johnson, 2009; Knol *et al.*, 2016; Meuwissen *et al.*, 2001). Die Genotypisierung mit dichten Markerkarten ermöglicht eine Modellierung der Verwandtschaft auf DNA-Basis (genomische Verwandtschaftsmatrix) (VanRaden, 2008). G-BLUP Vorhersagen unterliegen der Annahme, dass alle SNPs die gleiche Varianz aufweisen (Meuwissen *et al.*, 2001). Eine bessere Modellierung der SNP-Effekte wird durch nicht-lineare Bayes-Methoden erreicht. Bei diesen Modellen werden Vorannahmen über die Verteilung der SNP-Effekte (viele QTL mit kleinen Effekten und wenige QTL mit großen Effekten) miteingebunden und somit die Varianz der QTL Effekte besser modelliert. Je nach Bayes-Methode stammen die QTL-Effekte aus einer (BayesA und B) oder zwei t-Verteilungen (BayesC und D) (Gianola, 2013). Diese Modelle sind jedoch rechentechnisch sehr aufwendig. Bereits Benson *et al.* (2010) beschrieb die Zusammensetzung der Darmmikroben als quantitatives Merkmal. Daraufhin belegten zahlreiche Studien bei Menschen, Mäusen und Schweinen den Einfluss des Wirtsgenoms auf die bakterielle Zusammensetzung im Darm (siehe Tabelle 1). Bei Mensch und Maus wurden für einzelne Taxa moderate bis hohe Heritabilitäten geschätzt (Goodrich *et al.*, 2014; Org *et al.*, 2015; Davenport *et al.*, 2015). Estellè *et al.* (2014) schätzten in einer französischen Large White Population niedrige bis hohe Heritabilitäten für 31 bakterielle Genera. Es kann angenommen werden, dass die relativ hohen Heritabilitäten ein Resultat der symbiotischen Beziehung zwischen Wirt und Darmmikrobiom sind, welche sich in Millionen von Jahren gemeinsam entwickelt hat (Org *et al.*, 2015). Erste genomweite Assoziationsanalysen bei Menschen und Mäusen zeigten, dass die Zusammensetzung der Darmmikrobiota als quantitative Merkmale betrachtet werden können (Benson *et al.*, 2010; McKnite *et al.*, 2012; Leamy *et al.*, 2014; Org *et al.*, 2015; Blekman *et al.*, 2015). Das Wirtsgenom kann die bakterielle Zusammensetzung im Darm auf verschiedenen Wegen beeinflussen. Unterschiede im Immunsystem können eine verschiedenartige Zusammensetzung der Darmmikrobiota

bewirken. Es wurde gezeigt, dass ein Mangel an Immunglobulinen, wie z.B. Immunglobulin A (Shulzhenko *et al.*, 2011), oder ein Mangel an proinflammatorischen Zytokinen zu Veränderungen in der Mikrobiotastruktur führt (Wen *et al.*, 2008; Vijay-Kumar *et al.*, 2010). Außerdem beeinflusst eine veränderte Mukosastruktur, wie z.B. eine veränderte Glykosylierung der Mucine oder eine mangelnde Regeneration bzw. Proliferation der Mukosa, die bakteriellen Zusammensetzung (Sommer *et al.*, 2014; Wlodarska *et al.*, 2014). Auch Unterschiede im Gallensäurestoffwechsel wirken sich auf die mikrobielle Zusammensetzung im Darm aus. So führt ein Mangel an Gallensäurerezeptoren zu einer Veränderung der Mikrobenzusammensetzung im Darm (Ryan *et al.*, 2014).

Tabelle 1: Übersicht über bereits durchgeführten Studien zu Heritabilitäten und QTL Kartierungen für Darmmikrobiota (verändert nach Davenport, 2016).

Auswertung	Organismus	Probenart	n ¹	Loci	Signifikante Ergebnisse	Quelle
Heritabilität	Schwein	Kot	299	NA	31 Genera	Estellè <i>et al.</i> (2014)
Heritabilität	Mensch	Kot	832	NA	zahlreiche Taxa	Goodrich <i>et al.</i> (2014)
Heritabilität	Maus	Caecum/Kot	599	NA	16 Genera	Org <i>et al.</i> (2015)
Heritabilität	Mensch	Kot	127	NA	> 10 Taxa	Davenport <i>et al.</i> (2015)
QTL	Maus	Kot	645	530	18 Loci	Benson <i>et al.</i> (2010).
QTL	Maus	Kot	30	3 785	5 Loci	McKnite <i>et al.</i> (2012)
QTL	Maus	Kot	472	2 058	42 Loci	Leamy <i>et al.</i> (2014)
QTL	Maus	Caecum/Kot	599	200K	7 Loci	Org <i>et al.</i> (2015)
QTL	Mensch	Kot	93	33	83 SNPs	Blekhman <i>et al.</i> (2015)

¹Stichprobenumfang

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Datenerhebung

Im Rahmen der Mast- und Schlachtleistungsprüfung an der Landesanstalt für Schweinezucht in Boxberg wurden insgesamt 207 Piétrain Sauen phänotypisiert und beprobt. Die Haltung, Phänotypisierung, sowie Schlachtung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen nach den Richtlinien des Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion e.V (ZDS, 2007). Die Leistungsprüfung der Tiere begann mit einem Lebendgewicht von 30 kg und endete mit dem Mastendgewicht von 105 kg. Das mittlere Schlachtagter lag bei 188 (\pm 14) Tagen. Es wurden der Futterverzehr in kg (FVZ) und die täglichen Zunahmen in g (TZ) erfasst. Außerdem wurde die Futterverwertung (FUV) als das Verhältnis von Futterverzehr in kg zu den Zunahmen in kg während der Stationsprüfung berechnet. Eine deskriptive Statistik der Merkmale ist im Anhang in Tabelle A1 dargestellt. An 14 Schlachttagen wurden während des Schlachtvorganges 200 ml EDTA Vollblut pro Tier gewonnen. Nach dem Öffnen der Bauchhöhle wurden aus dem mittleren Teil des Colon Chymusproben entnommen und auf Eis gelagert. Die Langzeitlagerung der Blutproben erfolgte bei -20 °C und der Chymusproben bei -80 °C.

Bakterielle DNA-Isolierung und 16S-rRNA Sequenzierung

Die im folgenden Abschnitt beschriebene bakterielle DNA-Isolierung, 16S-rRNA Sequenzierung sowie die Datenaufbereitung wurde von der Nachwuchsgruppe Microbial Ecology, Universität Hohenheim unter der Leitung von Dr. A. Camarinha-Silva, durchgeführt. Die Chymusproben wurden auf Eis aufgetaut und homogenisiert. Von jeder Probe wurden 250 mg zur Isolierung von bakterieller DNA mit dem FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) verwendet. Es erfolgte eine Amplifizierung der V1 und V2 Region mittels PCR (Camarinha-Silva *et al.*, 2014). Die PCR-Produkte wurden mit dem SequalPrep Normalization Kit (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) gereinigt und normalisiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte gepoolt und 250 bp mittels Illumina MiSeq Sequenzierung (Illumina, San Diego, CA, USA) mit gepaarten Enden sequenziert. Die bioinformatische Aufbereitung der erhaltenen Sequenzen erfolgte nach Camarinha-Silva *et al.* (2014). Die rohen DNA-Sequenzen wurden assembliert (Cole *et al.*, 2014) und mit MOTHUR (gotoh Algorithmus mit SILVA Referenz Datenbank) aligned. Die Sequenzen wurden mit einer Ähnlichkeit von \geq 97 % zu Operational Taxonomic Units (OTUs) geclustert. OTUs, die in weniger als in fünf Proben vorkamen und eine relative Häufigkeit kleiner als 0,01 % aufwiesen, wurden aus dem Datensatz entfernt. Insgesamt wurden pro Tier $40\,379 \pm 1\,149$ Sequenzen gewonnen. Die taxonomische Zuordnung erfolgte mit dem naïve Bayesian RDP Klassifikator

(Wang *et al.*, 2007) und resultierte in 2 714 OTUs. Die OTUs wurden anschließend anhand der Seqmatch Funktion der RDP Datenbank ausgewertet.

Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde zunächst die DNA der Tiere isoliert. Die Isolierung der DNA erfolgte aus Vollblut mit dem Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Die 207 Sauen wurden mit dem Illumina PorcineSNP60 BeadChip genotypisiert (Illumina, San Diego, CA, Ramos *et al.*, 2009). Die Position der Marker auf dem porcinen 60K SNP-Chip wurde der neuesten Genomeassembly *Sus scrofa* (SSC) 11.1 entnommen (Warr *et al.*, 2017). Der Abgleich der Nukleotidsequenzen von Illumina mit der FASTA Sequenz der Genomeassemblierung SSC 11.1, sowie deren Filterung ist in Stratz *et al.* (2017) beschrieben. Die Genotypen wurden nach signifikanter Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p < 0,0001$), Call Rate (Entfernung von SNPs mit Call Rates $< 95\%$), Minor Allele Frequency (MAF; Entfernung von SNPs mit MAF $< 5\%$) gefiltert. Die Filterung erfolgte mit dem Programm GenomeStudio (Illumina, San Diego, CA, USA). Außerdem wurden die Geschlechtschromosomen nicht berücksichtigt. Sporadisch fehlende Genotypen wurden mit Beagle (Browning und Browning, 2007, 2009) imputiert. Es verblieben 44 059 SNPs für die weiteren Analysen.

2.2.2 Statistische Auswertung

Mikrobielle Gemeinschaft

Die im folgenden Abschnitt beschriebene statistische Auswertung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde von Dr. A. Camarinha-Silva (Leiterin Nachwuchsgruppe Microbial Ecology, Universität Hohenheim) durchgeführt. Ein multivariater Datensatz bestehend aus den relativen Häufigkeiten eines jeden Phylotypen und über alle Tiere hinweg wurde mittels v.6.1.6, PRIMER-E (Plymouth Marine Laboratory, UK, Clarke und Warwick, 2001) analysiert. Vorab definierte Gruppen (z.B. Gewicht, Alter, TZ, FUV und FVZ) wurden mittels Analysis of Similarity (ANOSIM) statistisch verglichen. Es wurden 999 Permutationen durchgeführt und das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ gesetzt. Spezies, welche die Unterschiede verursachten, wurden anhand von Similarity Percentage (SIMPER) identifiziert (Clarke und Warwick 2001).

Genetische Parameter für bakterielle Genera

Zur Reduktion der Anzahl an statistischen Tests wurden die genetischen Parameter für Bakterien auf Genus Ebene in ASReml R (Butler *et al.* 2009) geschätzt. Es wurden nur Genera mit einer relativen Häufigkeit > 0,1 % berücksichtigt. Zunächst wurden fixe und zufällige Effekte der Genera durch Anpassung von gemischten linearen Modellen an jeden Genus geschätzt. Das Gewicht und das Alter bei Ankunft auf Station, sowie das Schlachtgewicht wurden als fixe Effekte in die Modelle mitaufgenommen. Als zufälliger Effekt wurde der Schlachttag berücksichtigt. Basierend auf einer Backward-Elimination wurden nicht signifikante Effekte ($p < 0,05$) aus den Modellen entfernt. Zusätzlich wurden zufällige maternale Effekte und der zufällige Effekt der Bucht getestet. Diese Effekte waren jedoch nicht signifikant und wurden somit nicht weiter in den Modellen berücksichtigt. Zur Schätzung der genetischen Parameter wurden die Modelle auf ein genomisch gemischtes lineares Modell erweitert:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}_b \mathbf{b} + \mathbf{Z}_{sd} \mathbf{sd} + \mathbf{a} + \mathbf{e}, \quad (1)$$

wobei \mathbf{y} der Vektor mit den Beobachtungen (relative Häufigkeiten der Bakterien auf Genus Ebene), \mathbf{b} der Vektor mit fixen Effekte (siehe oben), \mathbf{sd} der Vektor mit dem zufälligen Schlachttagseffekt, \mathbf{a} der Vektor mit dem zufälligen genetischen Effekt des Tieres, \mathbf{e} der Vektor mit dem Residuum, \mathbf{X}_b und \mathbf{Z}_{sd} die dazugehörigen Designmatrizen waren. Die Verteilung des zufälligen Tiereffektes war $\mathbf{a} \sim N(0, \mathbf{G}\sigma_A^2)$, mit σ_A^2 als die additiv-genetische Varianz. Die genomische Verwandtschaftsmatrix \mathbf{G} wurde basierend auf SNP Genotypen nach VanRaden (2008) berechnet als

$$\mathbf{G} = \frac{(\mathbf{Z} - 2\mathbf{Q})(\mathbf{Z} - 2\mathbf{Q})^T}{\sum_m 2p_m(1-p_m)},$$

wobei \mathbf{Z} die Gen-Content Matrix ist und die Zahl der 1-Allele (kodiert mit 0, 1 und 2) für jeden SNP und jedes Tier enthält. Die Matrix \mathbf{Q} enthält die Häufigkeit p_m für jeden SNP m . Die p -Werte der Heritabilitäten wurden mittels eines Likelihood-Ratio-Tests des zufälligen Tiereffektes mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ berechnet. Zur Korrektur um das multiple Testen wurde die False Discovery Rate (FDR) berechnet. Hierfür wurde mit dem Programm QVALUE (Storey, 2002; Storey und Tibshirani, 2003) für jeden Test ein q -Wert berechnet, welcher den Anteil an falsch positiven Tests angibt. Anschließend wurden paarweise bivariate Analysen zur Berechnung von genetischen Korrelationen zwischen Genera mit signifikanten Heritabilitäten und den Leistungsmerkmalen FUV, TZ und FVZ durchgeführt. Hierfür wurden dieselben Effekte wie in den univariaten Analysen verwendet.

Genomweite Assoziationsanalysen für bakterielle Genera - Single-Marker Modell

Die genomweiten Assoziationsanalysen wurden für bakterielle Genera mit signifikanten Heritabilitäten durchgeführt und erfolgten mit dem Programm GCTA (Yang *et al.*, 2014). Um eine annähernde Normalverteilung der relativen Häufigkeiten der bakteriellen Genera zu erhalten, wurden diese *log*-transformiert. Folgendes gemischtes lineares Modell wurde für jeden SNP j nacheinander angewandt:

$$y_i = \mu + b_j x_{ij} + a_i + e_i, \quad (2)$$

wobei y_i der phänotypische Wert (*log* transformierte und um Schlachttag vorkorrigierte relative Häufigkeiten der bakteriellen Genera) des Tieres i , μ das Populationsmittel, b_j der Effekt des zu testenden SNPs j , x_{ij} die Anzahl an 1-Allelen am SNP j für das Tier i ($x_{ij} = 0, 1$ oder 2) und a_i der zufällig modellierte polygene Effekte des Tieres ist ($\mathbf{a} \sim N(0, \mathbf{G}\sigma_A^2)$). \mathbf{G} ist die genomische Verwandtschaftsmatrix, σ_A^2 die additiv-genetische Varianz und e_i ist das Residuum des Tieres i . Bei der Assoziationsanalyse wurde jeweils das Chromosom, auf welchem sich der SNP des zu schätzenden Markereffektes befindet, von der Modellierung der genomischen Verwandtschaftsmatrix ausgeschlossen. So wird eine doppelte Modellierung des betrachteten SNPs vermieden, was zu einem Verlust der statistischen Power führen könnte (Yang *et al.* 2014). Neben dem genomweiten Signifikanzniveau ($p_{\text{genomweit}} < 0,05$) wurde ein weniger stringentes Signifikanzniveau von $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$ verwendet. Zur Korrektur um das multiple Testen wurde zudem die FDR, wie unter dem Punkt „Genetische Parameter für bakterielle Genera“ beschrieben, berechnet.

Genomweite Assoziationsanalysen für bakterielle Genera - Multi-Marker Modell

In Single-Marker Modellen kann der Effekt von kausalen Mutationen aufgrund von unvollständigem Kopplungsungleichgewicht (LD) nur zum Teil erfasst werden. Der Effekt von kausalen Mutationen lässt sich besser anhand von allen SNPs, welche die kausale Mutation umgeben, erklären. Um dies zu berücksichtigen, werden Multi-Marker Modelle (z.B. BayesC) angewandt. In Multi-Marker Modellen werden die Effekte aller SNPs simultan geschätzt. Die SNP Effekte werden dabei als zufällige Effekte modelliert. Somit können die LD-Strukturen zwischen allen Markern bzw. zwischen den Markern und den kausalen Mutationen abgebildet werden (Fernando und Garrick, 2013). Für die Auswertung der genomischen Modelle wurde BayesC (Verbyla *et al.*, 2009) angewandt, welches in dem R Paket BayesDsamples (Wellmann und Bennewitz, 2012) implementiert ist.

Folgendes Regressionsmodell wurde angewendet:

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^{n_{SNP}} b_j x_{ij} + e_i, \quad (3)$$

dabei ist y_i der phänotypische Wert (*log*-transformierte und um Schlachttag vorkorrigierte relative Häufigkeiten der bakteriellen Genera) des Tieres i , μ das allgemeine Mittel, x_{ij} ist die Anzahl an 1-Allelen am SNP j für das Tier i ($x_{ij} = 0, 1$ oder 2), b_j der zufällige Effekt des SNP j und e_i das Residuum des Tieres i . A priori wird in BayesC angenommen, dass der Effekt des i -ten SNP aus zwei verschiedenen skalierten t-Verteilungen stammt. Als Anzahl an Freiheitsgraden (ν) der t-Verteilungen wurden 2,5 Freiheitsgrade angenommen. Mit der Wahrscheinlichkeit pLD resultiert ein SNP-Effekt aus der t-Verteilung mit großer Skalierung, welche für SNPs in LD mit kausalen Mutationen angenommen wird. Die jeweiligen Skalierungsparameter s^2 wurden vom Programm so angepasst, dass die erwartete, durch die Marker erklärte additiv-genetische Varianz, gleich der geschätzten additiv-genetischen Varianz ist (Wellmann und Bennewitz 2012). Eine Bernoulli-verteilte Variable γ_i determinierte ob ein SNP-Effekt aus einer größer ($\gamma_i = 1$) oder kleiner skalierten t-Verteilung ($\gamma_i = 0$) stammt. Der Hyperparameter pLD gibt dabei die Wahrscheinlichkeit für $\gamma_i = 1$ an und wurde auf 0,2 festgelegt. Dabei ist die t-Verteilung um den Faktor ε kleiner skaliert, wenn $\gamma_i = 0$. Die Vorannahmen für die Verteilung eines SNP-Effekts a_i , lassen sich wie folgt beschreiben:

$$a_i | \gamma_i \sim \gamma_i t(0, \nu, s^2) + (1 - \gamma_i) \varepsilon t(0, \nu, s^2)$$

$$\gamma_i \sim \text{Bernoulli}(pLD)$$

Es wurden 50 000 Gibbs-Sample Iterationen durchgeführt, wobei die erste Hälfte der Iterationsschritte als Burn-In verworfen wurde. Um Rückschlüsse auf die Effekte ziehen zu können, wurde die „Window Posterior Probability of Association“ (WPPA) berechnet (Fernando *et al.*, 2017; Fernando und Garrick, 2013). Diese Methode kontrolliert den Anteil an falsch Positiven indem die posteriori Wahrscheinlichkeit der Merkmalsassoziation für jeden SNP, oder für jedes Fenster von konsekutiven SNPs, berechnet wird. Die WPPAs wurden für „sliding windows“ der Länge 2 cM berechnet. Eine detaillierte Beschreibung der WPPA Berechnung ist bei Bennewitz *et al.* (2017) zu finden.

Putative Kandidatengene

Mit NCBI Map Viewer (Dombrowski und Maglott, 2003) wurden positionelle Kandidatengene in einer Region von 1 MB up- bzw. downstream um die signifikanten SNPs kartiert. Diese Gene wurden anhand der Literatur auf Zusammenhänge mit der bakteriellen Darmstruktur als putative Kandidatengene validiert.

Genetische und mikrobielle Parameter der Leistungsmerkmale

Durch Anpassung von gemischt linearen Modellen an die Merkmale TZ, FUV und FVZ wurden zunächst fixe und zufällige Effekte geschätzt. Als fixe Effekte wurden das Gewicht und das Alter bei Ankunft auf Station, sowie das Schlachtgewicht in die Modelle mitaufgenommen. Als zufälliger Effekte wurden der Schlachttageneffekt und der Buchteneffekt berücksichtigt. Nicht signifikante Effekte (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$), wurden mittels Backward-Elimination von den Modellen ausgeschlossen. Zur Schätzung von genetischen Parametern wurden die Modelle auf genomisch gemischte Modelle in ASReml R (Butler *et al.* 2009) erweitert:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}_b \mathbf{b} + \mathbf{Z}_{sd} \mathbf{sd} + \mathbf{Z}_{pen} \mathbf{pen} + \mathbf{a} + \mathbf{e}, \quad (4)$$

wobei \mathbf{y} der Vektor mit den Beobachtungen (TZ, FUV und FVZ), \mathbf{b} der Vektor mit den fixen Effekten, \mathbf{sd} der Vektor mit dem zufälligen Schlachttageneffekt und der Varianz σ_{sd}^2 , \mathbf{pen} der Vektor mit dem zufälligen Buchteneffekt und der Varianz σ_{pen}^2 und \mathbf{a} der Vektor der zufälligen polygenen Effekte des Tieres, \mathbf{Z}_{sd} bzw. \mathbf{Z}_{pen} die zugehörigen Designmatrizen und \mathbf{e} der Vektor mit dem Residuum und der Varianz σ_e^2 waren. Die Verteilung des zufälligen Tiereffektes war $\mathbf{a} \sim N(0, \mathbf{G}\sigma_A^2)$, mit σ_A^2 als die additiv-genetische Varianz und \mathbf{G} als die genomische Verwandtschaftsmatrix (siehe „Genetische Parameter für bakterielle Genera“). Die p -Werte der Heritabilitäten wurden wie unter „Genetische Parameter für bakterielle Genera“ beschrieben berechnet.

Zur Schätzung von mikrobiellen Varianzkomponenten wurden die Leistungsmerkmale mittels mikrobiellen gemischten linearen Modellen in ASReml R (Butler *et al.* 2009) analysiert:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}_b \mathbf{b} + \mathbf{Z}_{sd} \mathbf{sd} + \mathbf{Z}_{pen} \mathbf{pen} + \mathbf{m} + \mathbf{e}, \quad (5)$$

wobei die Modellparameter, außer der Vektor \mathbf{m} , welcher den zufälligen mikrobiellen Tiereffekt enthält und der Verteilung $\mathbf{m} \sim N(0, \mathbf{M}\sigma_m^2)$ folgt, denen aus Modell (4) entsprechen. Die mikrobielle Varianz wird beschrieben durch σ_m^2 . Die mikrobielle Verwandtschaftsmatrix \mathbf{M} wurde berechnet als $\mathbf{M} = \frac{1}{N} (\mathbf{X}\mathbf{X}^T)$ mit Matrix \mathbf{X} (Dimension $n \times N$ mit n als Anzahl an Tieren und N als die Anzahl an OTUs). Die Elemente von \mathbf{X} sind

$$X_{ik} = \frac{\log P_{ik} - \overline{\log P_{\cdot k}}}{sd(\log P_{\cdot k})}.$$

Die Elemente P_{ik} enthalten die relative Häufigkeit des OTU k in Tier i (+ 0,01). Somit werden die Nicht-Diagonalelemente der Matrix \mathbf{M} berechnet als

$$M_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N X_{ik} X_{jk},$$

und die Diagonalelemente als

$$M_{ii} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N X_{ik}^2 = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{(\log P_{ik} - \overline{\log P_{\cdot k}})^2}{\text{var}(\log P_{\cdot k})}$$

Die Microbiability m^2 (Difford *et al.*, 2016) wurde berechnet als $m^2 = \frac{\sigma_m^2}{\sigma_p^2}$, mit $\sigma_p^2 = \sigma_m^2 + \sigma_{sd}^2 + \sigma_{pen}^2 + \sigma_e^2$ als die phänotypische Varianz. Die p -Werte der Microbiability wurden wie unter „Genetische Parameter für bakterielle Genera“ beschrieben, berechnet.

Genomische und mikrobielle Vorhersagen

Um die Leistungsmerkmale (TZ, FUV und FVZ) basierend auf genomischen und mikrobiellen Daten vorherzusagen, wurden G-BLUP bzw. M-BLUP Modelle angewandt. Ausgehend von den zuvor geschätzten Varianzkomponenten wurde Modell (4) für die G-BLUP Vorhersage und Modell (5) für die M-BLUP Vorhersage genutzt. Für beide Vorhersagen wurde eine fünffache Kreuzvalidierung mit 10 000 Iterationen durchgeführt. Hierbei wurden 80 % der Tiere ohne zurücklegen aus dem Datensatz zufällig gezogen (Referenzpopulation). Die verbleibenden 20 % der Tiere wurden genutzt um den Phänotyp basierend auf den Ergebnissen aus der Referenzpopulation vorherzusagen (Validierungspopulation). Die Genauigkeit der Vorhersage war als die Korrelation zwischen den geschätzten und beobachteten Phänotyp in der Validierungspopulation definiert. Es wurde die mittlere Korrelation der 10 000 Korrelationschätzer berechnet. Die Konfidenzintervalle der Korrelationen wurden als 2,5 und 97,5 % Quantil der 10 000 geordneten Korrelationen berechnet.

Schätzung der OTU-Effekte auf Leistungsmerkmale

Um OTUs identifizieren zu können, welche an der Merkmalsausprägung der Leistungsmerkmale TZ, FUV und FVZ beteiligt sind, wurden marginale OTU-Effekte für die Leistungsmerkmale, basierend auf den M-BLUP Ergebnissen, berechnet. Die M-BLUP Schätzer wurde nach den OTU-Effekten aufgelöst (Strandén und Garrick 2009), wobei die OTU-Effekte für jeden OTU und für jedes Leistungsmerkmal wie folgt berechnet wurden:

$$\hat{\mathbf{u}} = \frac{\mathbf{X}'\mathbf{M}^{-1}\hat{\mathbf{m}}}{N},$$

wobei $\hat{\mathbf{u}}$ der Vektor der geschätzten OTU-Effekte, \mathbf{X}' die $N * n$ Matrix, mit N OTUs und n Tieren, \mathbf{M}^{-1} die invertierte mikrobielle Verwandtschaftsmatrix und $\hat{\mathbf{m}}$ der Vektor der geschätzten zufälligen mikrobiellen Tiereffekte aus Modell (5) war.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Mikrobielle Zusammensetzung des Schweinedarms

Die mikrobielle Gemeinschaft im Darm setzte sich bei den Sauen hauptsächlich aus den Phyla Firmicutes (54 %), Bacteroidetes (42 %), Proteobacteria (2 %) und Spirochaetes (1 %) zusammen. Auf Familienebene waren hauptsächlich Ruminococcaceae (24 %), Prevotellaceae (21 %), Porphyromonadaceae (8 %), Clostridiaceae (6 %), Rikenellaceae (6 %) und Lachnospiraceae (5 %) vertreten. Die mikrobielle Zusammensetzung der einzelnen Sauen zeigte eine Ähnlichkeit von 35 % zwischen den Tieren. In Abbildung 1 ist ein nicht metrischer multidimensionaler Skalierungsplot dargestellt, der die Ähnlichkeit zwischen den bakteriellen Strukturen im Darm der einzelnen Tiere zeigt. In dieser Abbildung wurden signifikante Unterschiede zwischen zwei Tiergruppen gefunden. Eine Gruppe zeigte eine stärkere Besiedlung mit Firmicutes (F), die andere Gruppe eine stärkere Besiedlung mit Bacteroidetes (B) ($R = 0,339$, $p = 0,001$). Die Gruppen zeigten eine durchschnittliche Unähnlichkeit von 68 %.

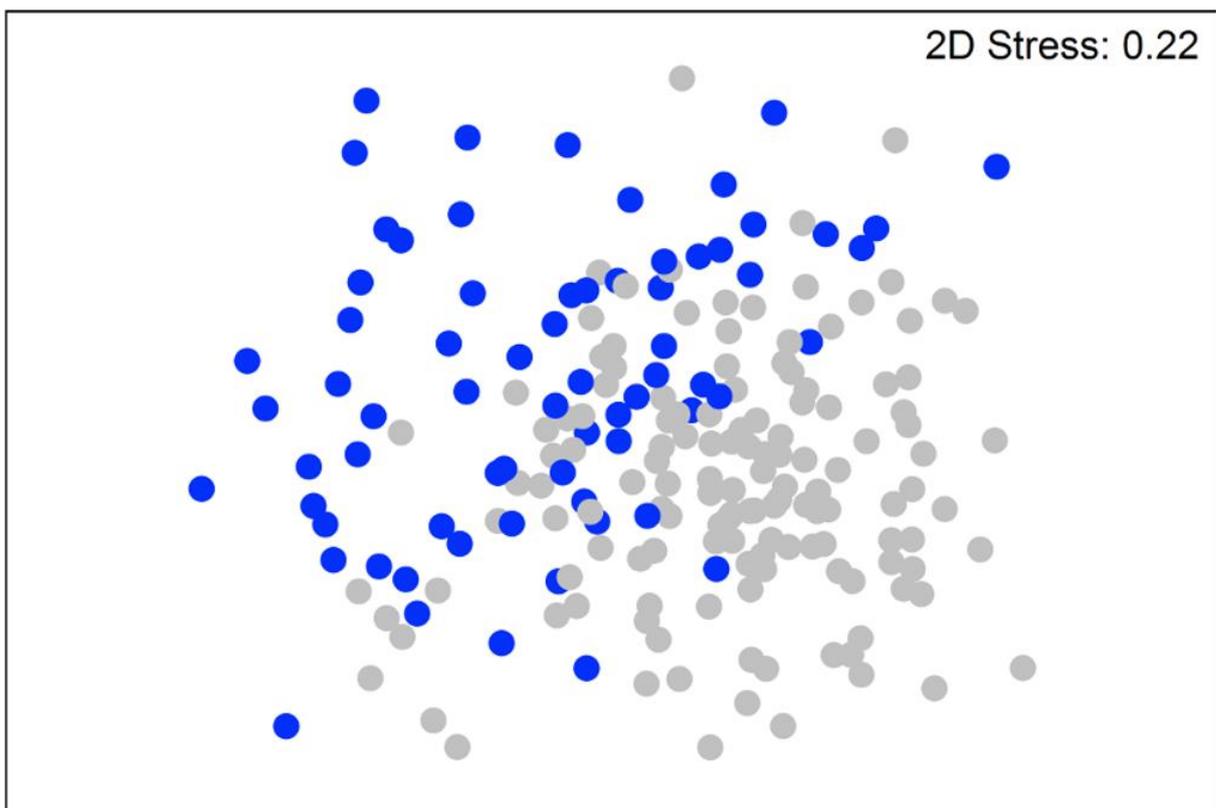


Abbildung 1: Multidimensionaler Skalierungsplot mit den Ähnlichkeiten in den bakteriellen Gemeinschaftsstrukturen im Schweinedarm und einen zweidimensionalen (2D) Stresswert. Tiere sind mehr besiedelt mit Firmicutes (●) bzw. mit Bacteroidetes (●).

Heritabilitäten und genetische Korrelationen der bakteriellen Genera

Ausgehend von 51 bakteriellen Genera mit einer relativen Häufigkeit > 0,1 % wurden für 10 Genera signifikante Heritabilitäten ($p < 0,05$) geschätzt (Tabelle 2). Die signifikanten Heritabilitäten lagen in einem Bereich von 0,28 bis 0,57. Die FDR der signifikanten Heritabilitäten war < 0,11. Die geschätzten Heritabilitäten aller Genera werden im Anhang Tabelle A2 gezeigt.

Tabelle 2: Heritabilitäten (h^2) und ihre Standardfehler (SE) sowie deren p -Werte für die relativen Häufigkeiten der bakteriellen Genera.

Genera	h^2	SE	p-Wert
<i>Alloprevotella</i>	0,34	0,16	0,01
<i>Blautia</i>	0,33	0,14	<0,01
<i>Catenibacterium</i>	0,39	0,16	0,01
<i>Lactobacillus</i>	0,34	0,16	0,02
<i>Uncultured Firmicutes</i>	0,28	0,15	0,02
<i>Uncultured Proteobacteria</i>	0,29	0,15	0,01
<i>Uncultured Spirochaetales</i>	0,52	0,15	<0,01
<i>Uncultured Spirochaetes</i>	0,32	0,17	0,01
<i>Uncultured Succinivibrionaceae</i>	0,57	0,14	<0,01
<i>Uncultured Veillonellaceae</i>	0,33	0,15	0,01

Genetische Korrelationen wurden nur zwischen Genera mit einer signifikanten Heritabilität und den Leistungsmerkmalen Futtermittelverwertung, tägliche Zunahmen, bzw. Futtermittelverzehr berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Standardfehler der geschätzten Korrelationen waren relativ hoch, was bei einem solch kleinen Datensatz zu erwarten war.

Tabelle 3: Genetische Korrelationen mit Standardfehlern (SE) zwischen Futtermittelverwertung (FUV), tägliche Zunahmen (TZ) bzw. Futterverzehr (FVZ) und den relativen Häufigkeiten der bakteriellen Genera.

Genera	FUV	SE	TZ	SE	FVZ	SE
<i>Alloprevotella</i>	-0,42	0,41	0,01	0,27	-0,45	0,44
<i>Blautia</i>	-0,09	0,44	0,03	0,26	-0,11	0,46
<i>Catenibacterium</i>	0,06	0,44	-0,31	0,26	0,11	0,47
<i>Lactobacillus</i>	-0,29	0,45	0,08	0,25	-0,30	0,50
<i>Uncultured Firmicutes</i>	-0,43	0,51	0,02	0,28	-0,33	0,57
<i>Uncultured Proteobacteria</i>	0,20	0,48	-0,17	0,27	0,49	0,53
<i>Uncultured Spirochaetales</i>	0,79	0,35	-0,21	0,22	0,74	0,40
<i>Uncultured Spirochaetes</i>	0,06	0,44	-0,19	0,25	-0,01	0,48
<i>Uncultured Succinivibrionaceae</i>	-0,11	0,39	-0,16	0,21	-0,18	0,43
<i>Uncultured Veillonellaceae</i>	-0,26	0,40	0,14	0,25	-0,50	0,44

2.3.2 Genomweite Assoziationsanalyse für bakterielle Genera

Die genomweiten Assoziationsanalysen wurden für bakterielle Genera mit einer signifikanten Heritabilität ($p < 0,05$) durchgeführt. Im Single-Marker Modell wurden insgesamt 22 signifikante SNPs ($p < 5 \times 10^{-5}$) mit 6 bakteriellen Genera assoziiert (siehe Tabelle 4). Manhattan-Plots für die einzelnen Genera sind im Anhang Abbildung A1 dargestellt. Die Hälfte der signifikanten SNPs war mit dem Genus *Uncultured Spirochaetales* assoziiert. Der SNP H3GA0020584 auf SSC 7 war mit dem Genus *Catenibacterium* und *Uncultured Spirochaetes* assoziiert. Außerdem wurden positionelle Kandidatengene kartiert. Diese sind ebenfalls in Tabelle 4 dargestellt. Die Multi-Marker Analyse ergab keine signifikanten Ergebnisse. Die Substitutionseffekte und WPPAs für 5 bakterielle Genera mit den höchsten Heritabilitäten werden im Anhang in Abbildung A2 gezeigt.

Tabelle 4: Signifikante SNPs ($p < 5 \times 10^{-5}$) der Single-Marker Analyse mit p -Werten und chromosomaler Position (SSC), sowie die Zuordnung positioneller Kandidatengene für die verschiedenen Genera.

Genus	SNP	SSC	Position (MB)	p -Wert	FDR	Positionelle Kandidatengene ^a
<i>Alloprevotella</i>	H3GA0034838	12	54,20	$3,63 \times 10^{-6}$	0,17	} SCIMP, CLDN7
	H3GA0055864	12	54,20	$1,48 \times 10^{-5}$	0,36	
<i>Blautia</i>	DRGA0015203	15	66,75	$1,15 \times 10^{-5}$	0,57	MYO7B
	H3GA0044495	15	69,51	$4,28 \times 10^{-5}$	0,71	
	INRA0049540	15	71,63	$2,44 \times 10^{-5}$	0,61	
<i>Catenibacterium</i>	H3GA0020584	7	27,08	$8,94 \times 10^{-5}$	0,44	SLA-Komplex
<i>Uncultured Spirochaetales</i>	INRA0042796	14	13,80	$1,54 \times 10^{-5}$	0,18	
	MARC0034457	14	13,89	$1,54 \times 10^{-5}$	0,18	
	DRGA0013631	14	14,01	$4,51 \times 10^{-5}$	0,18	
	DRGA0013632	14	14,06	$4,51 \times 10^{-5}$	0,18	
	ASGA0063685	14	57,58	$3,88 \times 10^{-5}$	0,18	
	H3GA0045850	16	3,99	$1,63 \times 10^{-5}$	0,18	
	ALGA0097282	18	18,80	$2,63 \times 10^{-5}$	0,18	} CPA1
	ASGA0079098	18	19,45	$3,07 \times 10^{-5}$	0,18	
	H3GA0054426	18	19,74	$3,07 \times 10^{-5}$	0,18	
		H3GA0050661	18	26,36	$4,20 \times 10^{-5}$	0,18
	ASGA0079549	18	34,71	$1,52 \times 10^{-5}$	0,18	
<i>Uncultured Spirochaetes</i>	MARC0114161	1	111,09	$8,55 \times 10^{-6}$	0,31	SMAD4
	H3GA0020584	7	27,08	$1,24 \times 10^{-5}$	0,31	SLA-Komplex
<i>Uncultured Veillonellaceae</i>	MARC0072557	12	20,15	$2,37 \times 10^{-5}$	0,55	} PYY, PPY
	ALGA0120212	12	19,75	$2,93 \times 10^{-5}$	0,55	
	MARC0110340	12	19,71	$3,31 \times 10^{-5}$	0,55	

^a Positionelle Kandidatengene mit potentieller biologischer Beteiligung an der Merkmalsausprägung, welche 1 MB up- und downstream um den signifikanten SNP kartiert wurden.

2.3.3 Heritabilitäten bzw. Microbiabilities für Leistungsmerkmale und Ergebnisse der mikrobiellen und genomischen Vorhersagen

Die genomische und die mikrobielle Verwandtschaftsmatrix sind im Anhang in Abbildung A3 bzw. A4 dargestellt. Die Heritabilitäten für TZ, FUV und FVZ lagen in einem Bereich von 0,11 bis 0,42 (siehe Tabelle 5). Die Microbiability lag in einem Bereich von 0,16 bis 0,28 für die untersuchten Leistungsmerkmale (siehe Tabelle 5). Die Microbiability war für alle 3 Leistungsmerkmale signifikant, wohingegen nur der Heritabilitätsschätzer für tägliche Zunahme signifikant war. Die Microbiabilities für Futterverwertung und Futterverzehr waren ebenfalls etwas höher als die geschätzten Heritabilitäten für diese Merkmale.

Tabelle 5: Microbiabilities (m^2) und Heritabilitäten (h^2) mit Standardfehlern (SE) und p -Werten für die Leistungsmerkmale tägliche Zunahme (TZ), Futterverwertung (FUV) und Futterverzehr (FVZ).

Leistungsmerkmal	m^2	SE	p -Wert	h^2	SE	p -Wert
TZ	0,28	0,13	0,01	0,42	0,14	<0,01
FUV	0,21	0,14	0,01	0,19	0,13	0,08
FVZ	0,16	0,10	0,03	0,11	0,11	0,22

Tabelle 6: Genauigkeiten der mikrobiellen (r_m) und genomischen Vorhersagen (r_g) für die Leistungsmerkmale tägliche Zunahme (TZ), Futterverwertung (FUV) und Futterverzehr (FVZ) mit Vertrauensintervallen (VI).

Leistungsmerkmal	Mikrobielle Vorhersage		Genomische Vorhersage	
	r_m	95 % VI	r_g	95 % VI
TZ	0,41	0,18:0,62	0,35	0,08:0,58
FUV	0,33	0,07:0,54	0,23	-0,04:0,48
FVZ	0,33	0,15:0,51	0,20	-0,08:0,46

Ausgehend von den geschätzten Varianzkomponenten wurden mikrobielle und genomische Vorhersagen durchgeführt. Die Genauigkeiten der mikrobiellen Vorhersage lagen bei 0,41 für TZ und für FUV bzw. FVZ bei 0,33 (siehe Tabelle 6). Die Genauigkeiten der genomischen Vorhersage waren mit 0,35 für TZ, 0,23 für FUV und 0,20 für FVZ hingegen etwas geringer. Außerdem lagen die Vertrauensintervalle der genomischen Vorhersage für FUV und FVZ teilweise im negativen Bereich. Eine Abbildung von marginalen OTU Effekten für die Leistungsmerkmale wird in Abbildung 2 gezeigt. Keiner der geschätzten OTU Effekte zeigte einen deutlichen Effekt auf die Merkmalsausprägungen. Ausreißer der marginalen OTU Effekte sind in Tabelle 7 zu sehen. Es wurden für das Merkmal TZ drei, für das Merkmal FUV zwei und für FVZ ein Ausreißer der OTU-Effekte detektiert.

Tabelle 7: Ausreißer der marginalen OTU Effekte (\hat{u}) mit Bezeichnung und mittlerer relativer Häufigkeit für die Leistungsmerkmale tägliche Zunahme (TZ), Futterverwertung (FUV) und Futterverzehr (FVZ).

OTU	Leistungsmerkmal	Bezeichnung	Mittlere Häufigkeit	\hat{u}
1284	TZ	<i>Uncultured Veillonellaceae</i>	0,017	-0,009
1459	TZ	<i>Uncultured Prevotellaceae</i>	<0,010	-0,008
4300	TZ	<i>Uncultured Proteobacteria</i>	0,002	-0,008
901	FUV	<i>Uncultured Bacteroidales</i>	0,029	-0,006
2525	FUV	<i>Uncultured Clostridiales</i>	0,008	0,008
2812	FVZ	<i>Uncultured Clostridiales</i>	0,007	0,006

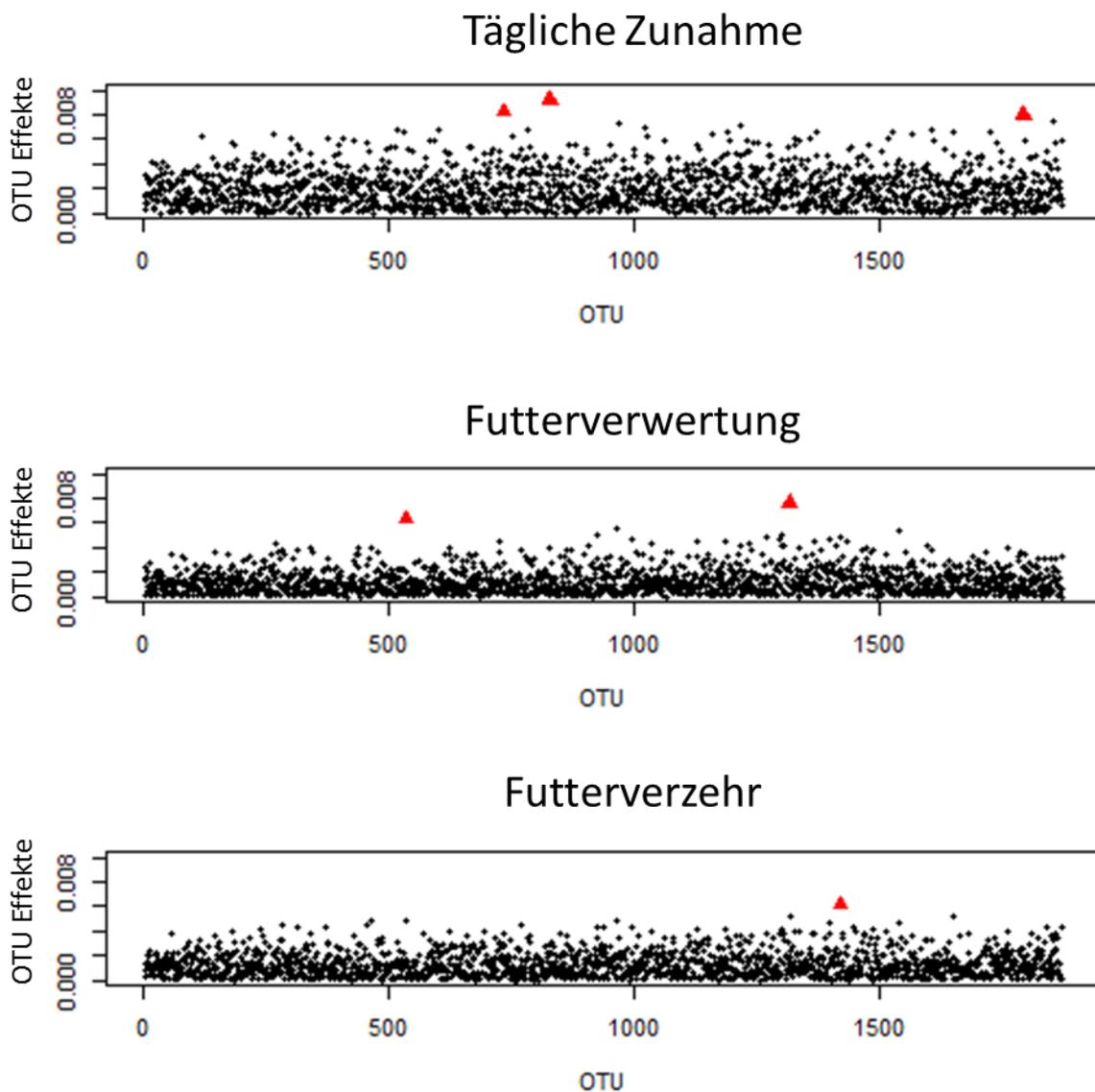


Abbildung 2: Marginale OTU Effekte (absolut Werte) für jeden OTU und für jedes Leistungsmerkmal. Ausreißer sind rot markiert.

2.4 Diskussion

Bakterielle Zusammensetzung im Schweinedarm

Die generelle mikrobielle Zusammensetzung im Darm der Schweine, stimmte in der vorliegenden Arbeit mit anderen Untersuchungen dieser Art überein (Kim und Isaacson, 2015; Looft *et al.*, 2014). Es konnte kein Einfluss des Firmicutes-Bacteroidetes Verhältnisses auf die Merkmale TZ, FUV und FVZ gezeigt werden. Auch Mach *et al.* (2015) konnten keinen Einfluss des Firmicutes-Bacteroidetes Verhältnisses auf Leistungsmerkmale beim Schwein nachweisen. In früheren Studien wurde dieses Verhältnis jedoch als Indikator für Übergewicht beim Menschen in Betracht gezogen (Ley *et al.*, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2006). Andere Studien hingegen zeigten einen gegensätzlichen Effekt oder konnten gar keinen Einfluss des Firmicutes-Bacteroidetes Verhältnisses auf Übergewicht beim Menschen nachweisen (Duncan *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2009; Jumpertz *et al.*, 2011).

Darmmikroben als quantitatives Merkmal

Für 10 von 51 bakteriellen Genera konnten signifikante Heritabilitäten geschätzt werden, was darauf rückschließen lässt, dass die Genetik der Tiere einen Beitrag zur mikrobiellen Zusammensetzung im Schweinedarm liefert. Ähnliche Heritabilitäten wurden bereits bei Estellè *et al.* (2014) für eine segregierende Large White Population und bei O'Connor *et al.* (2014) für eine segregierende Mäusepopulation geschätzt. Zwischen jedem Leistungsmerkmal und Genera mit signifikanten Heritabilitäten ($p < 0,05$) wurden genetische Korrelationen berechnet. Je nach Leistungsmerkmal und bakteriellem Genus schwankten die genetischen Korrelationen zwischen deutlich negativen und stark positiven Bereichen. Aufgrund der hohen Standardfehler der Korrelationsschätzer sollten die Ergebnisse jedoch kritisch betrachtet werden. Die hohen Standardfehler resultieren aus der relativ geringen Tieranzahl ($n=207$). Die moderaten bis hohen Heritabilitäten der 10 bakteriellen Genera implizieren, dass Gene auf dem Schweinengenom kartiert werden können, welche einen Effekt auf die relative Häufigkeit der einzelnen Genera besitzen. Der genetische Hintergrund des Tieres kann somit die Bakterienzusammensetzung im Darm aufgrund von Unterschieden in der Immunabwehr im Darm selbst (Wen *et al.*, 2008; Vijay-Kumar *et al.*, 2010; Shulzhenko *et al.*, 2011), in der Darmmukosa (Sommer *et al.*, 2014; Wlodarska *et al.*, 2014), und aufgrund von Unterschieden im Gallensäurestoffwechsel (Ryan *et al.*, 2014) beeinflussen.

Die Single-Marker Analysen lieferten zahlreiche signifikant assoziierte SNPs ($p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$) für 6 der insgesamt 10 untersuchten Genera. Für den Genus *Uncultured Spirochaetales* mit einer hohen Heritabilität ($h^2=0,52$) wurden die meisten signifikanten SNPs ($n=11$) detektiert. Interessanterweise war der SNP H3GA0020584 auf SSC 7 mit zwei bakteriellen Genera

(*Catenibacterium* und *Uncultured Spirochaetes*) signifikant assoziiert. Dieser SNP liegt im sogenannten „Swine Leukocyte Antigen“ (SLA) Komplex. Beim Menschen ist dieser Komplex als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bekannt. Es ist eine hoch variable Region auf dem Genom, deren Gene eine wichtige Rolle in der Funktion der Immunabwehr spielen (Lunney, 1994). Außerdem konnten weitere potentielle Kandidatengene im Bereich vom 1 MB up- bzw. downstream um die signifikanten SNPs identifiziert werden (siehe Tabelle 4). So wurde das Gen *SCIMP* auf SSC 12 als Kandidatengen identifiziert. *SCIMP* ist an der MHC Klasse II Signalübertragung beteiligt und dient als Regulator der Antigenpräsentation (Draber *et al.*, 2011). Es wird in B-Zellen und anderen antigenrepräsentierenden Zelle exprimiert (Draber *et al.*, 2011). Immunglobulin A wird von B-Zellen in das Darmlumen sezerniert und verändert die bakterielle Zusammensetzung im Darm, indem es Pathogene neutralisiert oder die Anheftung von Bakterien an das Darmepithel verhindert (Bauché und Marie, 2017). Park *et al.* (2001) zeigten, dass ein Mangel an *SMAD4*. *Claudin7* (*Cldn7*) beeinflusst die intestinale Permeabilität für gelöste organische Stoffe (Tanaka *et al.*, 2015). *MYO7B* ist ein weiteres Kandidatengen, das im Verdauungstrakt eine wichtige Rolle spielt und ist an der Differenzierung der Darmzotten beteiligt, indem es die Mikrovilli Organisation und Länge beeinflusst (Crawley *et al.*, 2014). In einer Studie an *SLC13A1* Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieser Sulfattransporter die Zusammensetzung der Darmschleimhaut verändert. So war der Gehalt an Sulfomucinen in der Darmschleimhaut reduziert und die Darmdurchlässigkeit erhöht (Dawson *et al.*, 2009). Das Gen *CPA1* codiert für die Carboxypeptidase A, welche in der Bauchspeicheldrüse produziert und in den Darm abgegeben wird. Es ist an der Proteinverdauung im Darm beteiligt (Waldschmidt-Leitz und Purr, 1929). Mutationen im *CPA1* Gen sind beim Menschen mit einer chronischen Entzündung der Bauchspeicheldrüse assoziiert (Witt *et al.*, 2013). Zudem wurde gezeigt, dass Menschen mit chronischen Bauchspeicheldrüsenentzündungen eine veränderte bakterielle Zusammensetzung im Darm aufweisen (Jandhyala *et al.*, 2017). Auf SSC 12 wurde das Gen *PYY* lokalisiert. Es codiert für das Peptid YY. Dieses Peptidhormon, das in endokrinen Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird, hemmt die Sezernierung von Magensäure, fördert das Auffüllen der Gallenblase und hemmt die Magenentleerung, sowie die Durchflussrate des Chymus durch den Darm (Hill *et al.*, 1991). Benachbart zu *PYY* befindet sich das Gen *PPY*. Dieses Gen kodiert für das pankreatische Hormon. Dieses Hormon wird in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse gebildet (Adrian *et al.*, 1976). Es erhöht die Sezernierung von Magensäure, hemmt die Magenentleerung, die exokrine Sezernierung der Bauchspeicheldrüse und die Motilität der Gallenblase (Kojima *et al.*, 2007).

In der Multi-Marker Regression konnte anhand von den WPPAs keine Assoziation zwischen Markern und den Genera gezeigt werden. Dies ist auf die relativ geringe Tieranzahl zurückzuführen. Insgesamt implizieren die Ergebnisse der genomweiten Assoziationsanalyse,

dass die bakterielle Zusammensetzung im Schweinedarm ein quantitatives Merkmal darstellt, welches durch viele Gene mit kleinen Effekten und wenigen Genen mit großen Effekten beeinflusst wird. Dies konnte bereits in genomweiten Assoziationsanalysen bei Menschen und Mäusen gezeigt werden (Knights *et al.*, 2014; Blehman *et al.*, 2015; Benson *et al.*, 2010; McKnite *et al.*, 2012; Leamy *et al.*, 2014; Org *et al.*, 2015).

Darmmikroben als erklärende Variable für die Leistungsmerkmale

Die Microbiability war im Gegensatz zu den Heritabilitäten für alle drei Leistungsmerkmale signifikant. Außerdem waren die Microbiabilities für FUV und FVZ höher als die geschätzten Heritabilitäten für diese Merkmale. Dies zeigt, dass die Darmmikroben einen wesentlichen Beitrag zur phänotypischen Ausprägung der Leistungsmerkmale leisten und nicht nur als quantitatives Merkmal betrachtet werden können, sondern auch als erklärende Variable in Zuchtwertschätz Modelle mitaufgenommen werden können. So kann angenommen werden, dass sich die phänotypische Varianz der untersuchten quantitativen Leistungsmerkmale durch die Summe der genetischen Varianz, der mikrobiellen Varianz und der verbleibenden Umweltvarianz beschreiben lässt. Die genomische und die mikrobielle Verwandtschaftsmatrix könnten somit gemeinsam zur Zuchtwertschätzung genutzt werden. Aufgrund der geringen Tieranzahl wurde dieser Ansatz jedoch nicht untersucht. Die mikrobielle Vorhersage für die Merkmale TZ, FUV und FVZ wies eine deutlich höhere Genauigkeit als die genomische Vorhersage auf. Dies unterstreicht die Ergebnisse der Microbiability Schätzungen und zeigt ebenfalls den deutlichen Einfluss der Darmmikroben auf die Varianz in den Leistungsmerkmalen. Die dargestellten OTU Effekte für die einzelnen Leistungsmerkmale (Abbildung 2) implizieren, dass es nur wenige OTUs mit großen Effekten, aber dafür sehr viele OTUs mit kleinen Effekten auf die Merkmale gibt. Die Merkmale TZ, FUV und FVZ sind somit nicht nur polygen, sondern auch polymikrobiell determiniert. Basierend auf diesen Ergebnissen würde sich eine Durchführung der Vorhersage mit beiden (genomische und mikrobielle) Verwandtschaftsmatrizen anbieten. In dieser Studie kann dies aber auf Grund der zu geringen Tieranzahl nicht evaluiert werden. Ross *et al.* (2013) führten eine ähnliche Vorhersagen an Rindern und Daten aus der Humanmedizin durch. Die Autoren nutzten das Metagenom der bakteriellen Gemeinschaft im Pansen bzw. im Darm, um Methanemissionen bzw. Gesundheitsmerkmale beim Menschen, wie entzündliche Darmerkrankungen und Body Mass Index vorherzusagen.

Züchtungsstrategien

Aus züchterischer Sicht können Merkmale mit signifikanten Heritabilitäten für gezielte Züchtungsstrategien verwendet werden, da ein Selektionserfolg für diese Merkmale zu erwarten ist. Im Fall der bakteriellen Genera kann ein solcher Züchtungsansatz zur Unterstützung von schwer erfassbaren Leistungsmerkmalen, wie die Verwertung von Phosphor (Beck *et al.*, 2016) und die Reduktion von Methanemission bei Rindern (Roehe *et al.*, 2016) zielführend sein. Dies beinhaltet jedoch die Phänotypisierung der mikrobiellen Zusammensetzung im Darm für alle Tiere. Ein weiterer Ansatz ist es, die Darmmikroben als erklärende Variable in das Modell der Zuchtwertschätzung mit aufzunehmen und somit die Genauigkeit der Zuchtwertschätzung zu erhöhen. Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota von Jungtieren könnte zur Schätzung von schwer erfassbaren Leistungsmerkmalen, welche erst im Erwachsenenalter der Tiere erfasst werden können, oder die Phänotypisierung sehr aufwendig ist, herangezogen werden. Hierzu müsste eine Validierung und Standardisierung des Probezeitpunktes und der Probenart gewährleistet sein, da die Mikrobenzusammensetzung im Darm nicht nur vom Alter der Tiere sondern auch von der Darmregion abhängig ist (Pajarillo *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2011; Mach *et al.*, 2015). In Bezug auf Methanemissionen bei Rindern könnte eine Referenzpopulation, in der die Methanemissionen, sowie die relative Häufigkeiten von bakteriellen Genen, erfasst und dazu genutzt werden, die Methanemissionen von Selektionskandidaten ohne deren aufwendige Phänotypisierung schätzen zu können (Roehe *et al.*, 2016).

3 Strukturelle und funktionelle genomische Analysen von Fleischqualitätsmerkmalen

In der Schweinezucht ist die Verbesserung der Fleischqualität, vor allem in den Vaterrassen, von großer Bedeutung. In dem folgendem Kapitel wurden mittels genomweiter Expressionsmessung potentielle Kandidatengene für Fleischqualitätsmerkmale identifiziert. Die Ziele waren:

- Funktionelle Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen
- Verknüpfung von funktionellen Annotationen mit strukturellen Genominformation (GWAS)
- Identifizierung von potentiellen Kandidatengenen

3.1 Literatur

3.1.1 Merkmale der Fleischqualität

Fleischqualität ist als die Summe aller sensorischen, ernährungsphysiologischen, hygienisch-toxikologischen und verarbeitungstechnologischen Eigenschaften definiert (Hofmann, 1973). Den sensorischen Eigenschaften werden Faktoren wie Farbe, Struktur, Festigkeit und Geschmack zugeordnet. Unter den ernährungsphysiologischen Eigenschaften sind z.B. der Proteingehalt, das Fettsäuremuster und der Gehalt an Mineralstoffen oder Vitaminen zu verstehen. Die hygienisch-toxikologischen Faktoren beziehen sich auf die Belastung mit Krankheitserregern und Schwermetallen. Außerdem können hierbei Medikamentenrückstände eine Rolle spielen. Zu den verarbeitungstechnologischen Eigenschaften zählen beispielsweise das Wasserbindungsvermögen und die Fettgehalte. Von großer wirtschaftlicher Bedeutung sind die sensorischen Eigenschaften, wie der intramuskuläre Fettgehalt und die verarbeitungstechnologischen, wie der Tropfsaftverlust. Diese beiden Merkmale werden im Folgenden näher erläutert.

Intramuskulärer Fettgehalt

Intramuskulärer Fettgehalt ist definiert als der Gehalt an Fett innerhalb der Muskelstrukturen und ist abzugrenzen von dem intermuskulären Fettgehalt, der die Menge an Fett zwischen Muskeln beschreibt (Hocquette *et al.*, 2010). Auf chemischer Ebene setzt sich der intramuskuläre Fettgehalt aus Phospholipiden (Bestandteil der Zellmembranen), Triglyceriden (Energiereserven) und Cholesterol zusammen (Hocquette *et al.*, 2010). Der intramuskuläre Fettgehalt kann durch verschiedene Analyseverfahren bestimmt werden. Zum einen können nasschemische Analyseverfahren angewendet werden. Dazu zählt die Extraktion nach

Soxhlet mit organischen Lösungsmitteln (z. B. n-Hexan, Methanol/Chloroform und Petrolether). Zum anderen können Schnellbestimmungsmethoden, wie Nah-Infrarot-Transmissions- (NIT) bzw. -Reflexions-Spektroskopie (NIR) eingesetzt werden. Der Einsatz von Schnellbestimmungsmethoden setzt eine nasschemische Referenzanalytik voraus (Mörlein, 2007). Für die Analysen wird meist eine ca. 1-2 cm dicke Fleischscheibe in Höhe der 13./14. Rippe herausgeschnitten. Der intramuskuläre Fettgehalt beeinflusst die Saftigkeit, den Geschmack und die Zartheit (sensorische Eigenschaften) des Fleisches (Hodgson *et al.*, 1991; Hovenier *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 2008). Das Optimum des intramuskulären Fettgehalts liegt bei 2,5 % - 3,0 %. In diesem Bereich werden die sensorischen Eigenschaften des Fleisches positiv beeinflusst (Bejerholm und Barton-Gade, 1986). Ein höherer Anteil an intramuskulären Fett führt zu keiner weiteren Verbesserung der sensorischen Eigenschaften, beeinflusst jedoch die Verbraucherakzeptanz aufgrund des steigenden Anteils an sichtbarem Fett im Fleisch negativ (Bejerholm und Barton-Gade, 1986). Der intramuskuläre Fettgehalt ist über die Fütterung beeinflussbar. Es wurde gezeigt, dass ein Lysin Mangel in der Ration am Ende der Mast den intramuskulären Fettgehalt erhöht (Witte *et al.*, 2000). Eine restriktive Fütterung mit geringen Protein- und Energiegehalten führt hingegen zu einer Reduktion des intramuskulären Fettgehalts, wohingegen eine *ad libitum* Fütterung mit geringen Proteingehalten in einem erhöhten intramuskulären Fettgehalt resultiert (Gondret und Lebret, 2002). Morel *et al.* (2008) zeigten, dass eine Ergänzung der Futtermischung mit Selen und Vitamin E zu einer Zunahme des intramuskulären Fettgehalts führt. Rationen ohne Zusatz von synthetisch hergestellten Aminosäuren erhöhten den intramuskulären Fettgehalt, reduzierten jedoch die Wachstumsleistung (Sundrum *et al.*, 2000). Neben der Fütterung, nimmt aber auch die Genetik einen wesentlichen Einfluss auf den intramuskulären Fettgehalt. In Tabelle 8 ist eine Übersicht über geschätzte Heritabilitäten für den intramuskulären Fettgehalt verschiedener Schweinerassen dargestellt. Die Heritabilitäten liegen in einem Bereich von 0,25 - 0,78, was auf moderate bis hohe Erbllichkeit des Merkmals hinweist.

Tabelle 8: Heritabilitäten (h^2) mit Standardfehler (SE) und Anzahl getesteter Tiere (n) aus der Literatur für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt – eine Auswahl.

h^2	SE	n	Rasse	Quelle
0,78	0,05	686	Bunte Bentheimer	Biermann <i>et al.</i> (2015)
0,42	<0,09	3 603	Piétrain	Dodenhoff <i>et al.</i> (2011)
0,73	<0,09	16 073	Mutterrassen ¹	Dodenhoff <i>et al.</i> (2011)
0,39	0,02	544	Duroc	Suzuki <i>et al.</i> (2005)
0,44	0,10	383	Large White	Larzul <i>et al.</i> (1997)
0,25	0,03	1 489	Iberisches Schwein	Fernandez <i>et al.</i> (2003)

¹ Die untersuchten Mutterrassen setzten sich aus dem Deutschen Edelschwein und der Deutschen Landrasse zusammen.

Tropfsaftverlust

Der Tropfsaftverlust ist ein Maß für das Safthaltevermögen von Fleisch. Hohe Tropfsaftverluste lassen auf ein schlechtes Safthaltevermögen schließen. Das Safthaltevermögen ist die Eigenschaft von Fleisch das in ihm natürlich enthaltene Wasser teilweise oder auch ganz zu halten (Honikel, 1987). Der Tropfsaftverlust ist von großer Bedeutung, da er nicht nur einen Gewichtsverlust, sondern auch ein Verlust an wertvollen Proteinen bedeutet (Huff-Lonergan und Lonergan 2005). Hohe Tropfsaftverluste beeinflussen außerdem die Verbraucherakzeptanz von Frischfleischprodukten. Rohes Fleisch, welches hohe Tropfsaftverluste zeigt, ist meistens weniger zart, saftig und geschmackvoll (Huff-Lonergan und Lonergan 2005). Die genaue Entstehung von Tropfsaftverlusten ist noch nicht geklärt. Als maßgebliche Ursachen für hohe Tropfsaftverluste sind jedoch die Höhe und die Schnelligkeit des pH-Wert Abfalls nach der Schlachtung, sowie die Proteolyse und Proteinoxidation bei der Fleischreifung zu nennen. Als weitverbreitete Standardmethode zur Erfassung des Tropfsaftverlustes ist die Bag-Methode nach Honikel (1998) zu nennen. Hierbei wird der Tropfsaftverlust ohne Einwirkung von mechanischem Zwang erfasst. Es wird 24 h Stunden nach der Schlachtung zwischen der 12. und 15. Rippe ein 2 cm dickes Kotelettstück entnommen. Diese Probe wird gewogen und anschließend in einem Folienbeutel eingeschweißt. Außerdem wird das Fleischstück mit einem Faden oder Haken so fixiert, dass es weder den Beuteltboden noch den Beutelrand berührt. Nach einer Lagerung bei 4 °C für 24 h bzw. 48 h wird das Fleischstück rückgewogen. Der prozentuale Anteil des Gewichtsverlustes entspricht dem Tropfsaftverlust.

Eine Nüchterung der Tiere vor der Schlachtung, kann den Tropfsaftverlust reduzieren (Salmi *et al.*, 2012). Durch die Nüchterung werden die Glykogenreserven des Muskels aufgebraucht. Folglich kommt es zu keinem zu starken und zu schnellen pH-Abfall *post mortem* und der Tropfsaftverlust wird reduziert. Doch auch die Lagertemperatur nach der Schlachtung nimmt merklich Einfluss auf den Tropfsaftverlust. Wird das Fleisch sehr rasch gekühlt, so dass es eine Temperatur unter 15 °C vor Eintritt der *rigor mortis* erreicht, kommt es zum sogenannten cold shortening (Honikel und Schwägele, 1998). Der Muskel verkürzt sich, es kommt zu erhöhter Zähigkeit und erhöhtem Tropfsaftverlust (Honikel und Schwägele, 1998). Kurz vor Einsetzen der *rigor mortis* und einem pH-Wert von 5,7 bis 6,0 kommt es bei Temperaturen über 20 °C zum rigor shortening (Honikel und Schwägele, 1998). Dies kann eine Verkürzung der Muskulatur um bis zu 20 % hervorrufen und führt ebenso zu erhöhtem Tropfsaftverlust und erhöhter Zähigkeit. Ähnlich wie der intramuskuläre Fettgehalt ist der Tropfsaftverlust gering bis hoch erblich. Heritabilitäten für einzelne Schweinerassen sind in Tabelle 9 dargestellt. Sie liegen in einem Bereich von 0,08 bis 0,66.

Tabelle 9: Heritabilitäten (h^2) mit Standardfehler (SE) und Anzahl getesteter Tiere (n) aus der Literatur für das Merkmal Tropfsaftverlust – eine Auswahl.

h^2	SE	n	Rasse	Quelle
0,40	0,05	658	Bunte Bentheimer	Biermann <i>et al.</i> (2015)
0,28	<0,09	3 510	Mutterrassen ¹	Dodenhoff <i>et al.</i> (2011)
0,66	<0,09	1 553	Piértrain	Dodenhoff <i>et al.</i> (2011)
0,21	<0,04	5 890	Large White	Knapp <i>et al.</i> (1997)
0,10	<0,04	3 126	Landrasse	Knapp <i>et al.</i> (1997)
0,10	<0,04	6 483	Piértrain	Knapp <i>et al.</i> (1997)

¹ Die untersuchten Mutterrassen setzten sich aus dem Deutschen Edelschwein und der Deutschen Landrasse zusammen.

Majorgene der Fleischqualität

Mehrere Hauptgene, die die Fleischqualität stark beeinflussen, wurden bis dato identifiziert. Eines der wichtigsten Gene dabei, ist der *Ryanodin Rezeptor 1 (Ryr1)*. Schon sehr früh wurde eine autosomal rezessive Variation dieses Gens in Zusammenhang mit dem Malignen Hyperthermie Syndrom (MHS) gebracht und ein indirekter Gentest, basierend auf einer Reaktion auf Halothanästhesie eingeführt (Eikelenboom und Minkema, 1974). Fujii *et al.* (1991) identifizierten die Mutation als Substitution der Base C zu T im *Ryr1* auf Chromosom 6, welche zu einer Substitution der Aminosäure Arginin zu Zytosin führt. Mittlerweile ist ein direkter Gentest verfügbar. Vor allem bei Rassen, wie beispielsweise Piértrain, welche in der kommerziellen Schlachtschweineerzeugung eingesetzt werden und auf starke Bemuskelung, sowie geringe Verfettung selektiert wurden, kam es zu einer Akkumulation dieser Variation. Defekte im *Ryr1* beeinflussen den Transport von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der Muskelzelle in das Zytoplasma und somit die Muskelkontraktion. Träger der Mutation weisen eine stärkere Bemuskelung und geringere Verfettung auf. *Post mortem* kommt es jedoch aufgrund des veränderten Calciumionenstoffwechsels zu blassen (Pale), weichen (Soft) und wässrigen (Exudative) Veränderungen des Fleisches, dem sogenannten PSE-Fleisch. Biochemische Grundlage dafür ist ein rapider Glykogenverbrauch durch den Muskel, was zu einer starken Anreicherung von Lactat führt (Bendall und Swatland, 1988) und somit einen schnelleren Abfall des pH-Wertes, im Vergleich zu normalen Bedingungen bei der Fleischreifung, veranlasst. Dies führt zu einer Denaturierung der Zellstruktur und somit zu der typischen visuellen Erscheinung des PSE-Fleisches. In der Rasse Hampshire wurde ein weiteres Hauptgen für die Fleischqualität entdeckt. Ein erhöhter Glykogengehalt der Skelettmuskulatur, ein niedriger End-pH-Wert am Ende der Fleischreifung, ein geringes Wasserbindungsvermögen und eine helle Farbe des Fleisches ließen sich auf ein dominantes Allel am *Rendement Napole (RN)* Locus zurückführen (Monin und Sellier, 1985). Rendement ist französisch für Ausbeute und Napole ist eine Methode zur Bewertung der Koch-

schinkenausbeute. Eine Feinkartierung des *RN* Locus zeigte eine kausale Punktmutation im *PRKAG3* Gen auf Chromosom 15 (Milan *et al.*, 2000). Bei der Variation handelt es sich um eine missense Mutation, anstelle der Aminosäure Arginin wird Glycin codiert. Die Mutation führt zu einer steigenden Glukoseaufnahme in die Muskulatur.

3.1.2 Funktionelle Genannotation

Unter funktioneller Annotation ist das Sammeln von Informationen über und die Beschreibung von der biologischen Identität eines Gens zu verstehen (Berardini *et al.*, 2004). Die am häufigsten angewendete Quelle zur funktionellen Annotation sind die Gen Ontologie (GO) und Stoffwechseldatenbanken, wie z.B. die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Gene Ontology Consortium, 2001; Kanehisa *et al.*, 2004). Gen Ontologien werden in drei Bereiche eingeteilt, die im Folgenden näher erläutert werden. Die molekularen Funktionen beschreiben die Funktion des Genproduktes auf biochemischer Ebene. Biologische Prozesse sind zelluläre Abläufe, an denen das Genprodukt beteiligt ist. Die zelluläre Komponente bezieht sich auf den Zellort an dem das Genprodukt gefunden wird (Gene Ontology Consortium, 2001). Bei den Gen Ontologien handelt es sich jedoch nicht um Ontologien im klassischen Sinne, sondern um eine standardisierte und begrenzte Verwendung von definierten Termen (Berardini *et al.*, 2004). Die Terme sind hierarchisch aufgebaut und besitzen definierte Beziehungen zwischen einander. GO Terme liefern einen schnellen Einblick in die Funktion von Transkripten. Für Fleischqualitätsmerkmale beim Schwein wurden bereits zahlreiche Genexpressionsanalysen durchgeführt (Ponsuksili, Murani *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007; Ponsuksili *et al.*, 2010; Heidt *et al.*, 2013). Für den intramuskulären Fettgehalt konnten basierend auf funktioneller Annotation bereits Gene und Stoffwechselwege identifiziert werden. Vincent *et al.* (2012) untersuchten den Fettstoffwechsel anhand von Microarray-Analysen von zwei unterschiedlichen Schweinerassen, der mageren Rasse Large White und dem zur Verfettung neigendem Basken Schwein. Die GO-Enrichment-Analysen hoben den Energiestoffwechsel der Mitochondrien und die Immunantwort hervor. In denselben Rassen zeigten Damon *et al.* (2013) mittels funktioneller Annotation, dass insbesondere Transkripte, welche an der Proteinsynthese, Glykolyse und am Lipidkatabolismus beteiligt sind, den intra-muskulären Fettgehalt beeinflussen. In selbiger Studie wurden die Glykolyse, Fettsäuren-oxidation und der Harnstoffzyklus in Bezug zum Tropfsaftverlust gesetzt. Ponsuksili *et al.* (2009) untersuchten den Einfluss von Genexpressionen auf Fleischqualitätsmerkmalen bei Duroc x Piétrain Kreuzungstieren. Anhand von funktionellen Enrichment-Analysen wurden hierbei, die Ubiquitinierung von Proteinen, der mitochondrielle Stoffwechsel und die Strukturproteine des Muskels als Einflussfaktoren auf den Tropfsaftverlust identifiziert.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Datenerhebung

Bei den verwendeten Tieren dieser Arbeit handelte es sich um 210 Sauen der Rasse Piétrain, welche am LSZ Boxberg im Rahmen der Mast und Schlachtleistungsprüfung phänotypisiert und beprobt wurden. Die Haltung, Schlachtung und Phänotypisierung der Tiere erfolgte nach der Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein (ZDS, 2007). Vor Ort wurden routinemäßig die Merkmale intramuskulärer Fettgehalt (IMF) und Tropfsaftverlust (TSV) erfasst. An 14 Schlachttagen wurden je Tier 20 ml EDTA Vollblut gewonnen. Anschließend wurden je Tier 1 g Gewebe aus dem *M. semimembranosus* entnommen und in RNALater Lösung konserviert. Alle Proben wurden zunächst auf Eis und anschließend bei -20 °C gelagert.

Genotypisierung

Die Genotypisierung entspricht der gleichen Herangehensweise wie unter 2.2.1 beschrieben. Sie wird im folgendem nochmals erläutert. Für die Genotypisierung wurde zunächst die DNA der Tiere isoliert. Die Isolierung der DNA erfolgte aus Vollblut mit dem Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Die 210 Sauen wurden mit dem Illumina PorcineSNP60 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA, Ramos *et al.*, 2009) genotypisiert. Die Position der Marker auf dem porcinen 60K SNP-Chip wurde der neuesten Genomeassembly *Sus scrofa* (SSC) 11.1 entnommen (Warr *et al.*, 2017). Der Abgleich der Nukleotidsequenzen von Illumina mit der FASTA Sequenz der Genomassemblierung SSC 11.1, sowie deren Filterung ist in Stratz *et al.* (2017) beschrieben. Die Genotypen wurden nach signifikanter Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p < 0,0001$), Call Rate (Entfernung von SNPs mit Call Rates < 95 %), Minor Allele Frequency (MAF; Entfernung von SNPs mit MAF < 5 %) gefiltert. Die Filterung erfolgte mit dem Programm GenomeStudio (Illumina, San Diego, USA). Außerdem wurden die Geschlechtschromosomen entfernt. Sporadische fehlende Genotypen wurden mit Beagle (Browning und Browning, 2007, 2009) imputiert. Es verblieben 44 059 SNPs für die weiteren Analysen. Aufgrund des fehlenden MHS-Genotyps auf dem SNP60BeadChip wurde anschließend der MHS-Status der Tiere mittels der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) -Methode erfasst. Hierfür wurde ein 132 basenpaarlanges DNA-Fragment aus dem Exonbereich des Ryanodinrezeptor-Gens (*Ryr1*) mittels PCR amplifiziert. Die Primer-Sequenzen sind im Anhang in Tabelle A3 dargestellt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *Hin6I* behandelt. Die Darstellung der Restriktionsfragmente erfolgte durch Elektrophorese im Polyacrylamidgel.

RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurden ca. 0,3 g Gewebe eingewogen und mittels FastPrep System (MP Biomedicals, Solon, USA) homogenisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Plus Universal Kit (Quiagen, Hilden, DE). Hierbei handelte es sich um eine Phenol/Guanidin basierte Zellyse mit integrierter Kiesegelmembranreinigung. Die Lysate wurden anschließend bei -80 °C gelagert. Im Anschluss wurde die isolierte RNA mittels NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) und Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) mit dem Agilent RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) quantifiziert und qualifiziert.

Differentielle Genexpressionsmessung

Für die differentielle Genexpressionsmessung wurden je Merkmal (IMF bzw. TSV) acht extrem diskordante Voll- bzw. Halbgeschwisterpaare aus insgesamt 29 Vollgeschwisterfamilien und 19 Halbgeschwisterfamilien ausgewählt. Dies soll sicherstellen, dass differentielle Expressionen aufgrund ihrer Unterschiede in einzelnen Genen, welche die zu betrachtenden Merkmale beeinflussen, und nicht aufgrund des genetischen Hintergrundes gefunden werden. Die geringe Tieranzahl ist ein Kompromiss zwischen den erforderlichen extremen Unterschieden in der Phänotypausprägung der Geschwister, was die Anzahl an geeigneten Geschwisterpaare begrenzt, und einer angemessenen Darstellung der biologischen Varianz zwischen den extrem diskordanten Geschwisterpaaren (Ponsuksili *et al.*, 2005). Die genomweite Expressionsmessung erfolgte am Institut für Genombiologie des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie (FBN Dummerstorf, DE). Gemäß dem Affymetrix Protokoll wurden mit dem Affymetrix One Cicle Synthesis und Labelling Kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) pro Tier 500 ng RNA zu cDNA revers transkribiert, sowie zu cRNA transkribiert und markiert. Die Hybridisierung der fragmentierten biotin-markierten cRNA erfolgte mit dem Affymetrix Snowball Array (Freeman *et al.*, 2012; Fairbairn *et al.*, 2014). Die Normalisierung und \log_2 -Transformation der Rohdaten erfolgte mit dem Robust Multichip Analysis (RMA) Algorithmus und der Affymetrix Expression Console 1.1 Software (Affymetrix, Santa Clara, USA). Zur Erhöhung der statistischen Power wurden Transkripte mit einem Mittelwert $< 2,5$ und einer Standardabweichung $< 0,20$ vom Datensatz entfernt (Bourgon *et al.*, 2010). Die Annotationsinformationen stammen von den Entwicklern des Affymetrix Snowball Arrays (Freeman *et al.*, 2012; Fairbairn *et al.*, 2014).

3.2.2 Statistische Auswertung

Differentielle Genexpression und funktionelle Analyse

Die Auswertung der differentiellen Genexpression für jedes Merkmal erfolgte in der Software R mittels eines zweiseitigen t-Tests mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$. Anschließend wurden zwischen signifikant differentiell exprimierten Genen und den Merkmalsausprägungen (IMF, TSV) die Pearson-Korrelationen ($p < 0,05$) berechnet. Die signifikant differentiell exprimierten und merkmalskorrelierten Gene wurden für die weiteren Analysen verwendet. Diese Gene wurden anhand von Gen Ontologie (GO) Information mittels Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) funktionell kategorisiert und mit der Literatur abgeglichen. Eine Gen-Term-Enrichment-Analyse wurde mit der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; Huang *et al.*, 2009) durchgeführt, um die relevantesten biologischen Terme zu identifizieren. Die p -Werte wurden anhand des exakten Fisher-Tests berechnet. Dabei wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass Gene dieser Studie im Vergleich zum gesamten Schweinegenom in bestimmten GO Termen mehr angereicht sind, als es durch Zufall möglich wäre ($p < 0,05$).

Genomweite Assoziationsanalyse

Die Assoziationskartierungen folgen der Beschreibung aus Punkt 2.2.2 und sollen an dieser Stelle nochmals erläutert werden. Die genomweite Assoziationsanalyse wurde mit der Software GCTA (Yang *et al.*, 2014) durchgeführt. Die Merkmale wurden um den MHS-Status als Kovariate vorkorrigiert. Folgendes gemischtes lineares Modell wurde für jeden SNP j nacheinander angewandt:

$$y_i = \mu + b_j x_{ij} + a_i + e_i, \quad (6)$$

wobei y_i der phänotypische Wert (IMF bzw. TSV) des Tieres i , b_j der Effekt des zu testenden SNPs j , μ das Populationsmittel, x_{ij} Anzahl an 1-Allelen am SNP j für das Tier i ($x_{ij} = 0, 1$ oder 2) und a_i der zufällig modellierte polygene Effekte des Tieres ist ($\mathbf{a} \sim N(0, \mathbf{G}\sigma_A^2)$). \mathbf{G} ist die genomische Verwandtschaftsmatrix, σ_A^2 die additiv-genetische Varianz und e_i das Residuum des Tieres i . Bei der Assoziationsanalyse wurde jeweils das Chromosom, auf welchem sich der SNP des zu schätzenden Markereffektes befindet, von der Modellierung der genomischen Verwandtschaftsmatrix ausgeschlossen. So wird eine doppelte Modellierung des betrachteten SNPs vermieden, was zu einem Verlust der statistischen Power führen könnte (Yang *et al.* 2014). Neben dem genomweiten Signifikanzniveau ($p_{\text{genomweit}} < 0,05$) wurde ein weniger stringentes Signifikanzniveau von $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$ verwendet. Zur Korrektur um das multiple

Strukturelle und funktionelle genomische Analysen von Fleischqualitätsmerkmalen

Testen wurde die False Discovery Rate (FDR) berechnet. Hierfür wurde mit dem Programm QVALUE (Storey, 2002; Storey und Tibshirani, 2003) für jeden Test ein q -Wert berechnet, welcher den Anteil an falsch positiven Tests angibt. Mit NCBI Map Viewer (Dombrowski und Maglott, 2003) wurden Gene im cis-Bereich von 3 MB up- bzw. downstream um die signifikanten SNPs kartiert.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Differentielle Genexpression und funktionelle Annotation

In Tabelle 10 ist die deskriptive Statistik der merkmalsdivergenten Geschwisterpaare (high/low) für die Merkmale IMF und TSV dargestellt. Nach der Filterung verblieben für das Merkmal IMF 25 716 Transkripte, von denen 21 213 annotiert wurden. Eine differentielle Expression ($p < 0,01$) zeigten 94 Transkripte, wovon 35 merkmalskorreliert ($p < 0,05$) waren. Für TSV verblieben nach der Filterung 25 191 Transkripte. 20 860 Transkripte wurden annotiert und 119 Transkripte zeigten eine differentielle Expression ($p < 0,01$), wovon 114 merkmalskorreliert ($p < 0,05$) waren. Diese 35 (bzw. 114) Transkripte wurden für die weiteren Analysen genutzt.

Tabelle 10: Leistungen der 210 Piétrain Sauen bzw. der merkmalsdivergenten Geschwisterpaare (high/low) mit Mittelwert \pm Standardabweichung für die Merkmale intramuskulärer Fettgehalt (IMF) und Tropfsaftverlust (TSV).

	Gesamt	high	low
Anzahl an Tieren	210	5	5
IMF	1,17 \pm 0,36	2,24 \pm 0,47	1,19 \pm 0,37
TSV	2,72 \pm 1,46	5,01 \pm 1,01	1,50 \pm 0,57

Funktionelle Annotation

Ausgehend von den 35 bzw. 114 differentiiell exprimierten und merkmalsassoziierten Genen für IMF bzw. TSV, wurden für diese GO Terme erstellt. Für IMF (bzw. TSV) wurden 1 561 (bzw. 1 978) GO Terme biologischen Prozessen, 226 (bzw. 309) zellulären Komponenten und 236 (bzw. 374) molekularen Funktionen zugeordnet. Die Gen-Term-Enrichment-Analyse ergab 4 GO Terme für IMF und 6 GO Terme für TSV, in denen Gene signifikant angereichert waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 bzw. 12 dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Gen-Term-Enrichment-Analyse mit GO Term, den GO Term zugeordneten Genen und den p -Wert für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt (IMF).

GO Term	Gene	p -Wert
positive regulation of protein serine/threonine kinase activity	<i>RALB, SNCA</i>	$9,20 \times 10^{-5}$
phospholipid binding	<i>APOM, SNCA</i>	$4,00 \times 10^{-4}$
long-term synaptic potentiation	<i>MAPK1, SNCA</i>	$2,30 \times 10^{-4}$
extracellular exosome	<i>RALB, APOM, KLK1, LYVE1, MAPK1</i>	$2,20 \times 10^{-2}$

Tabelle 12: Ergebnisse der Gen-Term-Enrichment-Analyse mit GO Term, den GO Term zugeordneten Genen und den *p*-Wert für das Merkmal Tropfsaftverlust (TSV).

GO Term	Gene	<i>p</i> -Wert
skeletal muscle cell differentiation	<i>BTG2, MAFF, ATF3</i>	1,60 x 10 ⁻⁴
extracellular exosome	<i>BTG2, CXCR4, CD37, CD84, FAS, MUM1L1, BCAM, CAD, OSTF1, PPIA, PABpc1L, SLC15A2</i>	2,30 x 10 ⁻²
histone deacetylase complex	<i>MECOM, HDAC4</i>	1,60 x 10 ⁻³
positive regulation of telomerase RNA localization to Cajal body	<i>SHQ1, NAF1</i>	1,30 x 10 ⁻³
regulation of cell proliferation	<i>BRAF, FAS, GKN3</i>	1,30 x 10 ⁻²
long-term synaptic potentiation	<i>BRAF, GFAP</i>	3,70 x 10 ⁻³

Des Weiteren wurden alle aus Blast2GO erhaltenen GO Terme mit bereits in der Literatur beschriebenen GO Terme für diese Merkmale abgeglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 für IMF und in Tabelle 14 für TSV dargestellt. Der Abgleich mit der Literatur ergab 10 GO Terme für das Merkmal IMF. Für das Merkmal TSV waren 16 GO Terme mit der Literatur deckungsgleich.

Tabelle 13: Abgleich der GO Terme von signifikant assoziierten Genen aus der differentiellen Genexpressionsmessung mit der Literatur für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt (IMF).

GO Terme aus der Literatur	Signifikant assoziierte Gene
Vincent <i>et al.</i> (2012)	Eigene Studie
GO:0006119 oxidative phosphorylation	<i>SNCA</i>
GO:0006928 movement of cell or subcellular component	<i>BOC, ANK2</i>
GO:0006955 immune response	<i>MLT, NMT2, SNCA</i>
GO:0022904 respiratory electron transport chain	<i>SNCA</i>
GO:0030029 actin filament-based process	<i>ANK2</i>
GO:0034097 response to cytokine	<i>SNCA</i>
GO:0034220 ion transmembrane transport	<i>CACNG8, AKAP7, ANK2, SNCA</i>
GO:0042773 ATP synthesis coupled electron transport	<i>SNCA</i>
Damon <i>et al.</i> (2013)	Eigene Studie
GO:0070271 protein complex biogenesis	<i>BLM, RALB, MLT, HIST1H4E, SNCA</i>
GO:0000166 nucleotide binding	<i>NTRK2, BLM, RALB, MAPK1, AKAP7</i>

Tabelle 14: Abgleich der GO Terme von signifikant differentiell exprimierten und korrelierten Genen aus der differentiellen Genexpressionsmessung mit der Literatur für der Merkmal Tropfsaftverlust (TSV).

GO Term aus der Literatur		Signifikant assoziierte Gene
Damon <i>et al.</i> (2013)		Eigene Studie
GO:0016072	rRNA metabolic process	<i>SHQ1</i>
GO:0070271	protein complex biogenesis	<i>UVRAG, PSMC4, SPIRE2, TOMM20L, FAS, BIRC2</i>
GO:0005764	lysosome	<i>CXCR4, GFAP</i>
GO:0031410	cytoplasmic vesicle	<i>UVRAG, PSMC4, SPIRE2, FAS, CXCR4, DCLK2, TJAP1</i>
Ponsuksili <i>et al.</i> (2009)		Eigene Studie
GO:0006793	phosphorus metabolic process	<i>NTRK2, CD84, MAP3K1, SH2D4A, DCLK2, MRE11A, BRAF, CYR61, PLB1, PLD2, C17orf87, FAS, ALPK3, PDE7A, TRIB1, PPIA, ATF3</i>
GO:0016567	protein ubiquitination	<i>KLHL34, TRIB1, PARP14, BIRC2</i>
GO:0005789	endoplasmic reticulum membrane	<i>TMEM110</i>
GO:0012505	endomembrane system	<i>GALNT7, UVRAG, FAS, CXCR4, DCLK2, P4HB, ACBD3, TJAP1, PLD2, TMEM110</i>
GO:0031090	organelle membrane	<i>GALNT7, TOMM20L, SPIRE2, FAS, ACBD3, GFAP</i>
GO:0044429	mitochondrial part	<i>TOP1MT, TOMM20L</i>
GO:0005524	ATP binding	<i>NTRK2, MAP3K1, QARS, TTC33, PSMC4, DCLK2, BRAF, NEB, ALPK3, TRIB1</i>
GO:0016787	hydrolase activity	<i>HDAC4, MRE11A, NEB, PLB1, PLD2, CTRL, PSMC4, TOP1MT, SPOCK3, DPEP2, FAS, MNDA, PDE7A, OTUD1</i>

3.3.2 Verknüpfung von funktionellen Annotationen und GWAS

Genomweite Assoziationsanalysen

Die Ergebnisse der genomweiten Assoziationsanalyse sind in Abbildung 3 dargestellt. Unter dem genomweiten Signifikanzniveau konnte keine signifikante Assoziation gefunden werden. Für IMF wurde ein merkmalsassoziierter SNP auf SSC 14 und für TSV ein merkmalsassoziierter SNP auf SSC 16 unter der Annahme des nominalen Signifikanzniveaus von $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$ kartiert. Eine genaue Auflistung der signifikanten SNPs ist im Anhang Tabelle A4 dargestellt.

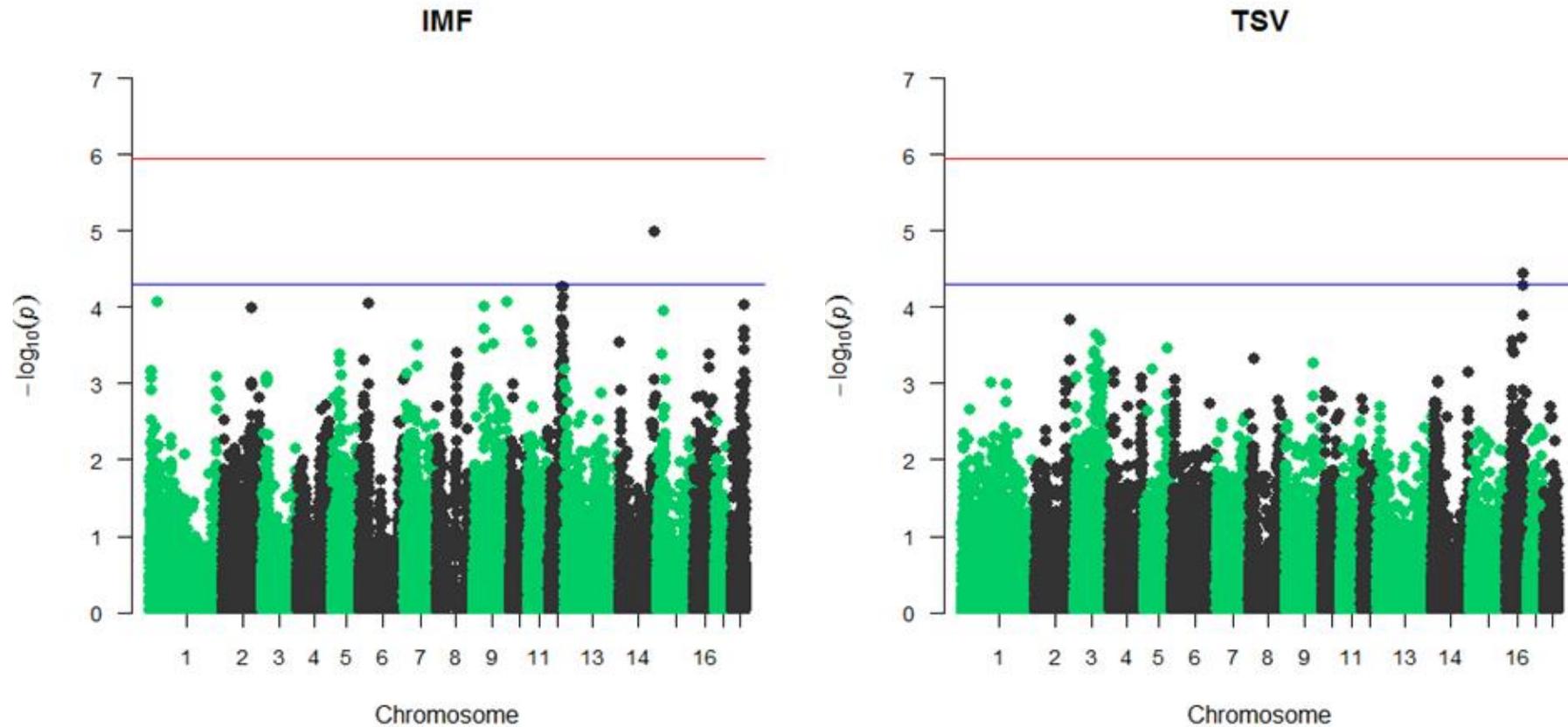


Abbildung 3: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und IMF bzw. TSV. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p)$ -Wert. Die obere Linie entspricht $p_{\text{genomweit}} < 0,05$ und die untere Linie $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$.

Gene Ontologie Terme für Gene im cis-Bereich signifikanter SNPs

Gene in einem Bereich von 3 MB up- und downstream um die signifikanten SNPs (pQTL) wurden zur Erstellung von GO Termen genutzt. Für IMF (bzw. TSV) wurden 796 (bzw. 379) GO Terme biologischen Prozessen, 76 (bzw. 99) zellulären Komponenten und 115 (bzw. 104) molekularen Funktionen zugeordnet. Die erstellten GO Terme aus den genomweiten Assoziationsanalysen wurden mit den GO Termen, welche im Literaturvergleich bestätigt worden sind, abgeglichen. Es wurden vier überlappende GO Terme für IMF und drei überlappende GO Terme für TSV identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 und 16 dargestellt.

Tabelle 15: Überlappende GO Terme aus der funktionellen Annotation der signifikant assoziierten Gene (Microarray) und der cis-Region des signifikanten SNPs (pQTL) für IMF.

Signifikant assoziierte Gene (Microarray)	Identische GO Terme	Beschreibung	Gene in der cis-Region der pQTL
<i>BOC, ANK2</i>	GO:0006928	movement of cell or subcellular component	<i>ADRA2A</i>
<i>ANK2</i>	GO:0030029	actin filament-based process	<i>ADRA2A</i>
<i>CACNG8, AKAP7, ANK2, SNCA</i>	GO:0034220	ion transmembrane transport	<i>ADRA2A</i>
<i>NTRK2, BLM, RALB, MAPK1, AKAP7</i>	GO:0000166	nucleotide binding	<i>RBM20, SMC3</i>

Tabelle 16: Überlappende GO Terme aus der funktionellen Annotation der signifikant assoziierten Gene (Microarray) und der cis-Region des signifikanten SNPs (pQTL) für TSV.

Signifikant assoziierte Gene (Microarray)	Identische GO Terme	Beschreibung	Gene in der cis-Region der pQTL
<i>NTRK2, CD84, MAP3K1, SH2D4A, DCLK2, MRE11A, BRAF, CYR61, PLB1, PLD2, C17orf87, FAS, ALPK3, PDE7A, TRIB1, PPIA, ATF3</i>	GO:0006793	phosphorus metabolic process	<i>PANK3, LCP2</i>
<i>GALNT7, UVRAG, FAS, CXCR4, DCLK2, P4HB, ACBD3, TJAP1, PLD2, TMEM110</i>	GO:0012505	endomembrane system	<i>TENM2</i>
<i>NTRK2, MAP3K1, QARS, TTC33, PSMC4, DCLK2, BRAF, NEB, ALPK3, TRIB1</i>	GO:0005524	ATP binding	<i>PANK3, RARS</i>

3.4 Diskussion

In dieser Studie wurden Transkriptspiegel von Muskelgewebe zum Zeitpunkt der Schlachtung in Kombination mit Fleischqualitätsmerkmalen untersucht. Diese Studie sollte einen Einblick in die beteiligten biologischen Prozesse geben, welche die Fleischqualität beeinflussen. Basierend auf den in Kapitel 3.3 gezeigten Ergebnissen, ließen sich potentielle Kandidatengene identifizieren.

Auf die Korrektur um das multiple Testens wurde verzichtet, da die biologischen Unterschiede zwischen den beiden getesteten Gruppen (high/low) im Vergleich zum Rauschen des Microarrays, relativ gering waren. Für das Merkmal IMF konnte ein signifikanter SNP ($p < 5 \times 10^{-5}$) auf SSC 14 und für TSV ein signifikanter SNP auf SSC 16 kartiert werden. Eine Erhöhung der Tieranzahl würde die Power zur Assoziationskartierung wesentlich erhöhen und es könnten somit eindeutigere Signale detektiert werden. Die im weiteren Verlauf vorgeschlagenen potentiellen Kandidatengene sollten mittels quantitativer PCR an den 210 beprobten Tieren validiert werden.

Funktionelle Annotation für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt

Die Enrichment-Analyse ergab 4 GO Terme für IMF, in denen Gene signifikant angereichert waren. Darunter waren die Serin/Threoninkinase Aktivität, die Phospholipidbindung und die extrazelluläre Exosomen. Vincent *et al.* (2012) untersuchten die Neigung zur Verfettung auf Transkriptomebene bei Schweinen. Hierbei wurden die magere Large White Rasse mit einer körperfettbetonten Rasse, Basken-Schwein, verglichen. In der vorliegenden Studie waren 8 GO Terme in Übereinstimmung mit der Studie von Vincent *et al.* (2012). Damon *et al.* (2013) analysierten mittels genomweiter Expressionsmessung Gene, welche mit IMF von 30 Basken-Schweinen assoziiert sind. Signifikant assoziierte Gene wurden in einer Large White Population ($n=20$) validiert. Zwei GO Terme dieser Studie wurden auch in der vorgelegten Arbeit für IMF gefunden, darunter waren Proteinsynthese und Nukleotidbindungen. Die Verknüpfung der GO Terme aus der Literaturrecherche mit den GO Termen, welche auf Grundlage von Genen im cis-Bereich des signifikanten SNPs aus der GWAS gebildet wurden, ergab eine Übereinstimmung von 4 GO Termen. Insbesondere Gengruppen, welche dem Energiestoffwechsel der Mitochondrien, der Immunantwort und dem Fettstoffwechsel angehören, scheinen Einfluss auf die Verfettung zu nehmen. Klimcakova *et al.* (2010) zeigten beim Menschen, dass eine erhöhte Immunantwort und ein herabgesetzter Stoffwechsel hauptsächlich an der Entwicklung von Übergewicht und metabolischen Erkrankung beteiligt sind. Beim Menschen (Klimcakova *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2005) oder bei Mäusen (Wilson-Fritch *et al.*, 2004) wurde der mitochondrielle Energiestoffwechsel und der Elektronentransport mit

Übergewicht assoziiert. Vor allem in der Physiologie und dem Stoffwechsel von weißem Fettgewebe scheinen Mitochondrien eine wesentliche Rolle zu spielen (De Pauw *et al.*, 2009; Villarroya *et al.*, 2009). Die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien ist der wesentliche Mechanismus der ATP-Synthese. Zahlreiche Stoffwechselwege, die Energie bereitstellen, scheinen in Muskeln mit hohem IMF runterreguliert zu sein (Hamill *et al.*, 2012). Die eingeschränkte Oxidation von Fettsäuren in diesem Gewebe scheint die Akkumulierung von Fettablagerungen im Muskelgewebe zu begünstigen (Hamill *et al.*, 2012). In Rinderrassen wurde ebenso eine verminderte Expression von mitochondriellen Genen im Muskelgewebe von fetteren Phänotypen (Wagyu Rind) im Vergleich zu mageren Phänotypen (Piemonteser Rind) beobachtet (Wang, Bower *et al.*, 2009). Bei Hunden konnte gezeigt werden, dass Gene, welche in der Immunantwort beteiligt sind, mit der Entwicklung von Übergewicht assoziiert sind (Grant *et al.*, 2011). Bei übergewichtigen Menschen und Nagern waren Gene, welche in Beziehung mit der Immunantwort stehen, im Fettgewebe überrepräsentiert (Le *et al.*, 2005; Klimcakova *et al.*, 2010; Kim und Park, 2010; Henegar *et al.*, 2008; Wolfs *et al.*, 2010). Insgesamt bestärken die Ergebnisse, dass IMF von verschiedenen metabolischen, zellulären und molekularen Stoffwechselwegen abhängt. Anhand von weiteren Literaturrecherchen konnten potentielle Kandidatengene identifiziert werden. So ist das Gen *APOM* in der Fetteinlagerung (Pan *et al.*, 2010) und *MAPK1* an der Adipogenese beteiligt (Wang, Wang *et al.*, 2009). Aus den Ergebnissen der GWAS konnte ein weiteres interessantes potentielles Kandidatengen anhand der funktionellen Annotation abgeleitet werden. Der α_2 -Androgen-Rezeptor (*ADRA2*) ist mit der Körperfettverteilung beim Menschen assoziiert (Oppert *et al.*, 1995).

Funktionelle Annotation für das Merkmal Tropfsaftverlust

Die Enrichment-Analyse ergab 6 GO Terme für TSV, in denen Gene signifikant angereichert waren. Darunter fielen die Zellproliferation und die Differenzierung von Muskelzellen. Die Größe und Anzahl der Muskelfasern, sowie der Muskelfasertyp beeinflussen den Tropfsaftverlust. Dabei ist die Muskelfasergröße negativ mit dem Tropfsaftverlust korreliert (Larzul *et al.*, 1997). Muskelfasern Typ IIb sind hingegen positiv mit dem TSV korreliert (Karlsson *et al.*, 1999). Damon *et al.* (2013) annotierten Gene funktionell, welche bereits mit dem TSV assoziiert sind. Gengruppen des RNA-Metabolismus, der Proteinbiogenese, des Lysosoms und der zytoplasmischen Vesikel waren in Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie. Ponsuksili *et al.* (2009) analysierten mittels funktioneller Annotation Gene für das Merkmal TSV bei Duroc x Piétrain Kreuzungen. In der vorliegenden Studie waren 11 GO Terme in Übereinstimmung mit der funktionellen Annotation aus Ponsuksili *et al.* (2009). Die genannten Autoren stellten die Ubiquitinierung von Proteinen, den mitochondriellen

Stoffwechsel und Strukturproteine des Muskels für TSV in den Vordergrund. Bereits Ponsuksili, Murani *et al.* (2008) zeigten, dass der Energiemetabolismus und die Proteolyse die bestimmenden Faktoren für TSV sind. Das Ubiquitin-Proteasom System ist ein proteolytisches System, welches für die Proteindegradation im Muskel verantwortlich ist (Voisin *et al.*, 1996; Sultan *et al.*, 2001) und vor allem Muskeleigenschaften, welche verantwortlich für die Fleischqualität nach der Schlachtung sind, beeinflussen (Ponsuksili *et al.* 2009). Die Expressionen von Untereinheiten des Proteasoms oder Enzyme der Ubiquitinierung sind bei Muskelatrophie erhöht (Lecker *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, sind Mitochondrien die Kraftwerke der Zelle und liefern Energie durch die Bereitstellung von ATP über aerobe Glykolyse und oxidative Phosphorylierung. Im lebenden Tier wird genügend Sauerstoff bereitgestellt und aerobe Prozesse finden statt. Nach der Schlachtung ist jedoch der Sauerstoff limitiert und es wird auf anaerobe Respiration, welche die Produktion von Lactat beinhaltet, umgestellt. Die Anreicherung von Lactat hat einen pH-Abfall sowie Proteindegradierung zur Folge. Diese Prozesse führen zu einem erhöhten Tropfsaftverlust (Rosenvold und Andersen, 2003; Huff-Lonergan und Lonergan, 2005). Anhand weiterer Literaturrecherchen konnten potentielle Kandidatengene identifiziert werden. Das Gen *UVRAG* ist an der Autophagie beteiligt und wurde bei Schweinen in Verbindung mit der Myogenese gebracht (Muráni *et al.*, 2007). *PSMC4* ist eine Untereinheit des Proteasoms und trägt wesentlich zur Degradation von Myofibrillen bei (Kitajima *et al.*, 2014). *TMEM110* steuert den Calciuminflux in die Zelle (Jing *et al.*, 2015). *ACBD3* ist an der Glukoseaufnahme in das Muskelgewebe beteiligt (Belman *et al.*, 2015).

4 Allgemeine Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden SNP-Chip Genotypen, Darmmikrobiota- und Genexpressionsdaten zur Analyse komplexer Merkmale beim Schwein verwendet. Basierend auf quantitativ genetischen Methoden wurden die Zusammenhänge zwischen dem Wirtsgenom, der bakteriellen Zusammensetzung im Darm und Wachstumsmerkmalen untersucht. Zur Identifikation von Kandidatengenen für Fleischqualitätsmerkmale wurden genomweite Expressionsmessungen mittels funktioneller Annotation evaluiert. Im folgenden Abschnitt sollen weitere Methoden zur Bestimmung der Darmmikrobiota und Methoden zur Analyse der Beziehung zwischen Tiergenetik, mikrobieller Zusammensetzung bzw. Leistungsmerkmalen diskutiert werden. Außerdem werden die Möglichkeiten zur Implementierung von Mikrobiotadaten in der Tierzucht und Methoden zur Verknüpfung von GWAS, Expressionsanalysen und Netzwerkanalysen aufgezeigt. Abschließend werden die Schlussfolgerungen aus Punkt 2 und Punkt 3 kurz zusammengefasst.

Methoden zur Bestimmung von Darmmikrobiota

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung der hypervariablen Regionen V1-2 des 16S rRNA Gens zur Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung genutzt. Aufgrund der Zusammensetzung aus hypervariablen und konservierten Regionen eignet sich das Gen gut zur Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft. Diese Methode reduziert die Kosten der Sequenzierung wesentlich und ist gleichzeitig eine effektive Methode Schwankungen in mikrobiellen Populationen zu detektieren (Caporaso *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu den kostenaufwendigeren Metagenomsequenzierungen kann es bei dieser Methode jedoch zu Verzerrungen kommen (Harris *et al.*, 2012). Ein weiterer Vorteil von Metagenomsequenzierungen ist die Identifizierung von allen Genen, welche in der mikrobiellen Gemeinschaft vorliegen. Außerdem werden die Taxonomien spezifischer erfasst und Gene können funktionell klassifiziert werden (Franzosa *et al.*, 2014). Beide Ansätze geben jedoch keine Auskunft darüber, welche der Mikroben aktiv sind und welche Funktionen sie im Moment der Beprobung erfüllen. Um festzustellen, welche Bakterien tatsächlich zum Zeitpunkt der Probenahme aktiv sind, kann das Metatranskriptom, basierend auf Microarray-Technologien oder Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierungen (RNA-Seq), analysiert werden. Die Analyse des Metatranskriptoms als Ergänzung zu 16S rRNA-Methoden oder Metagenomanalysen eignet sich besonders gut zur Erklärung der Struktur und Funktion des Mikrobioms (Franzosa *et al.*, 2014).

Analyse der Beziehungen zwischen Tiergenetik, mikrobieller Zusammensetzung im Darm und Leistungsmerkmalen

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie wäre es von Interesse, die Zusammenhänge zwischen Tiergenetik, mikrobieller Zusammensetzung im Darm, und den Leistungsmerkmalen detaillierter zu untersuchen. Eine Möglichkeit diese Beziehungen zu analysieren bieten strukturelle Gleichungssysteme. Diese Modelle wurden bereits in der Tierzucht angewandt (Gianola und Sorensen, 2004; Lutz *et al.*, 2017). Durch die Anwendung von strukturellen Gleichungssystemen können direkte und indirekte genetische Effekte voneinander getrennt und ein kausaler Zusammenhang aufgedeckt werden. Direkte genetische Effekte lassen sich anhand der Kopplung zwischen Genen oder durch Pleiotropie erklären. Wenn ein kausaler Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen besteht, dann beeinflussen voraussichtlich Gene, welche das eine Merkmal direkt beeinflussen, indirekt auch das andere Merkmal (Valente *et al.*, 2010). So könnte der Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung im Darm und den Leistungsmerkmalen genauer analysiert werden. In dieser Studie konnten strukturelle Gleichungssysteme aufgrund der geringen Tieranzahl nicht angewendet werden.

Implementierung von Mikrobiotadaten in der Tierzucht

Wie bereits erwähnt, könnten Darmmikrobiotadaten in der Tierzucht Anwendung finden. Dies setzt eine standardisierte Phänotypisierung der Mikrobiota voraus. Das Darmmikrobiom ist nicht statisch sondern entwickelt sich zusammen mit dem Wirt (Kim und Isaacson, 2015). Dies erfordert die Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Probennahme. Studien an Ferkeln haben gezeigt, dass das Mikrobiom im frühen Entwicklungsstadium, einen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung, Gesundheitsmerkmale, sowie das Wachstum der Tiere nimmt (Thompson *et al.*, 2008; Mach *et al.*, 2015; Ramayo-Caldas *et al.*, 2016). Eine routinemäßige Beprobung einer großen Anzahl an Jungtieren wäre aufgrund von wirtschaftlichen und tierschutzrechtlichen Aspekten nur im Kot möglich. Looft *et al.* (2014) untersuchten die Zusammensetzung der Bakterien entlang der verschiedenen Darmabschnitte und im Kot von Ferkeln. Die Autoren zeigten, dass die alleinige Beprobung von Kot keine informative Quelle für das Ökosystem im Darm ist. Die möglichen Verzerrungen durch die Probenahme im Kot, im Gegensatz zu bestimmten Darmabschnitten, müssten noch genauer untersucht werden. Außerdem nimmt die Geburtsumgebung einen wesentlichen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung bei Ferkeln (Thompson *et al.*, 2008). Derzeit findet bei Schweinen eine standardisierte Leistungsprüfung auf Station ab einem Gewicht von 30 kg bis zum Erreichen des Schlachtgewichtes von 105 kg statt (ZDS, 2007). Sollten Ferkel beprobt werden, müsste auch die Wurfumwelt standardisiert werden, d.h. bereits die Ferkelmütter bzw. Sauen sollten standardisiert im Rahmen der Leistungsprüfung auf Station gehalten werden.

Methoden zur Verknüpfung von GWAS, Expressionsanalysen und Netzwerkanalysen

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene funktionell annotiert, um potentielle Kandidatengene zu identifizieren. Auch die Verknüpfung mit Ergebnissen von GWAS erfolgte über die funktionelle Annotation. Eine weitere Methode zur Kombination von GWAS und Expressionsmessungen ist die expression QTL (eQTL) Kartierung. Hintergrund und Basisannahme dieser Methode ist, dass die Menge an Transkript in Zusammenhang mit einer Mutation in einem regulatorischen Element eines Gens steht. Folglich kann der Genexpressionsspiegel als Phänotyp eines quantitativen Merkmals angesehen werden, welches anhand von gängigen Kopplungs- und genomweiten Assoziationsanalysen als eQTL kartiert werden kann (Cookson *et al.*, 2009; Schadt *et al.*, 2003). Mehrere eQTL-Studien wurden bereits zu Fleischqualitätsmerkmalen beim Schwein durchgeführt (Ponsuksili, Jonas, *et al.*, 2008; Ponsuksili *et al.*, 2010; Ponsuksili *et al.*, 2014; Heidt *et al.*, 2013; Steibel *et al.*, 2011, 2014). Zur Durchführung von eQTL-Studien werden jedoch Stichproben von mindestens 100 Tieren benötigt, um Assoziationen zwischen Markern und Transkriptspiegel detektieren zu können (Schliekelman, 2008). Zum besseren Verständnis biologischer Zusammenhänge sollten nicht einzelne Gene sondern umfassendere Ansätze gewählt werden, da jedes Gen mit ca. 4 bis 8 anderen Genen interagiert (Arnone und Davidson, 1997) und an ungefähr 10 biologischen Funktionen beteiligt ist (Miklos und Rubin, 1996). Netzwerkanalysen erfassen die Beziehungen zwischen allen gemessenen Transkripten. Ponsuksili *et al.* (2015) kombinierten eQTL-Kartierungen mit Weighted Correlation Network Analysen (WGCNA) zur Identifizierung von molekularen Netzwerken und deren Regulatoren für Fleischqualitätsmerkmale beim Schwein. Die Integration von eQTL in die Netzwerkanalysen ermöglicht somit eine Interpretation der differentiell regulierten Gene aus systemischer Sicht.

Schlussfolgerungen

Unter Punkt 2 „Genetische und mikrobielle Analysen komplexer Merkmale“ wurde gezeigt, dass Teile der Darmmikroben erblich sind und auch als quantitatives Merkmal betrachtet werden können. Gleichzeitig können sie als erklärende Variable für Wachstumsmerkmale, wie tägliche Zunahme, Futtermittelverwertung und Futtermittelverzehr, genutzt werden. Das Darmmikrobiom ist jedoch keine Konstante und unterliegt vielen Umwelteinflüssen, was die Verwendung zu züchterischen Zwecken erschwert. Unter Punkt 3 „Strukturelle und funktionelle genomische Analysen für Fleischqualitätsmerkmale“ wurden für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt Gengruppen identifiziert, welche dem Energiestoffwechsel der Mitochondrien, der Immunantwort und dem Fettstoffwechsel angehören. Gengruppen, welche der Ubiquitinierung von Proteinen, dem mitochondrialem Stoffwechsel und den Strukturproteinen des Muskels angehören, wurden assoziiert mit Tropfsaftverlust. Ein besseres Verständnis über die Variation

von komplexen Merkmalen kann zu einem besseren Verständnis der Biologie dieser Merkmale beitragen. Für diese Zwecke wurden in dieser Arbeit genomische und mikrobielle Daten, sowie Genexpressionen als erklärende Variablen genutzt. Idealerweise werden alle drei Variablenklassen in einem holistischen Modell gemeinsam analysiert. Dies war in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Datenstruktur nicht möglich.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Multidimensionaler Skalierungsplot mit den Ähnlichkeiten in den bakteriellen Gemeinschaftsstrukturen im Schweinedarm und einen zweidimensionalen (2D) Stresswert. Tiere sind mehr besiedelt mit Firmicutes (●) bzw. mit Bacteroidetes (●)..... 22

Abbildung 2: Marginale OTU Effekte (absolut Werte) für jeden OTU und für jedes Leistungsmerkmal. Ausreißer sind rot markiert. 27

Abbildung 3: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und IMF bzw. TSV. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p\text{-Wert})$. Die obere Linie entspricht $p_{\text{genomweit}} < 0,05$ und die untere Linie $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$ 44

Anhang

Abbildung A1: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und den bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p\text{-Wert})$. Die obere Linie entspricht $p_{\text{genomweit}} < 0,05$ und die untere Linie $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$ 69

Abbildung A2: Links dargestellt die Substitutionseffekte aus BayesC von 44 059 SNPs für die einzelnen bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den absoluten Substitutionseffekt. Rechts dargestellt die Window Posterior Probability of Association (WPPA) für Fenster der Breite 2 cM. 74

Abbildung A3: Genomische Verwandtschaftsmatrix G . Ein dunkleres rot zeigt eine höhere Ähnlichkeit zwischen den Tieren..... 79

Abbildung A4: Mikrobielle Verwandtschaftsmatrix M . Ein dunkleres rot zeigt eine höhere Ähnlichkeit zwischen den Tieren..... 80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über bereits durchgeführten Studien zu Heritabilitäten und QTL Kartierungen für Darmmikrobiota (verändert nach Davenport, 2016).....	14
Tabelle 2: Heritabilitäten (h^2) und ihre Standardfehler (SE) sowie deren p -Werte für die relativen Häufigkeiten der bakteriellen Genera.....	23
Tabelle 3: Genetische Korrelationen mit Standardfehlern (SE) zwischen Futtermittelverwertung (FUV), tägliche Zunahmen (TZ) bzw. Futterverzehr (FVZ) und den relativen Häufigkeiten der bakteriellen Genera.....	24
Tabelle 4: Signifikante SNPs ($p < 5 \times 10^{-5}$) der Single-Marker Analyse mit p -Werten und chromosomaler Position (SSC), sowie die Zuordnung positioneller Kandidatengene für die verschiedenen Genera.	25
Tabelle 5: Microbiabilities (m^2) und Heritabilitäten (h^2) mit Standardfehlern (SE) und p -Werten für die Leistungsmerkmale tägliche Zunahme (TZ), Futtermittelverwertung (FUV) und Futterverzehr (FVZ).	26
Tabelle 6: Genauigkeiten der mikrobiellen (r_m) und genomischen Vorhersagen (r_g) für die Leistungsmerkmale tägliche Zunahme (TZ), Futtermittelverwertung (FUV) und Futterverzehr (FVZ) mit Vertrauensintervallen (VI).....	26
Tabelle 7: Ausreißer der marginalen OTU Effekte (\hat{u}) mit Bezeichnung und mittlerer relativer Häufigkeit für die Leistungsmerkmale tägliche Zunahme (TZ), Futtermittelverwertung (FUV) und Futterverzehr (FVZ).....	27
Tabelle 8: Heritabilitäten (h^2) mit Standardfehler (SE) und Anzahl getesteter Tiere (n) aus der Literatur für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt – eine Auswahl.....	33
Tabelle 9: Heritabilitäten (h^2) mit Standardfehler (SE) und Anzahl getesteter Tiere (n) aus der Literatur für das Merkmal Tropfsaftverlust – eine Auswahl.....	35
Tabelle 10: Leistungen der 210 Piétrain Sauen bzw. der merkmalsdivergenten Geschwisterpaare (high/low) mit Mittelwert \pm Standardabweichung für die Merkmale intramuskulärer Fettgehalt (IMF) und Tropfsaftverlust (TSV).	41
Tabelle 11: Ergebnisse der Gen-Term-Enrichment-Analyse mit GO Term, den GO Term zugeordneten Genen und den p -Wert für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt (IMF).....	41
Tabelle 12: Ergebnisse der Gen-Term-Enrichment-Analyse mit GO Term, den GO Term zugeordneten Genen und den p -Wert für das Merkmal Tropfsaftverlust (TSV).....	42
Tabelle 13: Abgleich der GO Terme von signifikant assoziierten Genen aus der differentiellen Genexpressionsmessung mit der Literatur für das Merkmal intramuskulärer Fettgehalt (IMF).	42

Tabelle 14: Abgleich der GO Terme von signifikant differentiell exprimierten und korrelierten Genen aus der differentiellen Genexpressionsmessung mit der Literatur für der Merkmal Tropfsaftverlust (TSV)..... 43

Tabelle 15: Überlappende GO Terme aus der funktionellen Annotation der signifikant assoziierten Gene (Microarray) und der cis-Region des signifikanten SNPs (pQTL) für IMF. 45

Tabelle 16: Überlappende GO Terme aus der funktionellen Annotation der signifikant assoziierten Gene (Microarray) und der cis-Region des signifikanten SNPs (pQTL) für TSV. 45

Anhang

Tabelle A1: Deskriptive Statistik der erfassten Merkmale mit Abkürzung (Abk.), Tieranzahl (N), Mittelwert (μ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min), und Maximum (Max). 81

Tabelle A2: Heritabilitäten (h^2) mit p -Werten und FDR für die relativen Häufigkeiten aller analysierten bakteriellen Genera. Signifikante Heritabilitäten sind **fett** gedruckt. 81

Tabelle A3: Primersequenzen für RFLP-Genotypisierung des MHS-Status. 83

Tabelle A4: Signifikante SNPs ($p < 5 \times 10^{-5}$) der GWAS mit p -Werten und chromosomaler Position (SSC) für die Merkmale intramuskulärer Fettgehalt (IMF) und Tropfsaftverlust (TSV). 83

Literaturverzeichnis

Adrian TE, Besterman HS, Cooke TJC, Bloom SR, Barnes J, Russell RCG und Faber RG (1977). Mechanism of Pancreatic Polypeptide Release in Man. *The Lancet* **309**:161–163.

Arnone MI und Davidson EH (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* **124**: 1851–1864.

Bauché D und Marie JC (2017). Transforming growth factor β : a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clin Transl Immunol* **6**: e136.

Beck P, Piepho HP, Rodehutschord M und Bennewitz J (2016). Inferring relationships between Phosphorus utilization, feed per gain, and bodyweight gain in an F2 cross of Japanese quail using recursive models. *Poult Sci* **95**: 764–773.

Bejerholm C und Barton-Gade P (1986). Effect of intramuscular fat level on eating quality of pig meat. In: *Proc 30th Europ Meet Meat Res Workers*, Bristol. 389–391.

Belman JP, Bian RR, Habtemichael EN, Li DT, Jurczak MJ, Alcázar-Román A, McNally LJ, Shulman GI und Bogan JS (2015). Acetylation of TUG Protein Promotes the Accumulation of GLUT4 Glucose Transporters in an Insulin-responsive Intracellular Compartment. *Biol Chemistry* **290**: 4447–4463.

Bendall J und Swatland H (1988). A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Sci* **24**: 85–126.

Bennewitz J, Edel C, Fries R, Meuwissen THE und Wellmann R (2017). Application of a Bayesian dominance model improves power in quantitative trait genome-wide association analysis. *Genet Sel Evol* **49**: 7.

Bennewitz J und Meuwissen THE (2010). The distribution of QTL additive and dominance effects in porcine F2 crosses. *J Anim Breed Genet* **127**: 171–179.

Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, Zhang M, Oh PL, Nehrenberg D, Hua K, Kachman SD, Moriyama EN, Walter J, Peterson D und Pomp D (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *PNAS* **107**: 18933–18938.

Berardini TZ, Mundodi S, Reiser L, Huala E, Garcia-Hernandez M, Zhang P, Mueller LA, Yoon J, Doyle, A, Lander G, Moseyko N, Yoo D, Xu I, Zoeckler B, Montoya M, Miller N, Weems D und Rhee SY (2004). Functional Annotation of the Arabidopsis Genome Using Controlled Vocabularies. *Plant Physiol* **135**: 745–755.

Bernalier-Donadille A (2010). Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroenterol Clin Biol* **34**: 16-22.

Biermann ADM, Yin T, König von Borstel UU, Rübesam K, Kuhn B und König S (2015). From phenotyping towards breeding strategies: using in vivo indicator traits and genetic markers to improve meat quality in an endangered pig breed. *Animal* **9**: 919–927.

Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, Spector TD, Keinan A, Ley RE, Gevers D und Clarke AG (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biol* **16**: 191.

Bourgon R, Gentleman R und Huber W (2010). Independent filtering increases detection power for high-throughput experiments. *PNAS* **107**: 9546–9551.

- Browning BL und Browning SR (2009). A Unified Approach to Genotype Imputation and Haplotype-Phase Inference for Large Data Sets of Trios and Unrelated Individuals. *Am J Hum Genet* **84**: 210–223.
- Browning SR und Browning BL (2007). Rapid and Accurate Haplotype Phasing and Missing-Data Inference for Whole-Genome Association Studies by use of Localized Haplotype Clustering. *Am J Hum Genet* **81**: 1084–1097.
- Butler D, Cullis B, Gilmour A, Gogel B. (2009). Analysis of Mixed Models for S-language Environments: ASReml-R Reference Manual. Department of Primary Industries and Fisheries, Brisbane, Australia
- Camarinha-Silva A, Jáuregui R, Chaves-Moreno D, Oxley APA, Schaumburg F, Becker K, Wos-Oxley, ML und Pieper DH (2014). Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environ Microbiol* **16**: 2939–2952.
- Camarinha-Silva A, Maushammer M, Wellmann R, Vital M, Preuss S und Bennewitz J (2017). Host Genome Influence on Gut Microbial Composition and Microbial Prediction of Complex Traits in Pigs. *Genetics* **206**: 1637–1644.
- Canovas A, Quintanilla R, Amills M und Pena RN (2010). Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. *BMC Genomics* **11**: 372.
- Caporaso JG, Paszkiewicz K, Field D, Knight R und Gilbert JA (2011). The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *ISME J* **6**: 1089–1093.
- Ciobanu D, Bastiaansen J, Malek M, Helm J, Woollard J, Plastow G, und Rothschild M (2001). Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics* **159**: 1151–62.
- Clarke KR und Warwick RM (2001). Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation, Ed. 1. E Ltd, Plymouth, UK.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M und Robles M (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**: 3674–3676.
- Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M und Lathrop M (2009). Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet* **10**: 184–194.
- Crawley SW, Shifrin DA, Grega-larson NE, Mcconnell RE, Benesh AE, Mao S, Zheng Y, Zhen QY, Nam KT, Millis, BA, Kachar B und Tyska MJ (2014). Intestinal Brush Border Assembly Driven by Protocadherin-Based Intermicrovillar Adhesion. *Cell* **157**: 433–446.
- Damon M, Denieul K, Vincent A, Bonhomme N, Wyszynska-Koko J und Leuret B (2013). Associations between muscle gene expression pattern and technological and sensory meat traits highlight new biomarkers for pork quality assessment. *MESC* **95**: 744–754.
- Daniel H, Gholami AM, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot S, Lepage P, Rothballer M, Walker A, Bo C, Wenning M, Wagner M, Blaut M, Schmitt-Kopplin P, Kuster B, Haller D und Clavel T (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J* **8**: 295–308.
- Davenport ER (2016). Elucidating the role of the host genome in shaping microbiome composition. *Gut Microbes* **7**: 178–184.

- Davenport ER, Cusanovich DA, Michelini K, Barreiro LB, Ober C und Gilad Y (2015). Genome-wide association studies of the human gut microbiota. *PLoS One* **10**: e0140301.
- Dawson PA, Huxley S, Gardiner B, Tran T, McAuley JL, Grimmond S, McGuckin MA und Markovich D (2009). Reduced mucin sulfonation and impaired intestinal barrier function in the hyposulfataemic NaS1 null mouse. *Gut* **58**: 910–919.
- Diaz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forsberg H und Petterson S (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *PNAS* **108**: 3047–3052.
- Difford GF, Lassen J und Løvendahl P (2016). Genes and microbes, the next step in dairy cattle breeding. In: Proc 67th EAAP, Belfast, Irland: 285.
- Dodenhoff J, Schuster M, Wittmann W, Littmann E, Lindner J und Götz KU (2011). Leistungsprüfung und Zuchtwertschätzung für Tropfsaftverlust beim Schwein in Bayern. *Züchtungskunde* **83**: 142–152.
- Dombrowski SM und Maglott D 2002. Using the Map Viewer to Explore Genomes. In: The NCBI handbook [Internet], National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, Chapter 19. Available in the Entrez Books database.
- Dongowski G, Huth M, Gebhardt E und Flamme W (2002). Dietary Fiber-Rich Barley Products Beneficially Affect the Intestinal Tract of Rats 1. *Nutrition* **132**: 3704–3714.
- Draber P, Vonkova I, Stepanek O, Hrdinka M, Kucova M, Skopцова T, Otahal P, Angelisova P, Horejsi V, Yeung M, Weiss A und Brdicka T (2011). SCIMP, a Transmembrane Adaptor Protein Involved in Major Histocompatibility Complex Class II Signaling. *Mol Cell Biol* **31**: 4550–4562.
- Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P und Flint HJ (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes* **32**:1720–1724.
- Eikelenboom G und Minkema D (1974). Prediction of pale, soft, exudative muscle with a non-lethal test for the halothane-induced porcine malignant hyperthermia syndrome. *Tijdschr Diergeneeskde* **99**: 421–426.
- Estellè J, Mach N, Ramayo-Caldas Y, Levenz F, Lemonnier G, Denis C, Doré J, Larzul C, Lepage P, Rogel-Gaillard C und SUS_Flora Consortium (2014). The influence of host's genetics on the gut microbiota composition in pigs and its links with immunity traits. In: Proc 10th WCGALP, Vancouver, Kanada.
- Fairbairn L, Kapetanovic R, Beraldi D, Sester P, Tuggle CK, Archibald AL und Hume DA (2014). Comparative Analysis of Monocyte Subsets in the Pig. *J Immunol* **190**:6389-6396
- Fernandez A, de Pedro E, Nuez N, Silio L, Garcia-Casco J und Rodriguez C (2003). Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in Iberian pigs. *Meat Sci* **64**: 405–410.
- Fernando R und Garrick D (2013). Bayesian Methods Applied to GWAS. In: Gondro C, van der Werf J, Hayes B. Genome-wide association studies and genomic prediction Methods in molecular biology. Springer protocols, New York: 237–274.
- Fernando R, Toosi A, Wolc A, Garrick D und Dekkers J (2017). Application of Whole-Genome Prediction Methods for Genome-Wide Association Studies : A Bayesian Approach. *J Agric Biol Environ Stat* **22**: 172–193.

- Flint HJ, Duncan SH, Scott KP und Louis P (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc* **74**: 13–22.
- Franzosa EA, Morgan XC, Segata N, Waldron L, Reyes J, Earl AM, Giannoukos G, Boylan MR, Ciulla D, Gevers D, Izard J, Garret WS, Chan AT und Huttenhower C (2014). Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *PNAS* **111**: E2329–E2338.
- Freeman TC, Ivens A, Baillie JK, Beraldi D, Barnett MW, Dorward D, Downing A, Fairbairn L, Kapetanovic R, Raza S, Tomoiu A, Alberio R, Wu C, Su AI, Summers KM, Tuggle CK, Archibald AL und Hume DA (2012). A gene expression atlas of the domestic pig. *BMC Biol* **10**: 90.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ und MacLennan DH (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**: 448–451.
- Gene Ontology Consortium (2001). Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation. *Genome Res* **11**: 1425–1433.
- Gianola D (2013). Priors in whole-genome regression: The Bayesian alphabet returns. *Genetics* **194**: 573–596.
- Gianola D und Sorensen D (2004). Quantitative genetic models for describing simultaneous and recursive relationships between phenotypes. *Genetics* **167**: 1407–1424.
- Goddard ME und Hayes BJ (2001). The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genet Sel Evol* **33**: 209–229.
- Gondret F und Lebreton B (2002). Feeding intensity and dietary protein level affect adipocyte cellularity and lipogenic capacity of muscle homogenates in growing pigs, without modification of the expression of sterol regulatory element binding protein. *Anim Sci* **80**: 3184–3193.
- Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, van Treuren W, Knight R, Bell J, Spector TD, Clark AG und Ley RE (2014). Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* **159**: 789–799.
- Grant RW, Boler BMV, Ridge TK, Graves TK und Swanson KS (2011). Adipose tissue transcriptome changes during obesity development in female dogs. *Physiol Genomics* **43**: 295–307.
- Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H und Wang K (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol* **47**: 367–373.
- Hamill RM, McBryan J, Mcgee C, Maria A, Sweeney T, Talbot A, Cairns MT und Davey GC (2012). Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. *Meat Sci* **92**: 440–450.
- Harris BL und Johnson DL (2009). Genomic predictions for New Zealand dairy bulls and integration with national genetic evaluation. *Genet Sel Evol* **93**: 1243–1252.
- Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HMB, Solomon AW, Cutcliffe T, Marsh P, Skilton RJ, Holland MJ, Maybe D, Peeling W, Lewis DA, Spratt BG, Unemo M, Persson K, Bjartling C, Brunham R, de Vries HJC, Morr e SA, Speksnijder A, B eb ear CM, Clerc M, de Barbeyrac B, Parkhill J und Thomson NR (2012). Whole genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* **44**: 413–429.

- Heidt H, Cinar MU, Uddin MJ, Looft C, Jüngst H, Tesfaye D, Becker A, Zimmer A, Ponsuksili S, Wimmers K, Tholen E, Schellander K und Große-Brinkhaus C (2013). A genetical genomics approach reveals new candidates and confirms known candidate genes for drip loss in a porcine resource population. *Mamm Genome* **24**: 416–26.
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD und Clement K (2008). Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* **9**: R14.
- Hill FLC, Zhang T, Gomez G und Greeley GH (1991). Peptide YY, a new gut hormone (a mini-review). *Steroids* **56**: 77–82.
- Hill MJ (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* **6**: 43–45.
- Hocquette JF, Gondret F, Baeza E, Medale F, Jurie C und Pethick DW (2010). Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* **4**: 303–319.
- Hodgson RR, Davis GW, Smith GC, Savell JW und Cross HR (1991). Relationships between pork loin palatability traits and physical characteristics of cooked chops. *J Anim Sci* **69**: 4858–4865.
- Hofmann K (1973). Was ist Fleischqualität? *Fleischwirtschaft* **54**: 485.
- Honikel KO (1987). How to measure the water-holding capacity of meat? Recommendation of standardized methods. In: Tarrant PV, Eikelenbloom G und Monin G. Evaluation and control of meat quality in pigs. Springer Niederlande: 129-142.
- Honikel KO (1998). Reference Methods for the Assessment of Physical Characteristics of Meat. *Meat Sci* **49**: 447–457.
- Honikel KO und Schwägele F (1998). Biochemische Prozesse der Fleischreifung. In: Branscheid W, Honikel KO, Von Lengerken G und Troeger K. Qualität von Fleisch und Fleischwaren II. Deutscher Fachverlag, Frankfurt: 593–616.
- Hovenier R, Kanis E, van Asseldonk T und Westerink NG (1992). Genetic parameters of pig meat quality traits in a halothane negative population. *Livest Prod Sci* **32**: 309–321.
- Huang DW, Sherman BT und Lempicki RA (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**: 44–57.
- Huff-Lonergan E und Lonergan SM (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci* **71**: 194–204.
- Jandhyala SM, Madhulika A, Deepika G, Rao GV und Reddy DN (2017). Altered intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis: implications in diabetes and metabolic abnormalities. *Sci Reports* **7**: 43640.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M und Reddy DN (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**: 8836–8847.
- Jing J, He L, Sun A, Quintana A, Ding Y, Ma G, Tan P, Chen L, Zhang S, Huang Y, Dong MQ, Walker C, Hogan P, Wang Y und Zhou Y (2015). Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as regulator of Ca²⁺ influx. *Nat Cell Biol* **17**: 1339–1347.

- Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI und Krakoff J (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in human. *Am J Clin Nutr* **94**: 58–65.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y und Hattori M (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* **32**: D277–D280.
- Karlsson AH, Klont RE und Fernandez X (1999). Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livest Prod Sci* **60**: 255–269.
- Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ und Isaacson RE (2011). Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet Microbiol* **153**: 24–133.
- Kim HB und Isaacson RE (2015). The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet Microbiol* **177**: 242–251.
- Kim Y und Park T (2010). DNA microarrays to define and search for genes associated with obesity. *Biotechnology* **5**: 99–112.
- Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, Urushitani M, Nagatomi R, Takahashi R und Aoki M (2014). Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *Cell Sci* **127**: 5204–5217.
- Klimcakova E, Roussel B, Marquez-Quinones A, Kovacova Z, Kovacicova M, Combes M, Siklova- Vitkova M, Hejnova J, Sramkova P, Bouloume A, Viguerie N, Stich V und Langin D (2010). Worsening of Obesity and Metabolic Status Yields Similar Molecular Adaptations in Human Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Decreased Metabolism and Increased Immune Response. *Endocr Rev* **31**: 944–945.
- Knapp P, Willam A und Sölkner J (1997). Genetic parameters for lean meat content and meat quality traits in different pig breeds. *Livest Prod Sci* **52**: 69–73.
- Knights D, Silverberg MS, Weersma RK, Gevers D, Dijkstra G, Huang H, Tyler AD, Sommeren SV, Imhann F, Stempark JM, Huang H, Vangay P, Al-Ghalith GA, Russel C, Sauk J, Knight J, Daly MJ, Huttenhower C und Xavier RJ (2014). Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med* **6**: 109.
- Knol EF, Nielsen B und Knap PW (2016). Genomic selection in commercial pig breeding. *Anim Front* **6**: 15.
- Kojima S, Ueno N, Asakawa A, Sagiyama K, Naruo T, Mizuno S und Inui A (2007). A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides* **28**: 459–463.
- Larzul C, Lefaucheur L, Ecolan P, Gogue J, Talmant A und Sellier P (1997). Phenotypic and Genetic Parameters for Longissimus Muscle Fiber Characteristics in Relation to Growth, Carcass, and Meat Quality Traits in Large White Pigs. *Anim Sci* **75**: 3126–3137.
- Le YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, Bogardus C und Permana PA (2005). Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians : increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia* **48**: 1776–1783.
- Leamy LJ, Kelly SA, Niefeldt J, Legge RM, Ma F, Hua K, Sinha R, Peterson DA, Walter J, Benson AK und Pomp D (2014). Host genetics and diet, but not immunoglobulin A expression,

- converge to shape compositional features of the gut microbiome in an advanced intercross population of mice. *Genome Biol* **15**: 552.
- Lecker SH, Solomon V, Mitch WE und Goldberg AL (1999). Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin- Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Nutrition* **129**: 227–237.
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD und Gordon JI (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* **102**: 11070–11075.
- Liu G, Jennen DGJ, Tholen E, Juengst H, Kleinwächter T, Hölker M, Tesfaye D, Un G, Schreinemachers HJ, Murani E, Ponsuksili S, Kim JJ, Schellander K und Wimmers K (2007). A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. *Anim Genet* **38**: 241–52.
- Liu J, Damon M, Guitton N, Guisle I, Ecolan P, Vincent A, Cherel P und Gondret F (2009). Differentially-expressed genes in pig longissimus muscles with contrasting levels of fat, as identified by combined transcriptomic, reverse transcription PCR, and proteomic analyses. *J Agric Food Chem* **57**: 3808–3817.
- Looft T, Allen HK, Cantarel BL, Levine UY, Bayles DO, Alt DP, Henrissat B und Stanton TB (2014). Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J* **8**: 1566–1576.
- Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM und Stanton TB (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *PNAS* **109**: 1691–1696.
- Lunney JK (1994). Current status of the swine leukocyte antigen complex. *Vet Immunol Immunopathol* **43**: 19–28.
- Lutz V, Kjaer JB, Iffland H, Rodehutschord M, Bessei W und Bennewitz J (2017). Quantitative genetic analysis of causal relationships among feather pecking, feather eating, and general locomotor activity in laying hens using structural equation models. *Poult Sci* **95**: 1757–1763.
- Mach N, Berri M, Estellé J, Levenez F, Lemonnier G, Denis C, Leplat JJ, Chevaleyre C, Billon Y, Doré J, Rogel-Gaillard C und Lepage P (2015). Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ Microbiol Rep* **7**: 554–569.
- Macpherson AJ und Harris NL (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 478–485.
- McKnite AM, Perez-Munoz ME, Lu L, Williams EG, Brewer S, Andreux PA, Bastiaansen JWM, Wang X, Kachman SD, Auwerx J, Williams RW, Benson AK, Peterson DA und Ciobanu DC (2012). Murine Gut Microbiota Is Defined by Host Genetics and Modulates Variation of Metabolic Traits. *PLoS One* **7**: e39191.
- Meuwissen THE, Hayes BJ und Goddard ME (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* **157**: 1819–1829.
- Miklos GLG und Rubin GM (1996). The Role of the Genome Project in Determining Gene Function : Insights from Model Organisms. *Cell* **86**: 521–529.
- Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Iannuccelli N, Rask L, Ronne H, Lundström K, Reinsch N, Gellin J, Kalm E, Roy PL, Chardon P und Andersson L (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* **288**:1248–1251.

- Monin G und Sellier P (1985). Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Sci* **13**: 49–63.
- Morel PCH, Janz JAM, Zou M, Purchas RW, Hendriks WH und Wilkinson BHP (2008). The influence of diets supplemented with conjugated linoleic acid, selenium, and vitamin E, with or without animal protein, on the composition of pork from female pigs. *Anim Sci* **86**: 1145–1155.
- Mörlein D (2007). Zerstörungsfreie Bestimmung des intramuskulären Fettgehaltes (IMF) im Kotelett von Schweinen mittels Ultraschall. *Züchtungskunde* **79**: 81–91.
- Murani E, Murániová M, Ponsuksili S, Schellander K und Wimmers K (2007). Identification of genes differentially expressed during prenatal development of skeletal muscle in two pig breeds differing in muscularity. *BMC Dev Biol* **7**: 109–125.
- Nicolucci AC und Reimer RA (2017). Prebiotics as a modulator of gut microbiota in paediatric obesity. *Pediatr Obes* **12**: 265–273.
- O'Connor A, Quizon PM, Albright JE, Lin FT und Bennett BJ (2014). Responsiveness of cardiometabolic-related microbiota to diet is influenced by host genetics. *Mamm Genome* **25**: 583–599.
- Oppert J, Touwille J, Chagnon M, Mauriege P, Dionne F, Pérusse L und Bouchard C (1995). DNA Polymorphisms in the Adrenoceptor Genes and Regional Fat Distribution in Humans: Association and Linkage Studies. *Obes Res* **3**: 249–255.
- Org E, Parks BW, Joo JWJ, Emert B, Schwartzman W, Kang EY, Mehrabian M, Pan C, Knight R, Gunsalus R, Drake TA, Eskin E und Lysis AJ (2015). Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome Res* **25**: 1558–1569.
- Pajarillo EAB, Chae J-P, P. Balolong M, Kim BH und Kang DK (2014). Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J Gen Appl Microbiol* **60**: 140–146.
- Pan G, Fu Y, Zuo B, Ren Z, Xu D, Lei M, Zheng R und Xiong YZ (2010). Molecular characterization, expression profile and association analysis with fat deposition traits of the porcine APOM gene. *Mol Biol Rep* **37**: 1363–1371.
- Park S, Lee J und Kim P (2001). Smad3 and Smad4 mediate transforming growth factor- β 1-induced IgA expression in murine B lymphocytes. *Eur J Immunology* **31**: 1706–1715.
- Pauw De A, Tejerina S, Raes M, Keijer J und Arnould T (2009). Mitochondrial (Dys)function in Adipocyte (De)differentiation and Systemic Metabolic Alterations. *Pathology* **175**: 927–939.
- Pedersen R, Andersen AD, Mølbak L, Stagsted J und Boye M (2013). Changes in the gut microbiota of cloned and non-cloned control pigs during development of obesity: gut microbiota during development of obesity in cloned pigs. *BMC Microbiol* **13**: 30.
- Ponsuksili S, Jonas E, Murani E, Phatsara C, Srikanchai T, Walz C, Schwerin M, Schellander K und Wimmers K (2008). Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. *BMC Genomics* **9**: 367.
- Ponsuksili S, Murani E, Phatsara C, Jonas E, Alz C, Schwerin M, Schellander K und Wimmers K (2008). Expression Profiling of Muscle Reveals Transcripts Differentially Expressed in Muscle That Affect Water-Holding Capacity of Pork. *J Agric Food Chem* **56**: 10311–10317.

- Ponsuksili S, Murani E, Phatsara C, Schwerin M, Schellander K und Wimmers K (2010). Expression quantitative trait loci analysis of genes in porcine muscle by quantitative real-time RT-PCR compared to microarray data. *Heredity* **105**: 309–317.
- Ponsuksili S, Murani E, Phatsara C, Schwerin M, Schellander K und Wimmers K (2009). Porcine muscle sensory attributes associate with major changes in gene networks involving CAPZB, ANKRD1, and CTBP2. *Funct Integr Genomics* **9**: 455–471.
- Ponsuksili S, Murani E, Schellander K, Schwerin M und Wimmers K (2005). Identification of functional candidate genes for body composition by expression analyses and evidencing impact by association analysis and mapping. *Biochimica et Biophysica Acta* **1730**: 31–40.
- Ponsuksili S, Murani E, Schwerin M, Schellander K und Wimmers K (2010). Identification of expression QTL (eQTL) of genes expressed in porcine M. longissimus dorsi and associated with meat quality traits. *BMC Genomics* **11**: 572.
- Ponsuksili S, Murani E, Trakooljul N, Schwerin M und Wimmers K (2014). Discovery of candidate genes for muscle traits based on GWAS supported by eQTL-analysis. *Int J Biol Sci* **10**: 327–37.
- Ponsuksili S, Siengdee P, Du Y, Trakooljul N, Murani E, Schwerin M und Wimmers K (2015). Identification of common regulators of genes in co-expression networks affecting muscle and meat properties. *PLoS One* **10**: e0123678.
- Ramayo-Caldas Y, Mach N, Lepage P, Levenez F, Denis C, Lemonnier G, Leplat JJ, Billon Y, Berri M, Doré J, Rogel-Gaillard und Estellé J (2016). Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J* **10**: 2973–2977.
- Ramos AM, Crooijmans RPM a, Affara N a., Amaral AJ, Archibald AL, Beever JE, Bendixen C, Churcher C, Clark R, Dehais P, Hansen MS, Hedegaard J, Hu ZL, Kerstens HH, Law AS, Megens HJ, Milan D, Nonneman DJ, Rohrer GA, Rothschild MF, Smith TPL, Schnabel RD, Van Tassell CP, Taylor JF, Wiedmann RT, Schook LB und Groenen MM (2009). Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS One* **4**: e6524.
- Rist VTS, Weiss E, Eklund M und Mosenthin R (2013). Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health : a review. *Animal* **7**: 1067–1078.
- Roehe R, Dewhurst RJ, Duthie CA, Rooke JA, McKain N, Ross DW, Hyslop JJ, Waterhouse A, Freeman TC, Watson M und Wallace RJ (2016). Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. *PLoS Genet* **12**: e1005846.
- Rosenvold K und Andersen HJ (2003). Factors of significance for pork quality-a review. *Meat Sci* **64**: 219–37.
- Ross EM, Moate PJ, Maret LC, Cocks BG und Hayes BJ (2013). Metagenomic Predictions: From Microbiome to Complex Health and Environmental Phenotypes in Humans and Cattle. *PLoS One* **8**: e73056.
- Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, Wilson-Pérez, HE, Sandoval DA, Kohli R, Bäckhed F und Seeley RJ (2014). FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* **509**: 183–188.

- Salmi B, Trefan L, Bünger L, Doeschl-Wilson A, Bidanel JP, Terlouw C und Larzul C (2012). Bayesian meta-analysis of the effect of fasting, transport and lairage times on four attributes of pork meat quality. *Meat Sci* **90**: 584–98.
- Sánchez B, Delgado S, Blanco-Miguez A, Lourenco A, Gueimonde M und Margolles A (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host. *Mol Nutr Food Res* **61**: 1–15.
- Schadt E, Monks S, Drake T und Lusk A (2003). Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* **422**: 297–302.
- Schliekelman P (2008). Statistical power of expression quantitative trait loci for mapping of complex trait loci in natural populations. *Genetics* **178**: 2201–2216.
- Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C und Hardt PD (2009). Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* **18**: 190–195.
- Shirkey TW, Siggers RH, Goldade BG, Marshall JK, Drew MD, Laarveld B und Van Kessel G (2006). Effects of Commensal Bacteria on Intestinal Morphology and Expression of Proinflammatory Cytokines in the Gnotobiotic Pig. *Exp Biol Med* **23**: 1333–1345.
- Shulzhenko N, Morgun A, Hsiao W, Battle M, Yao M, Gavrilova O, Orandle M, Mayer L, Macpherson AJ, McCoy KD, Fraser-Liggett C und Matzinger P (2011). Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat Med* **17**: 1585–1593.
- Smith K, McCoy KD und Macpherson AJ (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* **19**: 59–69.
- Sommer F, Adam N, Johansson ME V, Xia L, Hansson GC und Bäckhed F (2014). Altered mucus glycosylation in core 1 O-glycan-deficient mice affects microbiota composition and intestinal architecture. *PLoS One* **9**: e85254.
- Steibel JP, Bates RO, Rosa GJM, Tempelman RJ, Rillington VD, Ragavendran A, Raney NE, Ramos AM, Cardoso FF, Edwards DB und Ernst CW (2011). Genome-wide linkage analysis of global gene expression in loin muscle tissue identifies candidate genes in pigs. *PLoS One* **6**: e16766.
- Steibel JP, Reeb P, Ernst CW und Bates RO (2014). Cis and Trans-acting eQTL Mapping from RNAseq Data in Swine Populations. In: *Proc 10th WCGALP*, Vancouver, Kanada.
- Storey JD (2002). A direct approach to false discovery rates. *J R Statist Soc B* **64**: 479–498.
- Storey JD und Tibshirani R (2003). Statistical significance for genome wide studies. *PNAS* **100**: 9440–9445.
- Strandén I und Garrick DJ (2009). Technical note: Derivation of equivalent computing algorithms for genomic predictions and reliabilities of animal merit. *J Dairy Sci* **92**: 2971–2975.
- Stratz P, Schmid M, Wellmann R, Preuß S, Blaj I, Tetens J, Thaller G und Bennewitz J (2017). Linkage disequilibrium pattern and genome-wide association mapping for meat traits in multiple porcine F2-crosses. *Anim Genet*: submitted.
- Stratz P, Wellman R, Preuß S, Wimmers K und Bennewitz J (2014). Genome-wide association analysis for growth, muscularity and meat quality in Piétrain pigs. *Anim Genet* **45**: 350–356.
- Stratz P, Wellmann R und Bennewitz J (2014). Strategies to Implement Genomic Selection in Pig Breeding using Very Low Marker. In: *Proc 10th WCGALP*, Vancouver, Kanada.

- Sultan KR, Dittrich BT, Leisner E, Paul N und Pette D (2001). Fiber type-specific expression of major proteolytic systems in fast- to slow-transforming rabbit muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: 239–247.
- Sundrum A, Bütfering L, Henning M und Hoppenbrock KH (2000). Effects of on-farm diets for organic pig production on performance and carcass quality. *Anim Sci* **78**: 1199–1205.
- Suzuki K, Irie M, Kadowaki H, Shibata T, Kumagai M und Nishida A (2005). Genetic parameter estimates of meat quality traits in Duroc pigs selected for average daily gain, longissimus muscle area, backfat thickness, and intramuscular fat content. *Anim Sci* **83**: 2058–2065.
- Tanaka H, Takechi M, Kiyonari H, Shioi G, Tamura A und Tsukita S (2015). Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut* **64**: 1529–1538.
- Thompson CL, Wang B und Holmes AJ (2008). The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME J* **2**: 739–48.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald M, Magrini V, Mardis ER und Gordon JI (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**: 1027–1031.
- Valente BD, Rosa GJM, De Los Campos G, Gianola D und Silva MA (2010). Searching for recursive causal structures in multivariate quantitative genetics mixed models. *Genetics* **185**: 633–644.
- VanRaden PM (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci* **91**: 4414–4423.
- Varel VH, Fryda SJ und Robinson IM (1984). Cellulolytic Bacteria from Pig Large Intestine. *Appl Environ Microbiol* **47**: 219–221.
- Verbyla KL, Hayes BJ, Bowman PJ und Goddard ME (2009). Accuracy of genomic selection using stochastic search variable selection in Australian Holstein Friesian dairy cattle. *Genet Res* **91**: 307–311.
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE und Gwartz AT (2010). Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science* **328**: 228–231.
- Villarroya J, Giralto M und Villarroya F (2009). Mitochondrial DNA: An Up-and-coming Actor in White Adipose Tissue Pathophysiology. *Obesity* **17**: 1814–1820.
- Vincent A, Louveau I, Gondret F, Lebret B und Damon M (2012). Mitochondrial function, fatty acid metabolism, and immune system are relevant features of pig adipose tissue development. *Physiol Genomics* **44**: 1116–1124.
- Voisin L, Breuillé D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Aurousseau E, Obled C und Attaix D (1996). Muscle Wasting in a Rat Model of Long-lasting Sepsis Results from the Activation of Lysosomal, Ca²⁺-activated, and Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathways. *Clin Investig* **97**: 1610–1617.
- Waaij D van der, Berghuis-de Vries JM und Lekkerkerk-van der Wees JEC (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *Epidemiol Infect* **69**: 405–411.
- Waldschmidt-Leitz E und Purr A (1929). Über Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas. *Ber Dt Chem Ges* **62**: 2217–2226.

- Wang M, Wang JJ, Li J, Park K, Qian X, Ma J und Zhang XJ (2009). Pigment epithelium-derived factor suppresses adipogenesis via inhibition of the MAPK / ERK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **297**: 1378–1387.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR und Al WET (2007). Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5261–5267.
- Wang YH, Bower NI, Reverter A, Tan SH, Jager N De, Wang R, McWilliam SM, Café LM, Greenwood PL und Lehnert SA (2009). Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *Anim Sci* **87**: 119–130.
- Warr A, Hall R, Kim K, Tseng E, Koren S, Phillippy A, Bickhart D, Rosen B, Schroeder SS, Hume D, Talbot R, Rund L, Schook L, Chow W, Howe K, Nonnemann D, Rohrer G, Putnam N, Green E, Watson M, Smith T und Archibald A (2017). Exploiting Long Read Sequencing Technologies to Establish High Quality Highly Contiguous Pig Reference Genome Assemblies. In: *Proc Intern Plant and Animal Genome XXV*, San Diego.
- Wellmann R und Bennewitz J (2012). Bayesian models with dominance effects for genomic evaluation of quantitative traits. *Genet Res* **94**: 21–37.
- Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI und Chervonsky AV (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* **455**: 1109–1113.
- Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar, J, Czech, MP und Corvera S (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *Clin Invest* **114**: 1281–1289.
- Wimmers K, Murani E und Ponsuksili S (2010). Pre- and postnatal differential gene expression with relevance for meat and carcass traits in pigs - a review. *Anim Sci Pap Reports* **28**: 115–122.
- Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen J, Chandak GR, Masamune A, Bence M, Szmola R, Oracz G, Macek M, Bhatia E, Steigenberger S, Lasher D, Bühler F, Delaporte C, Tebbing J, Ludwig M, Pilsak C, Saum K, Bugert P, Masson E, Paliwal S, Bhaskar S, Sobczynska-Tomaszewska, A, Bak D, Balascak I, Choudhuri G, Reddy DN, Rao GV, Thomas V, Kume K, Nakano E, Kakuta Y, Shimosegawa T, Durko L, Szabo A, Schnur A, Hegyi P, Rakonczay Z, Pfützer R, Schneider A, Groneberg DA, Kovacs P, Stumcoll M, Blüher M, Müller T, Janecke A, Teich N, Grützmann R, Schulz HU, Mössner J, Keim V, Löhr M, Ferec C und Satin-Toth M (2013). Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet* **45**: 1216–1220.
- Witte DP, Ellis M, McKeith FK und Wilson ER (2000). Effect of dietary lysine level and environmental temperature during the finishing phase on the intramuscular fat content of. *Anim Sci* **78**: 1272–1276.
- Wlodarska M, Thaiss CA, Nowarski R, Henao-Mejia J, Zhang JP, Brown EM, Frankel G, Levy M, Katz MN, Philbrick WM, Elinav E, Finlay BB und Flavell RA (2014). NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* **156**: 1045–1059.
- Wolfs MGM, Rensen SS, Dijk EJB, Verdam FJ, Greve J, Sanjabi B, Bruinenberg M, Wijmenga C, Haeften TW, Buurman WA, Franke L und Hofker MH (2010). Co-expressed immune and metabolic genes in visceral and subcutaneous adipose tissue from severely obese individuals

are associated with plasma HDL and glucose levels : a microarray study. *BMC Med Genomics* **3**: 34–48.

Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI und Whittington FM (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci* **78**: 343–58.

Yang J, Zaitlen NA, Goddard ME, Visscher PM und Price AL (2014). Advantages and pitfalls in the application of mixed-model association methods. *Nat Genet* **46**: 100–106.

ZDS, Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion e.V. (2007). Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein. Bonn, Deutschland.

Anhang

Abbildungen

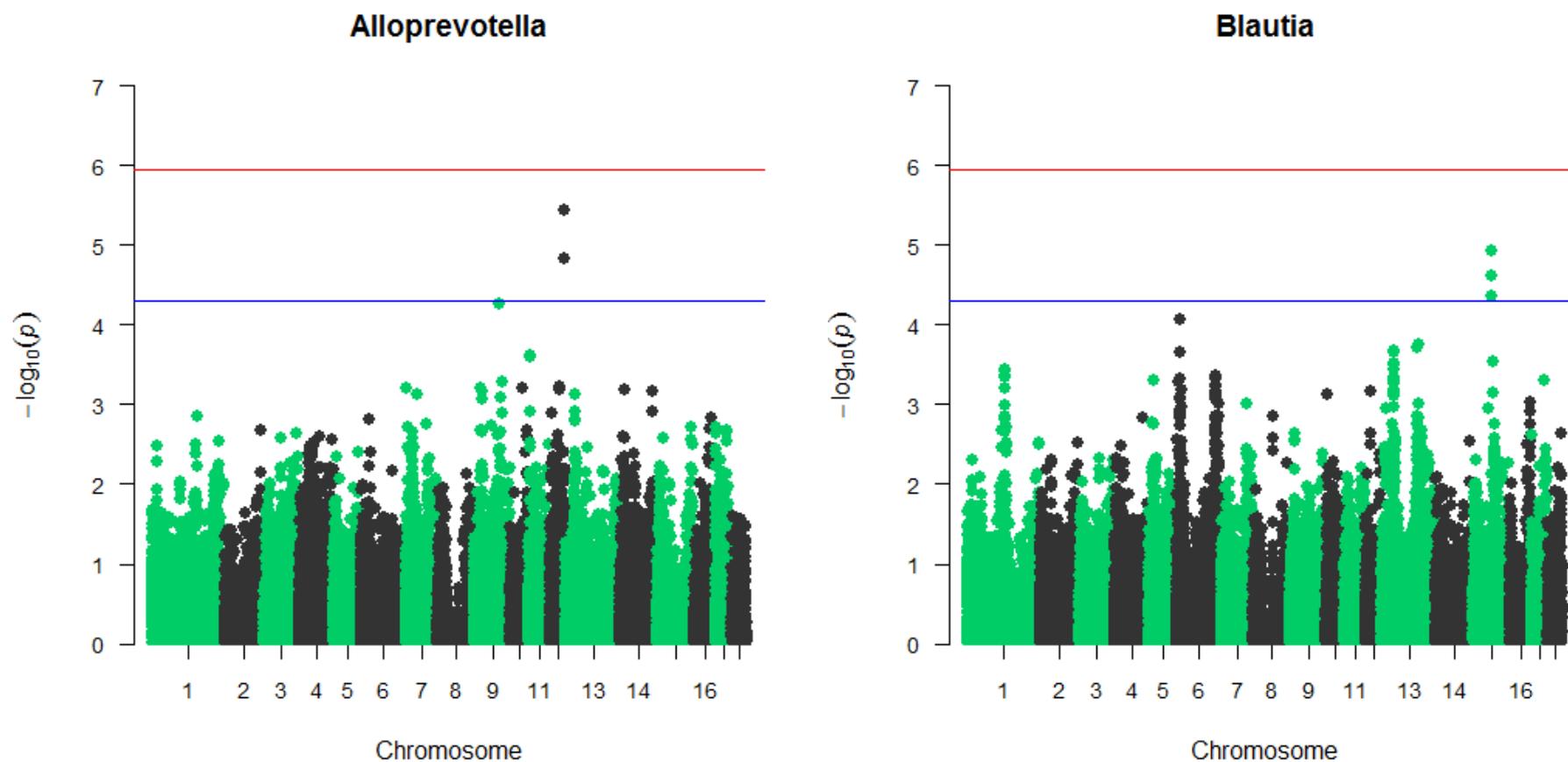
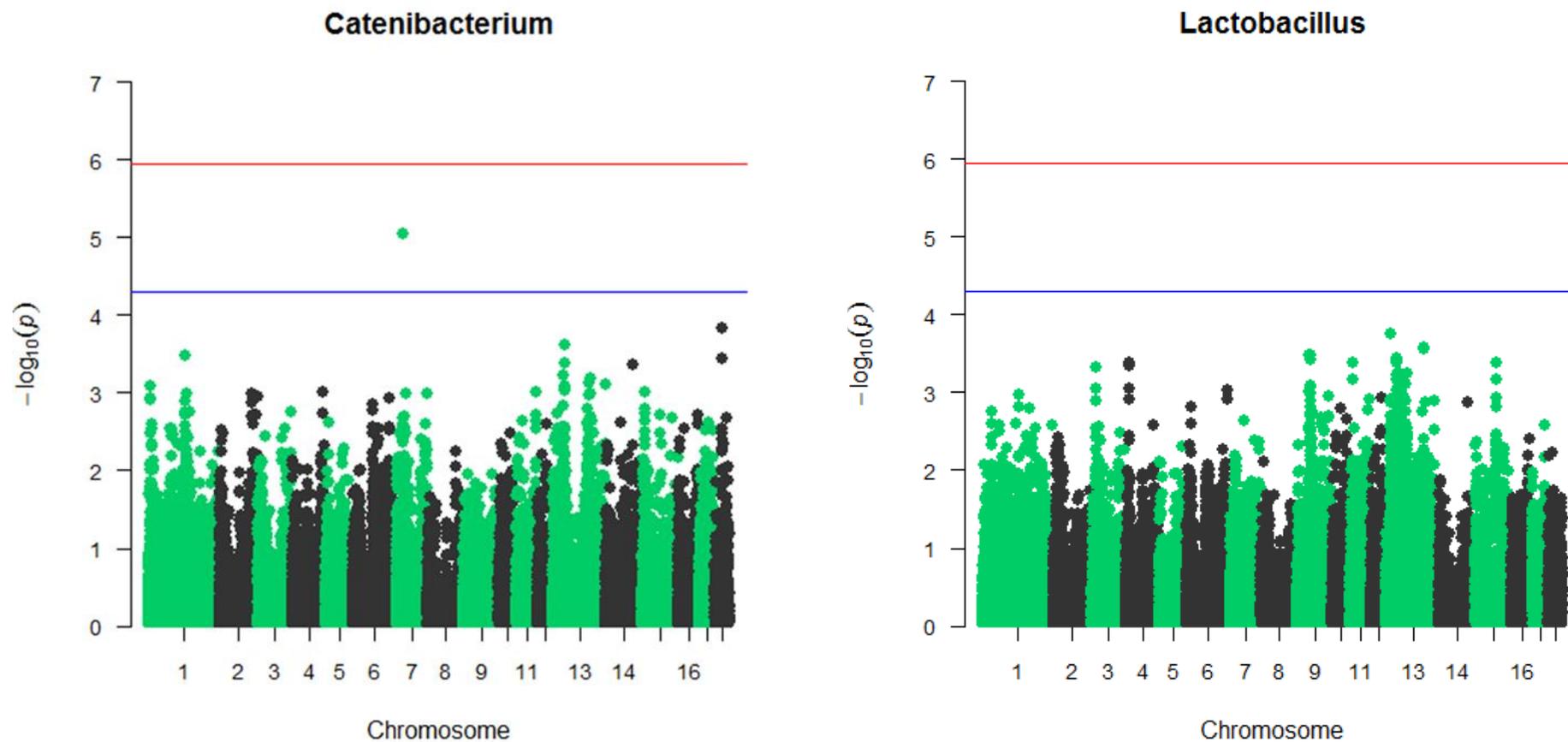
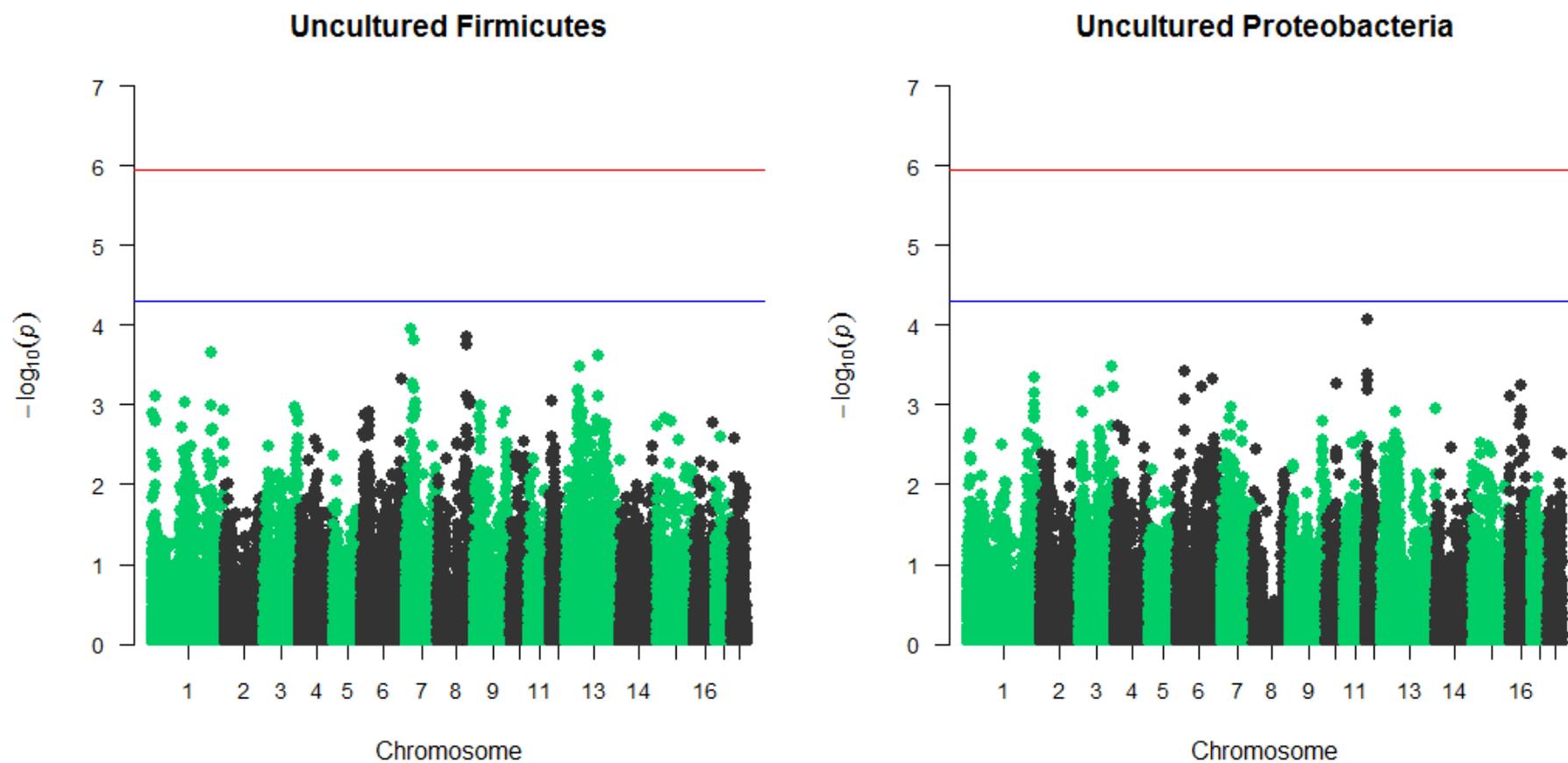


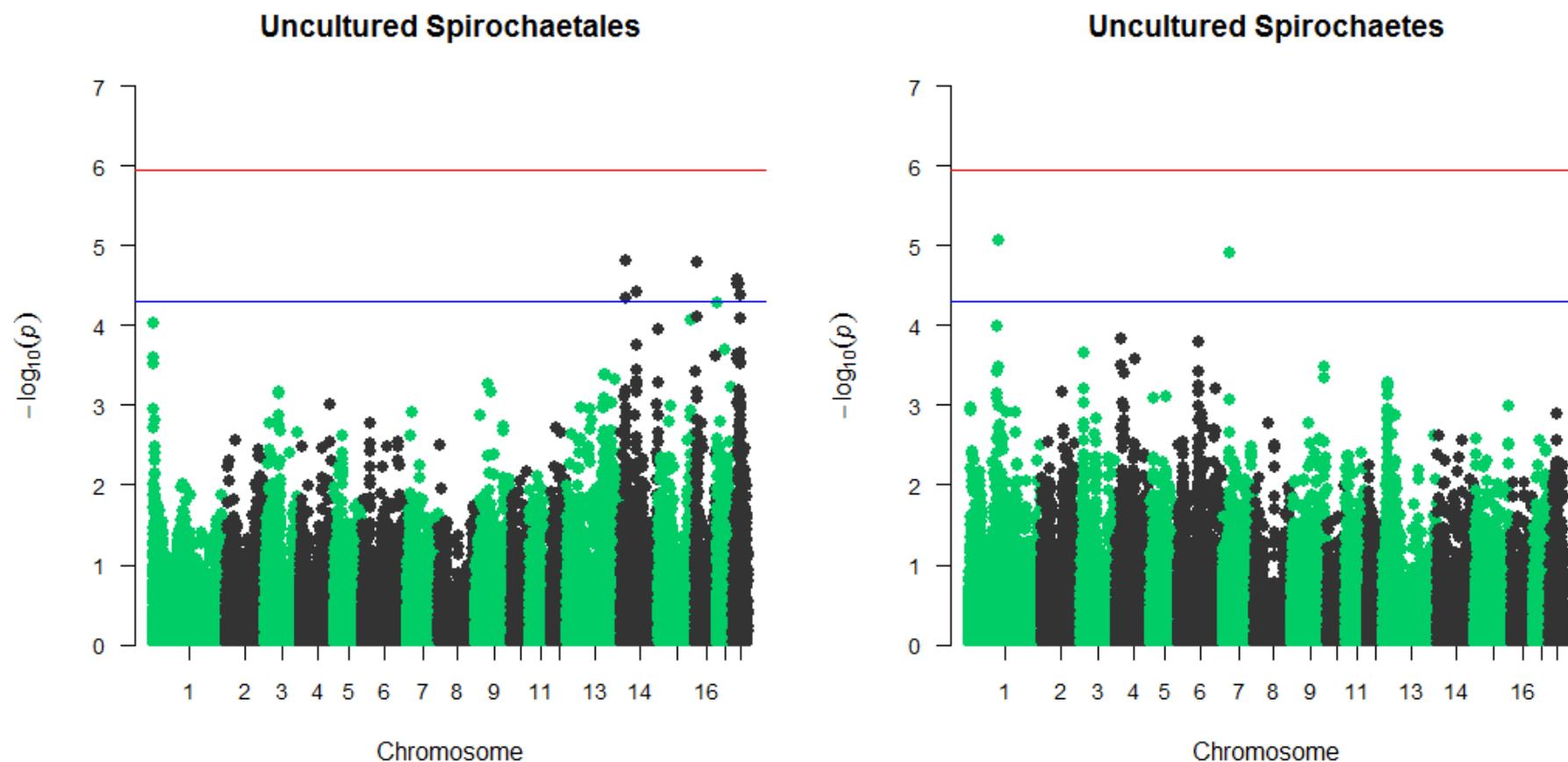
Abbildung A1: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und den bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p)$ -Wert. Die obere Linie entspricht $p_{\text{genomweit}} < 0,05$ und die untere Linie $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$.



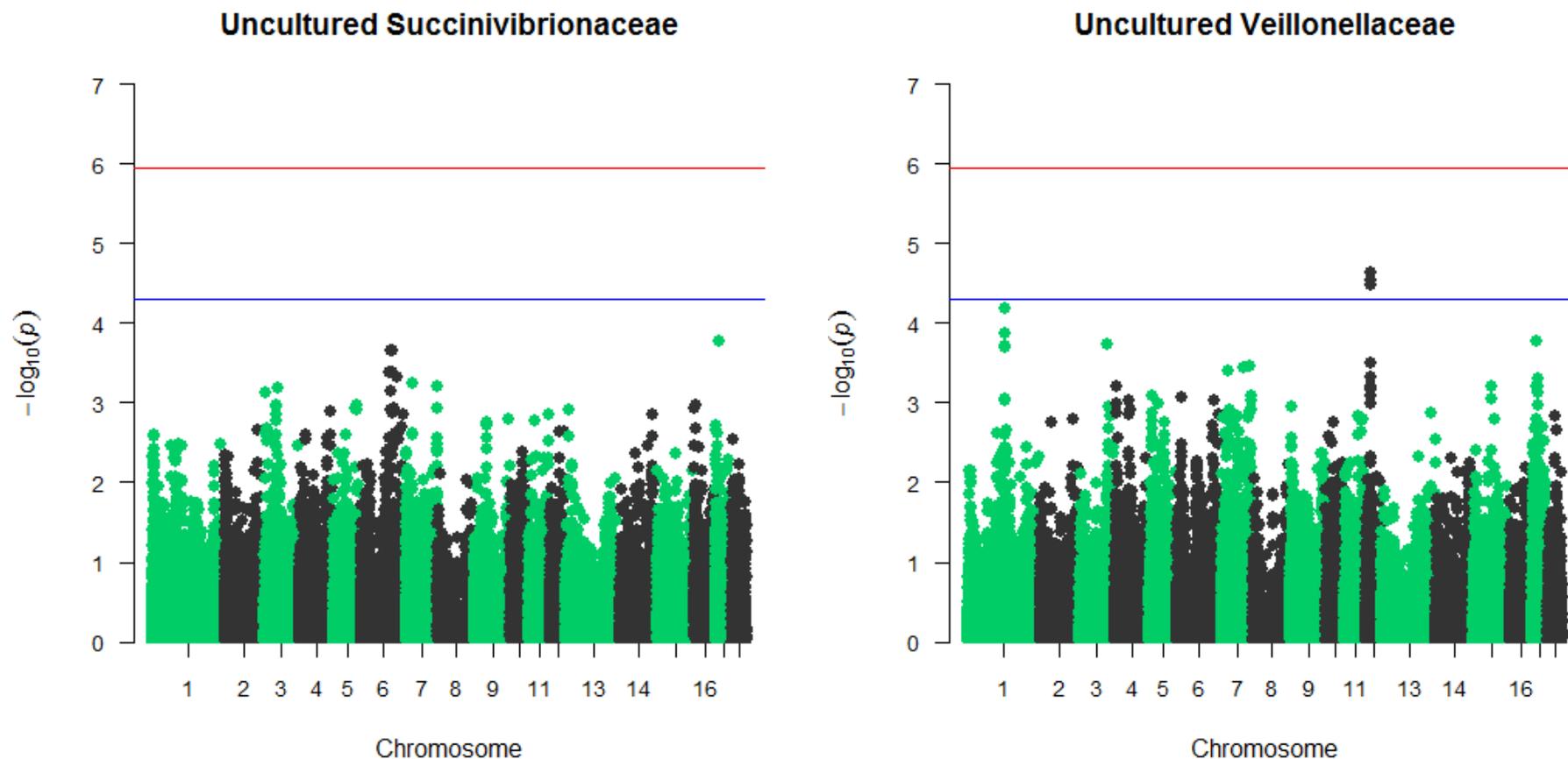
Fortsetzung **Abbildung A1**: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und den bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p)$ -Wert. Die obere Linie entspricht $p_{\text{genomweit}} < 0,05$ und die untere Linie $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$.



Fortsetzung **Abbildung A1**: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und den bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p)$ -Wert. Die obere Linie entspricht $p_{\text{genomweit}} < 0,05$ und die untere Linie $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$.



Fortsetzung **Abbildung A1**: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und den bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p)$ -Wert. Die obere Linie entspricht $p_{\text{genomweit}} < 0,05$ und die untere Linie $p_{\text{nominal}} < 5 \times 10^{-5}$.



Fortsetzung **Abbildung A1**: Manhattan-Plots mit der Assoziation zwischen 44 059 SNPs und den bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den beobachteten $-\log_{10}(p)$ -Wert. Die obere Linie entspricht $p_{genomweit} < 0,05$ und die untere Linie $p_{nominal} < 5 \times 10^{-5}$.

Alloprevotella

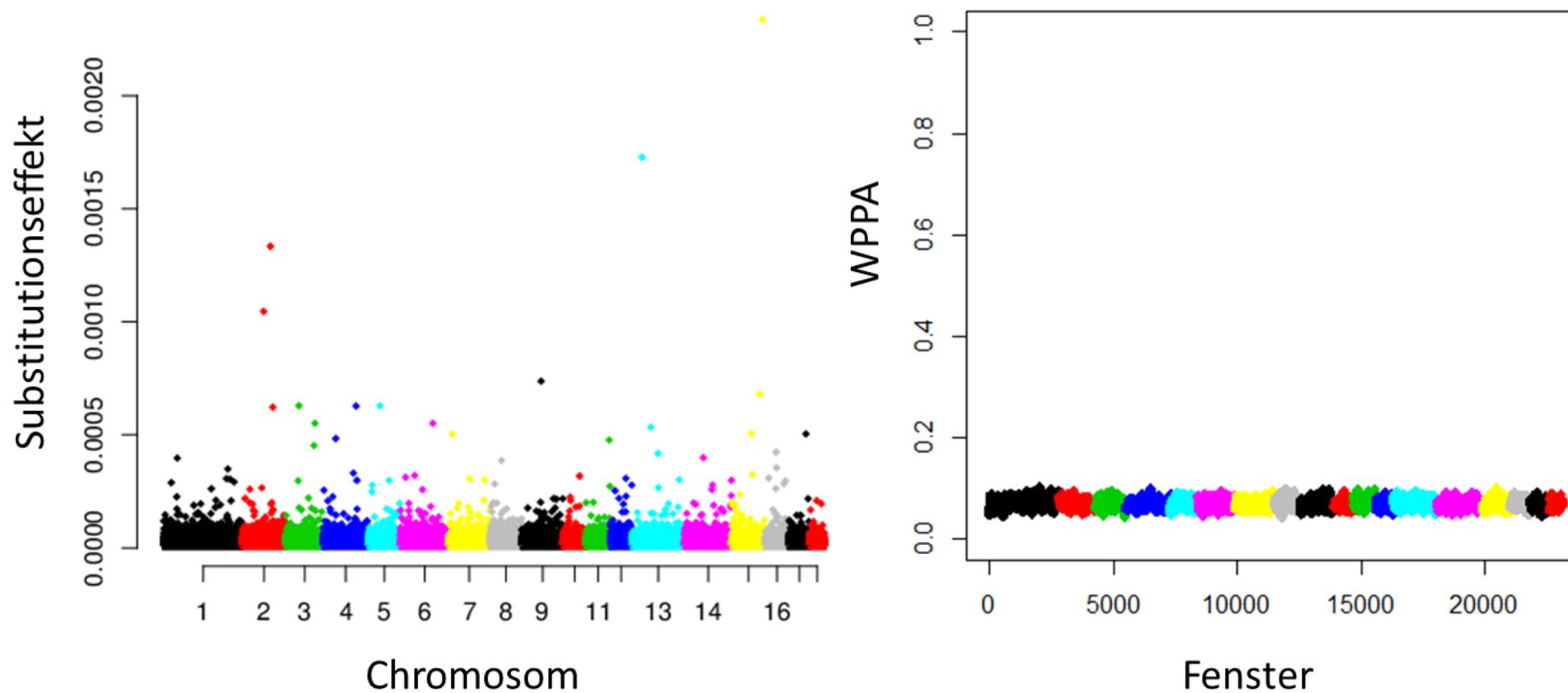
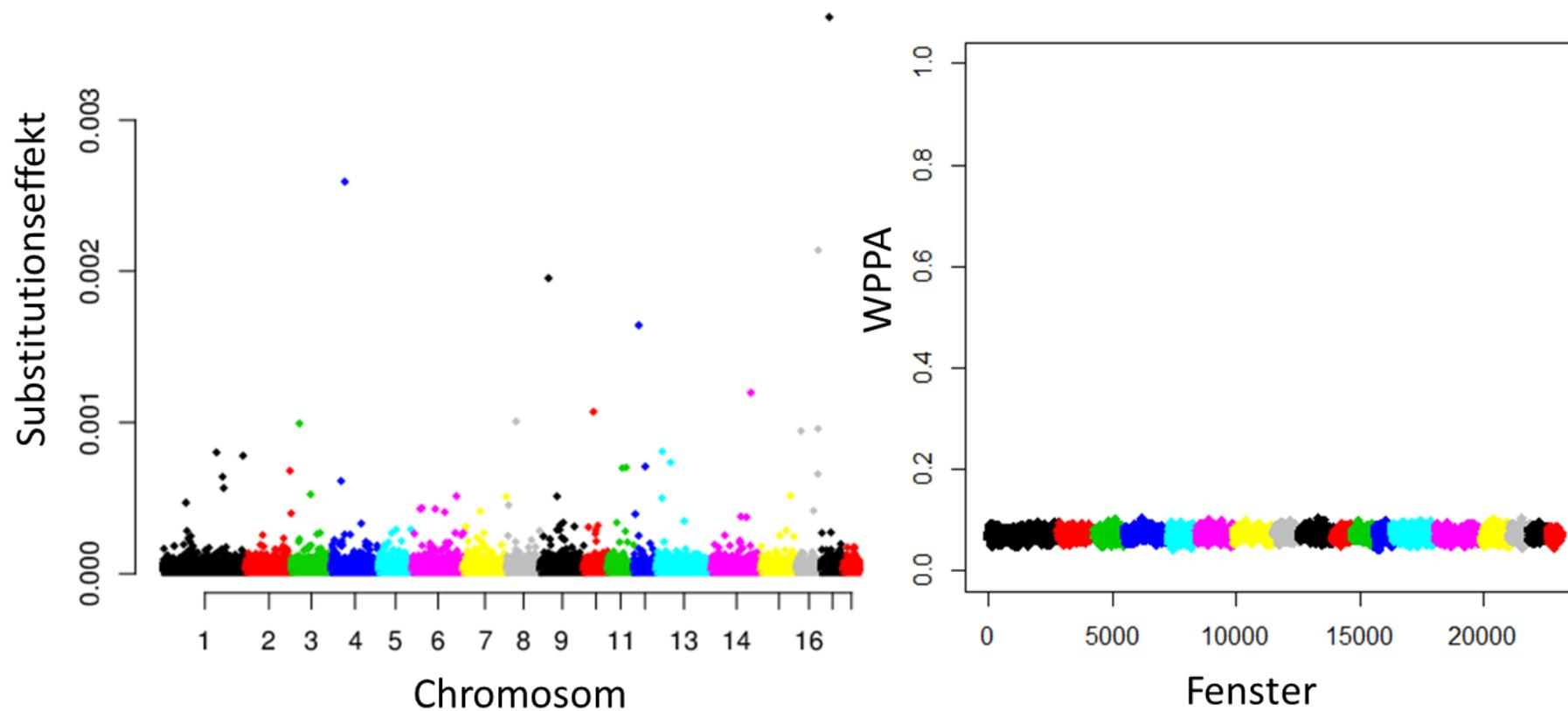


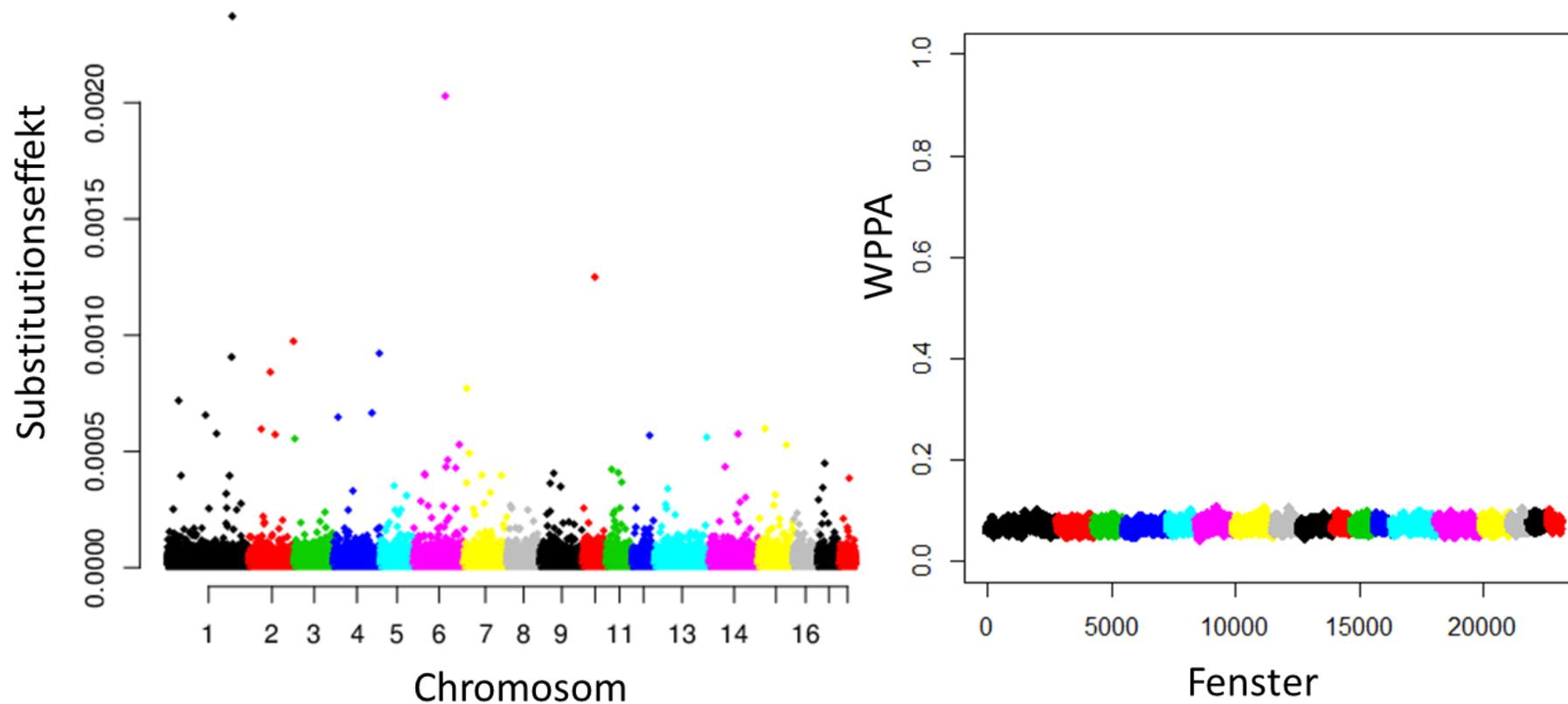
Abbildung A2: Links dargestellt die marginalen Substitutionseffekte aus BayesC von 44 059 SNPs für die einzelnen bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den absoluten Substitutionseffekt. Rechts dargestellt die Window Posterior Probability of Association (WPPA) für Fenster der Breite 2 cM.

Catenibacterium



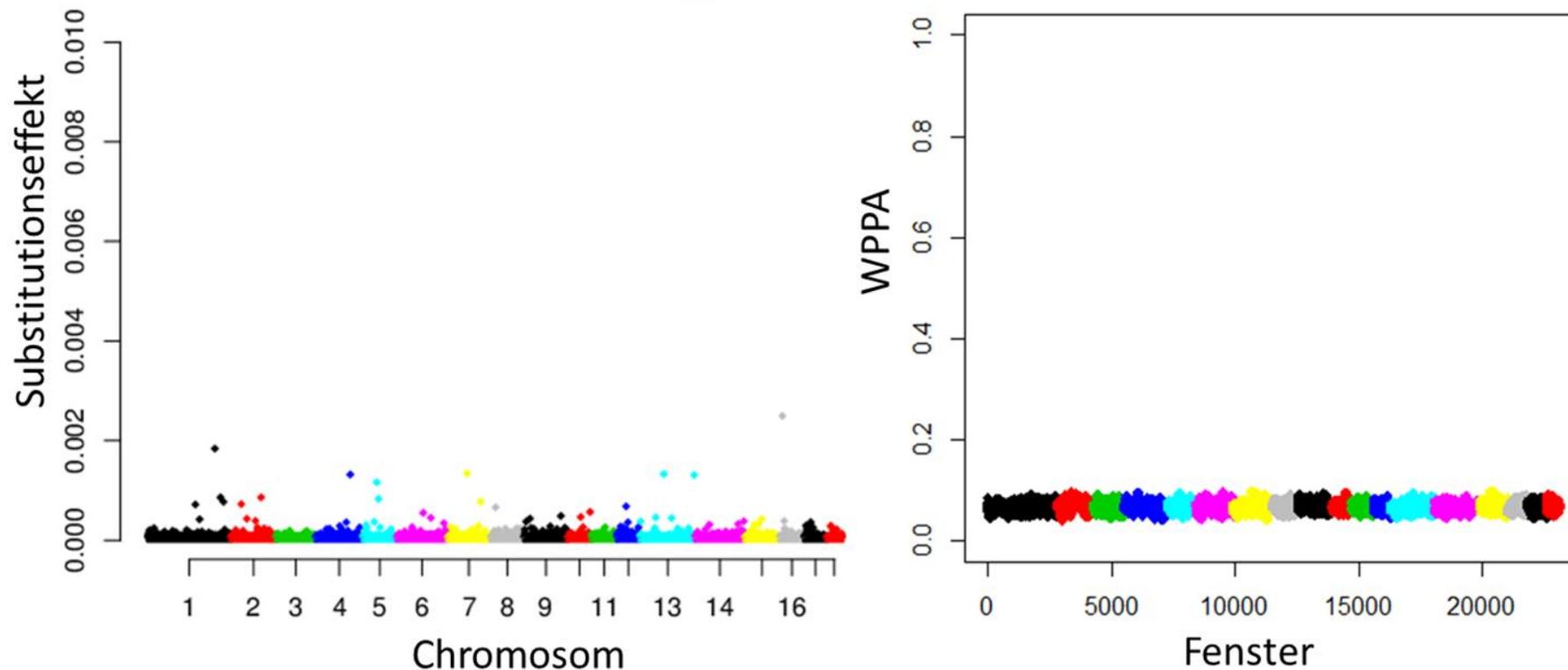
Fortsetzung **Abbildung A2**: Links dargestellt die marginalen Substitutionseffekte aus BayesC von 44 059 SNPs für die einzelnen bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den absoluten Substitutionseffekt. Rechts dargestellt die Window Posterior Probability of Association (WPPA) für Fenster der Breite 2 cM.

Lactobacillus

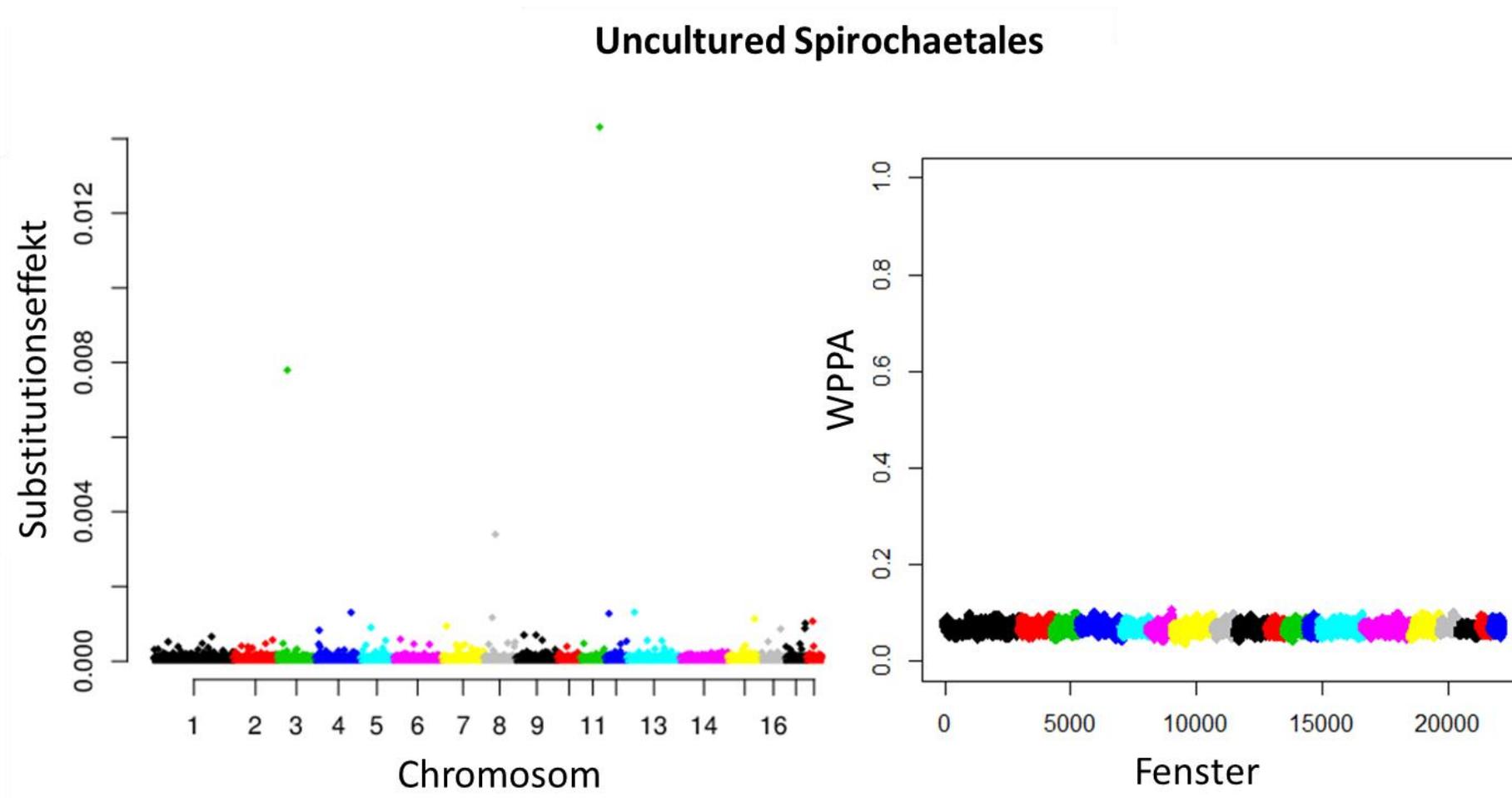


Fortsetzung **Abbildung A2**: Links dargestellt die marginalen Substitutionseffekte aus BayesC von 44 059 SNPs für die einzelnen bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den absoluten Substitutionseffekt. Rechts dargestellt die Window Posterior Probability of Association (WPPA) für Fenster der Breite 2 cM.

Uncultured Succinivibrionaceae



Fortsetzung **Abbildung A2**: Links dargestellt die marginalen Substitutionseffekte aus BayesC von 44 059 SNPs für die einzelnen bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den absoluten Substitutionseffekt. Rechts dargestellt die Window Posterior Probability of Association (WPPA) für Fenster der Breite 2 cM.



Fortsetzung **Abbildung A2**: Links dargestellt die marginalen Substitutionseffekte aus BayesC von 44 059 SNPs für die einzelnen bakteriellen Genera. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom und die y-Achse den absoluten Substitutionseffekt. Rechts dargestellt die Window Posterior Probability of Association (WPPA) für Fenster der Breite 2 cM.

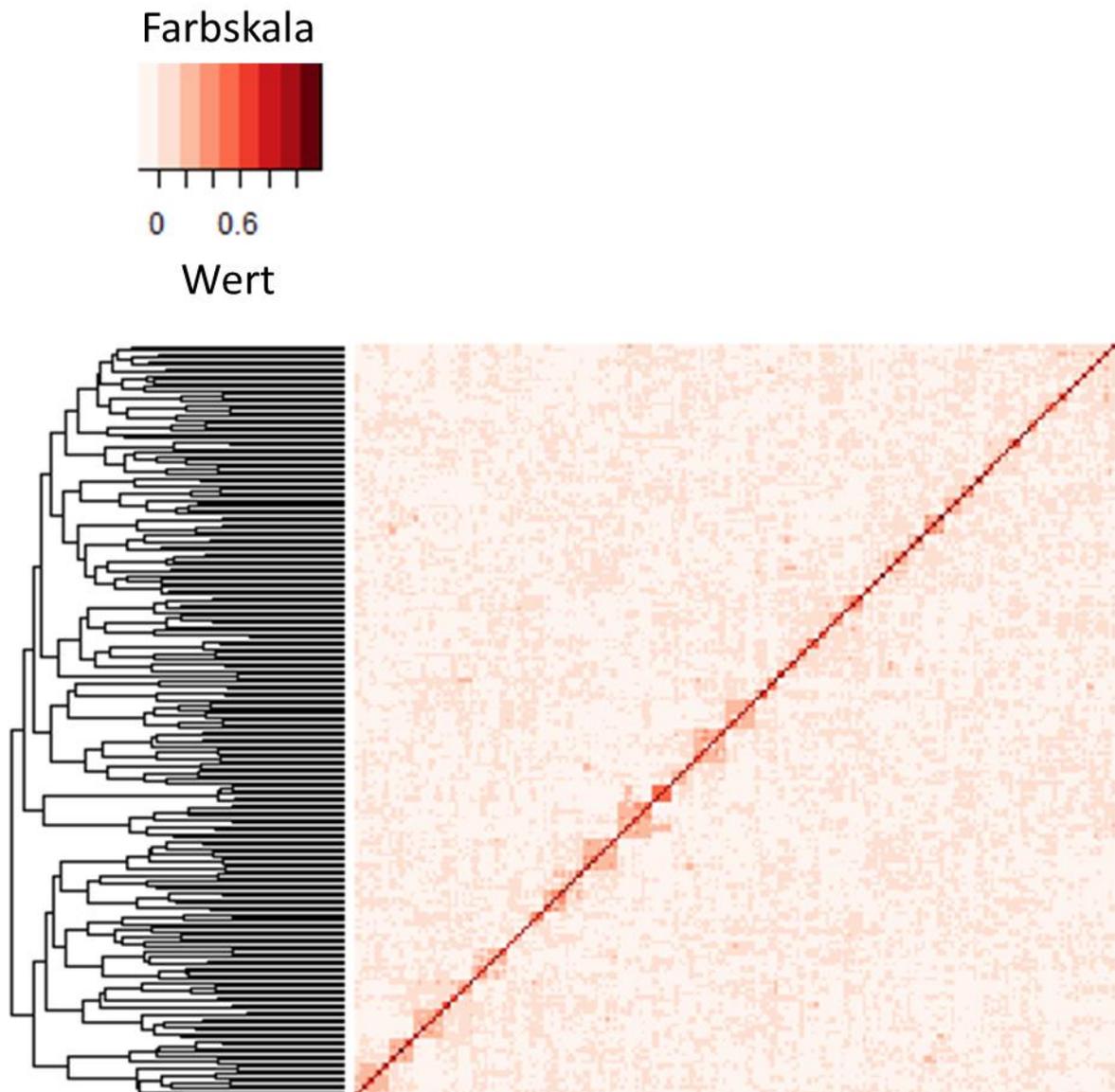


Abbildung A3: Genomische Verwandtschaftsmatrix G . Ein dunkleres rot zeigt eine höhere Ähnlichkeit zwischen den Tieren.

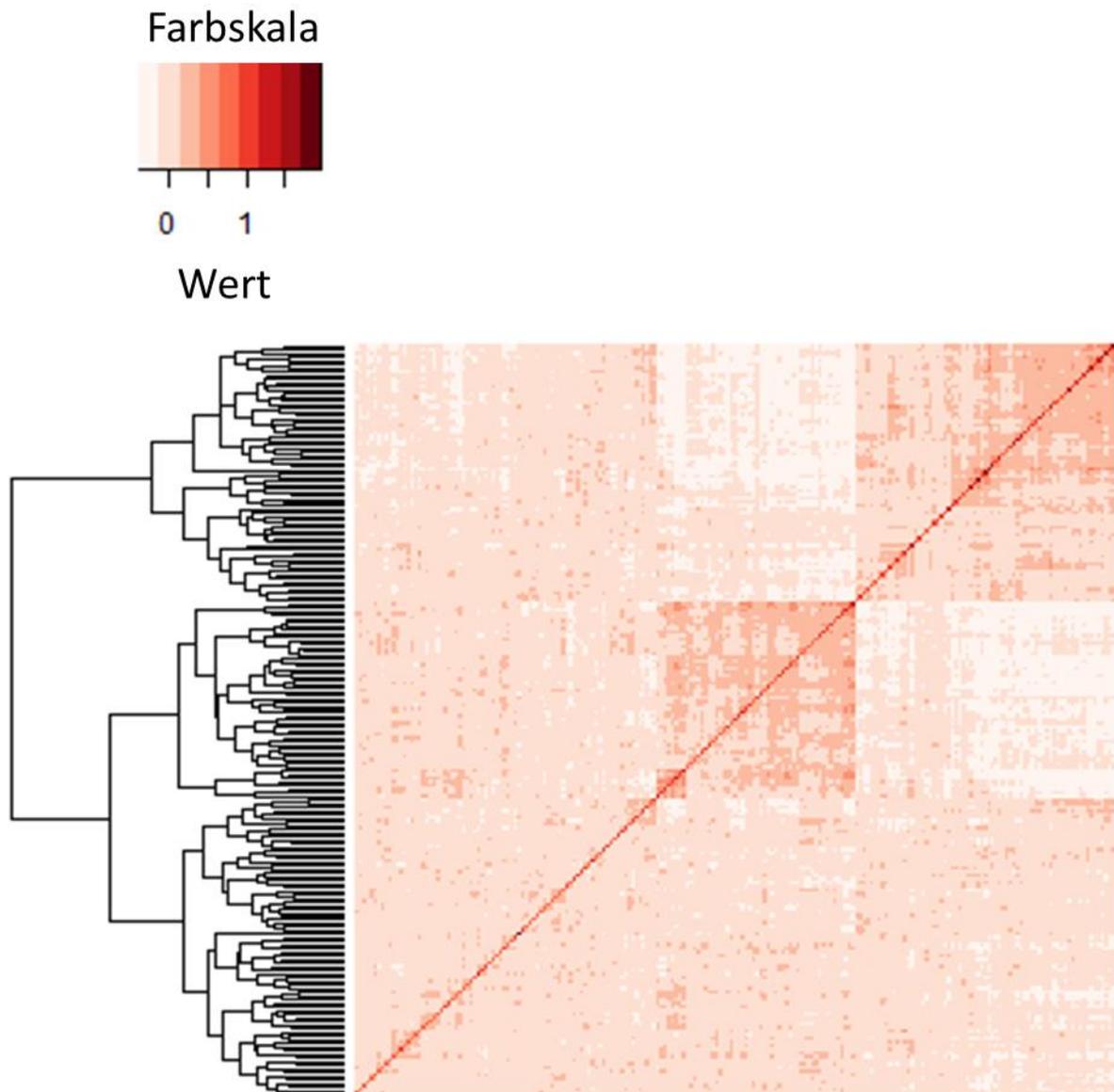


Abbildung A4: Mikrobielle Verwandtschaftsmatrix M . Ein dunkleres rot zeigt eine höhere Ähnlichkeit zwischen den Tieren.

Tabellen

Tabelle A1: Deskriptive Statistik der erfassten Merkmale mit Abkürzung (Abk.), Tieranzahl (N), Mittelwert (μ), Standardabweichung (SD), Minimum (Min), und Maximum (Max).

Merkm	Abk.	N	μ	SD	Min	Max
Tägliche Zunahme	TZ	207	759,8	79,7	445,0	984,0
Futtermverwertung	FUV	192	2,4	0,2	1,9	3,5
Futtermverzehr	FVZ	192	177,8	14,6	136,0	257,3

Tabelle A2: Heritabilitäten (h^2) mit p -Werten und FDR für die relativen Häufigkeiten aller analysierten bakteriellen Genera. Signifikante Heritabilitäten sind **fett** gedruckt.

Genus	h^2	SE	p -Wert	FDR
<i>Blautia</i>	0,33	0,14	<0,01	0,01
<i>Uncultured Spirochaetales</i>	0,52	0,17	<0,01	0,01
<i>Uncultured Succinivibrionaceae</i>	0,57	0,16	<0,01	0,01
<i>Alloprevotella</i>	0,34	0,16	0,01	0,07
<i>Catenibacterium</i>	0,39	0,16	0,01	0,07
<i>Uncultured Spirochaetes</i>	0,32	0,14	0,01	0,07
<i>Uncultured Veillonellaceae</i>	0,33	0,15	0,01	0,07
<i>Uncultured Proteobacteria</i>	0,29	0,15	0,01	0,07
<i>Lactobacillus</i>	0,34	0,16	0,02	0,12
<i>Uncultured Firmicutes</i>	0,28	0,15	0,02	0,12
<i>Uncultured Bacteroidia</i>	0,20	0,13	0,05	0,27
<i>Ruminococcus</i>	0,19	0,13	0,08	0,39
<i>Parabacteroides</i>	0,17	0,13	0,12	0,53
<i>Uncultured Bacteroidetes 1</i>	0,20	0,14	0,13	0,53
<i>Uncultured Ruminococcaceae</i>	0,16	0,13	0,15	0,57
<i>Faecalibacterium</i>	0,16	0,14	0,20	0,70
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,10	0,11	0,26	0,74
<i>Megasphaera</i>	0,13	0,13	0,27	0,74
<i>Oscillibacter</i>	0,16	0,15	0,27	0,74
<i>Uncultured Erysipelotrichales</i>	0,13	0,13	0,27	0,74
<i>Campylobacter</i>	0,15	0,14	0,29	0,75
<i>Uncultured Spirochaetaceae</i>	0,10	0,12	0,35	0,86

Fortsetzung **Tabelle A2.** : Heritabilitäten (h^2) mit p -Werten und FDR für die relativen Häufigkeiten aller analysierten bakteriellen Genera.

Genus	h^2	SE	p-Wert	FDR
<i>Treponema</i>	0,12	0,14	0,37	0,86
<i>Others</i>	0,12	0,14	0,41	0,91
<i>Uncultured Lachnospiraceae</i>	0,09	0,12	0,43	0,92
<i>Succinivibrio</i>	0,11	0,15	0,52	1,00
<i>Uncultured Bacteroidaceae</i>	0,04	0,10	0,58	1,00
<i>Uncultured Clostridiales incertae sedis XIII</i>	0,07	0,13	0,61	1,00
<i>Uncultured Peptococcaceae II</i>	0,05	0,12	0,65	1,00
<i>Roseburia</i>	0,06	0,13	0,66	1,00
<i>Erysipelotrichaceae incertae sedis</i>	0,05	0,12	0,69	1,00
<i>Anaerovibrio</i>	0,03	0,11	0,73	1,00
<i>Corynebacterium</i>	0,02	0,11	0,83	1,00
<i>Prevotella</i>	0,02	0,11	0,84	1,00
<i>Mitsuokella</i>	0,02	0,13	0,86	1,00
<i>Anaerovorax</i>	-	0,10	0,98	1,00
<i>Clostridium XI</i>	-	-	-	-
<i>Fibrobacter</i>	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-
<i>Turicibacter</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Bacteroidales</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Clostridia</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Clostridiales</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Gammaproteobacteria</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Lactobacillaceae</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Peptostreptococcaceae</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Porphyromonadaceae</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Prevotellaceae</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Rikenellaceae</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Saccharibacteria genera incertae sedis</i>	-	-	-	-
<i>Uncultured Tenericutes</i>	-	-	-	-

Tabelle A3: Primersequenzen für RFLP-Genotypisierung des MHS-Status.

Bezeichnung	Sequenz
Forward	CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG
Reverse	GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT

Tabelle A4: Signifikante SNPs ($p < 5 \times 10^{-5}$) der GWAS mit p -Werten und chromosomaler Position (SSC) für die Merkmale intramuskulärer Fettgehalt (IMF) und Tropfsaftverlust (TSV).

Merkmal	SNP	SSC	Position (MB)	p -Wert	FDR
IMF	MARC0010450	14	130,66	$1,01 \times 10^{-5}$	0,37
TSV	MARC0051044	16	60,74	$3,63 \times 10^{-5}$	0,84

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörn Bennewitz, der mir diese Arbeit ermöglichte, sich immer gern die nötige Zeit für mich nahm und mich in meinem Tun unterstützte.

Ganz besonders gilt dieser Dank auch Herrn Dr. Dr. Robin Wellmann, der sich immer Zeit nahm, um mich bei den statistischen Auswertungen zu unterstützen. Vielen Dank für die Geduld und Mühen. Gleichmaßen möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Patrick Stratz bedanken, dass er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Siegfried Preuß. Nicht nur, dass er immer wieder durch kritisches Hinterfragen wertvolle Hinweise gab, auch wurden unter seiner Leitung alle Laborarbeiten durchgeführt. An dieser Stelle gilt mein Dank außerdem allen Mitarbeiterinnen des Labors ohne deren Mühen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der Landesanstalt für Schweinezucht (LSZ) Boxberg und deren Mitarbeitern möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Probennahme im Schlachthof danken.

Gleiches gilt für die Unterstützung durch das gesamte Fachgebiet Tiergenetik und Züchtung, die mir immer hilfreich zur Seite standen, produktive Ratschläge gaben und ich durch ihr gutes und lustiges Arbeitsklima immer motiviert bei der Arbeit war.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie Dank, die mir mein Leben lang bedingungslos zur Seite gestanden hat. Ganz herzlich bedanke ich mich aber bei meinen Eltern, da Sie während der Promotion immer für mich da waren und mich auch finanziell unterstützt haben.

Abschließend möchte ich mich noch bei all jenen bedanken, die mich auf sonstige Weise unterstützt haben, oder die mir die Zeit meiner Doktorarbeit unvergesslich gemacht haben.

Curriculum Vitae

Name: Maria Maushammer
 Geburtsdatum u. -ort: 17.11.1988 in Dingolfing
 Nationalität: deutsch

Schulbildung/Studium

Juli 2008 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife, Gymnasium Dingolfing
 2008 – 2013 Studium der Agrarwissenschaften, Fachrichtung Tierwissenschaften an der Universität Hohenheim
 Oktober 2011 Bachelor of Science
 Dezember 2013 Master of Science
 Februar 2014 – September 2017 Promotion an der Universität Hohenheim, Fachgebiet Tiergenetik und Züchtung mit dem Titel: „Analyse komplexer Merkmale beim Schwein mittels SNP-Chip Genotypen, Darmmikrobiota- und Genexpressionsdaten“

Praktika/Beschäftigungen

März 2009 Praktikum in der Geschäftsstelle des Landesverbandes Bayerischer Pferdezüchter e.V., München-Riem
 August/September 2009 Praktikum in der Niederbayerischen Besamungsgenossenschaft Landshut Pocking e. G.
 März/April 2010 Praktikum auf dem Milchviehbetrieb der Familie Eichinger, Landau a.d. Isar
 August/September 2010 Praktikum auf dem Milchviehbetrieb der Familie Eichinger, Landau a.d. Isar
 März/April 2011 Praktikum am Amt für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Landshut, Sachgebiet Schweinezucht und -haltung
 2012 – 2013 Studentische Aushilfskraft bei ADIA-Zert, Audit- und Zertifizierungsdienstleistungen in der Agrar- und Ernährungswirtschaft GmbH, Stuttgart

 Ort, Datum

 Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

gemäß § 8 Absatz 2 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr.sc.agr.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema „Analyse komplexer Merkmale beim Schwein mittels SNP-Chip Genotypen, Darmmikrobiota- und Genexpressionsdaten“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Unterschrift