



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 32 306 T2** 2006.06.01

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 310 570 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 32 306.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 001 366.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **20.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.06.2006**

(30) Unionspriorität:

**47181                      20.05.1997                      US**

(74) Vertreter:

**GRUND Intellectual Property Group, 80802  
München**

(73) Patentinhaber:

**Biotechnology Research and Development Corp.,  
Peoria, Ill., US; The United States of America as  
represented by The Secretary of Agriculture,  
Washington, D.C., US; Swiss Federal Institute of  
Technology Zurich, Zürich, CH**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Bosworth, Brad T., Nevada, US; Voegeli, Peter,  
8180 Buelach, CH**

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Zusammensetzungen zur Identifizierung von Schweinen, die genetisch resistent gegenüber E. Coli F18-assoziierten Krankheiten sind**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

### Beschreibung

**[0001]** Es werden Zusammensetzungen und nicht-invasive Verfahren zur Identifizierung von Schweinen bereitgestellt, die gegenüber mit *E. coli* in Zusammenhang stehenden Krankheiten genetisch resistent sind, insbesondere intestinale Krankheiten, die mit einem Stamm von *E. coli* Bakterien assoziiert sind, der mit Fimbrien F18 ergänzt ist. DNA-Polymorphismen im alpha (1,2) Fucosyltransferasegen (FUT1) von Schweinen wurden identifiziert, die resistente von empfänglichen Schweinen unterscheiden und einen diagnostischen Test bereitstellen, der für Schweinezüchter nützlich ist.

**[0002]** Ein Hauptproblem bei der Zucht von Schweinen besteht darin, diese frei von Krankheiten zu halten. Darmerkrankungen nach der Entwöhnung stellen ein besonderes Problem dar. Eine begrenzte Zahl von Serotypen von toxischen *Escherichia (E.) coli*-Stämmen sind auslösende Agenzien von Ödem-Krankheit und Diarrhö nach Entwöhnung bei Schweinen, die ernste wirtschaftliche Verluste auf Schweinezuchtfarmen auf der ganzen Welt insbesondere bei 4 bis 12 Wochen alten Ferkeln hervorrufen. Die typischen klinischen Symptome der Ödem-Krankheit sind neurologische Anzeichen von Ataxie, Konvulsionen und Paralyse. Bei einer post mortem-Untersuchung ist das Ödem typischerweise an charakteristischen Stellen wie Augenlider, Stirn, Magenwand und Mesocolon anwesend. Die Krankheiten werden durch eine Shiga-artige Toxin-II-Variante bzw. durch die Enterotoxine LT, STa, STb ausgelöst, die von *E. coli* produziert werden, die die Oberfläche des Dünndarms besiedeln, ohne große morphologische Veränderungen der Enterozyten (Zellen im Darm) auszulösen. Bestimmte Arten bakterieller *E. coli*-Stämme, F18, F4 (K88) sind in dieser Hinsicht die hauptsächlichen letalen „Übeltäter“.

**[0003]** „Ödem-Krankheit von Schweinen stellt eine Enterotoxämie dar, die durch generalisierte vaskuläre Schädigung charakterisiert ist. Letztere wird durch ein Toxin, Shiga-artiges Toxin-II Variante hervorgerufen, das durch verschiedene *E. coli*-Stämme produziert wird“ (Bertschinger et al., 1993). *E. coli* unterscheiden sich in ihren Pili-Arten. Eine Gruppe von verwandten adhäsiven Fimbrien werden z.B. als K88 oder F18 bezeichnet (Vögeli et al., 1997).

**[0004]** Nicht alle Schweine erliegen *E. coli*-Infektionen. Besiedelung hängt von der Adhärenz der Bakterien an die Enterozyten ab, die durch die bakteriellen Fimbriae, bezeichnet z.B. als K88 oder F18, vermittelt wird. Es wurde gezeigt, dass Empfänglichkeit für Adhäsion, d.h. Expression von Rezeptoren zur Bindung der Fimbriae in Schweinen, durch den Wirt genetisch kontrolliert und als dominante Eigenschaft vererbt wird, wobei im Fall von F18 B das Empfänglichkeitsallel und b das Resistenzallel ist (Vögeli et al., 1996; Meijerink et al., 1997). Der genetische Locus für diesen *E. coli* F18-Rezeptor (ECF18R) wurde auf dem Schweine-Chromosom 6 (SSC6) kartiert, basierend auf der engen genetischen Kopplung mit dem S-Locus und anderen Loci der Halothan (HAL)-Kopplungsgruppe auf dem Chromosom 6. Der Rezeptor für K88 *E. coli* befindet sich auf Chromosom 13.

**[0005]** Der Resistenzmechanismus scheint darin zu bestehen, dass intestinale Grenzen in resistenten Tieren nicht durch *E. coli* besiedelt werden, d.h. die Bakterien heften sich nicht an Darmwände von resistenten Schweinen an. Es wurde gezeigt, dass Glycoprotein-Rezeptoren in der Bürstensaummembran des Darms für die Unterschiede zwischen adhäsiven und nicht-adhäsiven Phänotypen verantwortlich sind, die mit einigen *E. coli* in Zusammenhang stehen. Deshalb bestimmt der Genotyp des Wirtsschweins die Resistenz. Die Fimbria-Bakterien wurden ebenfalls untersucht (WO 94/13811).

**[0006]** Gegenwärtige Verfahren zur Identifizierung von Schweinen, die gegenüber F18 *E. coli*-assoziierten Krankheiten resistent sind, bestehen entweder darin 1) bei der Schlachtung Darmproben von Schweinen zu entnehmen und den mikroskopischen Adhäsionstest durchzuführen, 2) einen „challenge“ der Tiere mit virulentem *E. coli* (Besiedelungs-Test) durchzuführen, oder 3) Blut-Typisierung des A0 (S) Blutgruppensystems durchzuführen. Die ersten beiden Verfahren sind zur Identifizierung von resistenten Tieren, die als Zucht-Bestand verwendet werden sollen, nicht geeignet. Obwohl das Blut-Typisierungsverfahren resistente Tiere identifiziert, kann durch den Test nicht nachgewiesen werden, ob empfängliche Tiere hinsichtlich der Empfänglichkeit homo- oder heterozygot sind. Kenntnis des Genotyps der Tiere im Hinblick auf diese Allele (Zustände eines Gens) ist essentiell, um ein erfolgreiches Zuchtprogramm zu entwickeln. Der Zweck eines Zuchtprogramms besteht darin, Schweine zu erzeugen, die gegenüber F18 *E. coli*-assoziierten Krankheiten resistent sind, die nach Entwöhnung den Bestand dezimieren.

**[0007]** In einer Veröffentlichung äußerten die Autoren hinsichtlich der Ödem-Krankheit bei Schweinen, dass „Untersuchungen hinsichtlich geeigneter genetischer Marker gerade unternommen werden“ (Bertschinger et al., 1993, Seite 87) und zitierten Walters und Sellwood, 1982:

„Die Züchtung von resistenten Schweinen ist ein attraktives Verfahren zur Vermeidung von Krankheiten, für die es keine wirksame Prophylaxe gibt. Die Durchführbarkeit dieses Ansatzes hängt von der weiten Verbreitung des Gens/der Gene in der Schweinepopulation ab, die für Resistenz kodieren, von verbesserten Verfahren zum Nachweis resistenter Schweine, und vom Fehlen negativer genetischer Eigenschaften, die mit dieser Resistenz ko-selektiert werden.“

**[0008]** Ein genetischer „Marker“-Locus ist ein kodierender oder nicht-kodierender Locus, der einem interessierenden genetischen Locus nahe ist, aber nicht notwendigerweise selbst der Locus ist. Nachweisbare Phänotypen schließen kontinuierliche oder diskontinuierliche Eigenschaften ein, z.B. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen, Produktionseigenschaften, bakterielle Adhäsionseigenschaften, kolorimetrische oder enzymatische Reaktionen und Antibiotika-Resistenz. Der S Locus kontrolliert die Expression der A und O-Blutgruppenantigene. Schweine, die für den S Locus homozygot rezessiv sind, exprimieren weder A oder O Blutantigene. Ein ähnlicher Zustand existiert bei Menschen und beruht auf Mutationen im alpha (1,2) Fucosyltransferasegen, dass für die menschliche Blutgruppe H (Kelly et al., 1994, siehe auch WO 96/28967) kodiert. Das porcine alpha (1,2) Fucosyltransferasegen vom Schwein wurde kürzlich sequenziert (Cohney et al., 1996). Dieses Gen ist sehr wahrscheinlich das Gen, das am S Locus in Schweinen anwesend ist.

**[0009]** Die Blutgruppen H- und Se-Loci wurden genetisch und physisch auf dem humanen Chromosom 19q13.3 kartiert. Dieser Bereich ist evolutionär konserviert und enthält Gene, die homolog zur HAL-Kopplungsgruppe von Genen in Schweinen ist. Das für die Blutgruppe H kodierende Gen ist das sogenannte FUT1-Gen, wobei das Se-Gen äquivalent zum FUT2-Gen ist. FUT1 bestimmt die H-Antigenexpression in der erythroiden Zelllinie, während FUT2 die Expression des H-Antigens im sekretorischen Epithel und im Speichel reguliert. Konservierung des FUT1-Gens wurde in niederen Säugern wie Ratten und Kaninchen, und die mRNA-Expression wurde in Hirngewebe von Kaninchen und im Ratten-Colon gezeigt. In all diesen Spezies wurden zwei Arten von alpha (1,2) Fucosyltransferasegenen berichtet, die strukturell den menschlichen FUT1 und FUT2-Genen sehr ähnlich sind, aber insbesondere die FUT1-homologen Gene zeigen ein Spezies-spezifisches Expressionsmuster. Beim Menschen ist das FUT1-Gen für die Synthese von H-Antigenen in Erythrozytenvorläufern verantwortlich. In Schweinen absorbieren jedoch Erythrozyten H-artige Antigene aus dem Serum, so wie es auch für die menschlichen Lewis-Antigene der Fall ist. In Schweinen stehen alle H-artigen Antigene mit exokrinen sekretorischen Geweben in Verbindung, und die Expression des FUT2 (Secretor)-Gens wird in sekretorischem Gewebe anderer Tierspezies beobachtet. Daher könnte die Expression der porcinen A-O Blutgruppenderminanten, die mit anti-humanen Blutgruppe H- und A-Antikörpern kreuzreagieren, durch das FUT2-Gen beeinflusst sein.

**[0010]** Weitere Informationen über Blutgruppen und E. coli-Schweinekrankheiten schließen ein, dass Kohlenhydratstrukturen von Blutgruppenantigenen die Adhäsion einiger pathogener Mikroorganismen an Wirtsgewebe vermitteln, z.B. heftet sich *Helicobacter pylori* an Lewis<sup>b</sup> Blutgruppenantigene an, und E. coli, die Harnwegsinfektionen hervorrufen, heften sich an die Blutgruppe P-Substanz an. Gene, die für Glykosyltransferasen kodieren, die für die Bildung von blutgruppenspezifischen Kohlenhydratstrukturen verantwortlich sind, stellen deshalb Kandidatengene für die Kontrolle bakterieller Besiedelung durch den Wirt dar. Diese Gene sind in derselben chromosomalen Region lokalisiert wie der Locus, der für die Adhäsion/Nicht-Adhäsion von F18-positiven E. coli im Dünndarm von Schweinen verantwortlich ist. Schweine exprimieren die Blutgruppenantigene A und O nach der Entwöhnung nicht. Dies ist derselbe Zeitpunkt, an dem sie für die Krankheit empfänglich werden, die durch F18 E. coli ausgelöst wird.

**[0011]** Es werden neue Verfahren zur Diagnose und Behandlung von E. coli-assoziiierter intestinaler Krankheit in Schweinen benötigt. Der Nachweis einer genetischen Mutation wurde als ein diagnostischer Test für einige Schweine-Erkrankungen (maligne Hyperthermie) vorgeschlagen (Fujii et al., 1991; US-PS 5,358,649), aber es wurden keine polymorphen Marker für die Diagnose berichtet. Vakzine zur Resistenzentwicklung gegen Besiedelung durch E. coli wurden beschrieben US-PS 5,552,144; WO 86/04604). Aufgrund der Schwierigkeiten bei der oralen Verabreichung eines Lebend-Vakzins an neugeborene Schweine und aufgrund der regulatorischen Restriktionen ist es jedoch unwahrscheinlich, dass dies ein bevorzugtes Verfahren zur Vorbeugung von E. coli-Krankheit ist. Es gibt Antibiotika zur Behandlung, aber keine erfolgreiche Prophylaxe.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0012]** Die Zusammensetzungen und nicht-invasiven Verfahren der vorliegenden Erfindung stellen den Nachweis und die Eliminierung von Schweinen bereit, die für E. coli-assoziierte Krankheiten empfänglich sind. Ein nicht-invasives Verfahren zur Identifizierung eines Schweins, welches gegenüber der Darm-Besiedelung durch E. coli F18 resistent ist, schließt die folgenden Schritte ein: Bestimmung, ob ein genetischer Polymorphismus,

der mit der Resistenz gegen Besiedlung assoziiert ist, in einer biologischen Probe des Schweins vorliegt; und Folgern, dass das Schwein resistent ist, wenn das Schwein für den Polymorphismus homozygot ist (ein Polymorphismus ist eine Veränderung in einer Nukleotidsequenz, die in einer Population aufgrund einer Mutation existiert).

**[0013]** Insbesondere besteht das Verfahren darin, in einer biologischen Probe des Schweins zu bestimmen, ob die Stickstoffbase an Position 307 in dem alpha (1,2) Fucosyltransferasegen des Schweins nur Adenin ist oder Guanin aufweist; und die Identifizierung des Schweins als resistent, wenn die einzige Stickstoffbase an der Position 307 Adenin ist.

**[0014]** Zur Bestimmung, ob ein Polymorphismus in einer biologischen Probe vorhanden ist, werden Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen auf einem Gel analysiert, das diese nach Molekulargewicht auftrennt. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die Nukleinsäure-Moleküle an spezifischen Stellen reproduzierbar schneiden. Dies führt in Abhängigkeit von der Lokalisierung der Schnitte zu Nukleinsäure-Fragmenten mit verschiedenem Molekulargewicht.

**[0015]** Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Züchtung von Schweinen, die resistent gegenüber E. coli-assoziierten Krankheiten sind durch Selektion auf Zuchtschweine, die einen genetischen Polymorphismus im alpha (1,2) Fucosyltransferase 1 Gen aufweisen, der sie als Schweine identifiziert, die gegenüber E. coli-assoziierten Krankheiten resistent sind; und Züchten der ausgewählten Schweine.

**[0016]** Ein Aspekt der Erfindung ist ein DNA-Molekül, das polymorph für das alpha (1,2) Fucosyltransferase 1 Gen in Schweinen ist, insbesondere eine Sequenz gemäß [Fig. 1](#). Andere Aspekte der Erfindung sind Moleküle mit Nukleotidsequenzen, die zu der Sequenz in [Fig. 1](#) komplementär und an Resistenz-erzeugenden Nukleotidpositionen polymorph sind.

**[0017]** Ein Aspekt der Erfindung ist ein isoliertes DNA-Molekül mit einer Substitution von Adenin anstelle von Guanin an Position 307. Das Molekül kann auch eine Substitution von Adenin anstelle von Guanin an Position 857 aufweisen. Andere isolierte DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung schließen jene ein, die eine Mutation an Nukleotidposition 229 der Sequenz aus [Fig. 1](#) aufweisen, wobei das Codon CTT zu TTT ausgetauscht ist, sodass es für die Aminosäure Phenylalanin anstatt von Leucin codiert. Eine Mutation an der Nukleotidposition 714 ist ein Austausch von GAT→GAC, aber im codierten Produkt tritt kein begleitender Aminosäure-Austausch auf.

**[0018]** Polypeptide, die durch die DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung codiert werden und alpha (1,2) Fucosyltransferase-Aktivität aufweisen, sind ebenfalls Aspekte der Erfindung.

**[0019]** Ein molekularer Assay zum Nachweis von E. coli F18-Rezeptoren in Schweinen besteht darin, (a) DNA aus porcinen kernhaltigen Zellen zu isolieren; (b) die DNA in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Oligonukleotiden als Primer, die komplementär zu einer DNA-Sequenz des porcinen alpha (1,2) Fucosyltransferasegen 1 sind, zu amplifizieren; (c) einen Restriktionsenzymverdau mit wenigstens einem Restriktionsenzym, z.B. CfoI durchzuführen; (d) die entstehenden Fragmente durch Gelelektrophorese aufzutrennen; und (e) die entsprechende Anzahl und Länge der Fragmente auf dem Gel zu bestimmen; und (f) aus der Anzahl und Längen der Fragmente von FUT1 zu bestimmen, welcher F18-Rezeptor Genotyp in den porcinen Zellen anwesend ist.

**[0020]** Die Verwendung der größeren amplifizierten, hier beschriebenen Fragmente zur Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) ist weniger kostspielig als die Verwendung der kleineren Fragmente, da die DNA-Banden auf einem Agarosegel von relativ niedriger Konzentration aufgetrennt werden können. Zur Herstellung einiger Fragmente ist auch für eine konstante Restriktionsstelle, die der variablen diagnostischen Stelle benachbart ist, nur ein Restriktionsenzym erforderlich.

**[0021]** Ein Kit zum Nachweis von Polymorphismen, die mit E. coli F18-Rezeptoren assoziiert sind, verwendet in getrennten Behältern Oligonukleotide, die komplementär zu einer DNA-Sequenz des porcinen alpha (1,2) Fucosyltransferasegen 1 sind, dass resistente von sensitiven Schweinen unterscheidet. Der Test kann an Schweinen jeder Altersgruppe durchgeführt werden.

**[0022]** Die Polymorphismen sind ebenfalls zur Entwicklung von Arzneistoffen nützlich, um Schweine zu behandeln, die an einer E. coli-assoziierte Krankheit leiden. Eine mutierte Form der porcinen alpha (1,2) Fucosyltransferase könnte das normale Gen beeinträchtigen, und dadurch die Produktion von Darmrezeptoren für

F18 verhindern.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0023]** [Fig. 1](#) zeigt die Nukleotidsequenz (FUT1) (unten) und die vorhergesagte Aminosäuresequenz (oben) des Schweine  $\alpha 1 \rightarrow 2$  Fucosyltransferase-Polymorphismus der vorliegenden Erfindung im Ein-Buchstaben Aminosäurecode. Die feste Doppellinie unter den Aminosäuresequenzen (=) zeigt die mutmaßliche Transmembranregion, die gepunktete Linie unter den Aminosäuresequenzen zeigt drei mögliche N-gekoppelte Glykosylierungsstellen (...).

**[0024]** □ hier liegt in resistenten Schweinen ein Adenin (A) anstelle eines Guanins (G) vor \*zeigt das Terminationscodon an

**[0025]** Die folgenden Abkürzungen für die Aminosäurereste werden verwendet: A, Ala; c, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; und Y, Tyr.

#### BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORM

**[0026]** Die molekulare Analyse von DNA-Polymorphismen, die mit der Resistenz von Schweinen gegenüber E. coli-assoziierten Krankheiten assoziiert sind, erleichterte diagnostische Assays zur Selektion von resistenten Schweinen für die Zucht. Resistente Schweine unterscheiden sich von empfänglichen Schweinen am Rezeptorlocus von E. coli F18, wie durch die polymorphen Marker der vorliegenden Erfindung identifiziert.

**[0027]** Die vorliegende Erfindung stellt nicht-invasive Verfahren und Zusammensetzungen bereit, um mit hoher Sensitivität und Spezifität Schweine, die genetisch für Krankheiten empfänglich sind, die mit F18 E. coli-Infektionen assoziiert sind, von resistenten Schweinen zu unterscheiden. Es wurde ein DNA-Polymorphismus im alpha (1,2) Fucosyltransferase (FUT1)-Gen identifiziert, der resistente Schweine von empfänglichen Schweinen unterscheidet. Der Polymorphismus entstand durch eine Mutation (Veränderung) in einer Nukleotidsequenz, die zu einem neuen Allel führte. Ein Allel ist ein Zustand eines Gens. In einer Population kann es viele Allele eines Gens geben, die sich durch Stickstoffbase-Substitutionen unterscheiden, die wahrscheinlich durch Mutationen in einem Vorfahren-DNA-Molekül hervorgerufen wurden. Die Ko-Existenz von mehr als einem Allel in einer Population (manchmal als Variante bezeichnet) wird als genetischer Polymorphismus bezeichnet. Loci, an denen mehr als ein Allel als offensichtlich stabile Komponenten einer Population existieren können, kennzeichnen einen polymorphen Locus. Gewöhnlich liegt einer der polymorphen Loci in niedriger Frequenz in der Population vor.

**[0028]** Wie aus einer biologischen Probe, vorzugsweise Blut, bestimmt wird, weisen die resistenten Schweine in ihren Genomen einen Polymorphismus auf, in dem die einzige Base, die an der Position 307 (siehe [Fig. 1](#)) in der Nukleotidsequenz nachgewiesen wird, Adenin ist, wobei die Base an der gleichen Position in homozygoten empfänglichen Schweinen Guanin ist. Heterozygote Schweine zeigen beide Arten von DNA und sind empfänglich. Der Polymorphismus ist eine Variation einer porcinen Gensequenz, die von Cohnen et al., 1996, beschrieben wurde.

**[0029]** An Familien von Schweinen wurden genetische Kopplungs-Analysen durchgeführt und genetische Assoziationen zwischen den Polymorphismen in FUT1 und der Krankheitsresistenz in Auszucht-Schweinen bestimmt. Gemäß der vorliegenden Erfindung wurden Polymorphismen im alpha (1,2) Fucosyltransferase 1 Gen (FUT1) entdeckt. Ein Polymorphismus, der einen einzigen Nukleotidbasen-Austausch an Position 307 aufweist, wurde dazu verwendet, eine enge Kopplung zwischen dem Fucosyltransferasegen und dem S-System, dem ECF18R-Locus und anderen Loci der HAL-Kopplungsgruppe zu etablieren.

**[0030]** Der Nachweis der engen Kopplung der Mutationen bei FUT1 und ECF18R ermöglichte die Entwicklung eines molekularen Tests zur Identifizierung von E. coli F18-adhäsionsresistenten, heterozygoten (Träger) und homozygoten empfänglichen Schweinen. Dieser diagnostische Test identifiziert mit hoher Sensitivität und Spezifität Schweine, die gegenüber Ödem-Krankheit und Diarrhö nach Entwöhnung empfänglich sind. Die Inzidenz der Polymorphismen der vorliegenden Erfindung unterscheidet sich zwischen Schweinearten. Vögeli et al., 1997, stellten Frequenzen des M307-Allels in fünf Schweinearten aus Herden dar, die nicht miteinander verwandt waren. Die Erhältlichkeit des diagnostischen Tests für den erfindungsgemäßen Polymorphismus stellt für den Züchter die Möglichkeit bereit, das ECF18R-empfindliche Allel aus ihren Schweineherden zu eliminieren, wodurch eine Voraussetzung für E. coli F18-Bakterien eliminiert wird, Ödem-Krankheit und Diarrhö

nach Entwöhnung zu verursachen.

**[0031]** Die vorliegende Erfindung schließt weiterhin Nukleotidsequenzen, die Varianten einer Sequenz des alpha (1,2) Fucosyltransferasegens 1 sind, die verschiedene Polymorphismen bei bp 307 darstellen und diagnostische molekular-basierende Kits zur Identifizierung von Polymorphismen im alpha (1,2) Fucosyltransferasegen ein.

**[0032]** Um Kandidaten-Gene für den E. coli F18 Rezeptor Locus (ECF18R) zu erhalten, wurden fünf Cosmide und ein genomischer Klon, der das Gen enthält, aus einer porcinen Genom-Bibliothek isoliert, die die alpha (1,2) Fucosyltransferasegene FUT1 und FUT2 (Meijerink et al., 1997) enthält. Die Kartierung durch in situ Fluoreszenz-Hybridisierung lokalisierte alle Klone in der Bande q11 des porcinen Chromosoms 6 (SSC6q11). Die Sequenzanalyse der Cosmide führte zur Charakterisierung (a) eines offenen Leserahmens (ORF), 1098 Basenpaare lang, der 82,3% identisch zur menschlichen FUT1-Sequenz ist und (b) eines zweiten ORFs, 1023 Basenpaare lang, der 85% identisch zur menschlichen FUT2-Sequenz ist. Die FUT1 und FUT2 Loci scheinen daher porcine Äquivalente des Blutgruppen-H und Secretor-Locus zu sein. Direkte Sequenzierung der beiden ORFs in Schweinen, die gegenüber der Adhäsion und Besiedlung durch F18 Fimbrien-besetzten E. coli (ECF18R) entweder empfänglich oder resistent waren, zeigte zwei Polymorphismen bei Basenpaar 307 (M307) und bei Basenpaar 857 (M857) des FUT1 ORF. Die Nukleotidpositionen werden ausgehend von ATG (codiert für Methionin) nummeriert. Der offene Leserahmen (ORF) reicht von dort bis zum Terminationscodon, d.h. er hat eine Länge von 1098 Nukleotiden. Die Nukleotide vor und nach diesem ORF können z. B. wie in [Fig. 1](#) variieren. Analyse dieser Mutationen in 34 Paarungen von Landrace-Familien mit 221 Nachkommen zeigte eine enge Kopplung mit dem Locus, der die Resistenz und die Empfänglichkeit gegenüber der E. coli F18-Adhäsion und Besiedlung im Dünndarm (ECF18R) kontrolliert, und mit dem Locus des Blutgruppen-Inhibitors S. Deshalb ist die M307-Mutation ein guter Marker für die Marker-assistierte Selektion von E. coli F18-Adhäsions-resistenten Tieren. Es wurde entdeckt, dass eine andere Mutation an der Nukleotidposition 229 zu einem Polymorphismus führt, in dem das Codon, das für Leucin codiert (CTT), zu TTT umgewandelt wurde (codiert für Phenylalanin). Eine Mutation an der Position 714 (GAT→GAC) (codiert für Asparaginsäure) erzeugte keine Aminosäure-Substitution. Es wurden keine Polymorphismen bei FUT2 identifiziert, die eine Differenzierung zwischen empfänglichen und resistenten Schweinen ermöglichen.

## BEISPIELE

**[0033]** Die folgenden Beispiele stellen Ausführungsformen der Erfindung bereit.

### Beispiel 1: Ein Assay für resistente Schweine

**[0034]** Die Polymorphismen der vorliegenden Erfindung können einfach mit PCR-RFLP-Tests identifiziert werden. In einer Ausführungsform der Tests wurde ein 160 Basenpaar-Fragment der porcinen alpha (1,2) Fucosyltransferase 1 verwendet, dass durch PCR mit den folgenden Primern amplifiziert wurde: 5'CCAACGCCTCCGATTCTGT3' und 5'GTGCATGGCAGGCTGGATGA3' (Tabelle 1). Bevorzugte PCR-Bedingungen für diese Ausführungsform sind 25 Zyklen bei folgenden Zeiten und Temperaturen: 94°C, 30 Sekunden; 60°C, 45 Sekunden; 72°C, 90 Sekunden. Die amplifizierte DNA aus resistenten Schweinen wurde mit dem Restriktionsenzym HgaI, aber nicht mit dem Restriktionsenzym HinPI verdaut. Die amplifizierte DNA homozygoter empfänglicher Schweine wurde durch das Restriktionsenzym HinPI verdaut. Die amplifizierte DNA heterozygoter empfänglicher Schweine wurde partiell durch beide Enzyme verdaut.

**[0035]** Alternativ dazu wurde DNA gemäß Standardverfahren aus porcinen kernhaltigen Zellen isoliert. Die direkte Sequenzierung der porcinen FUT1 und FUT2-Sequenzen und ihrer flankierenden Bereiche in Tieren mit verschiedenen ECF18R-Genotypen (Bb, bb) führte zur Identifizierung von zwei G→A Transitionen an den Positionen 307 und 857 (bezeichnet als M307 bzw. M857) des FUT1 ORF. Die M307-Transition eliminiert eine Restriktionsstelle für CfoI. Die Amplifikation von DNA, die aus porcinen kernhaltigen Zellen isoliert wurde, wurde gemäß Standardverfahren mit den Primern P6 und P11 durchgeführt (3 Minuten bei 95°C, 30 Zyklen von 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 56°C und 30 Sekunden bei 72°C, gefolgt von 7 Minuten abschließender Verlängerung bei 72°C), gefolgt von Verdau durch CfoI und Auftrennung auf einem 3% Agarosegel führte zu einem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Homozygote M307<sup>AA</sup>-Tiere zeigten zwei Banden. Homozygote M307<sup>GG</sup>-Tiere zeigten Fragmente von 93, 241 und 87 Basenpaaren. Heterozygote Tiere zeigten alle vier Fragmente.

## Beispiel 2: Sensitivität und Spezifität eines Assays unter Verwendung von alpha (1,2) Fucosyltransferase beim Nachweis von Schweinen die resistent gegenüber F18 E. coli sind

**[0036]** Zur Bestimmung der Assoziation zwischen der Krankheits-Resistenz und dem Polymorphismus an Position 307 des FUT1-Gens wurde eine Untersuchung durchgeführt. 183 entwöhnte Schweine (im Alter von zwei bis sechs Monaten) wurden aus sechs verschiedenen Zucht-Herden erhalten. Vor der Untersuchung wusste man nur, dass in einer Herde resistente Tiere enthalten sind, und von dieser Herde ist bekannt, dass sie eine hohe Inzidenz des porcinen Stress-Syndroms aufweist. Die anderen 5 Herden zeigten keine Evidenz des porcinen Stresssyndroms und die Inzidenz der Krankheitsresistenz war unbekannt. Aus jeder Herde wurden zufällig Schweine ausgewählt und auf humane Weise getötet. Milzen und Dünndarmproben wurden entfernt. Aus Milzgewebe wurde DNA extrahiert und in einem wie im Beispiel 1 beschriebenen PCR-RFLP-Assay verwendet. Darmzellen wurden durch Abkratzen der Mucosa-Oberfläche vom Darm, durch Lyse der Zellen in einer hypotonischen EDTA-Lösung und durch Waschen durch Zentrifugation aufgereinigt. Die gereinigten Darmzell-Bürstensäume wurden mit F18 E. coli inkubiert. Dieses Gemisch wurde durch Phasenkontrast-Mikroskopie untersucht. Dieser Assay wies nach, ob Schweine empfänglich (intestinale Proben wiesen anheftende Bakterien auf) oder resistent (intestinale Proben zeigten keine anheftenden Bakterien) waren. Der PCR-RFLP-Assay für den Polymorphismus korrelierte mit dem Bakterien-Darm-Zellbindungsassay bei 53 von 53 resistenten Schweinen und bei 128 von 130 empfänglichen Schweinen. Zwei Schweine, die durch den Bakterien-Darm-Zellbindungsassay als empfänglich bestimmt wurden, waren durch den PCR-RFLP-Assay fälschlicherweise als resistent hervorgesagt worden. Zwei der sechs untersuchten Herden enthielten resistente Schweine, während nur eine Herde das porcine Stress-Syndrom aufwies. Dies zeigte, dass der PCR-RFLP-Assay gegen Krankheit resistente Tiere unter Tieren identifizieren kann, die kein porcines Stress-Syndrom aufweisen.

## Beispiel 3: Lokalisierung von FUT1 auf Chromosom 6 (SSC6)

**[0037]** Cosmide ETHs1, -s2, -s3, -s4 und -s6 wurden nach dem Screening der Cosmid-Bibliothek mit einer FUT1-Nukleotidsonde identifiziert, die aus porciner genomischer DNA mit den Primern P7 und P10 erhalten wurde. Sie wurden durch FISH und DISC-PCR auf das Chromosom 6 in Bande q11 kartiert.

## Beispiel 4: Identifizierung des porcinen FUT1 ORF

**[0038]** Die Hybridisierung von KspI-, EcoRI- und KspI/EcoRI-Cosmidverdaus mit radioaktiv markierten porcinen FUT1-Fragmenten P6 und P11 und mit P7 und P10 für Southern Blot-Analyse zeigte für ETHs2, -s4 und -s6 identische autoradiographische Signale auf, wobei für die Cosmide ETHs1 und -s3 verschiedene Signale erhalten wurden. Aus dem Cosmid ETHs2 KspI wurden Subklone mit einer Länge von 940 bp und 6,2 kb isoliert, die der abgeschätzten Länge der hybridisierten KspI-Fragmente auf dem Southern Blot entsprachen. Die Sequenzierungsergebnisse beider Subklone wurden zu einer Sequenz von 1501 bp zusammengesetzt. Dies stimmte mit der direkten Sequenzierung genomischer PCR-Produkte überein. Die 1501 bp-Sequenz enthält einen offenen Leserahmen (ORF) von 1098 bp, der dem menschlichen FUT1 ORF entspricht, mit 82,3% Nukleotid- und 80,8% Aminosäureidentität. Der ORF kodiert für ein Polypeptid.

## Beispiel 5: Identifizierung eines porcinen FUT2 und eines Pseudogens FUTP

**[0039]** ETHs1 weist ein DNA-Fragment (2,7 kb) auf, das an FUT1-Sequenzen hybridisiert, während ETHs3 zwei Fragmente aufweist (2,7 kb und 8,2 kb) (Meijerink et al., 1997). Subklonierung und partielle Sequenzierung des 2,7 kb EcoRI-Fragments von ETHs1 und -s3 bestätigte, dass diese beiden Fragmente identisch sind. Die Sequenz ist zum menschlichen FUT2 sehr ähnlich, zeigt jedoch einige Veränderungen in den NH<sub>2</sub>- und -COOH terminalen Bereichen. Diese Veränderungen führen zu Rasterverschiebungen, die mit einem konservierten ORF nicht kompatibel sind. Eine Annahme ist daher, dass die aus dem 2,7 kb-Fragment erhaltene Sequenz ein Pseudogen darstellt (FUT2P). Nach Subklonierung der ETHs3 BamHI-Verdaus wurden die hybridisierenden Sequenzen, die in dem 8,2 kb-EcoRI-Fragment enthalten sind, identifiziert. Die Sequenz der erhaltenen Subklone stellt einen 1023 bp-ORF dar und ist auf der Nukleotidebene zu 85% und auf der Aminosäureebene zu 83% identisch zur menschlichen FUT2-Sequenz. Zwischen der porcinen FUT2-Sequenz und der FUT2P-Sequenz, die von dem 2,7 kb-Fragment abgeleitet wurde, wurden viele Unterschiede in den NH<sub>2</sub>- und -COOH terminalen Bereichen festgestellt. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz entspricht der teilweise bestimmten Aminosäuresequenz der porcinen Secretor-Enzyme (Thurin und Blaszyk-Thurin, 1995). Die erhaltenen porcinen FUT1-, FUT2- und FUTP-Sequenzen wurden bei GenBank eingereicht und haben die Zugangsnummern U70883, U70881 bzw. U70882. Die FUT1- und FUT2-Gene haben hoch homologe Sequenzen. Dies muss z.B. bei der Primer-Konstruktion berücksichtigt werden. Weiterhin muss die Enzymaktivität von



FUT1 und FUT2 in weiteren Untersuchungen differenziert werden.

#### Beispiel 6: Identifizierung der M307 und M857-Mutationen und Charakterisierung von M307

**[0040]** DNA wurde aus porcinen kernhaltigen Zellen durch Standardverfahren isoliert. Direkte Sequenzierung der porcinen FUT1- und FUT2-Sequenzen und ihrer flankierenden Bereiche in Tieren mit verschiedenen ECF18R-Genotypen (Bb, bb) führte zur Identifizierung von zwei G-A Transitionen an den Positionen 307 und 857 (als M307 bzw. M857 bezeichnet) des FUT1 ORF. Die M307-Transition eliminiert eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym CfoI. Amplifikation von DNA, die aus porcinen kernhaltigen Zellen isoliert wurde, wurde gemäß Standardverfahren mit den Primern P6 und P11 (3 min bei 95°C, 30 Zyklen von 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 56°C und 30 sec bei 72°C, gefolgt von einer 7-minütigen finalen Verlängerung bei 72°C) durchgeführt, gefolgt von Verdau mit CfoI. Auftrennung auf einem 3% Agarosegel führte zu einem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Homozygote M307<sup>AA</sup>-Tiere zeigten 2 Banden (93 und 328 bp Fragmente). Homozygote M307<sup>AA</sup>-Tiere zeigten 87, 93, und 241 bp Fragmente. Heterozygote Tiere zeigten alle vier Fragmente.

#### Beispiel 7: Charakterisierung der Mutation M857

**[0041]** Die M857-Mutation ist eine Transition, die eine Acil-Stelle eliminiert. Der Primer PBEST wurde entworfen, um zwei zusätzliche Acil-Stellen an den Positionen 866 und 872 fehlzupaaren. Eine PCR mit den Primern P7 und PBEST (3 Minuten bei 95°C, 30 Zyklen mit 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 56°C und 30 Sekunden bei 72°C, gefolgt von 7 Minuten finaler Verlängerung bei 72°C), gefolgt von Acil-Verdau, ermöglicht eine PCR-RFLP-Analyse auf einem 3% Agarosegel. Homozygote M857<sup>AA</sup>-Tiere zeigen ein 174 bp Fragment, während Amplifikationsprodukte von M857<sup>GG</sup>-Tieren 136 bp und 38 bp Fragmente zeigen.

#### Beispiel 8: Genetische Kartierung des FUT1-Gens

**[0042]** In Landrace-Schweinefamilien zeigten Rekombinationsereignisse zwischen M307 und den Loci der HAL-Kopplungsgruppe (S, ECF18R, RYR1, GP1, PGD) Rekombinationsfraktionen von  $\theta < 0,04$  (Tabelle 2) auf. Die „Lodscores“ Z für die gesamten Rekombinationsfraktionen betrugen zwischen 24,5 und 50,6. Dies ist ein starker Hinweis auf Kopplung zwischen diesen Loci. Diese Daten ermöglichen die genetische Kartierung des FUT1-Gens zu der HAL-Kopplungsgruppe in enger Nähe von S und ECF18R, die beide durch FUT1 beeinflusst werden. In den experimentellen Landrace-Familien wurde eine allelische Assoziation zwischen ECF18R und RYR1 gefunden. Ein Überschuss an Genotypen RYR1<sup>TT</sup> an der Position 1843 in RYR1 (Halthan-empfindlicher Genotyp) wurde bei Schweinen beobachtet, die gegenüber Ödem-Krankheit und Diarrhö nach Entwöhnung (Genotyp ECF18R<sup>bb</sup>, Tabelle 3) resistent sind. Diese allelische Assoziation ist ein Ergebnis eines Kopplungs-Ungleichgewichts, d.h. einer Abweichung beobachteter Haplotyp-Frequenzen von erwarteten Haplotyp-Frequenzen bei unabhängiger Auswahl der Allele. Kopplungs-Ungleichgewicht kennzeichnet daher eine nicht-zufällige Assoziation von Allelen, die zu gekoppelten Loci gehören. Wegen geringer Rekombinationsraten konnte keine Locus-Reihenfolge als signifikant besser als eine andere bestimmt werden.

#### Beispiel 9: Assoziation von M307<sup>A</sup> mit ECF18R<sup>b</sup> und M307<sup>G</sup> mit ECF18R<sup>B</sup>

**[0043]** In Landrace (SL) und Large White (LW) Elternschweinen ist ECF18R<sup>b</sup> (das Ödem- und Post-Entwöhnungs-Diarrhö-Resistenzallel) zu 100% mit M307<sup>A</sup> und ECF18R<sup>B</sup> (das Ödem- und Post-Entwöhnungs-Diarrhö-Empfindlichkeitsallel) zu 100% mit M307<sup>G</sup> (wobei A Adenin und G Guanin ist) assoziiert. In SL-Schweinen sind 88% (30/34) S<sup>s</sup> für alle ECF18R<sup>b</sup> bzw. M307<sup>A</sup>-Haplotypen verantwortlich. Die entsprechenden Werte sowohl für S<sup>s</sup>-ECF18R<sup>b</sup> als auch für die S<sup>s</sup>-M307<sup>A</sup>-Haplotypen betrugen in Large White Schweinen 82% (9/11). In den experimentellen SL-Familien war das Auftreten des M857<sup>A</sup>-Allels am FUT1-Locus gering und fehlte in LW-Schweinen sogar. Daher wurde zwischen den Allelen M857 und den Allelen der flankierenden Gene keine signifikante gametische Assoziation beobachtet. Die G→A Transitionen an den Positionen FUT1 307 und FUT1 857 wurden mit variablen Frequenzen auch in Duroc, Hampshire und Pietrain-Schweinen gefunden. Dies macht es wahrscheinlich, dass diese Transitionen auch in anderen Schweinearten auftreten.

#### Beispiel 10: Verteilung von FUT1-Genotypen

**[0044]** Tabelle 4 zeigt, dass sich die Verteilung von FUT1-Genotypen an der Nukleotidposition 307 zwischen ECF18R-Typen signifikant von dem erwarteten Verhältnis unter der Hypothese unterschied, dass die beiden unabhängig sind. Von den 119 ECF18R<sup>b/b</sup>-Tieren, die gegenüber Ödem-Krankheit und Post-Entwöhnungs-Diarrhö resistent waren, wurde von 188 Tieren in einem DNA-basierten Test bestimmt, dass sie den Genotyp M307<sup>A/A</sup> haben. Ein resistentes Tier wies den Genotyp M307<sup>A/G</sup> auf. Von den 131 empfänglichen Schweinen



waren 130 M307<sup>A/G</sup> oder M307<sup>G/G</sup>. Ein Tier, dass für E. coli-Adhäsion empfänglich war, erwies sich im DNA-Test als homozygot für M307<sup>A/A</sup>. Die Daten aus diesem Beispiel und aus Beispiel 2 legen zusammen mit anderen Untersuchungen nahe, dass das FUT1 Gen das Gen ist, das am S-Locus in Schweinen und am ECF18-Locus anwesend ist. Während 4 Tiere in diesem Beispiel und in Beispiel 2 dieser Hypothese widersprechen, ist es wahrscheinlich, dass diese Tiere im Hinblick auf Krankheitsresistenz/-Empfänglichkeit falsch phänotypisiert wurden.

#### Beispiel 11: Aminosäureaustausche in der alpha (1,2) Fucosyltransferase

**[0045]** Die G-A Veränderungen bei bp + 307 und bp + 857 des alpha (1,2) Fucosyltransferasegen 1 führen zu einer vorhergesagten Aminosäuresubstitution von Threonin (neutral-polar) anstatt von Alanin (neutral-unpolar) bzw. Glutamin (neutral-polar) anstatt von Arginin (basisch), was im kodierten Produkt zu funktionellen Konsequenzen führen könnte. Eine C-T Veränderung bei bp 229 führt zu einer Aminosäuresubstitution von Leucin (neutral-unpolar) anstatt von Phenylalanin (neutral-unpolar).

TABELLE 1: Sequenzen von vorwärts (Forward, F) und reversen (R) Primern und ihre relative Position zu den porcinen FUT1 und FUT2 Startcodons<sup>2</sup>

Primername	Primersequenz	Position
<i>FUT1</i> P6 (R)	5'-CTTCAGCCAGGGCTCCTTTAAG-3'	+489
<i>FUT1</i> P7 (F)	5'-TTACCTCCAGCAGGCTATGGAC-3'	+720
<i>FUT1</i> P10 (R)	5'-TCCAGAGTGGAGACAAGTCTGC-3'	+1082
<i>FUT1</i> P11 (F)	5'-CTGCCTGAACGTCTATCAAGATC-3'	+69
<i>FUT1</i> P16 (F)	5'-AGAGTTTCCTCATGCCCACAGG-3'	-90
<i>FUT1</i> P18 (R)	5'-CTGCTACAGGACCACCAGCATC-3'	+1203
<i>FUT1</i> PBEST (R)	5'- ACCAGCAGCGCAAAGTCCCTGACGGGCACGGCCTC-3'	+893
<i>FUT1</i> P16 (R)	5'-CTCCCTGTGCCTTGGAAGTGAT-3'	+1094
<i>FUT1</i> P17 (F)	5'-AACTGCACTGCCAGCTTCATGC-3'	-83

<sup>2</sup> Primier FUT1 P10 und FUT1 P11 sind vom menschlichen FUT1-Gen abgeleitet.

TABELLE 2: Gesamt-rekombinante Fraktionen  $\theta$ , Lodscores (Z) und Anzahl informativer Tiere (N) für M307 und Loci der HAL-Kopplungsgruppe in der experimentellen Landrace-Population

Locuspaar	N	$\theta$	Z
<i>S-ECF18R</i>	183	0,01	50,6
<i>M307-S</i>	183	0,01	50,6
<i>M307-ECF18R</i>	216	0,01	57,1
<i>M307-RYR1</i>	198	0,02	47,2
<i>M307-GPI</i>	147	0,03	34,2
<i>M307-PGD</i>	147	0,04	24,5

TABELLE 3: Haplotyp-Frequenzen an den vier Loci [S-FUT1 (M307, M857)-ECF18R-RYR1] in der experimentellen Landrace (SL)-Population und zufällig ausgewählten Large White (LW)-Schweinen

Art	Haplotyp <sup>3</sup> bei S, FUT1 (M307, M857), ECF18R, RYR1	Frequenz <sup>4</sup> (Anzahl)
SL	<i>sAGbT</i>	70 (28)
	<i>sAGbC</i>	5 (2)
	<i>sGGBC</i>	15 (6)
	<i>sGABC</i>	10 (4)
LW	<i>sAGbC</i>	56 (9)
	<i>sGGBC</i>	31 (5)
	<i>sGGBC</i>	13 (2)

<sup>3</sup>S: Suppressorlocus für Blutgruppen A und 0 (S und s).

FUT1 (M307): Austausch von Adenin (A) zu Guanin (G) am Nukleotid 307 des alpha (1,2) Fucosyltransferasegens (FUT1). FUT1 (M857): Austausch von Adenin (A) zu Guanin (G) am Nukleotid 857 des FUT1-Gens. ECF18R: E. coli F18-Rezeptor. Das dominante empfängliche Allel ist als B bezeichnet und das resistente Allel als b. RYR1: Skelettmuskel-Ryanodinrezeptor. C (Cytosin) ist das dominante resistente und T (Thymin) das empfängliche Allel für maligne Hyperthermie.

<sup>4</sup> Haplotyp-Frequenzen in % und absoluter Zahl der Haplotypen in Klammern.

TABELLE 4: Verteilung der Genotypen, Tetrachorische Korrelation (r) und Signifikanz der Assoziation ( $\chi^2$  und  $w \times \chi^2$ )<sup>5</sup> der assoziierten polymorphen FUT1 (M307 und ECF18R-Loci in der experimentellen Landrace (SL)-Population und zufällig ausgewählten Large White (LW)-Schweinen

Art	Locus	<i>FUT1/M307</i>			r	$\chi^2$	$w \times \chi^2$
		Genotyp	A/G	A/A			
SL	<i>ECF18R</i> <sup>6</sup>	<i>b/b</i>	1	113	0,98	213,1	42,6***
		<i>B/b</i>	106	1			
		Genotyp	A/G, G/G	A/A			
LW	<i>ECF18R</i> <sup>6</sup>	<i>b/b</i>	0	5	1,00	29,0	11,6***
		<i>B/b, B/B</i>	24	0			

<sup>5</sup> Es wurde ein Gewichtungsfaktor von  $w = 0,2$  (SL) und  $0,4$  (LW) angewandt, um die fehlende Genauigkeit zu korrigieren, die aus der Einbeziehung verwandter Tiere in die Daten resultierte, gemäß Cotterman (1947). \*\*\* $p < 0,001$

<sup>6</sup> Tiere des Genotyps *b/b* am ECF18R-Locus sind resistent und jene des Genotyps *B/b* und *B/B* sind gegenüber der Adhäsion von F18ab E. coli-Bakterien empfänglich.

## VERFAHREN

### 1. Primer

**[0046]** Vom menschlichen FUT1-Gen abgeleitete Primer wurden zur Amplifizierung seines porcinen Gegenstücks aus genomischer DNA verwendet. Aus den entstehenden porcinen Sequenzen wurden spezifische Primer entworfen, die für die weitere Amplifikation und Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden (Tabelle 1).

## 2. Screening einer porcinen genomischen Bibliothek

**[0047]** Porcine genomische Bibliotheken wurden entweder mit einer porcinen FUT1-Sonde, die mit den Primern P7 und P10 erhalten wurde, oder einer porcinen FUT1 cDNA gescreent. Eine in SuperCos 1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) konstruierte porcine genomische Bibliothek wurde mit einer  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP-markierten (Prime It II, Stratagene) FUT1-Sonde gescreent, die aus porciner genomischer DNA mit den Primern P7 und P10 erhalten wurde. Nach der Hybridisierung von Replika-Filtern bei 42°C für 15 Stunden (50% Formamid, 6 × SSC, 5 × Denhardt's, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml Lachssperma) und zweifachem Waschen bei 65°C für 30 Minuten (1 × SSC, 0,1% SDS) wurden positive Kolonien nach Exposition (15 Stunden, -80°C) auf Röntgenfilm identifiziert.

## 3. In situ Hybridisierung von porcinen Metaphase-Chromosomen

**[0048]** Cosmidklone ETHs1, ETHs2, ETHs3, ETHs4 und ETHs6 wurden einer in situ Fluoreszenzhybridisierung (FISH) (Solinas Toldo et al., 1993) oder direkter in situ chromosomaler PCR (DISC PCR) auf porcinen Metaphasen unterzogen. Metaphasen-Chromosomen wurden Q-Bandengefärbt und vor der Hybridisierung photographiert. Die Sonden wurden durch „random priming“ mit Biotin-16-dUTP markiert. Signalnachweis und Amplifizierung wurden mit Avidin-FITC und biotinyliertem anti-Avidin durchgeführt. Die Chromosomen wurden mit 4,6-Diamino-2-Phenylindol gegengefärbt und die relativen Positionen wurden wie von Solinas Toldo, 1993 beschrieben bestimmt.

## 4. Subklonierung

**[0049]** Enzymatische Verdaus von Sonden-positiven genomischen Kolonien wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und Sonden-positive Banden wurden zur FUT1-Sequenzierung in Plasmide subkloniert. Die aus diesem Verfahren abgeleitete Sequenz von FUT1 ist in [Fig. 1](#) gezeigt.

**[0050]** KspI-, EcoRI- und KspI/EcoRI-Verdaus aller Cosmide wurden auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und auf eine Hybond N Nylonmembran transferiert (Meijerink et al., 1987). Dieser Blot wurde mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP-markierten porcinen FUT1-PCR-Produkten (Primer P6–P11 und P7–P10) hybridisiert. Basierend auf den autoradiographischen Signalen wurden ETHs1, -s2 und -s3 weiter in pBluescript SK- (Stratagene) subkloniert und FUT-Sequenzen wurden aus Subklonen bestimmt. Die Sequenzen der beiden FUT-artigen offenen Leserahmen (ORFs) (FUT1 und FUT2), die aus den Cosmiden ETHs2 und -s3 erhalten wurden, wurden in ECF18R-positiven (BB/Bb) und -negativen (bb) Tieren durch direkte Sequenzierung der PCR-Produkte verglichen.

## 5. Polymerasekettenreaktion und direkte Sequenzierung

**[0051]** Unter Verwendung des Perkin Elmer Ready Reaction Dye Terminator Kits (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) und 10 pmol Primer wurde Zyklus-Sequenzierung mit einem Wärmeprogramm durchgeführt, das aus einer anfänglichen Denaturierung von fünf Minuten bei 95°C, gefolgt von 25 Zyklen von 30 Sekunden bei 95°C, 15 Sekunden bei 50°C und 4 Minuten bei 60°C bestand. Primer, die für die Amplifizierung und die Sequenzierung des porcinen alpha (1,2) Fucosyltransferasegens verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Es wurden zusätzliche Primer entworfen, um die Möglichkeit der Kreuz-Anlagerung von Primern aufgrund der Ähnlichkeit von FUT1, FUT2 und dem FUT2 Pseudogen in Betracht zu ziehen. Proben wurden auf einem 373A ABI Sequencer (Applied Biosystems Inc.) analysiert und Sequenzanalyse wurde mit dem GCG-Paket durchgeführt (Devereux, 1984).

## 6. Herstellung von informativen Nachkommen

**[0052]** Einzelne Nukleotid-Polymorphismen wurden in 221 Landrace-Schweinen, die aus 4 Ebern und 16 Säuen entstanden, und in 29 Large White (LW)-Schweinen analysiert, die aus 9 Paarungen nicht-verwandter Schweine entstanden. Um eine große Anzahl informativer Nachkommen zur Untersuchung der Kopplung zwischen porcinen Genen herzustellen, die für ECF18-Rezeptoren und ausgewählte polymorphe Loci kodieren, wurden nur informative Landrace-Verpaarungen des Typs B/b × b/b hergestellt.

## 7. Kolonialisierungstest

**[0053]** In einer Untersuchung von Bertschinger et al., 1993, wurden die vorstehend genannten Landrace-Schweine für ihre ECF18-Empfänglichkeit auch in einem Besiedelungstest untersucht. Dazu wurden Schweine kurz nach der Entwöhnung mit Bakterien des E. coli-Stamms 124/76 des Serotyps

O139:K12(B):H1:F18 (Rippinger et al., 1995) inokuliert. Fäkale Ausscheidung der Bakterien wurde täglich überwacht. Das Ausmaß der Besiedelung wurde als Mittelwert der beiden höchsten fäkalen Werte berechnet. Schweine mit einem mittleren fäkalen Wert von 3,5, entsprechend 6,7 log koloniebildender Einheiten (CFU)/g oder mehr wurden als empfänglich für Besiedelung betrachtet. Dieses Limit basierte auf fehlender Mortalität unterhalb dieses Werts und auf Werten, die von vollständig resistenten Würfen erhalten wurden.

#### 8. Kopplungsanalyse von Nukleotidpolymorphismen

**[0054]** Die Ergebnisse der Einzelnukleotidpolymorphismen wurden mit Typisierungsdaten für ECF18R verglichen, die in einem in vitro Adhäsionsassay identifiziert wurden, der von Vögeli et al., 1996, beschrieben wurde, und mit Typisierungsdaten für die GPI-, PGD-,  $\alpha$ -1-B-Glycoprotein-(A1BG), Ryanodinrezeptor (RYR1), EAH- und S-Loci, wie veröffentlicht von Vögeli et al. (1996). Eine paarweise Kopplungsanalyse und die Berechnung der Rekombinationsfraktionen wurde mit dem CRI-MAP Version 2.4-Programm (Green et al., 1990) durchgeführt. Mehrpunkt-Kopplungsanalyse wurde durch aufeinanderfolgende Insertion der oben genannten Loci in die Karte durchgeführt. Haplotyphäufigkeiten wurden von den Elterntieren berechnet, in den Landrace Familien und von den 8 parental Large White Tieren, die für ECF18R aus Nachkommeninformation haplotypisiert wurden. Tetrachorische Korrelationen von ECF18R und von Mutationen in FUT1 (FUT1/M307 (Polymorphismen) wurden bei allen Landrace und Large White-Nachkommen berechnet.

#### 9. Southern Blot Analyse

**[0055]** Southern Blot Analyse wurde von den Cosmiden ETHs1, ETHs2 und ETHs3 nach Verdau mit den Enzymen KspI, EcoRI und KspI/EcoRI und Auftrennung auf 0,8% Agarose durchgeführt. Hybridisierung mit einem  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP-markiertem 5' FUT1-Fragment (Primer P6-P11) führt sowohl im KspI-Verdau als auch im KspI/EcoRI-Verdau zur gleichen hybridisierenden Bande von 940 bp. Die Hybridisierung mit einem 3' FUT1-Fragment (Primer P7-P10) (Meijerink et al., 1997) zeigt jedoch eine 6,2 kb KspI-Bande und eine 1,1 kb KspI/EcoRI-Bande. Sowohl die 5' und 3'-FUT1-Fragmente hybridisieren an dasselbe 4,6 kb EcoRI-Fragment. Dies zeigt die Anwesenheit einer KspI-Schnittstelle in den FUT1-Gen auf, das im Cosmid ETHs2 enthalten ist. Kreuzhybridisierung des 3'-Fragments weist 2,7 und 8,2 kb Banden nach, was zur Identifizierung der FUT2-Pseudogen (unvollständiger ORF) bzw. der FUT2-Gensequenzen führte.

#### 10. Restriktionsfragmentpolymorphismus

**[0056]** Der Nachweis von (A) der M307 G zu A- und (B) der M857 G zu A-Mutation im porcinen FUT1-Gen wurde durch Restriktionslängenpolymorphismus-Analyse erreicht, unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme. Verdau der amplifizierten FUT1-Fragmente mit CfoI (A) und AclI (B) resultiert in einem Restriktionsfragmentpolymorphismus (Meijerink et al., 1997). (A) Der M307<sup>A/A</sup>-Genotyp generiert 328 und 93 bp Restriktionsfragmente, während der M307<sup>G/G</sup>-Genotyp 93, 241 und 87 bp Fragmente generiert. Heterozygote M307<sup>A/G</sup>-Genotypen zeigen alle vier Fragmente.

**[0057]** (B) Verdau des M857<sup>A/A</sup>-Genotyps generiert 174 bp Fragmente, während er in den M857<sup>G/G</sup>-Genotypen 136 und 38 bp Fragmente generiert. In M857<sup>A/G</sup>-Genotypen werden alle drei Fragmente generiert.

#### 11. Herkunft der Schweine

**[0058]** Daten der Schweizer Landrace experimentellen Population kamen von zwei Stammbäumen, welche am Institut für Veterinärbakteriologie, Universität Zürich, aufgebaut wurden. Alle anderen Schweine der Large White, Swiss Landrace, Duroc, Hampshire und Pietrain-Art kamen aus verschiedenen Zuchtherden aus der Schweiz. Andere Schweine wurden zufällig von Farmen aus dem US-amerikanischen mittleren Westen erhalten.

#### Zitierte Dokumente:

Bertschinger et al., (1993) *Veterinary Microbiology* 35: 79–89  
 Cottermann (1947) *Contrib. Lab. Vertebr. Biol. Univ. Mich.* 33: 1–21  
 Cohnen et al., (1996) *Immunogenetics* 44: 76–79  
 Devereux et al., (1984) *Nucleic Acids Res.* 1: 387–395  
 Fujii et al. (1991) *Science* 253: 448–451  
 Green et al. (1990) *Documentation for CRI-MAP, Version 2.4*, St. Louis: Washington University School of Medicine

Kelly et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5843–5847  
Meijerink et al. (1997) Mamm. Genome 8: 736–741  
Rippinger (1995) Vet. Microbial. 45: 281–295  
Solinas Toldo et al. (1993) Mamm. Genome 4: 72–727  
Thurin und Baszyk-Thurin (1995) J. Biol. Chem. 270 (44): 26577–26580  
Vögeli et al. (1996) Animal Genetics 27: 321–328  
Vögeli et al. (1997) Schweiz. Arch. Tierheilk. 139: 479–484  
US-PS 5,358,649, MacLennan et al.  
US-PS 5,552,144, Valery et al.  
WO 86/04604 987P, Erfinder: Peterson  
WO 96/28967, Erfinder: Koike, C.  
WO 94/13 811, Erfinder: Imberechts und Lintermans  
TW 266264, Erfinder: Jeng und Liou

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung eines Schweins, das resistent ist gegenüber einer Darmkolonialisierung durch E. coli, die zur Bindung des ECF18R im Schwein fähig sind, wobei das Verfahren umfasst:
  - a. Bestimmen ob ein genetischer Polymorphismus, bei dem eine Stickstoffbase an der Position 307 in dem alpha-(1,2)-Fucosyltransferase-Gen 1 des Schweins Adenin ist oder ein Polymorphismus in allelischer Assoziation mit dem FUT1-Polymorphismus, der ein Adenin an der Position 307 hat, in einer biologischen Probe von dem Schwein vorliegt; und
  - b. Folgern, dass das Schwein resistent ist, wenn das Schwein homozygot ist für den FUT1-Polymorphismus oder einen Polymorphismus in einem Bindungsungleichgewicht mit ihm.
2. Verfahren zur Identifizierung eines Schweins das resistent ist gegenüber Darmkrankheiten, die durch einen Mikroorganismus ausgelöst werden, der zur Bindung an ECF18R im Schwein fähig ist, wobei das Verfahren umfasst:
  - a. Bestimmen in einer biologischen Probe aus dem Schwein, ob die einzige Stickstoffbase an der Position 307 in dem alpha-(1,2)-Fucosyltransferase-Gen 1 des Schweins Adenin ist; und
  - b. Identifizieren des Schweins als resistent, wenn die einzige Stickstoffbase an der Position 307 Adenin ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die E. coli der F-18 Stamm ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1

	M	W	V	P	S	R	R	H	L	C	L	T	F	L	L	V	C				
CT	CGA	GCC	ATG	TGG	GTC	CCC	AGC	CGC	CGC	CAC	CTC	TGT	CTG	ACC	TTC	CTG	CTA	GTC	TGT	17	
V	L	A	A	I	F	F	L	N	V	Y	Q	D	L	F	Y	S	G	L	D	59	
GTT	TTA	GCA	GCA	ATT	TTC	TTC	CTG	AAC	GTC	TAT	CAA	GAC	CTC	TTT	TAC	AGT	GGC	TTA	GAC	37	
	L	L	A	L	C	P	D	H	N	V	V	S	S	P	V	A	I	F	C	L	119
CTG	CTG	GCC	CTG	TGT	CCA	GAC	CAT	AAC	GTG	GTA	TCA	TCT	CCC	GTG	GCC	ATA	TTC	TGC	CTG	57	
A	G	T	P	V	H	P	N	A	S	D	S	C	P	K	H	P	A	S	F	179	
GCG	GGC	ACG	CCG	GTA	CAC	CCC	AAC	GCC	TCC	GAT	TCC	TGT	CCC	AAG	CAT	CCT	GCC	TCC	TTT	77	
S	G	T	W	T	I	Y	P	D	G	R	F	G	N	O	M	G	Q	Y	A	239	
TCC	GGG	ACC	TGG	ACT	ATT	TAC	CCG	GAT	GGC	CGG	TTT	GGG	AAC	CAG	ATG	GGA	CAG	TAT	GCC	97	
T	CTG	L	A	L	A	Q	L	N	G	R	O	A	F	I	O	P	A	M	H	299	
ACG	CTG	CTG	GCC	CTG	CCG	CAG	CTC	AAC	GGC	CGC	CAG	GCC	TTC	ATC	CAG	CCT	GCC	ATG	CAC	117	
A	V	L	A	P	V	F	R	I	T	L	P	V	L	A	P	E	V	D	R	359	
GCC	GTC	CTG	GCC	CCC	GTG	TTC	CGC	ATC	ACG	CTG	CCT	GTC	CTG	CGC	CCC	GAG	GTA	GAC	AGG	137	
H	A	P	W	R	E	L	E	L	H	D	W	M	S	E	D	Y	A	H	L	419	
CAC	GCT	CCT	TGG	CGG	GAG	CTG	GAG	CTT	CAC	GAC	TGG	ATG	TCC	GAG	GAT	TAT	GCC	CAC	TTA	157	
K	E	P	W	L	K	L	T	G	F	P	C	S	W	T	F	F	H	H	L	479	
AAG	GAG	CCC	TGG	CTG	AAG	CTC	ACC	GGC	TTC	CCC	TGC	TCC	TGG	ACC	TTC	TTC	CAC	CAC	CTC	177	
R	E	O	I	R	S	E	F	T	L	H	D	H	L	R	Q	E	A	Q	G	539	
CGG	GAG	CAG	ATC	CGC	AGC	GAG	TTC	ACC	CTG	CAC	GAC	CAC	CTT	CGG	CAA	GAG	GCC	CAG	GGG	197	
V	L	S	Q	F	R	L	P	R	T	G	D	R	P	S	T	F	V	G	V	599	
GTA	CTG	AGT	CAG	TTC	CGT	CTA	CCC	CGC	ACA	GGG	GAC	CGC	CCC	AGC	ACC	TTC	GTG	GGG	GTC	217	
H	V	R	R	G	D	Y	L	R	V	M	P	K	R	W	K	G	V	V	G	659	
CAC	GTG	CGC	CGC	GGG	GAC	TAT	CTG	CGT	GTG	ATG	CCC	AAG	CGC	TGG	AAG	GGG	GTG	GTG	GGT	237	
D	G	A	Y	L	Q	Q	A	M	D	W	F	R	A	R	Y	E	A	P	V	719	
GAC	GGC	CGT	TAC	CTC	CAG	CAG	GCT	ATG	GAC	TGG	TTC	CGG	GCC	CGA	TAC	GAA	GCC	CCC	GTC	257	
F	V	V	T	S	N	G	H	E	W	C	R	K	N	I	D	T	S	R	G	779	
TTT	GTG	GTC	ACC	AGC	AAC	GGC	ATG	GAG	TGG	TGC	CGG	AAG	AAC	ATC	GAC	ACC	TCC	CGG	GGG	277	
D	V	I	F	A	G	D	G	R	E	A	A	P	A	R	D	F	A	L	L	839	
GAC	GTG	ATC	TTT	GCT	GGC	GAT	GGG	CCG	GAG	GCC	GCG	CCC	GCC	AGG	GAC	TTT	GCG	CTG	CTG	297	
V	Q	C	N	H	T	I	H	T	I	G	T	F	G	F	W	A	A	Y	L	899	
GTG	CAG	TGC	AAC	CAC	ACC	ATC	ATG	ACC	ATT	GGC	ACC	TTC	GGC	TTC	TGG	GCC	GCC	TAC	CTG	317	
A	G	G	D	T	I	Y	L	A	N	F	T	L	P	T	S	S	F	L	K	959	
GCT	GGT	GGA	GAT	ACC	ATC	TAC	TTG	GCT	AAC	TTC	ACC	CTG	CCC	ACT	TCC	AGC	TTC	CTG	AAG	337	
I	F	K	P	E	A	A	F	L	P	E	W	V	G	I	N	A	D	L	S	1019	
ATC	TTT	AAA	CCC	GAG	GCT	GCC	TTC	CTG	CCC	GAG	TGG	GTG	GGC	ATT	AAT	GCA	GAC	TTG	TCT	357	
P	L	Q	M	L	A	G	P													1079	
CCA	CTC	CAG	ATG	TTG	GCT	GGG	CCT	TGA	ACC	AGC	CAG	GAG	CCT	TTC	TGG	AAT	AGC	CTC	GGT	365	
CAA	CCC	AGG	GCC	AGC	GTT	ATG	GGT	CTC	CGG	AAG	CCC	GAG	TAA	CTT	CCG	GAG	ATG	CTG	GTG	1139	
GTC	CTG	TAG	CAG	GCT	GGA	CAC	TTA	TTT	CAA	GAG	TGA	TTC	TAA	TTG	GCT	GGA	CTC	AGA	GGA	1199	
AAC	CCT	GCA	G																	1259	
																				1269	