

Aus dem Institut
für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik
der Landwirtschaftlichen Fakultät
(Dekan: Prof. Dr. habil. W. Merbach)
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

**„Molekulargenetische, biochemische und morphologische
Untersuchungen zum Syndrom Congenitales
Ausgrätschen beim Saugferkel“**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

von Diplomagraringenieur
Simone Jäsert

Halle/Saale 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005046

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005046>]

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik

**„Molekulargenetische, biochemische und morphologische
Untersuchungen zum Syndrom Congenitales Ausgrätschen beim
Saugferkel“**

Der Landwirtschaftlichen Fakultät

(Dekan: Prof. Dr. habil. W. Merbach)

der

Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

als

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieur

Simone Jäsert

geb. am 18.05.1967

in Nordhausen

Gutachter:

Prof. Dr. Weber

PD Dr. Maak

Prof. Dr. Schellander

Verteidigung am: 12.05.2003

Halle/Saale 2003

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Literaturübersicht | 3 |
| 2.1. Das Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel | 3 |
| 2.1.1. Auftreten und klinisches Bild | 3 |
| 2.1.2. Untersuchungen zur Ursache des Ausgrätschsyndroms | 6 |
| 2.1.2.1. Wirksamkeit des Acetylcholins (Ach) | 6 |
| 2.1.2.2. Funktionen der Mineralstoffe an den Synapsen | 7 |
| 2.1.2.3. Störungen im Glykogenstoffwechsel | 9 |
| 2.1.2.4. Ausreifung des neuromuskulären Systems zum Geburtszeitpunkt | 10 |
| 2.1.2.5. Aktivität von Enzymen im Nervensystem und Muskelgewebe | 13 |
| 2.2. Genetische Ursachen von Erbkrankheiten | 16 |
| 2.2.1. Grundlagen | 16 |
| 2.2.2. Hypothesen zum genetischen Hintergrund des Ausgrätschsyndroms | 22 |
| 2.2.3. Molekulargenetische Methoden zur Untersuchung von Erbkrankheiten | 23 |
| 3. Material und Methoden | 31 |
| 3.1. Tiermaterial | 31 |
| 3.2. Identifizierung von Kandidatengenen mit der Differential Display/Reverse Transkriptase PCR (DDRT-PCR) | 31 |
| 3.2.1. RNA-Isolierung | 31 |
| 3.2.2. Reverse Transkription | 33 |
| 3.2.3. Amplifizierung der cDNA | 34 |
| 3.2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Silbernitratfärbung | 35 |
| 3.2.5. Präparation von ausgewählten Banden aus dem Polyacrylamidgel | 36 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.6. | Reamplifizierung der gewonnenen Eluate | 37 |
| 3.2.7. | Klonierung der zu untersuchenden differentiellen Banden | 38 |
| 3.2.8. | Plasmidpräparation und Sequenzierung | 39 |
| 3.2.9. | Sequenzanalyse | 41 |
| 3.2.10. | Untersuchungen zur Struktur des porcinen CDKN 3 Genes | 42 |
| 3.3. | Erfassung der Enzymaktivitäten von Creatinkinase (CK) sowie Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzyme | 45 |
| 3.3.1. | Gesamtaktivität von Creatinkinase (CK) | 45 |
| 3.3.2. | Gesamtaktivität von LDH und deren Isoenzyme | 46 |
| 3.3.3. | Statistische Auswertung | 47 |
| 3.4. | Elektronenmikroskopische Untersuchungen des <i>M. biceps femoris</i> bei gesunden und mit dem Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln | 48 |
| 3.5. | Anpaarungsexperimente | 50 |
| 4. | Ergebnisse | 52 |
| 4.1. | Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenen für das Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel | 52 |
| 4.1.1. | Ergebnisse der Differential Display/Reverse Transkription PCR | 52 |
| 4.1.2. | Charakterisierung von merkmalsassoziierten exprimierten cDNA-Sequenzen | 56 |
| 4.1.3. | Isolierte EST's (expressed sequence tags) aus dem <i>M.biceps femoris</i> neugeborener Ferkel | 63 |
| 4.2. | Enzymaktivitäten von Creatinkinase (CK), Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzyme | 64 |
| 4.2.1. | Creatinkinase (CK) | 64 |
| 4.2.2. | Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzyme | 65 |
| 4.3. | Elektronenmikroskopische Auswertung von Präparaten des <i>M.biceps femoris</i> im Vergleich zwischen gesunden und vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln | 69 |
| 4.4. | Auswertung der Anpaarungsexperimente | 72 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 5. | Diskussion | |
| 5.1. | Identifizierung von potentiellen Kandidatengen | 75 |
| 5.2. | Enzymaktivitäten von Creatinkinase (CK) und Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzymen | 79 |
| 5.3. | Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen des <i>Musculus biceps femoris</i> gesunden und erkrankten Ferkeln | 81 |
| 5.4. | Anpaarungsexperimente | 84 |
| 6. | Zusammenfassung | 86 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 87 |
| 8. | Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen | 98 |
| 9. | Anhang | |
| 9.1. | Verwendete Geräte | 101 |
| 9.2. | Verwendete Lösungen und Chemikalien | 103 |
| 9.3. | Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der Enzymaktivitäts- bestimmung | 105 |

1. Einleitung

Die in sich heterogene Gruppe von Erb- und Zuchtkrankheiten gehört bei den landwirtschaftlichen Nutztieren zu einer der inzwischen wichtigsten Krankheitsgruppen. Durch neu entwickelte Diagnostikverfahren ist heute eine große Anzahl genetischer Erkrankungen bekannt. Etwa 4-5 % aller Neugeborenen sind Träger einer solchen. Zu den Erbkrankheiten tragen sowohl Genmutationen als auch numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen bei. Darüber hinaus werden zahlreiche, nicht genetisch verursachte Krankheitssymptome durch die genetische Konstitution der Tiere begünstigt.

In der Tierzucht sind zwei Arten von genetischen Merkmalen von Bedeutung: solche, die nur von einem Genort bestimmt werden (Farbe, Erbkrankheiten) und eine größere Gruppe von Merkmalen, deren Ausprägung von mehreren Genorten gleichzeitig bestimmt wird. Zur zweiten Gruppe gehören alle wirtschaftlich wichtigen Merkmale wie Milch- und Fleischleistung, Gesundheit und Fruchtbarkeit. Erbkrankheiten werden in den meisten Fällen rezessiv vererbt, d.h. sie treten nur dann auf, wenn ein Tier das auslösende Gen von beiden Eltern erhalten hat. Dies ist das Hauptproblem der konventionellen Erbfehlerdiagnose: Die Eltern tragen in der Regel nur eine Kopie des die Krankheit verursachenden Gens in sich und sind daher selbst gesund. Ob ein Zuchttier ein Träger ist, stellt sich erst heraus, wenn der erste mit einem Erbfehler gezeichnete Nachkomme geboren ist. Unter ungünstigen Umständen kann ein Vatertier bis dahin schon hunderte Nachkommen gezeugt haben, von denen ein Teil wiederum Träger der Erbkrankheit ist. Je nach Krankheitsbild und -verlauf sind hier hohe ökonomische Verluste in den Zuchtbetrieben prognostizierbar. Lassen sich heterozygote Träger ermitteln, ist eine effiziente Selektion gegen die Erbkrankheit möglich.

In der klassischen Tierzucht können nicht alle Merkmalsausprägungen effektiv bearbeitet werden. Für die komplexere Ausprägung der Tierzucht in den Merkmalsselektionen bieten die Molekulargenetik einen optimalen Ansatzpunkt. Mit Hilfe der Analyse von Kandidatengenen können diese gezielt in der Selektion zum Ausschluß negativer Genvarianten genutzt werden (SCHWERIN et al., 1995).

Durch die neuen Methoden der Bio- und Gentechnik werden die Züchtungsmethoden nicht grundsätzlich verändert. Es wird lediglich die Zeitdauer verkürzt, die bis zum Erreichen des

gewünschten Zuchtzieles benötigt wird, da die Vererbungsleistung der Tiere (Zuchtwert) früher und genauer bestimmt werden kann als bisher.

Seit etwa 30 Jahren ist das Ausgrätschen von neugeborenen Ferkeln als ein weit verbreitetes Krankheitsbild beschrieben und kann unter ungünstigen Haltungsbedingungen zu erheblichen Ferkelverlusten führen. Trotz umfangreicher Untersuchungen auf der biochemischen und morphologischen Ebene konnte bisher für das Syndrom des congenitalen Ausgrätschen beim Saugferkel keine definierte Ursache nachgewiesen werden.

Eine geeignete Methode zur Identifizierung von Kandidatengenem stellt die mRNA differential display Methode (LIANG & PARDEE, 1992) dar. Diese erlaubt es über eine vergleichende elektrophoretische Darstellung transkribierter Moleküle nach RNA-Isolierung und c-DNA Synthese different exprimierte mRNA's / cDNA's darzustellen. Über weitere Analysen der Kandidatengene können merkmalsassoziierte Expressionsmuster aufgezeigt werden. Dieses Verfahren konnte bisher erfolgreich zur Identifizierung solcher Gene eingesetzt werden, die in verschiedenen Geweben oder in gleichen Geweben Expressionsunterschiede aufweisen (LIANG et al., 1993; AIELLO et al., 1994; LI et al., 1994; NISHIO et al., 1994).

Ausgehend vom bisherigen Kenntnisstand wird in der vorliegenden Arbeit versucht, Kandidatengene für diese Erkrankung zu identifizieren und zu charakterisieren. Als Methode kam dabei das obengenannte Verfahren „Differentielles Display/ Reverse Transkription und PCR „ (DDRT-PCR) zum Einsatz.

Die Arbeit umfasst folgende Komplexe:

- Identifizierung von Kandidatengenem für das Ausgrätschsyndrom,
- Biochemische Erfassung von Enzymaktivitäten von Creatinphosphokinase und Lactatdehydrogenase und deren Isoenzyme,
- Elektronenmikroskopische Vergleichsuntersuchungen,
- Anpaarungsexperimente.

2. Literaturübersicht

2.1. Das Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel

2.1.1. Auftreten und klinisches Bild

Das Syndrom „ Ausgrätschen beim Saugferkel “ wird in der Literatur unter vielen Synonymen aufgeführt, wie z.B. Ausgrätschsyndrom, Beinspreizen, Splayleg oder Leg weakness.

In den folgenden Ausführungen wird diese Erscheinung als Ausgrätschsyndrom bezeichnet.

Erstmals wurde diese Erkrankung durch ENSMINGER et al. (1947) in den USA erwähnt. Weitere Berichte folgten in den 60er Jahren aus Europa, Amerika und Australien, sowie Anfang der 70er Jahre aus Deutschland und Schweden (THURLEY et al., 1969; CUNHA, 1968; OLSON & PRANGE, 1968; DOBSON, 1968; BOLLWAHN & PFEIFFER, 1969; MEHLHORN et al., 1970; BERGSTRÖM, 1972).

Betroffen von diesem Syndrom sind neugeborene Ferkel. Ein rassespezifisches Auftreten wird kontrovers diskutiert. In Untersuchungen von THURLEY et al. (1969) und DOBSON (1968, 1971) wurden als Rassen die Landrasse und Large White genannt. VOGT et al. (1984) dokumentierten in ihren Untersuchungen im Vergleich zu Nachkommen von Yorkshire und Duroc einen erhöhten Anteil an Grätscherferkeln in Landrasseanpaarungen.

Auch zur Geschlechtsdisposition werden unterschiedliche Erkenntnisse genannt. In beschriebenen Fällen von LAX (1971) sind nur männliche Tiere erkrankt, wobei bei THURLEY et al. (1967) keine Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens zwischen männlichen und weiblichen Ferkeln vorkommen. SCHNAPPERELLE & KOCH (1980), SELLIER & OLLIVIER (1982) und VOGT et al. (1984) zeigen ein Verhältnis von 1,76 männliche Ferkel : 1 weiblichen Ferkel auf. Das Geschlechtsverhältnis bei Untersuchungen von VAN DER HEYDE et al. (1989) weist ähnliche Zahlen auf.

Untersuchungen zu Einflüssen der Wurfgröße sowie der Jahreszeit und weiteren Umweltfaktoren auf die Häufigkeit des Syndroms führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (Übersicht bei VAN DER HEYDE et al., 1989).

Beim Kaninchen wird ebenfalls der Begriff „Splay-Leg Syndrom“ verwendet. Diese kann man trotz einiger Ähnlichkeit im morphologischen Erscheinungsbild nicht mit dem

Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel vergleichen (ARENDA et al. 1966, JOOSTEN et al. 1981, JIRMANOVA 1983).

Das klinische Bild zeigt sich in einer zehenweiten Stellung der Hintergliedmaßen (Abbildung 1), woraus sich sofort nach der Geburt eine mehr oder weniger vollständige Grätschstellung entwickelt (BOLLWAHN & PFEIFFER, 1969; KRUEDEWIG, 1971). Es treten unterschiedliche Steh- und Fortbewegungsstörungen auf. In besonders schweren Fällen sitzen die Tiere mit gespreizten Hintergliedmaßen auf dem Beckenboden (BERGMANN, 1975). Es wird dabei eine charakteristische Stellung eingenommen: eine Hintergliedmaße wird neben dem Körper nach vorn gestreckt, die andere mehr seitlich gespreizt.



Abbildung 1: Ferkel mit Ausgrätschsyndrom

Die Fortbewegung erfolgt dann halbrutschend auf den Hinterextremitäten. Adäquate Veränderungen an den Vordergliedmaßen wurden von THURLEY et al. (1967) bei der Hälfte der betroffenen Tiere, von KRUEDEWIG (1971) dagegen nur bei 6,8% beobachtet.

Die Häufigkeit des Auftretens liegt bezogen auf alle lebend geborenen Ferkel bei ca. 0,2 %. Jedoch sind diesbezügliche Aussagen nicht einheitlich. KÖHLER & SEFFNER (1974) kamen zum Ergebnis, das in industriemäßig produzierenden Sauenanlagen 22% - 33% aller lebend geborenen Ferkel betroffen sind. HÖRÜGEL & LORENZ (1979) dagegen beobachteten Werte von 5% - 7,5%. In Großbritannien lagen die Zahlen 1972 bei 0,12% - 0,14%, in den Niederlanden schwanken diese zwischen 0,2% und 0,5%. Australien und Kanada weisen das Ausgrätschsyndrom als einen häufigen Erbdefekt aus (WRATHALL, 1988; PARTLOW et al., 1993).

Aufgrund dieser klinischen Erscheinungen sind stark betroffene Ferkel unfähig zum Saugen oder werden der Erdrückungsgefahr durch die Sau ausgesetzt.

Die Mortalität variiert zwischen 15 und 50% der erkrankten Ferkel (HÖRÜGEL & LORENZ, 1979; WRATHALL, 1988; SVENDSEN et al., 1991).

WARD (1978) charakterisiert das Ausgrätschsyndrom als multifaktorielles Syndrom, bei dem eine Anzahl variabler Umweltfaktoren in Kombination mit bestimmten Genotypen wirken und im klinischen Bild ihren Ausdruck finden.

Ist die Grätschstellung nur bis zu einem gewissen Grad fortgeschritten und zeigen die Ferkel durch ein normales Geburtsgewicht eine gute Konstitution, ist ein Heilen der Erkrankung möglich. Entscheidend ist, daß man den grätschenden Ferkeln über die kritischen ersten Lebenstage hinweghilft. Deshalb müssen sie unbedingt an das Gesäuge angesetzt werden. Als einzige wirklich erfolgversprechende Behandlungsmöglichkeit ist hier das Zusammenbinden der betroffenen Gliedmaßen in einem Abstand von ca. 5 cm zu empfehlen (BICKHARDT, 1984). Dafür werden mittlerweile spezielle Spreizerbänder mit Klettverschluß angeboten. Auch der Erfolg dieser Methode hängt von den Umweltbedingungen wie zum Beispiel Fußbodengestaltung, Anzahl der Geschwister und Initiative des Pflegepersonals ab. Nach 10 bis 14 Tagen ist ein Selbstheilungsprozeß erkennbar und die Ferkel sind in der weiteren Entwicklung nicht von gesunden Tieren zu unterscheiden.

Relativ neu ist ein in Dänemark entwickeltes Trainingsgerät für Grätscher. Durch gezielte Übungen in diesem Gerät soll die Rückenmuskulatur der betroffenen Tiere gestärkt werden.

Um hier ein optimalen Erfolg zu erzielen, ist sicherlich der Faktor Zeit unter Praxisbedingungen begrenzend zu bewerten.

2.1.2. Untersuchungen zur Ursache des Ausgrätschsyndroms

Nach Untersuchungen morphologischer und biochemischer Ursachenkomplexe in verschiedenen Studien konnte bisher noch kein eindeutiger Pathogenesemechanismus für das Syndrom gefunden werden.

Folgende Ursachenkomplexe sind bislang nicht auszuschließen:

- ungenügende Wirksamkeit des Acetylcholins (ACh) durch veränderte Aktivitäten ACh-synthetisierender und – abbauender Enzyme (Nachweis erhöhter Acetylcholinesterase - Aktivitäten im Zentralen Nervensystem –Kleinhirn, Hirnstamm (LE HONG et al., 1990)
- Störungen in der Funktion der Synapsen durch Dysregulation ihres Ca^{2+} Haushaltes (KOLB et al., 1987)
- Störungen im frühpostnatalen Glykogenstoffwechsel (DUCATELLE, 1986)
- Unvollständige Ausreifung des neuromuskulären Systems zum Geburtszeitpunkt (ELSCHNER et al., 1991).

Nachfolgend werden die wichtigsten Untersuchungen zu den möglichen Ursachen des Ausgrätschsyndroms zusammengefaßt.

2.1.2.1. Wirksamkeit des Acetylcholins (ACh)

Die Erregungsübertragung auf die Muskelfaser erfolgt unter wesentlicher Beteiligung von Acetylcholin in den motorischen Endplatten, indem es diese depolarisiert und den zur Impulsübertragung erforderlichen Ionenaustausch ermöglicht. Beim Defizit von Acetylcholin bzw. Überangebot von Cholinesterase kommt es zur Unterdrückung der Erregerübertragung und damit zur myasthenischen Reaktion. Diese ist als Ausdruck einer Funktionsstörung der motorischen Endplatte zu sehen, die trotz vermutlich verschiedener Noxen in immer gleicher Form die Impulsübertragung vom Nerven auf die Muskelzelle behindert. Bei dauerndem

Impulseingang und bestehender Cholinesterasehemmung häuft sich Acetylcholin langsam an, um schließlich in ausreichend großer Konzentration die Erregungsübertragung in dem motorischen Endplatten wieder zu gewährleisten.

Eine ungenügende Wirksamkeit des Acetylcholins spielt nach Untersuchungen von ZRUNEK et al. (1977) sowie von SCHNAPPERELLE & KOCH (1980) eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Ausgrätschsyndroms. Nach intramuskulärer Applikation von Neostigminmethylsulfat (0,1mg/Ferkel) wurde eine positive Veränderung des Zustandes erzielt.

Eine geringere Aktivität der das Acetylcholin synthetisierenden Cholin-Acetyltransferase in löslicher Form wurde von WITTNER et al. (1982) in verschiedenen Abschnitten des Zentralnervensystems nachgewiesen.

Untersuchungen von LE HONG et al. (1990) ergaben, dass die Aktivität der Acetylcholinesterase im untersuchten Gewebe (Hirnstamm, Rückenmark, Kleinhirn) von Grätscherferkeln höher lag als bei normalentwickelten Ferkeln. Im Homogenat des Großhirns bestand bei den Grätscherferkeln eine höhere Aktivität des Enzyms. Daraus ist die positive Beeinflussung der Erkrankung durch Verabreichung eines Hemmstoffes der Acetylcholinesterase – des Neostigminmethylsulfats – zu erklären (ZRUNEK et al., 1977).

LE HONG et al. (1990) unterstützten auch weiterhin mit ihren Erkenntnissen die Annahme, daß bei Grätscherferkeln eine Hemmung der Ausreifung des neuromuskulären Systems vorliegt, die bei leichter und mittelgradiger Ausprägung des Ausgrätschsyndroms durch Anwendung von Hemmstoffen der Acetylcholinesterase beseitigt werden kann. Beobachtungen in der Praxis weisen vereinzelt auf einen Zusammenhang mit der Unterversorgung bzw. erhöhten Bedarf an Cholinchlorid bei Sauen hin (CUNHA et al., 1968).

2.1.2.2. Funktionen der Mineralstoffe an den Synapsen

Um eine optimale Funktion der Skelettmuskulatur aufrechtzuerhalten, ist ein bestimmter Gehalt an Elektrolyten (Ca-, Mg-, Na- und K-Ionen) notwendig.

Der verminderte Gehalt an Ca-Ionen hat eine erhöhte Aktivität der Ca-Transport-Adenosintriphosphatase (ATPase) zur Folge. Die Ca-ATPase ist hauptsächlich im Bereich der Synapsen lokalisiert und spielt bei der Wiederherstellung der Erregbarkeit nach einer

Depolarisation eine Rolle. Bei Eingang einer Erregung in eine Synapse wird die Membran zeitweise für Ca-Ionen verstärkt durchlässig. Durch den erhöhten Einstrom von Ca-Ionen wird die Freisetzung von Acetylcholin aus den synaptischen Bläschen gefördert. Das Acetylcholin löst hier eine Depolarisation aus. In den Muskelfasern wird dadurch aus dem sarkoplasmatischen Retikulum Ca-Ionen freigesetzt, die an das Troponin C der Myofibrillen gebunden werden und den Kontraktionsmechanismus auslösen. Nach diesem Vorgang werden die Ca-Ionen durch die Ca-Pumpe in das Retikulum zurücktransportiert. Es folgt die Erschlaffung der Muskelfaser.

Zum Ca-Ionen-Gehalt in Geweben gesunder Ferkel und Grätscherferkel liegen umfangreiche Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Kolb (KOLB et al.1987) vor. Hier wurde festgestellt, dass der Ca-Gehalt in der Skelettmuskulatur bei Grätscherferkeln in erhöhter Menge vorliegt. Folgende Muskeln zeigten nach KOLB et al., 1987 einen deutlich erhöhten Ca-Ionen-Gehalt gegenüber denen von gesunden Ferkeln:

- *Musculus semimembranosus* (+36% - +55%)
- *Musculus semitendinosus* (+36% - +38%)
- *Musculus longissimus dorsi* mittlerer Abschnitt (+36%)
- *Musculus longissimus dorsi* hinterer Abschnitt (+81%)
- *Musculus gracilis* (+43%).

DICKERSON & WIDDOWSON (1960) analysierten den Ca-Gehalt in der Oberschenkelmuskulatur während der Entwicklung von Schweinefeten: Dabei wurde eine Abnahme des Ca-Ionen-Gehaltes von 7,3 mval/kg bei 46 Tagen alten Feten auf 3,5 mval/kg bei 90 Tagen alten Feten und auf 2,9 mval/kg bei neugeborenen Ferkeln festgestellt. Als Aussage konnte daraus abgeleitet werden, daß im Verlaufe der fetalen Ausreifung der Skelettmuskulatur der Ca-Ionen-Gehalt abnimmt.

Daraus schlußfolgerte man, daß der erhöhte Ca-Gehalt in der Muskulatur der Hinterextremitäten bei Grätscherferkeln als Zeichen einer Ausreifungshemmung gewertet werden kann.

Für weitere Elemente wie Natrium (Na) und Phosphor (P) wurden auch in der Muskulatur der Hintergliedmaßen erhöhte Gehalte bei Grätscherferkeln gegenüber gesunden Ferkeln

festgestellt. Bei Magnesium (Mg) und Kalium (K) gab es keine Unterschiede (KOLB et al., 1987).

Diese Abweichungen in der Mineralstoffzusammensetzung verschiedener Muskeln sind unter Berücksichtigung der Zu- und Abnahme des Gehaltes während der fetalen Entwicklung als Folge einer verzögerten Ausreifung zu betrachten, die erblich bedingt sein kann.

Der Gehalt an Mineralstoffen und Spurenelementen in anderen Geweben des Organismus wurde aber insgesamt nicht einheitlich beschrieben (KOLB et al., 1987).

2.1.2.3. Störungen im Glykogenstoffwechsel

Kohlenhydrate stellen neben den Fetten die wichtigsten energieliefernden Verbindungen im Körper dar. Glykogen, ein leicht mobilisierbarer Brennstoffspeicher, ist ein verzweigtes Polymer aus Glucoseeinheiten, das in großen Mengen in der Muskulatur vorkommt. Dort wird es im Cytoplasma in Form von hydratischen Körnchen gespeichert. Der größte Teil des Glycogenmoleküls wird durch die Phosphorylase zu Glucose-1-phosphat abgebaut. Die Glycogensynthese und -abbau werden durch eine in sich verstärkende Reaktionskaskade koordiniert. Die Glycogen-Synthase ist inaktiv, wenn die Phosphorylase aktiv ist, und umgekehrt. Adrenalin und Glycagon stimulieren den Glycogenabbau und hemmen die Synthese durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels; AMP aktiviert eine Protein-kinase. Die Kinase, die die Phosphorylase aktiviert, wird auch durch Ca-Ionen stimuliert, was zur Mobilisierung von Glucose aus Glycogen während der Muskelkontraktion führt.

Der Glycogenstoffwechsel ist ein Beispiel für die zentrale Rolle der reversiblen Phosphorylierung bei der Regulation biologischer Prozesse.

DUCATELLE et al. (1986) stellten in ihren Untersuchungen einen erhöhten Anteil von Glykogenpartikeln im extramyofibrillären Raum fest. Aufgrund charakteristischer Veränderungen der myofibrillären Hypoplasie wie dem Vorhandensein eines teilweise mit Glykogenpartikeln gefüllten extramyofibrillären Raumes, unregelmäßige bzw. diffuse Querstreifung der Muskelzellen, schlußfolgerten sie, dass eine Störung des frühpostnatalen Glykogenstoffwechsel ein wichtiger Aspekt in der Pathogenese des Ausgrätschsyndrom sein könnte.

Befunde der congenitalen myofibrillären Hypoplasie (MFH) gleichen dem Ausgrätsch-syndrom. Überwiegend wird jedoch von einer unterschiedlichen Ätiologie beider Syndrome in der Literatur ausgegangen, da die MFH auch bei nicht vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln gefunden wurde (JIRMANOVA & LOJDA, 1985; TUCEK et al., 1985)

2.1.2.4. Ausreifung des neuromuskulären Systems zum Geburtszeitpunkt

Am Organaufbau des Skelettmuskels ist neben den Muskelfasern auch das Bindegewebe beteiligt. Es bildet einerseits ein verschieblich-elastisches, die Versorgungsbahnen enthaltendes Gerüst, das den Zusammenhalt der in charakteristischer Weise gebündelter Muskelfaser gewährleistet. In Abbildung 2 ist die Architektur des Skelettmuskels dargestellt.

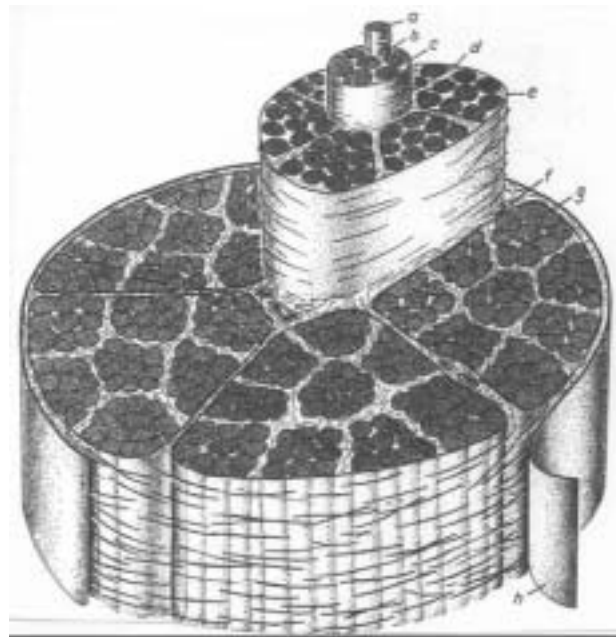


Abbildung 2: Architektur des Skelettmuskels (a Skelettmuskelfaser, b Endomysium, c Primärbündel, d Perimysium internum, e Sekundärbündel, f Perimysium externum, g Epimysium, h Faszie) (SMOLLICH et al., 1985)

Jede Skelettmuskelfaser wird von einer geschlossenen Basallamina umgeben. Diese legt sich der Plasmamembran der Muskelfaser eng an und stellt die Verbindung zum lockeren Bindegewebe des Muskelbauches her, das eine charakteristische hierarchische Gliederung aufweist.

Die Ausreifung der Muskeln findet bei Schweinefeten erst in den letzten Tagen vor der Geburt statt. In den ersten Tagen danach nehmen die DNA- und RNA- Synthese zu. Bei Grätscherferkeln war die DNA-Synthese bei 0 bis 7 Tage alten Ferkeln in verschiedenen Muskeln herabgesetzt (FARMER et al., 1980).

Untersuchungen von LE HONG (1990) zeigten einen erhöhten Proteingehalt im Homogenat der Gewebe des Zentralen Nervensystems bei Grätscherferkeln gegenüber gesunden Ferkeln. Der kann als Hinweis auf einen geringeren Anteil von Fettstoffen gewertet werden, der gegen Ende der fetalen und während der postnatalen Entwicklung mit der Vergrößerung des Anteils an Leitungsbahnen ansteigt. Die Tatsache des größeren Gehaltes an Gesamtprotein in den Geweben des Groß- und Kleinhirns kann als Indikator einer gewissen Hemmung der Ausreifung des neuromuskulären Systems bei Grätscherferkel angesehen werden.

Die erhöhte Permeabilität der Muskelzellmembranen sowie die Veränderungen der Aktivitäten von Enzymen des Peroxidabbaus sind als sekundäre Erscheinung des Krankheitsbildes zu sehen.

Bei der Entstehung von Störungen bei der Funktion des neuromuskulären Systems können folgende Faktoren eine Rolle spielen:

- Senkung der Hirnmasse bei Schweinen und damit Einschränkung der neuromuskulären Wechselbeziehungen (ZELENA & JIRMANOVA, 1979),
- Erhöhung der Fruchtbarkeit mit Einschränkung der Entwicklungsbedingungen der Feten – verminderte Plazentausbildung zur Nährstoff- und O₂ –Versorgung, herabgesetzte Bewegungsfreiheit mit Verminderung der neuromuskulären Wechselbeziehung, sinkende Körpermasse der Ferkel bei steigender Wurfgröße (MAY et al., 1978),
- bewegungsarme Haltung der Sauen (verminderte motorische Aktivität der Feten einschließlich einer Depression der neuromuskulären Wechselbeziehungen (BERGMANN, 1976a).

Die Muskulatur der Schweinefeten bleibt bis zur Geburt in einem relativ unreifen Zustand. Störungen in der nervalen Funktion können verminderte trophische Einflüsse des Nervensystem auslösen. Dies äußert sich in einem signifikant erhöhten Anteil dystrophischer und degenerativer Fasern sowie anderer Störungen in der Muskulatur von Grätscherferkeln (PATTERSON et al., 1969; PIVNIK et al., 1976; LUKAS et al., 1978; ZELENA et al., 1978; BRADLEY et al., 1980; WARD u. BRADLEY, 1980).

In einer Arbeit zu lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Skelettmuskulatur betroffener Ferkel kam BERGMANN (1976) zu der Aussage, dass lichtmikroskopisch eine myofibrilläre Hypoplasie oder dissiminierte Fasernekrosen vorliegt. Elektronenmikroskopisch waren 4 Fasertypen zu unterscheiden: der Normaltyp (intakte Fibrillen), der hypoplastische Typ (Unreife der Fibrillen), der dystrophe Typ (variable Fibrillendefekte) und der Primitivtyp (myoblastenähnliche Zellelemente mit überstürzter Fibrillogenese) (BERGMANN, 1976). Schlußfolgernd kam er zu der Aussage, daß bei Grätscherferkeln eine pränatale Entwicklungsstörung der Muskulatur vorliegt, die Charakteristika einer Myopathie aufweist.

Typischen Veränderungen wie das Vorhandensein eines teilweise mit Glykogenpatikeln gefüllten Raumes, unregelmäßige Querstreifung der Muskelzellen und eine vermehrte Anzahl an Ribosomen zeigen alle Charakteristika einer myofibrillären Hypoplasie (BERGMANN, 1976; DUCATELLE et al., 1986; BJÖRKLUND et al., 1987; CURVERS et al., 1989).

Elektronenmikroskopische Befunde bei Grätscherferkeln sind zu vergleichen mit denen von 80 Tagen alten Schweineföten (DEUTSCH & DONE, 1971). Ergebnisse zu DNA- und RNA-Gehalten zeigten im Gehirn und verschiedenen inneren Organen keine Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Ferkeln, dagegen lagen in der Skelettmuskulatur geringe Konzentrationsveränderungen in Abhängigkeit von der Körpermasse zwischen beiden Ferkelkategorien vor (HILLERT et al., 1987a; ELSCHNER et al., 1991).

2.1.2.5. Aktivität von Enzymen im Nervensystem und Muskelgewebe

Im Laufe der Entwicklung der Lebewesen hat sich im Zusammenhang mit der Entwicklung höher organisierter Lebewesen eine Steigerung des Umfangs der Enzymausrüstung ergeben. An den für grundlegenden Reaktionen des Zellstoffwechsels wichtigen Enzymen sind dabei z.T. beträchtliche Veränderungen in der Aminosäureanordnung eingetreten, wobei Enzyme ihre funktionellen Eigenschaften verändert oder beibehalten haben. Die einzelnen Zellen verfügen jeweils über eine Ausrüstung von etwa 1000-2000 verschiedenen Enzymen (LÖFFLER et al., 2001). Die Bedeutung der Enzyme besteht darin, dass sie sich mit den jeweiligen Substraten verbinden und durch Herabsetzung der Aktivierungsenergie den Ablauf der Umsetzungen in mehr oder weniger starkem Umfange beschleunigen.

Annahmen von Störungen im neuromuskulären System bei Grätscherferkeln, ließen Analysen der Aktivitäten von Adenosintriphosphatasen (ATPasen) in verschiedenen Abschnitten des peripheren und zentralen Nervensystem von erkrankten Ferkeln im Hinblick auf die Klärung der Ätiologie und Pathogenese des Ausgrätschsyndroms von Interesse zu sein (LEO et al., 1986).

Bei histochemischen Untersuchungen von LUKAS et al. (1978) wurde nachgewiesen, dass in den Muskelfasern von Muskeln der Hinterextremitäten von erkrankten Ferkeln niedrigere ATPase Aktivitäten als bei Gesunden vorliegen.

Im Nervensystem werden verschiedene ATPasen gefunden:

Mg-ATPase kommt in Membranen aller tierischer Zellen und im Nervengewebe vor. Zu ihren Funktionen zählen die Proteinphosphorylierung, eine Myosin-ATPase ähnliche Funktion, synaptische Transmission und der intraaxonaler Transport.

Schlüsselenzyme der Nervengewebe, Membranen und Muskelfasern sind die Natrium- und Kalium-ATPase. Diese sind verantwortlich für das gekoppelte Na- und K-Ionen-transportsystem als Voraussetzung der bioelektrischen Erregbarkeit.

Die Ca-ATPase spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Ca-Ionen Gehaltes. Änderungen in der cytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration haben Auswirkungen auf die Kontraktionskinetik.

Untersuchungen von LEO et al. (1986) zeigten, dass die ATPase-Aktivitäten im letzten Drittel der Trächtigkeit stark ansteigen, eine Tatsache, die für die Ausreifung des Gehirns notwendig

ist. Der Anstieg in der Aktivität der ATPasen ist bei Grätscherferkeln im wesentlichen gleich wie bei gesunden Ferkeln. Eine Ausnahme macht die signifikant verminderte Aktivität der Ca-ATPase im Homogenat aus dem Halsteil des Rückenmarkes von Ferkeln mit einer Körpermasse von weniger als 1000g. Die verminderte Aktivität der Calcium-ATPase im Rückenmark von Grätscherferkeln kann genetisch bedingt sein (LEO et al., 1986). Die Calcium-ATPase ist für die Regulation des Ca-Gehaltes in den Synapsen notwendig. Bei Eingang eines bioelektrischen Signals in den präsynaptischen Anteil der motorischen Endplatten gehen verstärkt Ca-Ionen in diesen über und fördern die Freisetzung von Acetylcholin.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass junge Tiere über beträchtliche Fähigkeiten zum kompensatorischen Wachstum verfügen (LIEBERT et al., 1983) und der Reversibilität der Veränderungen bei Grätscherferkeln können die erhöhten Aktivitäten der ATPasen in den peripheren Nervenabschnitten von Grätscherferkeln als Ausdruck gesteigerter bioelektrischer Prozesse sowie erhöhter Stoffwechselprozesse zur Beseitigung einer gewissen Retardierung der Reife des neuromuskulären Systems bei Grätscherferkeln gewertet werden. Auf eine mögliche Retardierung der Reifung des Nervensystems bei Grätscherferkeln weisen unter anderem WITTNER et al. (1982) hin, die Untersuchungen zur Aktivität der Acetylcholinesterase und Cholinacetyltransferase im Gehirn und in der Muskulatur von Grätscherferkeln vorgenommen haben. Im Zusammenhang mit der gesteigerten Aktivitäten der ATPasen in den peripheren Nerven sind die Ergebnisse der Untersuchungen von ROZMANOVA (1966a, b) und ROZMANOVA u. PALLADIN (1966) an sich regerierenden peripheren Nerven nach operativer Durchtrennung interessant. Von diesen Autoren wurden große Steigerungen der Aktivität der Mg-ATPase im Verlaufe der Regenerationphase der geschädigten Nervenabschnitte beschrieben. Die Veränderungen der Aktivitäten der Enzyme werden als sekundäre Erscheinung des Krankheitsbildes diskutiert, wobei für keinen genannten Ursachenkomplex durchgehend eindeutige Befunde vorliegen.

Als muskeltypische Enzyme sind die Creatinkinase (CK, EC 2.7.3.2), die Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) sowie die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) zu nennen. Die Lactatdehydrogenase ist ein Tetramer aus 35 kDa-Untereinheiten. Es gibt zwei

unterschiedliche Arten von Polypeptidketten, welche durch Kombination 5 Typen von Tetrameren (Isoenzymen) bilden: M_4 , M_3H , M_2H_2 , MH_3 und H_4 .

Der Begriff Isoenzyme wurde zunächst pragmatisch für solche Enzyme verwendet, die die gleiche Reaktion katalysieren und durch eine physiko-chemische Methode trennbar sind.

Die Trennbarkeit von Enzymen, die die gleiche Reaktion katalysieren, kann unterschiedliche Ursachen haben:

- sie werden an nichtallelen Genorten codiert,
- Unterschiede in den Allelen eines Gens bedingen trennbare Enzymaktivitäten (Allelozyme),
- es kann zur Ausbildung von homo- und heteropolymeren Enzymkomplexen kommen,
- posttranslationale Modifikation oder allosterische Interaktionen (Bindung an Liganden) führen zu stabilen oder semistabilen Veränderungen von Enzymen.

Das Synonym Isoenzym ist für diejenigen multiplen Formen eines Enzyms reserviert, deren Unterschiedlichkeit genetisch bedingt ist (Codierung an nichtallelen Genorten, Unterschiede in der Primärstruktur). Ein bestimmtes Muster an Isoenzymen ist charakteristisch für einen bestimmten Zelltyp, ein bestimmtes Entwicklungsstadium oder ein bestimmtes Organell.

Spezifische Profile bestimmter Isoenzyme weist auch die Lactatdehydrogenase im Herzmuskel und in der Skelettmuskulatur auf. Der letzte Schritt in der anaeroben Glykolyse wird durch die Lactatdehydrogenase katalysiert. Lactat als Endprodukt wird bei der Muskelaktivität über den Blutkreislauf zur Leber transportiert, wo es zur Gluconeogenese verwendet wird. Eine erhöhte Aktivität der CK im Überstand der Homogenate aus der Muskulatur der Hintergliedmaßen von Grätscherferkeln ist bereits von PATTERSON et al. (1969) festgestellt worden. Dieser Befund weist auf gewisse Unterschiede in der Synthese bzw. in der Geschwindigkeit des Abbaus der ASAT und der CK in einzelnen Muskeln der Hinterextremitäten bei gesunden Ferkeln und Grätscherferkeln im geburtsnahen Zeitpunkt hin, die genetisch bedingt sein können. Die ASAT hat die Funktion der Regulation des Gehaltes an Aspartat in den Muskelfasern. Die CK ist für die Bereitstellung von

energiereichem Phosphat aus Creatinphosphat für die Bildung von ATP bei erhöhter Aktivität verantwortlich.

Bei Untersuchungen von KOLB et al.(1981) konnte für die CK eine erhöhte Aktivität festgestellt werden, wobei TUCEK et al. (1985) keinerlei Unterschiede für CK und LDH-Aktivitäten im Vergleich von gesunden und erkrankten Ferkeln fanden. HILLERT et al. (1992) dagegen deckten bei ihren Untersuchungen eine gesteigerte CPK-Aktivität im Überstand von Homogenaten der Hinterextremitätenmuskulatur auf.

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu verschiedenen Aspekten des Ausgrätschsyndroms beim Saugferkel in den vergangenen Jahren sind weder der Pathogenesemechanismus noch der Vererbungsmodus eindeutig geklärt. Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert kein einheitliches Bild der Befunde bei betroffenen Ferkeln auf morphologischem und biochemischen Gebiet.

2.2. Genetische Ursachen von Erbkrankheiten

2.2.1. Grundlagen

Die Gesamtheit aller sichtbar erscheinenden und erfaßbaren Merkmale eines Organismus wird als Phänotyp bezeichnet. Dieser resultiert aus der Wirkung des Genotypes des Organismus sowie der Wechselwirkung mit dessen Umwelt als Ergebnis umfassender untereinander verknüpfter Reaktionsketten.

Die Grundlage der Merkmalsausprägung liegt in den Genen, die in ihrer eigenen Sequenz die Informationen für die Proteine und darausfolgend für den Bau und den Stoffwechsel der Zelle tragen.

Fehler in der Replikation oder Rekombination können Mutationen hervorrufen, die die Expression oder die Funktion von Proteinen verändern.

Veränderungen am Organismus können modifikatorischer oder mutativer Natur sein. Um die Ursache abzuklären sind zwei Arbeitsschritte erforderlich:

- Überprüfung, ob diese Veränderungen in der Folgegeneration konstant auftreten,
- Klärung der genetischen Grundlagen der abweichenden Veränderung (GOTTSCHALK, 1994).

Tritt die Veränderung bei den Nachkommen nicht wieder auf, so waren die Anomalien modifikatorisch bedingt. Bleiben sie bei den Nachkommen erhalten, so sind eine oder mehrere Mutationen in einem oder mehreren Genen wahrscheinlich.

Genmutationen sind auf Störungen der Nukleotidsequenz zurückzuführen. Für ihren Nachweis sind aufwendige Arbeitsmethoden notwendig. Durch diese vorliegenden Veränderungen wie Einzelbasenpolymorphismen (Punktmutationen: Transition, Transversion), Insertionen, Deletionen sowie Duplikationen von einem oder mehreren Nukleotiden kann die Qualität und Menge des Genproduktes beeinflusst werden.

Das von JACOB und MONOD (1971) zu Beginn der 60er Jahre entwickelte Modell erklärt zelluläre Regulationsvorgänge auf der Ebene der Transkription. Hierbei unterscheidet man zwischen Struktur- und Regulatorgenen.

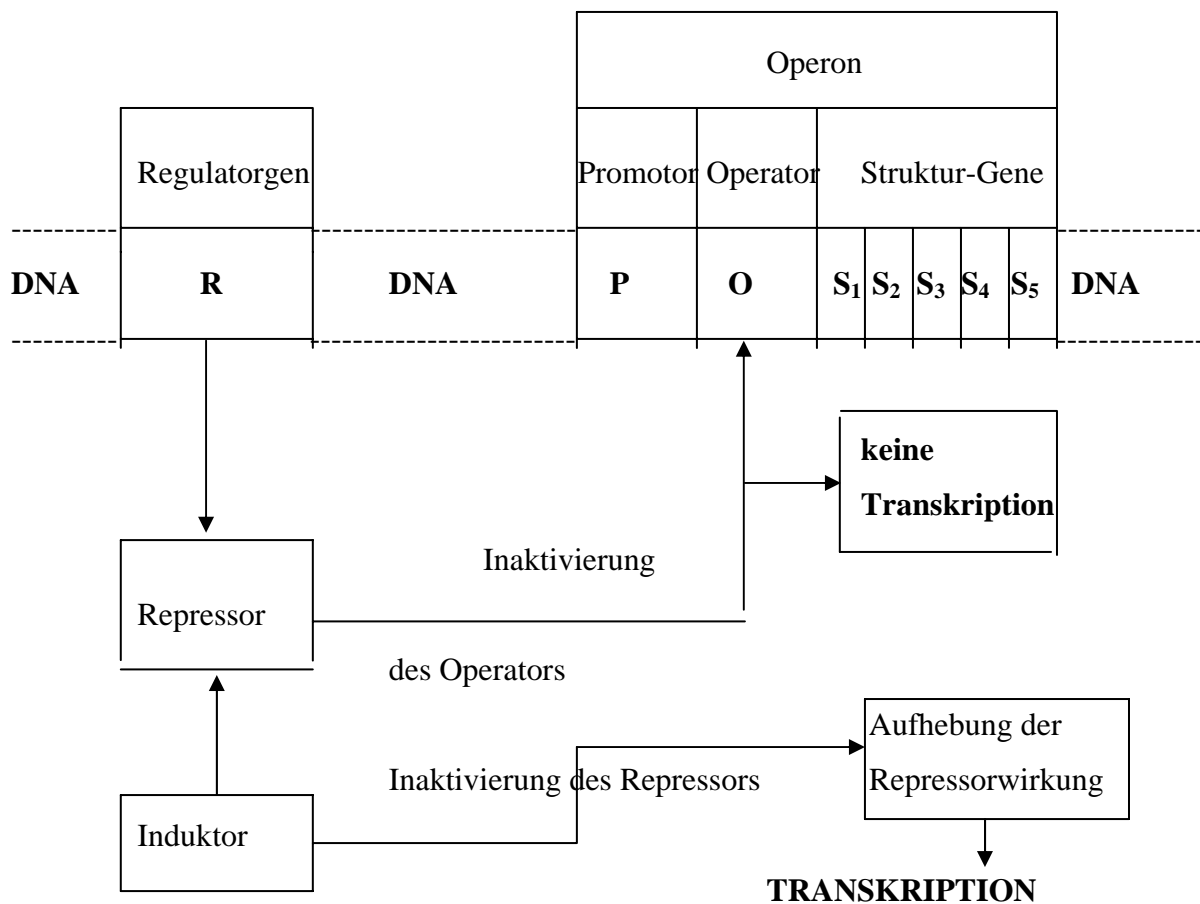


Abbildung 3: Regulation der Genaktivität nach dem Jacob-Monodschen Modell

(R – Regulatorgen; P- Promotor; O – Operator; S – Strukturgene)

Die Merkmalsausprägung untergliedert man in zwei Abschnitte – die primäre und die sekundäre Genwirkung.

Bei der primären Genwirkung gibt es zwei Stufen. Dabei umfaßt die erste Stufe die Transkription, in dessen Ergebnis `messenger RNA` (mRNA) als Transkript der DNA produziert wird. Die Translation, als zweite Stufe, übersetzt die Information der `messenger RNA` (Nukleinsäuresequenz) in eine Polypeptidkette (Aminosäuresequenz), welche das Genprodukt darstellt (RIEGER et al., 1976).

Die Gesamtheit aller Gene des Organismus wird als Genom bezeichnet. Die Größenordnung liegen beim Säuger genom bei 3×10^9 Basenpaaren (GOTTSCHALK, 1994).

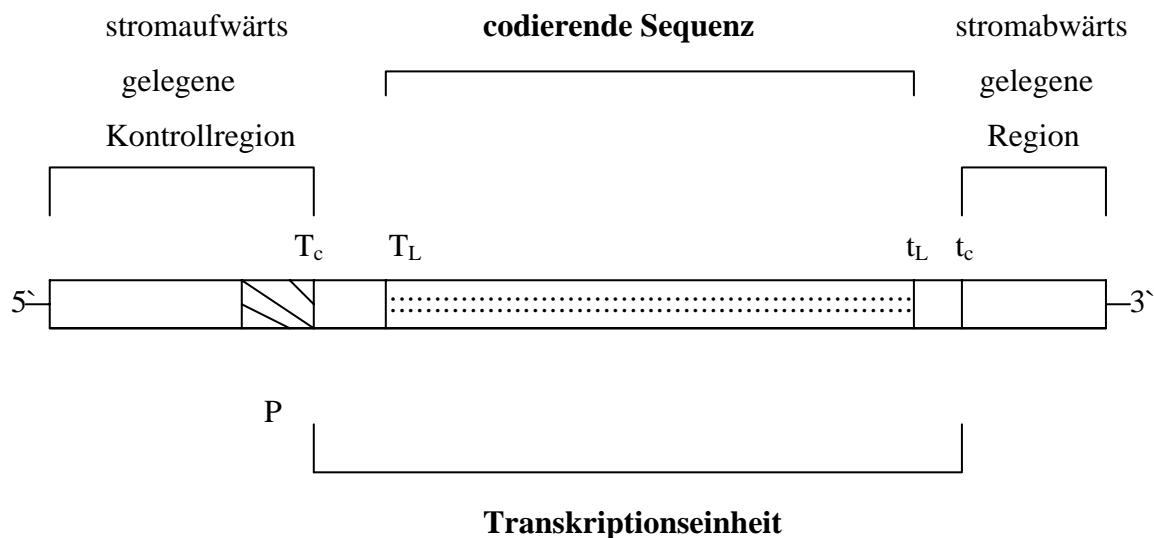


Abbildung 4: Organisation eines Gens

Die Transkriptionseinheit, definiert durch das Transkriptionsstart – (T_c) und ein Transkriptionsstoppsignal (t_c), bildet ein RNA-Molekül. Innerhalb der Transkriptionseinheit liegen - zwischen Translationsstart- (T_L) und Translationsstoppsignal (t_L) – die codierenden Sequenzen. Die Kontrollregion stromaufwärts enthält außer dem Promotor (P), an den die RNA-Polymerase bindet, noch andere regulatorische Elemente wie Operatoren. (NICHOLL, 1995)

Ein Gen ist der Abschnitt auf dem DNA-Strang, der für die Bildung der primären Transkripteinheit Voraussetzung ist. Dazu gehören der nichttranskribierte 5'-Promotorbereich, die transkribierten, aber nicht translatierten 5'- und 3'- Bereiche (UTR) und der eigentliche transkribierte Strukturgenbereich, der aus den translatierten Exon- und den nichttranslatierten Intron – Regionen besteht (SCHWERIN, 2000).

Bei doppelsträngiger DNA ist die genetische Information in jedem der beiden Stränge gespeichert.

Die sekundäre Genwirkung beinhaltet die Entstehung des Proteins im Zusammenspiel der physiologischen Prozesse. Es handelt sich dabei um Stoffwechselprozesse, wie Bildung komplexer Proteinstrukturen aus verschiedenen Untereinheiten, enzymatische Wirkungen von Proteinen, komplexe Wirkung von Metaboliten, die nach Synthese der primären Genprodukte die Merkmalsausprägung signifikant beeinflussen.

Unterschiede im genetischen Informationsmaterial können zu verschiedenen phänotypischen Merkmalen sowie verschiedenen Stufen der Merkmalsausprägung führen.

Verschiedene Zustandsformen des gleichen Gens, die in unterschiedlichen Merkmalsausprägung resultieren, bezeichnet man Allele.

Die Ausbildung von erblich bedingten Missbildungen und Krankheiten wird häufig mit durch Umweltfaktoren beeinflusst. Wenn Tiere von ihrem Genotyp her den Erbfehler phänotypisch zeigen sollten, mit einer Wahrscheinlichkeit (>0) jedoch phänotypisch normal sind, spricht man von unvollständiger Penetranz. Eine andere Modellvorstellung geht davon aus, dass ein Tier erst ab einem bestimmten Schwellenwert (genetischer Effekt + Umwelteffekt) die Missbildung oder Krankheit phänotypisch zeigt. Um beurteilen zu können, welcher Erbgang die beobachteten Fälle am besten erklärt, sind umfangreiche und komplexe Untersuchungen notwendig (= Segregationsanalyse). Es ist aus diesen Gründen im allgemeinen äußerst schwierig, den genauen Erbgang eines Defektes oder einer Krankheit festzustellen. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von Missbildungen und Erkrankungen sowie den vermuteten Erbgang.

Tabelle 1 Auswahl von Missbildungen und Erkrankungen beim Schwein

(ergänzt nach OLLIVIER und SELLIER, 1982)

| <i>Missbildung oder Erkrankung</i> | <i>Phänotyp</i> | <i>Vermuteter Erbgang</i> |
|------------------------------------|--|---|
| Epitheliogenesis imperfecta | Hautstellen mit fehlender Epidermis, semiletal | monogen rezessiv |
| Zitzenanomalien | veränderte Zitzenformen | polygen |
| Hydrocephalus | Wasserkopf, letal | rezessiv |
| Brachignathia inferior | Unterkieferverkürzung | rezessiv |
| Agnathia | fehlender Unterkiefer, letal | rezessiv |
| Syndactylie | Einzehigkeit | dominant |
| Polydactylie | Vielzehigkeit | dominant |
| Congenitaler Tremor | Zitterkrankheit, semiletal | unbekannt |
| Congenitale Ataxie | Bewegungsstörungsemiletal | rezessiv |
| Porphyrie | Übermäßige Porphyrin Ablagerung in Knochen und Zähnen | dominant? |
| Bananenkrankheit | Akute Rückenmuskelnekrose | rezessiv |
| Maligne Hyperthermie Syndrom | Stressanfälligkeit | rezessiv |
| Hämolytische Krankheit | Blutgruppen-Antikörperreaktion, letal | dominant |
| Atresia ani | Afterlosigkeit | 2 Erbgänge möglich: - rezessiv u. unvollständige Penetranz - dominant |
| Hernia scrotalis | Hodensackbruch | gemischter Erbgang mit einem Hauptgenort |
| Hernia umbilicalis | Nabelbruch | polygen |
| Kryptorchismus | Binnenhodigkeit | rezessiv |
| Hypercholesterolämie | Cholesterolüberschuss im Blut | unbekannt |
| Ödemkrankheit und Ferkeldiarrhoe | Erhöhte Anfälligkeit für Ödemkrankheit und Ferkeldurchfall | unbekannt |

Erbkrankheiten mit einfachen Erbgang wurden in Tabelle 1 diskutiert. Als Beispiel ist hier die Hämophilie genannt. Homozygot normale Tiere sind gesund und vererben die Krankheit nicht weiter. Bei rezessivem Erbgang sind heterozygote Tiere gesund jedoch Träger der Erbkrankheit. Lassen sich heterozygote Träger ermitteln, ist eine effiziente Selektion gegen die Erbkrankheit möglich.

Die Anfälligkeit gegenüber den meisten Krankheiten wird im allgemeinen nicht über einfache Erbgänge vererbt. Krankheitserreger werden häufig sowohl durch spezifische (z.B. Antikörper) wie auch unspezifische (z.B. Macrophagen) Abwehrmechanismen bekämpft. Man muss bei der Krankheitsresistenz von einem polygenen Merkmal ausgegangen werden, das von vielen Loci gesteuert und von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst wird.

LUNDEHEIM (1988) untersuchte die Krankheitsanfälligkeit von stationsgeprüften Schweinen in Schweden. Durchfall und Erkrankungen der Atemwege waren am häufigsten. Es wurden Rassen- und Geschlechtsunterschiede in der Krankheitsanfälligkeit festgestellt. Für die nach der Schlachtung erfassten Befunde wurden folgende Heritabilitäten geschätzt:

- Chronische Pneumonie $h^2 = 0,23$
- Pleuritis $h^2 = 0,08$
- Rhinitis $h^2 = 0,13$

Eine Selektion gegen diese Krankheiten scheint möglich zu sein (LUNDEHEIM, 1988).

Neben Krankheitsresistenz und genetisch bedingten Missbildungen werden beim landwirtschaftlichen Nutztier eine Anzahl von merkmalsassoziierten Genvarianten beschrieben. Für einige dieser Merkmalsausprägungen können schon gendiagnostische Tests verwendet werden.

Aufbauend auf den rapiden Fortschritten in der Genomanalyse bei Mensch und Maus sind auch bei den landwirtschaftlichen Nutztieren eine Anzahl von merkmalsassoziierten Genvarianten beschrieben wurden.

Die Autoren können aber einen Einfluß von weiteren Loci und Majorgenen nicht ausschließen. Zusammenfassend muß festgestellt werden, dass die bisherigen Erkenntnisse noch keine Aussage zum Pathogenesemechanismus des Ausgrätschsyndroms zulassen und der Erbgang nach wie vor ungeklärt ist.

2.2.3. Molekulargenetische Methoden zur Untersuchung von Erbkrankheiten

Unter den Begriff Genomanalyse fallen alle Untersuchungen, die zum Verständnis des Aufbaus und der Funktion des Genoms beitragen. Im engeren Sinne befasst sich die Genomanalyse mit zytogenetischen und molekulargenetischen Analysen, die letztendlich der genetischen Beschreibung eines Phänotyps dienen. Die aus den Analysen resultierenden Daten werden in Gen- und Markerkarten zusammengefasst. Solche Karten präsentieren Gene und anonyme Marker in linearer Abfolge auf den Chromosomen. In der Tierzucht und der veterinärmedizinischen Diagnostik sind vor allem Loci von Interesse, die polymorph sind, denn nur diese lassen einen direkten Bezug zu einem Phänotyp zu.

Qualitative und quantitative Merkmale charakterisieren den Phänotyp eines Individuums. Die qualitativen Merkmale kennzeichnen sich durch eine Beeinflussung durch eines oder wenige Gene aus. Umweltfaktoren spielen hierbei eine untergeordnete Rolle. Als Merkmale zählen hier zum Beispiel Erbfehler und Haut- und Haarfarbe. Werden diese Genvarianten klar identifiziert, ist eine direkte Selektion möglich.

Die meisten der für die wirtschaftliche Nutzung der Tiere wichtigen Merkmale sind aber quantitativ determiniert. Die kontinuierliche Variation dieser Merkmale werden durch zahlreiche Gene mit unterschiedlich großen Einzeleffekten verursacht. Zum anderen kommt der Faktor Umwelt hier zum Tragen.

Die strukturelle Genomanalyse umfaßt die gesamte Genomsequenzierung. Nach dem heutigen Stand der Forschung sind inzwischen die Genome von 8 Eukaryonten, zum Beispiel bei Mensch und Maus fast vollständig entschlüsselt. Untersuchungen zur Genomanalyse beim Schwein haben bereits begonnen. Der Zeitpunkt, wann die Genomentschlüsselung bei den landwirtschaftlichen Nutztieren abgeschlossen ist, ist noch nicht bekannt.

Die funktionelle Genomanalyse untersucht demgegenüber den Expressionsstatus eines Genoms (DAVID et al., 2000).

Zwei Ansätze der Genomanalyse kommen für die Identifizierung der an der Merkmalsausprägung beteiligten genetischen Varianten in Frage.

Einerseits ist der **Markeransatz** zu nennen. Unter molekulargenetischen Markern versteht man Polymorphismen auf der Ebene der DNA, die in verschiedene Klassen eingeteilt werden können und zur Definition des Genotyps eines Organismus beitragen (BEUZEN et al., 2000). Typ I-Marker repräsentieren Polymorphismen, die direkt in Genen lokalisiert sind. Typ II-Marker stellen dagegen Sequenzvariationen in nichtkodierender DNA dar. Die wichtigsten Methoden zur Darstellung der Marker beider Typen sind das DNA – Fingerprinting, zufällig amplifizierte polymorphe DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD), die Analyse von amplifizierten Fragmentlängen – Polymorphismen (amplified fragment length polymorphism, AFLP), die Analyse von Restriktionslängen – Fragment – Polymorphismen (restriction fragment length polymorphism, RFLP), die Verwendung von Mikrosatelliten, sowie neue Verfahren zur Detektion von Einzelpaar - Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP).

Die sogenannte „repetitive DNA“ stellt eine wesentliche Quelle genetischer Variation dar und eignet sich dadurch als genetischer Marker.

Grob eingeteilt sind zwei Arten:

- die dispersed-sequence elements
 - >1000 Basepaare = long interspersed elements (LINEs)
 - < 500 Basenpaare = short interspersed elements (SINEs)
- die tandem repeats zu nennen.

Tandem repeats sind Wiederholungen eines kurzen Sequenzmotivs. Diese Sequenzen werden auch als Satelliten bezeichnet. Die Zahl der Tandem-Kopien innerhalb der Satellitenloci variieren, so daß mit Satellitensequenzen als DNA-Sonden hochvariable Fragmentmuster erhalten werden, was als Information genetischer Marker in der Nutztierzucht angewendet

wird (SCHWERIN, 1992). Nach der Anzahl der Wiederholungen werden die Satelliten in Makro-, Midi-, Mini- und Mikrosatelliten eingeteilt.

Ein weiterer Ansatz wird als **Kandidatengenansatz** bezeichnet. Kandidatengene sind Gene, von denen man aufgrund der zur Verfügung stehenden Informationen vermuten kann, dass sie das untersuchte Merkmal beeinflussen.

Die entsprechend kodierenden Gene werden als potentielle Kandidatengene auf merkmalsassoziierte Varianten untersucht (SCHWERIN et al., 1995). Man unterscheidet funktionelle und positionelle Kandidatengene (SOLLER & GENIZI, 1998).

Positionelle Kandidatengene

Bei den positionellen Kandidatengen handelt es sich um Gene, die schon in kartierten QTL (quantitative trait loci) nachzuweisen sind. Mit Hilfe der physischen Genkarte des Menschen konnten schon eine Reihe von Kandidatengen identifiziert werden. Ein Beispiel hierfür wäre bei der Schweinerasse Hampshire die dort vorhandene RN⁻ Mutation. Von MILAN et al. (2000) konnte dieser RN-Locus schon 1996 dem SSC15 zugeordnet werden. Diese Mutation ist verantwortlich für die ungenügende Eignung des Muskelfleisches beim Hampshire zur Kochschinkenherstellung. Diese Tiere besitzen einen hohen Glycogengehalt im Muskel. Als Resultat langjähriger Forschung gelang es durch Sequenzierung von BAC-Fragmenten (bacterial artificial chromosome) dieser Region in einer Gesamtlänge von > 2,5 Mio. Basenpaaren ein Polymorphismus bei einem vom Schwein noch unbekanntem Gen zu identifizieren (AMP aktivierte Proteinkinase, gamma Untereinheit; PRKRAG3; MILAN et al., 2000).

Funktionelle Kandidatengene

Hier handelt es sich um Gene deren Wirkung im vorhandenen Phänotyp erkennbar sein kann. Dabei können Erfahrungen von anderen Spezies untereinander verglichen werden und so den zu untersuchenden Probanden zugeordnet werden. Wo das Gen lokalisiert ist, muss nicht bekannt sein.

Bei den landwirtschaftlichen Nutztieren konnten anhand von Kandidatengenanalysen eine Vielzahl von Zusammenhängen zwischen genetischer Varianz und Leistungsmerkmalen erkannt werden (FUJII et al., 1991, TAYLOR et al., 1998).

In Tabelle 3 sind einige schon in der züchterischen Selektion benutzten Polymorphismen in Kandidatengenomen aufgeführt.

Tabelle 3 Ausgewählte Kandidatengene für allgemeine und spezielle Leistungsmerkmale beim Schwein (MAAK, 2001)

| Merkmalskomplex | | |
|---|-------------------------|--|
| Merkmal | Gensymbol | Referenz |
| Fleischqualität MHS-Empfindlichkeit „Acid Meat“ | RYR1 PRKRAG3 | FUJII et al. (1991) MILAN et al. (2000) |
| Fruchtbarkeit Wurfgrösse | ESR PRLR | ROTHSCHILD et al. (1996) VINCENT et al. (1997) |
| Mast-und Schlachtleistung Intramuskuläres Fett Futteraufnahme, Verfettung | HFABP AFABP MC-4R | GERBENS et al. (2000) GERBENS et al. (2000) KIM et al. (2000) |
| Weitere Merkmale Haut-/Fellfarbe Haut-/Fellfarbe Ferkeldurchfall (E.coli F 18) | KIT MC-1R FUT-1 | MOLLER et al. (1996) KIJAS et al. (1998) MEIJERNIK et al. (1997) |

Zur Suche nach Kandidatengenomen existieren verschiedene Methoden. Eine davon ist die Differential Display Reverse Transkriptase PCR (DDRT-PCR). Erstmals wurde dieses Verfahren 1992 von LIANG & PARDEE dokumentiert. LIANG identifizierte 1992 Gene, die differentiell in gesunden und Krebszellen exprimiert wurden.

Mit einem oder zwei zufällig gewählten Primern wird eine PCR gestartet, um von einer DNA oder RNA eine PCR-Fingerprinting Analyse zu erstellen. Ist die Temperatur niedrig genug, lagert sich der Zufallsprimer, an die Stellen in der Matrize, die am besten zu ihm passen. Man kann dann den neu synthetisierten Strang und die entsprechenden Produkte mit demselben oder einem anderen Primer amplifizieren. Bei einigen Primern unterscheidet sich das Spektrum der Produkte, die von verschiedenen Matrizen gebildet werden, nicht, bei anderen Primern findet man dagegen Unterschiede. Die polymorphen Differenzen in den Bandenmustern des Gels können dann für die Genkartierung sowie phylogenetische oder epidemiologische Untersuchungen verwendet werden.

Auf die gleiche Weise kann man mit einer zufällig gestarteten PCR einer RNA mRNA-Transkripte nachweisen und klonieren, die in unterschiedlicher Konzentration vorliegen und beispielsweise die Unterschiede in der Genexpression von Geweben und Zelllinien widerspiegeln. Bei dieser Technik wählt man zufällige Primer mit einer Länge von 10 Basenpaaren und verankerte Oligo(dT)-Primer, um anhand einer Matrize aus dem ersten c-DNA-Strang zufällige Amplikone zu erstellen (BAUER et al., 1993).

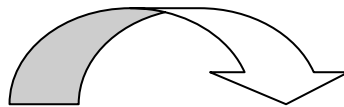
Die Primerpaare für die RNA-Amplifikation wurden so gewählt, dass jedes Paar 50 bis 100 mRNAs erzeugen kann. Diese Größenordnung ist notwendig, um einen deutlichen Nachweis auf einem Sequenziergel zu erbringen. Die 3' Primer sind so gewählt, daß sie an den poly-A-Ende der eukaryotischen mRNAs binden. Zwei an den oligo-dT-Primer angehängte Basen ergeben seine Spezifität. Das heißt, es entstehen unterschiedliche, aber zahlreiche cDNAs (LIANG & PARDEE, 1992).

Einen zweiten Primer (arbitrary Dekamer-Primer) benötigt man anschließend zur PCR-Amplifikation der umgeschriebenen cDNAs. Es müßten 20 arbitrary Dekamer-Primer mit den entsprechend 12 möglichen oligo-dT-Primer ausreichen, um alle mRNAs zu amplifizieren, die im untersuchten Gewebe vorhanden exprimiert sind.

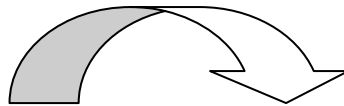
Für die elektrophoretische Auftrennung sind 4 bis 6 %ige nicht-denaturierende Polyarylamidgelle geeignet. Hier können doppelsträngige Fragmente als klare Einzelbanden getrennt werden (BAUER et al., 1993).

In dem Schema ist der Ablauf der DD/RT-PCR aufgezeigt:

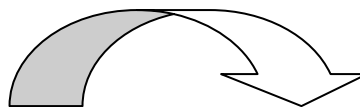
RNA-Isolierung aus Gewebe des Probanden



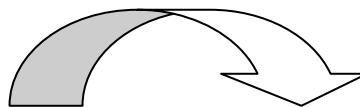
Reverse Transkription mit T₁₁XX-Downstream Primern



Produkt = cDNA-Populationen



Amplifikation mit zufällig ausgewählten Upstream Primern



Darstellung der Amplifikate aus den gewählten Primerkombinationen auf einem 4 %igen Polyacrylamidgel (Silberfärbung)

Um neue Kandidatengene zu identifizieren sind folgende weitere Analysen Voraussetzung:

- Eluierung von differentiell exprimierten Banden aus dem Gel
- Reamplifikation mit den entsprechenden Primern
- Klonierung der rekombinierten Fragmente
- Sequenzierung der klonierten Fragmente
- Prüfung auf Homologien gegen Sequenzen aus Datenbanksystemen.

Diese beschriebene Methode ist eine Alternative zur subtraktiven Hybridisierung. Der Vorteil besteht hier in der direkten Gewinnung der entsprechenden Genfragmente aus dem Gel und deren folgender Weiterbearbeitung.

NISHIO et al. (1994) zeigte vier entscheidende Vorteile des mRNA `differential display` :

- a) Es ist keine poly-A-mRNA notwendig, sondern nur geringe Mengen an Gesamt-RNA erforderlich.
- b) Die Ergebnisse sind schnell verfüg- und auswertbar.
- c) Es ist einfach, die Genexpression unter veränderten Bedingungen auf einem Gel zu untersuchen.
- d) Die Sensivität ist aufgrund der Amplifikation der Differenzen mittels PCR sehr hoch.

Erfolge der Anwendungen in Bereichen der Humangenetik zogen auch zunehmend den Einsatz in der Genomanalyse landwirtschaftlicher Nutztiere nach sich (LI et al., 1997; CLOUSCARD-MARTINATO et al., 1998; WHITE & DAUNCEY, 1999; PONSUKSILI et al., 2000).

In der eigenen Arbeit zur Identifizierung von Kandidatengenem zum Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel wurde die hier beschriebene Methode angewandt.

Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen ist es, die Pathogenese des Syndroms „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ zu erklären und einen genetischen Hintergrund darzustellen. Die Identifizierung potentieller Kandidatengene für das Syndrom stand dabei an erster Stelle.

Folgende Komplexe wurden dazu bearbeitet:

1. Identifizierung potentieller Kandidatengene für das Grätschsyndrom mit der DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transkription-PCR), gegebenenfalls Nachweis von DNA-Polymorphismen,

2. Erfassung von biochemischen Kennwerten verschiedener Parameter von Enzymaktivitäten, die Stoffwechsel- und Regulationssysteme beeinflussen
 - Creatinphosphokinase (CPK)
 - Lactatdehydrogenase (LDH) sowie deren Isoenzyme,
3. vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen des *Musculus biceps femoris* bei gesunden und erkrankten Ferkeln,
4. Anpaarungsversuche: Erstellung einer F₂ – Population mit dem Ziel der Überprüfung der erreichten Ergebnisse aus den Kandidatengenuntersuchungen.

3. Material und Methoden

3.1. Tiermaterial

Für die eigenen Untersuchungen wurden 1 Stunde post mortem Gewebeproben aus dem *Musculus biceps femoris* von je einem Vollgeschwisterpaar mit dem Ausgrätschsyndrom sowie einem Vollgeschwisterpaar, was nicht von dieser Erscheinung betroffen war, entnommen. Bei beiden Paaren handelte es sich um je ein männliches und weibliches Tier. Die Geburtsgewichte variierten zwischen 950 und 1450 g. Alle Tiere wurden am selben Tag geboren. In dem Wurf des gesunden Probandenpaares waren keine Grätscher unter den Wurfgeschwistern. In dem Wurf des erkrankten Paares traten noch weitere Grätscherferkel auf.

Die entnommenen Gewebeproben wurden sofort in flüssigen Stickstoff überführt und danach bei -80°C gelagert.

3.2. Identifizierung von Kandidatengenomen mit der Methode der Differential Display/Reverse Transkriptase-PCR

3.2.1. RNA-Isolierung

Zunächst wurden zur RNA-Isolierung Systeme von zwei Anbietern verwendet, die nach Herstellerangaben optimal für RNA-Gewinnung aus der Skelettmuskulatur geeignet sind (ToTALLY RNA Kit, Ambion, Austin, USA; QIAGEN RNA/DNA System, QIAGEN, Hilden). Die beiden verwendeten Präparationsmethoden erbrachten keine für die nachfolgenden Anwendungen ausreichende Qualität. Aus diesem Grund wurde eine RNA-Isolierung durch CsCl – Gradienten-Zentrifugation im Labor des Forschungsbereiches Molekularbiologie des FBN Dummerstorf vorgenommen. Folgende Schritte sind Bestandteil des Verfahrens:

Die tiefgefrorenen Muskelproben werden in einen vorgekühlten und mit flüssigen Stickstoff gefüllten Mörser pulverisiert. Dabei wurde beachtet, dass die Proben beim Vorgang des Pulverisierens nie auftauen. 500 mg dieses Pulvers werden in 50 ml sterile Falcon - Probegefäße überführt. Für die anschließende Homogenisation (Ultraturrax, Baudelin, Berlin)

erfolgt die Zugabe von 7,5 ml Homogenisationspuffer (Anhang). Nach Vorkühlen der Zentrifuge wurde das Homogenat 10 min bei 2300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß abpipettiert. Den Überstand schichtete man danach auf ein vorher mit Homogenisationspuffer gespültes, mit 3,5 ml CsCl befülltes Zentrifugenröhrchen. Bei diesem Vorgang wurde darauf geachtet, dass keine Durchmischung erfolgte. Für ca. 16 Stunden wurden die Proben bei 20°C und 450 000 x g zentrifugiert. Danach war nach Verwerfen des Überstandes ein durchsichtiges Pellett mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm sichtbar. Damit bei der Entnahme des Pelletts dieses nicht mit zurückgebliebenen Tropfen des Überstandes in Berührung kam, wurde das Röhrchen kurz oberhalb des Bodens mit einem glühenden Skalpell gekürzt. Somit konnte das Pellett leicht in ein neues Falcon-Probengefäß überführt werden. Dort wurde es in 1ml DEPC-behandeltem Wasser (Diethylpyrocarbonat 0,1% in H₂O) gelöst.

Bevor sich eine nächste Zentrifugation 5 min bei 1500 x g anschließt, wird ein Volumenanteil PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 25:24:1; Roth, Karlsruhe) zugegeben und gut durchmischt. Mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat und 2,5 % absolutem Ethanol wird der Überstand versetzt und abermals durchmischt. Nach einem Fällungsschritt bei – 20°C über 2 Stunden erhielt man die RNA pellettiert. Mit 70 %-igem Ethanol erfolgte ein Waschschriff des Pelletts mit Zentrifugation für 5 min bei 3200 x g. Anschließend wurde das Pellett getrocknet und 100 µl RNase-freies Wasser aufgenommen.

Die erreichte Reinheit der gewonnenen RNA wurde von 5 µl des Eluates mittels eines Elektrophoreselaufes sowie der Konzentrationsmessung mit einem Spektralphotometer kontrolliert. Die RNA war auf dem Gel als eine klare Doppelbande sichtbar.

Die Konzentration an Gesamt-RNA lagen bei den Proben zwischen 630 ng/µl und 1742 ng/µl (siehe Abbildung 5).

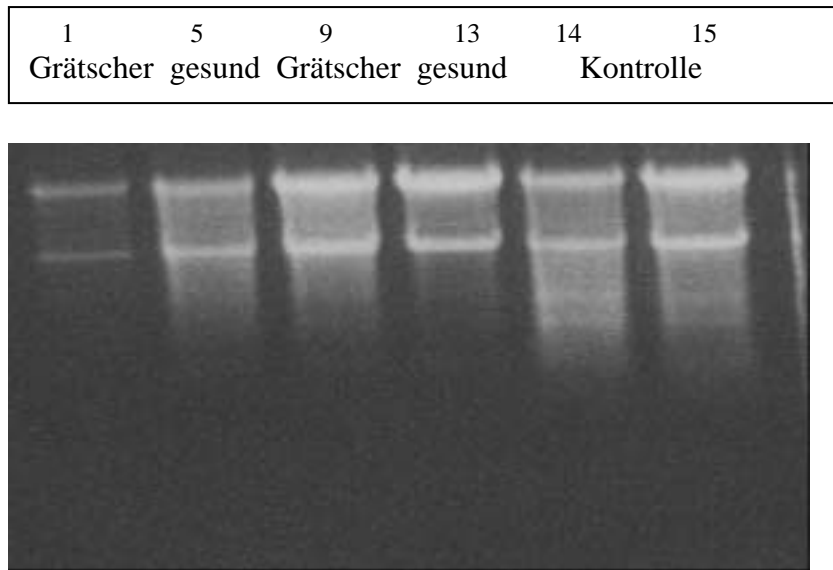


Abbildung 5: Gesamt-RNA aus dem *Musculus biceps femoris* (1, 5, 9, 13) und Kontrolle aus Lebergewebe (14, 15) (Präparation durch CsCl-Gradientenzentrifugation)

Die Gesamt-RNA wurde danach aliquotiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.2. Reverse Transkription (RT)

Die RNA wurde über die reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür kam ein Primersystem von Biometra (GenExScreen Kit; Biometra, Göttingen) zum Einsatz. Für die Optimierung des Ansatzes wurde die RNA auf eine Konzentration von 200 ng eingestellt. Bestandteile des Ansatzes waren 5 μM Primer D1-D12, 250 μM dNTPs, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 5 U RNase Inhibitor, 5 x Synthesepuffer und 50 U Expand Reverse Transkriptase.

Nach Verdünnung der RNA wurde folgende Reaktion angesetzt:

- 2 μl RNA (200 ng)
- 2 μl Downstream-Primer (D1-D12)
⇒ Inkubation 10 min bei 70°C .

Während der Inkubationszeit wurde ein Mastermix hergestellt. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils:

- 5 x RT-Puffer 4,0 µl
- DTT 2,0 µl
- dNTPs ATP 2,0 µl
 CTP 2,0 µl
 GTP 2,0 µl
 TTP 2,0 µl
- Reverse Transkriptase 1,0 µl
- RNase-Inhibitor 0,5 µl
- DEPC-H₂O 0,5 µl

in einem Volumen von 16 µl. Das Gesamtvolumen des Ansatzes ergab 20 µl. Alle Reaktionskomponenten (außer Primer und RNA) wurden von Roche (Mannheim) bezogen. Die Reaktionsansätze wurden für:

- 8 min bei Raumtemperatur
- 60 min bei 35°C
- 5 min bei 95°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase)

inkubiert.

Anschließend wurden 10 µl DEPC-H₂O zugegeben und es erfolgte eine Einlagerung bei –20°C.

3.2.3. Amplifizierung der cDNA

Die Transkriptionsreaktionen wurden mit 26 Zufalls-Primern (U1-U26) amplifiziert. Eine vollständige Analyse mit allen möglichen Primerkombinationen für 4 Tiere (4 x 12 x 26 = 1248) war nicht durchführbar. So wurden eine begrenzte Anzahl zufällig verschiedener Kombinationen von D-Primern und U-Primern ausgewählt.

Für diese PCR wurden 2 Masterrmixe (MM 1 und MM 2) hergestellt. Aus dem RT- Ansatz kamen 1 μl zum Einsatz. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem ExpandLong Template PCR System (Roche, Mannheim). Jeweils

⇒ MM1

| | | |
|------------------------------|-----|-------------------|
| • dNTPs | ATP | 0,5 μl |
| | CTP | 0,5 μl |
| | GTP | 0,5 μl |
| | TTP | 0,5 μl |
| • D-Primer | | 2,0 μl |
| • U-Primer | | 2,0 μl |
| • <u>DEPC-H₂O</u> | | 3,0 μl |
| | je | 9,0 μl |

⇒ MM2

| | | |
|------------------------------|----|-------------------|
| • 10 x Expand buffer 3 | | 2,0 μl |
| • Enzymmixture | | 0,3 μl |
| • <u>DEPC-H₂O</u> | | 7,7 μl |
| | je | 10 μl |

ergaben einen Gesamtansatz von 20 μl .

Die PCR lief unter folgenden Bedingungen:

| | |
|------------------|------|
| • 120 s | 94°C |
| danach 39 Zyklen | |
| • 30 s | 94°C |
| • 60 s | 40°C |
| • 60 s | 68°C |
| anschließend | |
| • 30 s | 94°C |
| • 60 s | 60°C |
| • 300 s | 68°C |
| • | |

ab. Bis zur weiteren Bearbeitung der Proben wurden diese bei 4°C gelagert.

3.2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Silbernitratfärbung

Die Reaktionsansätze aus der PCR wurden mittels Vakuumtrocknung von 20 μl auf 2 – 5 μl eingengt. Die Auftrennung der Fragmentgemische erfolgte auf einem 4%igen, nicht denaturierenden Polyacrylamidgel. Aufgetragen wurden jeweils die Ansätze für 4 Probanden mit identischer Primerkombination. Die Gellösung wurde aus 5,0 ml 40%igem Acrylamid,

5,0 ml 10 x TBE (auf 1l tri-dest.H₂O kamen 162 g Trisaminomethan, 27,5 g Borsäure und 9,5 g EDTA) und 39,66 ml tri-dest.H₂O hergestellt. Kurz vor dem Giessen des Geles kamen noch 300 µl 10%iges ABS und 40 µl TEMED dazu.

Die zuvor unter Vakuum eingeeengten Proben wurden vor dem Beladen des Geles noch mit 5 µl Stopplösung versetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE Puffer. Die Elektrophorese erfolgte im MacroPhor – System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 20°C und 60W für 90 min.

Um die bei der Auftrennung entstandenen Banden sichtbar zu machen, schloss sich eine Silberfärbung (Chemikalien von Roth, Karlsruhe; NaBH₄ von FLUKA, Deisenhofen) des Geles an:

Fixieren 6 min (10%iger Ethanol; 0,5%ige Essigsäure)

Färben 14 min (1 g/l AgNO₃)

Entwickeln bis zum Sichtbarwerden erster Banden (14g NaOH, 0,01g NaBH₄, 4ml Formaldehyd auf 1 l H₂O).

Zwischen den Färbeschritten wurde das Gel mit H₂O abgespült.

Die Zeitdauer des Entwickelns ist davon abhängig, wann die ersten Banden sichtbar werden. Kurz danach wird dieser Schritt abgebrochen, da das Gel im nachhinein noch nachdunkelt. Das eingefärbte Gel löst man mit Filterpapier von der Platte. Danach wurde es unter Vakuum getrocknet und mit einer transparenten Stretchfolie (Saran-Wrap; Roth, Karlsruhe) abgedeckt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Gele in eine zusätzliche Folie eingeschweißt und bei -80°C gelagert.

3.2.5. Präparation von ausgewählten Banden aus dem Polyacrylamidgel

Die Banden wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- ⇒ eindeutig abgegrenzte Banden mit geringer Hintergrundfärbung,
- ⇒ Größenbereich der Banden sollte zwischen 100 bis 1000 bp liegen,
- ⇒ Vorhandensein von gleichmäßig starken Banden bei allen Tieren um PCR- und Elektrophorese-Artefakte auszuschließen,
- ⇒ sichtbare Banden entweder bei Grätschern oder bei Gesunden,
- ⇒ scharf abgegrenzte Einzelbande.

Die nach den genannten Kriterien ausgewählten Banden wurden mit einem sterilen scharfen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 50 µl H₂O (Qiagen, Hilden) überführt. Die Tubes wurden danach gründlich durchgemischt. Die Eluierung erfolgte 15 min bei 95°C mit anschließender sofortiger Abkühlung auf 4°C. Wurden die Eluate nicht gleich weiterverwendet, wurden sie bei – 80°C gelagert.

3.2.6. Reamplifizierung der gewonnenen Eluate

Aus den Eluaten kamen in der folgenden PCR 5 µl zum Einsatz. Verwendet wurde das ExpandLongTemplate PCR-System (Roche, Mannheim). Die verwendeten Primerkombinationen waren mit den Primerkombinationen während der Reversen Transkription mit anschließender Amplifizierung identisch. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Es wurden 2 Mastermixe (MM) hergestellt.

⇒ MM1

| | | |
|-------------------------|-----|----------------|
| • dNTPs | ATP | 1,25 µl |
| | GTP | 1,25 µl |
| | CTP | 1,25 µl |
| | TTP | 1,25 µl |
| • D-Primer | | 2,0 µl |
| • U-Primer | | 2,0 µl |
| • <u>H₂O</u> | | <u>13,0 µl</u> |
| | je | 22,0 µl |

⇒ MM2

| | | |
|-------------------------|----|-----------------|
| • 10 x Template Puffer | | 5,0 µl |
| • Enzymmix | | 0,75 µl |
| • <u>H₂O</u> | | <u>17,25 µl</u> |
| | je | 23,0 µl |

Als PCR-Bedingungen galten folgende Einstellungen:

- 120s 94°C
- danach 39 Zyklen
- 30s 94°C
 - 30s 40°C
 - 60s 68°C
- anschließend

- 300s 68°C

halten bei 4°C.

Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Hier wurden die Größenordnungen zu den isolierten cDNA-Banden verglichen. Waren keine oder nur sehr schwache Banden sichtbar, schloß sich eine zweite PCR unter gleichen Bedingungen an.

Für die optimale Klonierung der Produkte wurden diese vorher noch von Primern und dNTPs mit Micro-Spin-Columns (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) gereinigt.

3.2.7. Klonierung der zu untersuchenden differenten Banden

Für die Ligation wurde ein für nicht modifizierte PCR-Produkte geeignetes System verwendet. Dabei handelt es sich um das pGEM-T-Vektorsystem (Promega, Madison, USA). Hier wurden die PCR-Produkte in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors ligiert.

Für die Reaktion kamen:

- 2 x Ligationspuffer 5 µl
- pGEMT-T-Vektor 1 µl
- T4-DNA-Ligase 1 µl
- DNA 1 µl – 3µl

zum Einsatz. Das Gesamtvolumen ergab 10 µl.

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Der nicht gleich weiterverwendete Ligationsansatz wurde bei –20°C gelagert.

Die Transformation kompetenter Zellen schloß sich als zweiter Schritt an. Hierfür wurden Agar-Platten und TB-Medium (Anhang) hergestellt. Fünfzig µl JM109 High Efficiency Competent Cells wurden in 10 ml steriles Falcon-Probengefäß gegeben, dazu kamen 1 µl des Ligationsansatzes. Das Falcon-Probengefäß wurde 20 min auf Eis gesetzt, anschließend exakt für 45s in 42°C inkubiert und danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Darauf wurden 950 µl des TB-Mediums (Terrific Broth; Sigma, Deisenhofen) zugesetzt und bei 37°C für 1,5 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf die Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Blau-Weiß-Screening des benutzten Systems zeigte im Resultat weiße und blaue Kolonien. Die weißen zeigen an, dass ein Insert vorhanden ist, wogegen die blauen kein Insert enthalten. Die scheinbar rekombinanten weißen Klone wurden jeweils in ein steriles, mit

10 ml TB (versetzt mit Ampicillin) gefülltes Falcon-Probengefäß abgesammelt. Zur Vermehrung der Klone wurden sie bei 37°C über Nacht geschüttelt.

3.2.8. Plasmidpräparation und Sequenzierung

Eine Trübung der Lösung zeigte eine erfolgreiche Vermehrung der Bakterien an. Bei den ersten Präparationen kam der Mini-Prep-Plasmid-Kit (QIAGEN, Hilden) zum Einsatz. Als erster Schritt wurden die Bakterienzellen in einem 2 ml Tube bei 11000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und nochmals werden 2 ml der Probe aus dem Falcon in demselben Tube abzentrifugiert. Auch dieser Überstand wird verworfen. Danach erfolgte die Zugabe von 0,3 ml des Resuspensionspuffers. In diesem wurden die Zellen wieder vollkommen durch mehrmaliges Vortexen gelöst. Anschließend begann durch Zusetzen von 0,3 ml Lysispuffer die Zellverdauung. Zur Neutralisation der Lösung kam 0,3 ml Neutralisationspuffer dazu. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur und bei 11000 xg zentrifugiert. Nach diesem Schritt erfolgte die Überführung des Überstandes in neues Tube. Der entstandene Überstand mußte eine klare Konsistenz annehmen. Es schließt sich ein Fällungsschritt durch Zugabe von 0,7 ml Isopropanol an. Bei 15000xg wird der Ansatz 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Das entstandene Pellet wird in TE-Puffer pH 7,0 aufgenommen und der im Kit befindliche QBT-Puffer mit einem Volumen von 1 ml dazu addiert. Diese Lösung wird vorsichtig auf eine mitgelieferte Säule pipettiert. In dieser Säule befindet sich eine DNA-bindende Matrix. Beim folgenden Zentrifugationschritt wird der entwichene Überstand aus der Säule verworfen. Dreimal erfolgt ein Waschvorgang mit dem Puffer QC. Nach Zugabe von 0,8 ml QF-Puffer wird die DNA bei einem weiteren Zentrifugationsvorgang aus der Matrix eluiert. Dem Eluat wird 0,7 ml Isopropanol zugesetzt und die Lösung nochmals 30 min bei 11000 xg zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Das Pellet ist aufgrund seines glasigen Aussehens nur schwer erkennbar. Um eine völlige Reinheit der DNA zu erzielen, wird das Pellet mit Ethanol gewaschen und anschließend vollständig getrocknet. Erst wenn alle Reste des Ethanols entfernt sind, wird das Pellet in 50 µl H₂O aufgenommen.

Bei weiteren Analyseschritten wurde der QIAprep Miniprep-Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Dabei wurde exakt nach der Herstellervorschrift vorgegangen. Zur Kontrolle der Plasmid-DNA-Konzentration wurden 5 μl der Probe mit 1 μl Stopplösung versetzt und auf einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Eine starke einzelne Bande zeigte eine erfolgreiche Präparation an.

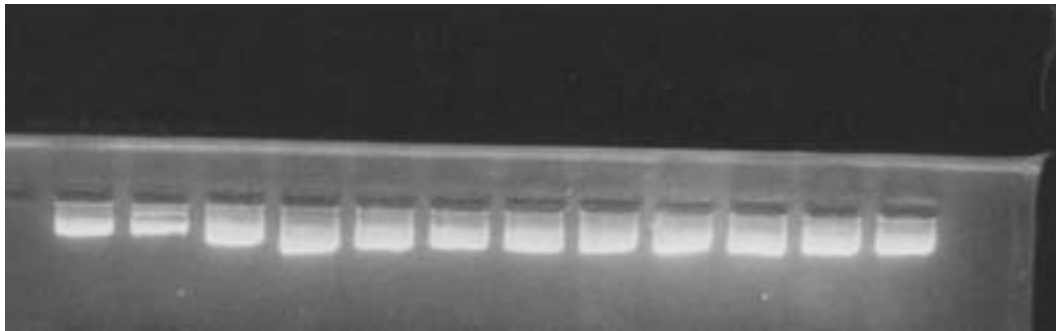


Abbildung 6: Plasmid-DNA Kontrolle auf einem Agarosegel

Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde der AutoReadTM Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Zwei μl der isolierten Template DNA wurden 8 μl 2 M NaOH zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden 7 μl 3 M Natriumacetat, 4 μl Wasser und 120 μl 100%iges Ethanol addiert. Sind alle Substanzen gut durchgemischt, lagert der Ansatz 15 min bei -70°C . Dem folgt eine 15 minütige Zentrifugation. Der Überstand wird abpipettiert. Durch Zugabe von 100 μl 70 %igen Ethanol wird das Pellet gewaschen. Nach der weiteren 10 minütigen Zentrifugation muß das Pellet vollkommen getrocknet werden. Die den Ablauf der Sequenzierung störenden Ethanolreste müssen komplett entfernt sein. Das Pellet wird in 10 μl H_2O , 2 μl entsprechender Primer (reverse oder universal; SP6 oder T7) und 2 μl Annealing Puffer aufgenommen. Nach Vortexen und kurzem anzentrifugieren erfolgt die Inkubation 5 min bei 65°C , anschließend 10 min bei 37°C im Wasserbad und zum Schluß 15 bis 20 min bei Raumtemperatur. Dem Mix wird danach 1 μl Extensionspuffer und 3 μl DMSO (Dimethyl sulfoxide) zugegeben. Während der beschriebenen Inkubationszeiten kann die Mikrotiterplatte mit je 2,5 μl A,C,G und T des Sequenzierungsgemisch befüllt werden. Die T7-DNA-Polymerase wird mit dem

Dilution-Puffer 1:1,5 verdünnt. Zum Sequenzierungsmix gibt man 2 µl verdünnte T7-DNA-Polymerase. In die vorbereitete Mikrotiterplatte wird je 4,5 µl des Mixes pipettiert und anschließend 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von je 5 µl Stopplösung erfolgt eine weitere Inkubation von 3 min bei 90°C. Die Proben werden sofort auf Eis gestellt und beim Auftragen weiter so gelagert. Für die Sequenzierung wird ein 4 %iges Polyacrylamidgel hergestellt und in ein automatischen Sequenziergerät eingegangen (ALFexpress, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Laufbedingungen waren wie folgt:

- Laufzeit 800 min
- 1500 V
- 35 mA
- 34 W
- Lauftemperatur 50°C.

3.2.9. Sequenzanalyse

Die gewonnenen Sequenzdaten wurden eines Datenbankhomologievergleiches unterzogen. Unter Nutzung des Computerprogrammes „DNASIS“ (Hitachi Software Engineering, 1995) konnten die bekannten Vektorsequenz eliminiert werden und die Fragmente wurden mit der Software BLAST auf Homologie zu Sequenzen in der Datenbank GenBank/EMBL verglichen. Die aus humanen Sequenzierungsprojekten gespeicherten genomischen Sequenzen sind in bezug auf Ableitungen der Struktur der Gene (Exon-Intron-Aufbau) auch für die eigenen Sequenzen nützlich.

Als Homologiekriterien stellten sich nach Aussagen von DAVOLI et al. (1999) folgende Punkte:

- Überlappung von >70bp zwischen eigenen und gespeicherten Datenbanksequenzen
- Homologie im übereinstimmenden Teil > 75%
- Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit – BLASTNE < 1⁻¹⁰.

Die eigenen isolierten porcinen cDNA-Sequenzen wurden in das Datenbanksystem EMBL übersandt. Dort erfolgte eine Zuteilung einer Accession-Nr..

3.2.10. Untersuchung zur Struktur des porcinen CDKN3 Genes

Wurde eine hohe Homologie eines Fragmentes mit einer in der Datenbank gespeicherten Sequenz eines Genes ermittelt und konnte man die Funktion des dort bekannten Genes in einen Zusammenhang mit dem Grätschsyndrom beim Saugferkel setzen, wurden aus dieser Sequenz heterologe Primer abgeleitet.

Bei der Ermittlung der Sequenz des CDKN3-Gen (cyclin-dependent kinase inhibitor 3) beim Schwein kamen folgende Primer zum Einsatz:

| | | |
|------------------|--------------------------|-------------------|
| KAP1U (forward) | GCCCAGTTCAATACAAACAAG | Ta 52-67°C |
| KAP1R (reverse) | CATTACATTTGATTTGATAATGCT | Produkt bei 736bp |
| KAP2U | GAAGAGCCTATTGAAGATGAAC | Ta 52-65°C |
| KAP2R | TGATTGTGAATCTCTTGATGA | Produkt bei 573bp |
| KAP3U | ATAGACAGCCTGCGAGACC | Ta 50-69°C |
| KAP3R | TTGCCAATAAAAGCTTAGGAA | Produkt bei 279bp |

Zur Untersuchung der vollständigen kodierenden Sequenz und eventuell vorhandenen Spleißvarianten wurde folgendes Primerpaar verwendet:

| | | |
|----------|--------------------------|-------------------|
| GESAMT F | GTGAGACTGCCAGCGATGAAG | Ta 53-72°C |
| GESAMT R | TTGATGATAGATGTGCAGCTATTT | Produkt bei 622bp |

Den Ausgangspunkt um eine cDNA – Konsenssequenz herzustellen wurden, bildeten Amplifikate aus einer PCR mit 100 ng cDNA (Primer D8/U17) zweier Probanden mit den entsprechenden Primern und einem PCR-Bead (ReadyToGo, AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) mit einem Endvolumen von 25 µl. Reaktionsbedingungen waren identisch denen bei der Reamplifizierung der Banden. Die sichtbaren Banden der Amplifikate wurden aus dem 3%-igen Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAEX Gel Extraktions Kit (QIAGEN) eluiert. War nur eine deutlich sichtbare Einzelbande zu erkennen, erfolgte die

Aufreinigung mit MicroSpin S300. Danach folgten die Schritte der Ligation, Transformation, Plasmidpräparation und anschließende Sequenzierung. Die aus überlappenden Sequenzen hergestellte Konsenssequenz für die porcine CDKN3 – cDNA wurde an das Datenbanksystem EMBL/GenBank übermittelt und unter der Accession No. AJ404882 registriert. Bei der Homologiesuche ergaben sich identische Abschnitte einer genomischen Sequenz des humanen Chromosoms 14 (NM_010084) zwischen 82 – 98 %. Auf Grund der Lage wurden Schlußfolgerungen über die Exon – Intron – Struktur des Genes gezogen. Daraus ableitend konnten Primer entwickelt werden, die zur Identifizierung der genomischen Sequenz des porcinen CDKN3-Genes verwendet wurden.

Tabelle 4 Verwendete Primerpaare zur Identifizierung der genomischen Sequenz des porcinen CDKN 3-Genes

| Primer (forward-F / revers-R) | Ta(°C) | Amplifikat |
|--------------------------------------|---------------|------------------------------|
| Gesamt F GTGAGACTGCCAGCGATGAAG | 53-72 | 24bp Exon1-Intron1 |
| IN1R CAGGGATCAGAAATGTCCACATA | | 110bp Exon2 |
| IN2F TCAGATGAAGAGCCTATTGAA | 50-66 | 50bp Exon2-Intron2 |
| IN2R GAAGAGCACAATAAACCAAGAA | | 53bp Exon3 |
| IN3F ATTCTCAGTTTCTTGGTTTA | 51-60 | 33bp Exon3-Intron3 |
| IN3R TTGGATATTTCTTCTAACATC | | 35bp Exon4 |
| IN4F GAAATATCCAAAAGATACAG | 49-60 | 24bp Exon4-Intron4 |
| IN4R CTGGTGCAGAAAACAATAC | | 49bp Exon5 |
| IN5F ACCAGAGGGAAGTCA | 53-67 | 74bp Exon5-Intron5 |
| IN5R TCCAAGTCCTCCGTAAC | | 20bp Exon6 |
| IN6F GTTACGGAGGACTTGGGAGAT | 54-70 | 30bp Exon6-Intron6 |
| IN6R ACAGGAACAGCAGTGGA | | 114bp Exon7+422bp Intron7 |
| KAP3U ATAGACAGCCTGCGACC | 54-70 | 51bp Exon7-Intron7 |
| KAP3L TTGCCAATAAAAGCTTTAGGAA | | 238bp Exon8 |

Aus den bisherigen erhaltenen Intronsequenzen wurden weitere Primer abgeleitet um fehlende

Abschnitte dieser Sequenzen zu schließen.

| | | | |
|-------|-----------------------|-------|--------------|
| IN4IF | GTTCTTTCCTGGTCATCCTA | 50-64 | Rest Intron4 |
| IN4IR | GCTGGTTTTTGTTCATCCTA | | |
| IN2IF | TGGAGGGGAGTGGTAGGAG | 53-72 | Rest Intron2 |
| IN2R | GAGATGTAGGTCGCAGAGCAG | | |
| IN1IF | CCTGGGGAAGCAGAAAC | 53-68 | Rest Intron1 |
| IN1IR | TGCGAAGACCCATAAAGTAAG | | |
| IN6F | GTTACGGAGGACTTGGGAGAT | 55-70 | Rest Intron6 |
| IN6R | CGCAATCCATCACCAGTT | | |

Die Amplifizierung fand unter den Zyklusbedingungen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, entsprechend der für den Primer angegebenen Annealing-Temperatur statt. Begonnen wurde dabei mit der niedrigsten Temperatur. Mit verschiedenen Temperaturansätzen wurde die PCR dann optimiert bis ein spezifisches Produkt vorlag. Für die weiteren Analyseschritten bis zur Sequenzierung wurden jeweils ein gesunder Proband und ein Spreizer verglichen. Da die Fragmente in Größenordnungen über 2000bp lagen, wurden vorbereitete Plasmid-DNA in einer Konzentration von 500ng/ μ l an ein Labor der SeqLab GmbH in Göttingen zur Analyse versandt.

3.3. Erfassung der Enzymaktivitäten von Creatinkinase (CK) sowie Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzyme

3.3.1. Gesamtaktivität von Creatinkinase (CK)

Für die Enzymbestimmung wurden bei 209 Ferkeln aus Anpaarungen klinisch gesunder Sauen (F1 aus DL Deutsche Landrasse Vater/Grätscher + DE Deutsches Edelschwein Mutter) und klinisch erkrankten Ebern sofort nach der Geburt, am 7. Tag und am 21. Tag Blut entnommen.

Im Blut erfolgte danach der Nachweis an der Enzymkonzentration der Creatinkinase. Zum Einsatz kam ein handelsüblicher Kit der Firma SIGMA (Sigma Diagnostics). Die Messung wurde mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt.

Die im Kit vorhandene CK-Reagenz wurde mit 10 ml Wasser aufgefüllt. In die Probenküvette werden 1,0 ml der CK-Reagenz zugegeben und diese auf die Inkubationstemperatur von 37°C erwärmt. Dieser Küvette setzt man 0,02 ml der zu messenden Probe dazu und mischt alles sehr gut durch. Für 3 min erfolgt eine Inkubation. Zur Erstellung einer Kalibrierung wird eine Wasserprobe gemessen. Nach der Inkubationszeit wird die Probe in verschiedenen Zeitabständen gemessen: 30 s, 60 s, 90 s, 120 s.

Um $\Delta A/\text{min}$ zu ermitteln, wird Initial A von Final A subtrahiert und dann durch 2 dividiert.

Zur Berechnung der CK –Konzentration wird folgende Formel verwendet:

$$\text{CK (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times 8200$$

Viele Enzyme zeigen erhebliche Unterschiede in den Aktivitäten im Plasma und im Serum. Sie beruhen auf dem zum Teil hohen Enzymgehalt der Blutplättchen. Bei der Gerinnung werden diese Enzyme an das Serum abgegeben. Dieser Effekt macht sich besonders stark bei der Lactatdehydrogenase bemerkbar. Stehenlassen des geronnenen Blutes bei Zimmertemperatur hat den Austritt von Enzymen aus den Blutkörperchen zur Folge. Aus dem gleichen Grunde sind hämolytische Seren unbrauchbar, wenn Enzyme bestimmt werden sollen, die in den Erythrozyten in hoher Konzentration vorliegen (LDH). Für die Enzymbestimmungen wurde ein Kit der Firma SIGMA (Sigma Diagnostics) verwendet. Der Kit kann für Serum, EDTA-Plasma und heparinisiertes Plasma verwendet werden.

3.3.2. Gesamtaktivität von LDH und deren Isoenzyme

Für die Blutentnahme wurden Röhrchen mit EDTA verwendet. Zur Probenaufbereitung wurde das Probenröhrchen 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Plasma wurde vorsichtig abpipettiert und in Tubes überführt. Das nicht verwendete Plasma kann bis zu weiteren Analysen bei -20°C gelagert werden. Die geringste Hämolyse kann die Messung erheblich beeinträchtigen.

Als ersten Schritt werden die im Kit enthaltenen Reagenzien vorbereitet:

| | |
|--------------------------------|---|
| LDH-Reagenz A (Puffer/Coenzym) | Zugabe von 20 ml dest. Wasser und durch Schütteln lösen (Lagerung bei RT) |
| LDH-Reagenz B (Pyruvat) | Zugabe von 5 ml dest. Wasser und durch Schütteln lösen (Lagerung bei RT) |

Zur Bestimmung der Messwerte werden die Reagenzien und das Probenmaterial auf Raumtemperatur erwärmt. Das Photometer mißt mit einer Wellenlänge von 340 nm. Als Vergleichswert erfolgt eine Messung mit Wasser. Die verwendeten Küvetten hatten eine Schichtdicke von 1 cm.

- Messung:
- 0,5 ml LDH- Reagenz A in Küvette einfüllen
 - 20 μl Probe zugeben und 1 min inkubieren (in dieser Zeit wird die Extinktion gemessen und als Wert 0 registriert)
 - Reaktion starten – Zugabe von 20 μl LDH-Reagenz B, Küvette in das Photometer stellen
 - Extinktion ablesen nach 1 min \Rightarrow Wert 1
 - Extinktion ablesen nach 2 min \Rightarrow Wert 2
 - Extinktion ablesen nach 3 min \Rightarrow Wert 3

Aus den Extinktionsdifferenzen pro min ($\Delta E/\text{min}$) wurden die Mittelwerte gebildet, um diese dann in die Berechnung einzusetzen.

$$\begin{aligned} \text{LDH-Aktivität (U/l)} &= F \times \Delta E/\text{min} && (F= \text{Hg}340\text{nm} = 4286) \\ &= 4286 \times \Delta E/\text{min} \end{aligned}$$

Isoenzyme können durch elektrophoretische (Agar, Agarose, Stärkegel, Polyacrylamidgel), säulenchromatographische und immunologische Verfahren getrennt werden. In vielen Fällen ist eine visuelle Auswertung nach Anfärbung im Gel ausreichend. Die quantitativen densitometrischen Auswertung ist jedoch am genauesten.

Die Bestimmung der LDH-Isoenzyme erfolgte über ein elektrophoretische Auftrennung auf einem 1 %igem Agarosegel. Als Marker für die Blutplasma-Proben wurde Bromphenolblau verwendet. Mit Microliterspritzen erfolgte das Auftragen der Proben in die Geltaschen. Die aufgetragenen Proben diffundierten einige Minuten in das Gel. Das Gel wurde danach in die Laufkammer plaziert und mit Laufpuffer (Fertigpuffer von Sigma 705-1 TRIZMA) bedeckt. Die Laufzeit betrug 3 Stunden bei 150 mA und 49 V. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel gründlich mit Aqua dest. gespült. Es folgten die Inkubation im Dunkeln bei 37°C mit dem Inkubationspuffer (Fertigpuffer von Sigma 705-2 TRIZMA) und die anschließende Färbung mit der Fertigreagenz von Sigma (705-30). Die optimale Anfärbung wird nach 40 bis 60 min erzielt. Die Gele wurden nach den genannten Schritten nochmals gründlich mit Aqua dest. gespült und getrocknet. Zur Analyse der durch die Auftrennung sichtbar gemachten Isoenzyme wurden die Gele eingescannt und am Computer mit der Software (Amersham Bioscience) ausgewertet.

3.3.3. Statistische Auswertung

Für die Aktivitäten der Enzyme von CK, LDH und deren Isoenzyme wurde ein allgemeines lineares Modell (Statistica for Windows 6.0, 2001) verwendet. Dabei wurden die Faktoren Gesundheit und Geschlecht als fixe Effekte eingesetzt. Das Geburtsgewicht wurde als Co-Variable berücksichtigt.

Berechnet wurde das verwendete Modell wie folgt:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + GG_{ijk} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = Merkmalswert des Tieres

μ = Gesamtmitte

S_i = Fester Effekt des Status mit $i = 0$ gesund; $i = 1$ krank

G_j = fester Effekt des Geschlechts mit $j = 1$ männlich; $j = 2$ weiblich

GG = Co-Variable Geburtsgewicht

E_{ijk} = Restfehler

Die Mittelwerte wurden als LeastSquareMeans + Standardfehler angegeben.

3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des *Musculus biceps femoris* bei gesunden und vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln

Die Entnahme der Gewebestücke erfolgten längs zu den Muskelfasern, damit die Z-Streifen sichtbar bleiben. Für die Einbettung der einzelnen Ultradünnschnitte mussten vorab folgende Fixiergemische hergestellt werden (nach ERL, SPURR-Harz-Kit; PLANO W. Planet GmbH):

- a) 3% Glutaraldehyd (GA) in 0,15 M Phosphatpuffer
für 100 ml : 12 ml 25%-GA-Lösung + 88 ml 0,15 M Phosphatpuffer
- b) 3% Glutaraldehyd + 1% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer
für 100 ml: 12,0 ml 25% GA-Lösung
+ 12,5 ml 8% PFA-Lösung
+ 75,5 ml 0,1 M Na-cacodylatpuffer
- c) 3% Glutaraldehyd + 0,5% PFA in 0,1 M Na-cacodylatpuffer
für 100 ml: 12,0 ml 25% GA-Lösung
+ 6,25 ml 8% PFA-Lösung
+ 81,75 ml 0,1 M Na-cacodylatpuffer
- d) 1M Saccharose in 0,15 M Phosphatpuffer
MG Saccharose = 342,3 g \Rightarrow 0,3423 g Saccharose in 1 ml 0,15 M
Phosphatpuffer

Nach folgendem Ablauf wurde das entnommene Gewebe des Muskels bearbeitet.

Epoxidharz-Einbettung:

- 2 stündige Fixierung mit 3%igem Glutaraldehyd in Phosphatpuffer
- in einem 15 minütigen und einmal 30 minütigen Abstand dreimal Waschen mit Phosphatpuffer
- Lagerung über Nacht bei 4°C
- Waschen mit Phosphatpuffer 60 min
- Nachfixieren mit OsO₄ in Paladepuffer 60 min
- 4 x 20 minütiges Waschen mit Wasser
- Fixierung in 20% Aceton + 1% Uranylacetat 30 min
- 8. Fixierung in Aceton 50% 10 min
- 9. Fixierung in Aceton 70% 10 min
- 10. Fixierung in Aceton 90% 10 min
- 2 x 20 min in Aceton abs. (mind.99,5%)
- Fixierung in Aceton/ERL 1:1 20 min
- Fixierung in Aceton/ERL 1:2 20 min
- ERL 60 min
- ERL über Nacht bei 4°C gelagert.

Die Proben werden in geeignete Einbettungsformen überführt und bei 60°C für 4 Tage polymerisiert.

Nach 4 Tagen konnte mit dem Schneiden der Probestücken begonnen werden. Die Schnittdicke lag zwischen 60 bis 80 nm. Geschnitten wurde solange, bis die Schnittfläche vollständig als Film vorlag. Anschließend wurde das Grid (Kupfernetz) mit der Filmoberseite auf die Schnitte aufgesetzt und abgehoben. Der Schnitt in eine Petrischale überführt und über Nacht getrocknet. Zur Optimierung des Schnittes erfolgte eine Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat (nach Reynolds).

Das Grid wird auf ein Uranylacetattropfen gelegt und nach 10 min mit H₂O gespült. Danach erfolgt der gleiche Schritt auf ein Bleicitratropfen. Auch danach wird das Grid gründlich gespült und mit einer Papiertuchecke abgetrocknet. Die anschließende Trocknung in der Petrischale dauert mindestens 4 bis 6 Stunden an.

3.5. Anpaarungsexperimente

Für den Aufbau einer Ausgangspopulation wurden in einem Herdbuchzuchtbetrieb verschiedene Anpaarungen vorgenommen. Zur Auswahl standen als väterliche Seite 3 Eber der Deutschen Landrasse, die als Ferkel klinisch manifeste Grätscher waren. Als Muttertiere kamen 12 vom Ausgrätschsyndrom nicht betroffene Sauen (7 x Deutsches Edelschwein + 5 Sauen aus Kreuzung DE/DL) zum Einsatz. Aus diesen Anpaarungen konnten 112 Ferkel erzeugt werden.

Aus dieser F₁- Population wurden 2 gesunde männliche Tiere sowie ein klinisch manifester Grätscher herausselektiert, die zur weiteren Anpaarung mit 24 klinisch gesunden weiblichen Tieren zur Verfügung standen. Die Sauen wurden dafür aus Würfen ausgewählt, in denen keine Ferkel mit dem Ausgrätschsyndrom auftraten. Im Ergebnis wurden 214 Ferkel geboren.

Übersicht der Anpaarungsmodelle

P – Generation

| | | | |
|-----------|---------|---------|---------|
| Grätscher | Eber 1 | Eber 2 | Eber 3 |
| | x | x | x |
| gesund | 5 Sauen | 3 Sauen | 4 Sauen |
| | ⇓ | ⇓ | ⇓ |

F 1 - Generation

(112 Nachkommen in 12 Würfen)

F 1 – Generation

| | | | | | |
|----------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Eber A | | Eber B | | Eber C | |
| (gesund aus Grätscherwurf) | | (gesund aus Grätscherwurf) | | (Grätscher) | |
| x | x | x | x | x | x |
| 10 Sauen | 8 Sauen | 2 Sauen | 2 Sauen | 1Sau | 1 Sau |
| (aus gesunden Wurf) | (aus Grätscherwurf) | (aus gesunden Wurf) | (aus Grätscherwurf) | (aus gesunden Wurf) | (aus Grätscherwurf) |
| ⇓ | ⇓ | ⇓ | ⇓ | ⇓ | ⇓ |

F 2 -Generation

(214 Nachkommen in 24 Würfen)

Um den Verlauf der wahrscheinlichen Vererbbarkeit des Ausgrätschsyndroms zu verfolgen, wurden in einer Versuchsstation des Institutes gerichtete Anpaarungen vorgenommen. Als Elterntiere kamen Nachkommen der F1 Generation zum Einsatz. Nach geplanten 11 Anpaarungen waren nur 6 erfolgreich. Als Gründe sind zu nennen: das Verenden von den ausgewählten Elterntieren und Schwierigkeiten bei der Besamung, die auf natürlichen Wege stattfinden sollte. Schon hier war erkennbar, dass die Eber die als Ferkel sehr stark mit dem Ausgrätschsyndrom betroffen waren, Probleme in der Kondition zeigten.

Als Anpaarungsmodell kamen 3 Varianten zum Einsatz:

Variante 1

| | | |
|----------------------|---|----------------------|
| männlich Grätscher | x | weiblich Grätscher |
| 185 (V 9502; M 1096) | | 54 (V 9502; M 9585) |
| | | 243 (V 9502; M 4147) |

Variante 2

| | | |
|----------------------|---|----------------------|
| männlich gesund | x | weiblich Grätscher |
| 147 (V 9502; M 3611) | | 111 (V 9502; M 9550) |

Variante 3

| | | |
|---------------------|---|----------------------|
| männlich Grätscher | x | weiblich gesund |
| 55 (V 9502; M 9585) | | 90 (V 9502; M 3667) |
| | | 85 (V 9588; M 9586) |
| | | 154 (V 9502; M 3611) |

Im Ergebnis der vorgenommenen Anpaarungen konnten von 326 Ferkeln Gewebeproben eingelagert werden, die zu weiteren Untersuchungen zur Verfügung stehen.

4. Ergebnisse

4.1. Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenem für das Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel

4.1.1. Ergebnisse der Differential Display/Reverse Transkription PCR

Ziel der Untersuchungen war es, potentielle Kandidatengene für das Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel zu identifizieren, die zu einer Klärung des noch nicht bekannten Pathogenesemechanismus beitragen können. Die Analyse beschränkte sich zunächst auf Gewebeproben des *Musculus biceps femoris*. Dieser Muskel ist primär in das Krankheitsbild einbezogen. Dementsprechend konnten hier differentiell exprimierte Gene gefunden werden. Hierzu wurde die Methode der Differential Display/Reverse Transkriptase-PCR (DD/RT-PCR) angewandt. Diese Methode erlaubt reproduzierbare Aussagen zu qualitativen und quantitativen Änderung der Genexpression zu treffen sowie systematisch neue Gene zu isolieren. Das Grundprinzip besteht darin, das sich mit Hilfe von arbiträren Primern jedes mRNA-Molekül von in einem Gewebe exprimierten Genen revers transkribieren und amplifizieren läßt. So entsteht die Möglichkeit, das Expressionsmuster in Geweben darzustellen und direkt mit den Mustern anderer Gewebe bzw. zwischen Geweben zu vergleichen.

Bei der Reversen Transkription kamen alle 12 Downstream – Primer (D1-D12) zum Einsatz. Das ergab bei einer Probenanzahl von 4 Tieren 48 PCR-Produkte. Im weiteren Verlauf der Amplifizierung der cDNA wurden aus Kapazitätsgründen nur eine begrenzte Anzahl von den Upstream-Primern eingesetzt. Die Auswahl erfolgte nach dem Zufallsprinzip. In der Gesamtanzahl ergaben sich dann 126 Primerkombinationen, die für jedes der vier Probanden analysiert wurde. Auf den Polyacrylamidgelen wurden 504 Produktgemische über eine Elektrophorese aufgetrennt.

In der folgenden Tabelle werden alle verwendeten Primerkombinationen aufgezeigt.

Tabelle 5 Einsatz der Primerkombinationen für die cDNA – Synthese aus mRNA des *Musculus biceps femoris* (U-Upstream; D-Downstream)

| Kombination mit U-Primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
| D-Primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D1 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | |
| D2 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | x | | x | x | x | | | | | | | | |
| D3 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | |
| D4 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | |
| D5 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | |
| D6 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | |
| D7 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D8 | | | | | | | | | | | | | | | | x | x | x | x | | | x | x | x | x | x |
| D9 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | |
| D10 | | | | | | | | | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | |
| D11 | x | x | x | x | x | x | | | x | | x | | | | | | | | | | | | | | | |
| D12 | | | | | | | | | | x | x | x | x | x | x | | | | | | | | | | | |

In diesen Kombinationen wurden zwischen 8 und 23 visuell differenzierbare Banden gefunden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung mit anschließender Silbernitratfärbung wurde eine große Variabilität der einzelnen Banden festgestellt. Daraus ableitend wurden verschiedene Kriterienswerpunkte für die Bestimmung der sichtbar gewordenen Banden festgelegt:

- ⇒ different auftretende Banden bei Grätschern und bei Gesunden
- ⇒ scharf abgegrenzte Einzelbande (Vermeidung von negativen Auswirkungen auf Klonierung und Sequenzierung)
- ⇒ gleichstarke Banden über alle Spuren der identischen Primerkombination (Ausschluß von Elektrophorese- und PCR-Artefakten)
- ⇒ Größenbereich der Fragmente zwischen 100 bis 1000 bp (optimaler Größenbereich für die verwendeten Analysesysteme).

Es zeigten sich bei manchen Kombinationen keine differenzierbaren Banden oder es traten starke Hintergrundfärbungen auf. Auf dieser Basis wurden weitere Kombinationsmöglichkeiten zwischen Downstream – und Upstream-Primern ausgewählt.

Nach der Auswahl der für die weitere Analyse in Frage kommenden Banden kamen wir auf eine Anzahl von 71 zu untersuchenden Primerkombinationen. Grenzten wir die Fragmente nach dem Kriterium des Auftretens nur bei Grätschern oder nur bei Gesunden nochmals ein, blieb eine Auswahl von 49 Primerkombinationen übrig. Auch wenn bei der Auswahl der Probanden versucht wurde, ein hohes Maß an Standardisierung zu gewährleisten, ist davon auszugehen, daß ein Anteil an differenten Banden nicht im direkten Zusammenhang mit dem Ausgrätschsyndrom stehen muß, sondern auch z.B. familienspezifisch sein kann.

Fragmente aus den Primerkombinationen mit den Downstream-Primern D1 und D2 waren besonders häufig. Im Gegensatz dazu gab es auch wie z.B. bei den 10 Kombinationen mit D7 keine Banden die den Auswahlkriterien entsprachen. Entsprechend der Hypothese einer kompensatorischen Hypoplasie bei Grätschern (BERGMANN, 1976) erfolgte eine Auswahl von Fragmenten, die ausschließlich oder deutlich stärker bei den Grätschern auftreten. Zu Grunde liegt hier die Vermutung, daß bei Grätschern während kompensatorischen Abläufen im früh – postnatalen Bereich eine verstärkte metabolische Aktivität auftreten kann, die sich in einer verstärkten Genexpression ausdrückt.

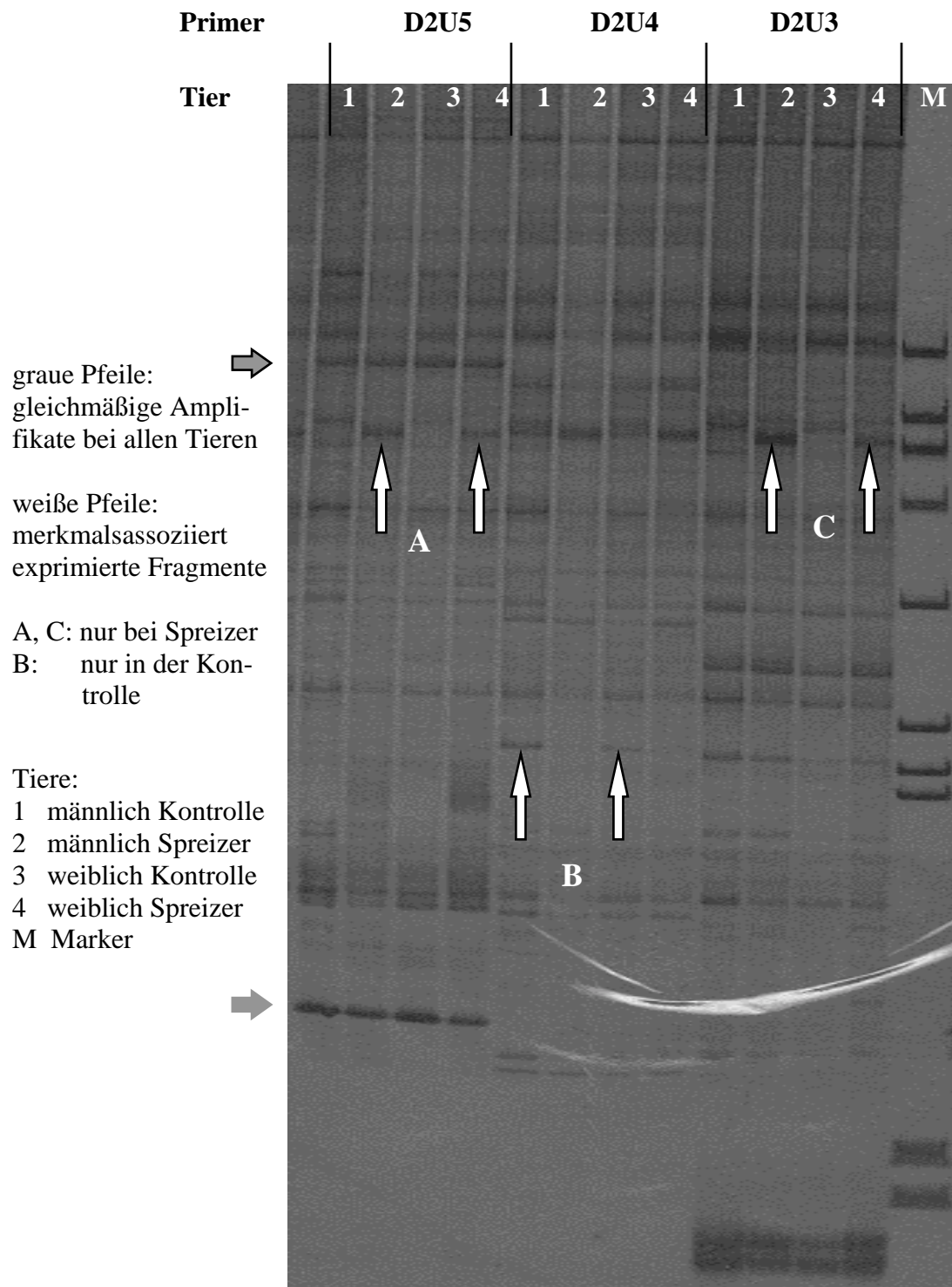


Abbildung 7: Beispiel eines silbernitratgefärbten Polyacrylamidgels mit verschiedenen Fragmenten entsprechend der beschriebenen Auswahlkriterien

4.1.2. Charakterisierung von merkmalsassoziierten exprimierten cDNA-Sequenzen

Nach Auswahl unter den genannten Kriterienswerpunkten kamen 22 Fragmente für die weitere Analyse in Frage. Davon konnten 16 Fragmente erfolgreich kloniert und sequenziert werden. Die Insertlänge lag zwischen 135 bp und 433 bp. Das Interesse galt besonders den isolierten Banden, die Homologien zu Genen aufwiesen, die in einem Zusammenhang mit den Ursachenkomplexen zum Ausgrätschsyndrom stehen könnten. Die Vergleiche der isolierten Fragmente zeigten keine bereits beim Schwein bekannten Gene. Nur bei zwei Produkten (AJ133891; AJ271016) konnten Homologien zu porcinen expressed sequence tags (ESTs) gefunden werden. Diese ESTs wurden aus gepooltem Embryonalgewebe bzw. Fettgewebe aus dem Rückenspeck isoliert. Homologien zu registrierten Genen bei Rind und Mensch zeigten vier Fragmente. Auch zu humanen, bovinen und murinen ESTs konnten Homologien festgestellt werden. Bei fünf DNA-Sequenzen war der Vergleich mit Sequenzen aus der Gendatenbank negativ.

Unter den isolierten Fragmenten befanden sich 4 Isolate mit Homologien zu beschriebenen Genen

- TATA box binding protein associated factor (TAF1B)
- B cell CLL, lymphoma 7B (BCL7B)
- ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e (ATP5I)
- cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3)

Die zwei erst genannten Gene sind in Prozesse der zellulären Differenzierung der Skelettmuskulatur involviert, wogegen die zwei weiter genannten für Enzyme kodieren, die Funktionen im Energiehaushalt der Zelle bzw. bei der Proteinaktivierung wahrnehmen. Auf der Basis der funktionellen Eigenschaften der Genprodukte sowie der differentiellen Expression bei gesunden und vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln werden diese Gene im Sinne von potentiellen Kandidatengen weiter untersucht.

Tabelle 6 Ergebnisse aus den Homologievergleichen in der EMBL/GenBank

| GenBank/ EMBL Accession No. | Primer | Länge (bp) | höchste Homologie zu: (Accession No.) | Homologie (%) | in bp |
|-----------------------------------|--------|---------------|---|------------------|-------|
| AJ404882 | D8U17 | 433 | H S cyclin-dependent kinase Inhibitor3, CDKN3 (U02681) | 86 | 131 |
| AJ278444 | D2U16 | 300 | B T ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e ATP5I (M6475.1) | 90 | 219 |
| AJ277993 | D1U6 | 352 | H S TATA box binding protein associated factor, TAF1B (L39061.1) | 85 | 339 |
| AJ404881 | D1U6 | 244 | H S B cell CLL, lymphoma 7B BCL7B (NM-001707.1) | 93 | 238 |
| AJ133888 | D3U12 | 280 | B T expressed sequence tag (BE809482.1) | 83 | 137 |
| AJ133890 | D1U8 | 174 | H S expressed sequence tag (AW968218.1) | 82 | 168 |
| AJ133891 | D1U6 | 175 | S S expressed sequence tag (AW414679.1) | 100 | 75 |
| AJ271016 | D2U7 | 381 | S S expressed sequence tag (AU059342.1) | 97 | 181 |
| AJ271017 | D4U7 | 135 | B T expressed sequence tag (AW478526.1) | 85 | 97 |
| AJ271018 | D4U7 | 280 | M M expressed sequence tag (BF134297.1) | 91 | 176 |
| AJ271019 | D6U13 | 208 | H S expressed sequence tag (AC073520.6) | 88 | 133 |
| AJ 133887 | D1U5 | 305 | keine signifikante Homologie | | |
| AJ133889 | D1U8 | 191 | keine signifikante Homologie | | |
| AJ271011 | D1U6 | 349 | keine signifikante Homologie | | |
| AJ271012 | D1U6 | 166 | keine signifikante Homologie | | |
| AJ271015 | D2U16 | 257 | keine signifikante Homologie | | |

Im folgenden Abschnitt wird am Beispiel des CDKN3-Genes die Identifizierung der Struktur erläutert.

Eine bei den Grätschern stark und bei den Kontrolltieren schwach sichtbare Bande aus der Primerkombination D8U17 lagen uns zu weiteren Analyseschritten vor. Ableitend aus diesem Fragment D8U17 konnten identische Sequenzen in dem Größenbereich zwischen 301 und 433bp zum humanen CDKN3 – Gen gefunden werden.

Im Vergleich zu den bislang diskutierten potentiellen Kandidatengen, ist das CDKN3-Gen sowie die Funktion des Genproduktes im Zusammenhang mit dem Zellzyklus relativ gut untersucht. Die Cyclin-abhängigen Kinasen sind in ihrer Funktion als Schlüsselproteine in der Steuerung der Übergänge zwischen den einzelnen Phasen (G1/S, G2/M) des Zellzykluses beteiligt.

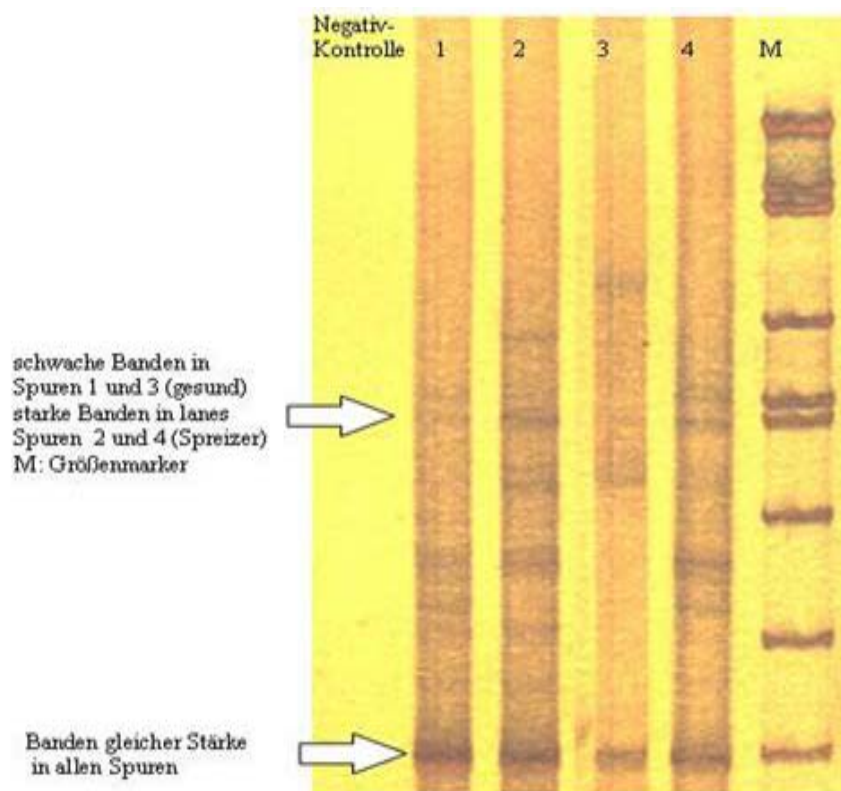


Abbildung 8: Differentielles Display von Banden mit der Primerkombination D8U17

Da sich bei den einzelnen Sequenzierungen nur teilweise identische cDNA-Sequenzen ergaben, erfolgte die Identifizierung auf genomischer Ebene. Auf Grundlage der bekannten genomischen Rohsequenz vom humanen Chromosom 14 (AL049778) wurde die Exon-Intron-Struktur abgeleitet. Mit den in Abschnitt 3.2.8.1.1. beschriebenen Primern konnte die Sequenz des porcinen CDKN3 – Gens aufgedeckt werden.

Tabelle 7 Genomische Struktur des humanen (obere Zeile) und porcinen (untere Zeile) CDKN3-Gens (Nukleotidpositionen nach Einträgen L27711(hCDKN3) und AJ404882(pCDKN3) in GenBank)

| 3'- Spleiß – Akzeptor Sequenz | | | | | 5'- Spleiß – Donor Sequenz | | |
|----------------------------------|------|-------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------|-------------|
| Intron | Exon | Exon No. | cDNA Nukleotid No. | Exon länge (bp) | Exon | Intron | Intron (bp) |
| | | 1 | <1-40 | >40 | AAGCCG/gtgagtcgga | | 2.400 |
| | | 1 | <1-24 | >24 | AAGCCG/gtgagtggg | | 2.328 |
| tcttttgaag/CCCAGT | | 2 | 41-123 | 83 | ATCATG/gtatgttagc | | 1547 |
| tcttttgaag/CCCAGT | | 2 | 25-107 | 83 | ATCATG/gtatgtggac | | 1602 |
| ttcttttcag/GCTATC | | 3 | 124-179 | 56 | TTCCAG/gtgggtaaca | | 7165 |
| ttcttttcag/GCTACC | | 3 | 108-163 | 56 | TTCCAG/gtaggtcaca | | 507 |
| ttacttatag/GTTGTA | | 4 | 180-224 | 45 | ATACAG/gtaggtataa | | 2694 |
| <i>acacttacag/GTTGTA</i> | | 4 | 164-208 | 45 | ATACAG/gtaggtgtaa | | 2651 |
| ctattggcag/AAGAAC | | 5 | 225-447 | 223 | AATACA/gtacgttctt | | 4192 |
| <i>gtattggcag/AAGAAC</i> | | 5 | 209-431 | 223 | AATACA/gtacgttctc | | 1571 |
| tccctttcag/CTGCTA | | 6 | 448-479 | 32 | GTCTTG/gtaagaaata | | 1917 |
| tccctttcag/CTGTTA | | 6 | 432-464 | 32 | GTCTTG/gtaagaaata | | >2036 |
| gttccattag/TAGCTG | | 7 | 480-583 | 104 | ATCAAG/gtgaggaggt | | 2040 |
| gttccattag/TAGCTG | | 7 | 464-567 | 104 | ATAAAG/gtaagtggca | | 1455 |
| ctttttcag/CAATAC | | 8 | 584-806 | 223 | | | |
| ctttttcag/CAATAC | | 8 | 568-805 | 238 | | | |

Die Regel der Exon/Intron-Übergänge „gt – ag“ wurde eingehalten (DIBB & NEWMAN, 1989). Die 300 bp des Intron 6 konnten als Folge von Schwierigkeiten in der spezifischen Amplifizierung nicht sequenziert werden. Introns 1, 2, 3, 4, 5, 7 wurden komplett sequenziert.

Tabelle 8 Homologe Abschnitte im porcinen und humanen CDKN3 – Gen
(AJ404883/404884 : NT_010084)

| Lokalisation in der porcinen genomischen Sequenz | Homologie (%) | homologer Abschnitt bp |
|--|---------------|------------------------|
| partielles Exon 1 | >84 | 24 |
| Intron 1 | 84 | 132 |
| Intron 1 | 81 | 127 |
| Intron 1 | 75 | 176 |
| Intron 1 | 85 | 63 |
| Intron 1, komplettes Exon 2 (83bp), Intron 2 | 80 | 513 |
| Intron 2 | 83 | 117 |
| Intron 2 | 83 | 107 |
| Intron 2 | 90 | 50 |
| Intron 2 | 84 | 76 |
| Intron 2 | 81 | 92 |
| Intron 2, komplettes Exon 3 (56bp), Intron 3 | 88 | 89 |
| Intron 3 | 75 | 288 |
| Intron 3, komplettes Exon 4 (45bp), Intron 4 | 84 | 233 |
| Intron 4 | 81 | 233 |
| Intron 4 | 77 | 177 |
| Intron 4 | 88 | 50 |
| Intron 4 | 79 | 77 |
| Intron 4, komplettes Exon 5 (223bp), Intron 5 | 88 | 299 |
| Intron 5 | 82 | 96 |
| Intron 5 | 76 | 122 |
| Intron 5 | 79 | 87 |
| Intron5, komplettes Exon 6 (32bp), Intron6 | 82 | 299 |
| Intron 6 | 85 | 149 |
| Intron 6 | 78 | 211 |
| Intron 6 | 90 | 52 |
| Intron 6 | 75 | 158 |

Tabelle 8 (Fortsetzung) Homologe Abschnitte im porcinen und humanen CDKN3 – Gen (AJ404883/404884 : NT_010084)

| | | |
|---|----|-----|
| Intron 6 | 82 | 81 |
| Intron 6 | 83 | 68 |
| Intron 6, komplettes Exon 7 (104bp), Intron 7 | 86 | 117 |
| Intron 7 | 87 | 58 |
| Intron 7, partielles Exon 8 (238bp) | 85 | 285 |

Im porcinen CDKN3 – Gen ist ein Poly (A) – Strang erkennbar, der bei den 4 untersuchten Tieren eine diallelen Längenpolymorphismus aufzeigt (14 bzw. 15 Adenosinreste)

Weiterhin wurden in vier Introns repetitive Sequenzen, die zu 85 – 94 % einem SINE-Motiv (single interspersed nucleotide element) PRE 1 (YASUE & WADA, 1996) ähneln, aufgedeckt.

Andere Intronabschnitte zeigen Ähnlichkeit mit repetitiven Elementen, die als L 1 Elemente genannt werden (KAZAZIAN, 2000). Nach BAUMGARTNER et al. (1999) weisen diese Elemente eine funktionelle Bedeutung in der Regulation der Gentranskription auf.

Außer im Gewebe der Skelettmuskulatur konnte in den eigenen Untersuchungen auch in Gewebeproben von Leber, Niere, Herz und Dünndarm neugeborener Ferkel eine Expression des Gens nachgewiesen werden.

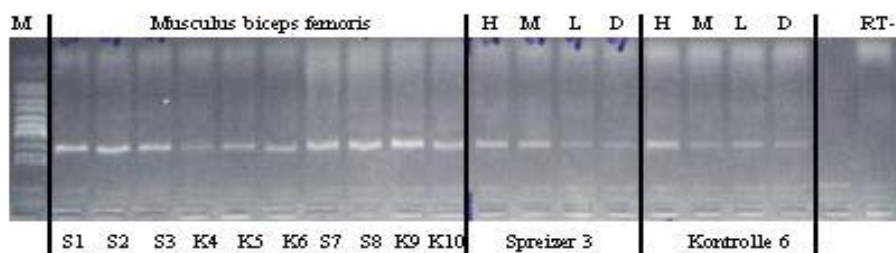


Abbildung 9 Expression des CDKN3 – Gens in verschiedenen Geweben von neugeborenen Ferkeln mittels RT-PCR (H-Herz, M-Milz, L-Leber, D-Darm)

Bei der elektrophoretischen Darstellung von PCR-Produkten des CDKN3-Gens wurde neben dem Produkt von 622 bp weitere kürzere PCR – Produkte sichtbar. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass es sich dabei um spezifische PCR – Produkte handelte. Mit der vorliegenden Exon/Intron – Struktur des porcinen CDKN3- Gens konnten die verschiedenen Varianten den entsprechenden Exons zugeteilt werden. Aus der Umschreibung der cDNA in Proteine resultierten 6 Varianten.

Bei der ersten Variante handelt es sich um eine vollständige Deletion der Exons 3, 4 und 5, die zu keiner Verschiebung des Leserasters führt. Die Aminosäuresequenz ist nur in einer Position (erste Aminosäure des katalytischen Kerns) verändert, es entsteht ein verkürztes Protein von 104 Aminosäuren gegenüber der normalen Variante (212 Aminosäuren).

Die Variante 2 zeigt in einer weiteren Sequenz, sind die Exons 4 und 5 deletiert. Es entsteht ein verschobenes Leseraster ab der Deletionsstelle. Nach 11 Kodons für unspezifische Aminosäuren wird ein Stoppkodon abgelesen und die Aminosäurekette bricht ab.

Bei Variante 3 fehlen die Exons 3 und 4. Es wird direkt an der Verbindungsstelle Exon 2 und Exon 5 ein Stoppkodon gebildet.

Die vollständige Deletion des Exons 4 führt bei Variante 4 zu einer Verkürzung des entstehenden Produktes auf 197 Aminosäurereste.

Bei Variante 5 wurde ein Sequenzeinschub beobachtet. Zusätzliche 50 Aminosäuren werden kodiert, bevor sich ein Stoppkodon anschließt. Das entstandene Produkt ist nur noch 41 % identisch mit dem entsprechenden Abschnitt des pCDKN3 – Gens.

Die Variante 6 war durch den Verlust von 47 bp aus dem Exon 6 gekennzeichnet. Es ergab sich eine damit eine veränderte Sequenz von 21 Aminosäureresten, bevor ein Stoppkodon zum Syntheseabbruch führt.

Die Varianten 1 bis 4 konnten bei Grätscherferkeln aufgezeigt werden, wogegen Varianten 5 und 6 bei gesunden Ferkeln zutrafen

Bei allen Varianten bis auf Nr. 1 kommt es durch die Veränderungen in der cDNA zum vorzeitigen Stoppkodon und daraus resultierend zum Abbruch der Proteinsynthese.

4.1.3. Isolierte EST`s (expressed sequence tags) aus dem *M. biceps femoris* neugeborener Ferkel

Aus den isolierten Fragmenten konnten in einer Vielzahl unspezifische Produkte ermittelt werden. Tabelle 8 zeigt eine Aufstellung der identifizierten expressed sequence tags.

Tabelle 9 Identifizierung der exprimierten Gene im *M. biceps femoris* neugeborener Ferkel

| Accession No. | Primer | Länge (bp) | Höchste Homologie zu: (Accession No.) | Homologie (%) | In bp |
|---------------|--------|------------|---|---------------|-------|
| AJ279587 | D1U6 | 223 | H S pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzym 4, PDK4 (NM_002612.1) | 93 | 219 |
| AJ279590 | D1U6 | 354 | H S ribosomal protein S10, RPS10 (NM_001014.1) | 90 | 346 |
| AJ279589 | D1U6 | 257 | H S SPARC-like 1, SPARCL1 (NM_004684.1) | 83 | 202 |
| AJ279582 | D8U17 | 261 | H S N-myc downstream regulated gene2, NDRG2 (NM_016250.1) | 94 | 259 |
| AJ279581 | D8U17 | 262 | H S pleomorphic adenoma gene like2, PLAGL2 (NM_002657.2) | 91 | 159 |
| AJ279591 | D1U6 | 284 | H s epithelial protein lost in neoplasm, EPLIN (NM_016357.1) | 86 | 281 |
| AJ279583 | D8U17 | 178 | H S BCL-2 associated transcription factor, BTF (NM_014739.1) | 96 | 178 |
| AJ279588 | D1U6 | 335 | S S expressed sequence tag (BE033234) | 91 | 247 |
| AJ279580 | D8U17 | 225 | keine signifikante Homologie | | |
| AJ279584 | D8U17 | 277 | keine signifikante Homologie | | |

Diese Fragmente wurden als expressed sequence tags aus der Skelettmuskulatur neugeborener Ferkel in die EMBL/GenBank registriert.

4.2. Enzymaktivitäten von Creatinkinase (CK), Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzyme

4.2.1. Creatinkinase (CK)

In den folgenden Diagrammen sind die ermittelten Enzymwerte am Tag der Geburt (CK 1), am 7. Tag (CK 2) und am 21.Tag (CK 3) in Abhängigkeit vom Status Grätscher oder Gesund dargestellt.

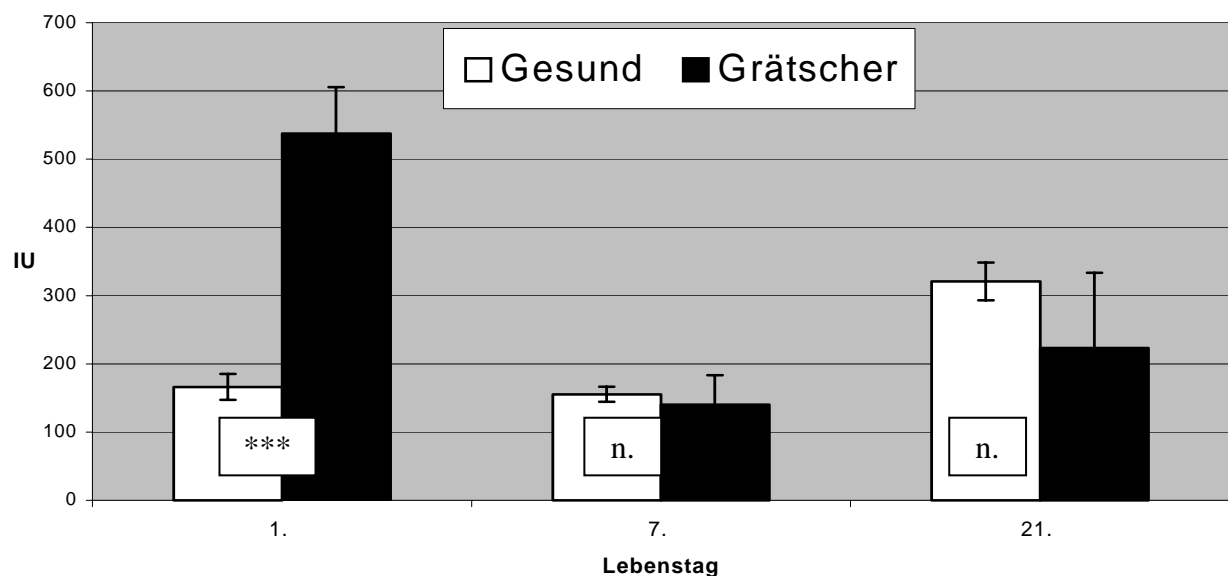


Abbildung 10: Aktivität des CK im Plasma im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln (LSM±SE) (***- $p < 0,001$; n.s. – nicht signifikant)

Grätscher zeigen am Tag der Geburt einen signifikant erhöhten CK-Wert von 537 IU im Vergleich zu 166 IU bei den klinisch gesund geborenen Ferkeln. Am 7. und 21 Tag postpartal lagen in den Enzymaktivitäten keine signifikanten Unterschiede vor (Anhang Tab. 12). Die Abhängigkeit zwischen CK-gehalt und dem Geschlecht zeigten keinerlei Signifikanzen auf (Anhang Tab.13).

Die Tendenz des CK-Gehaltes bei den gesunden Ferkeln liegt in den ersten 7 Lebenstagen gleich. Erst am 21.Tag hat sich dieser Wert verdoppelt. Bei den Grätschern fällt der erhöhte

erste Wert am 7.Tag auf 140,41 IU ab, wobei bis zum 21.Tag eine steigende Tendenz des CPK-Gehaltes sichtbar wird (Anhang).

4.2.2. Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzyme

LDH-gesamt wurde ebenfalls an 3 verschiedenen Blutentnahmetagen ermittelt.

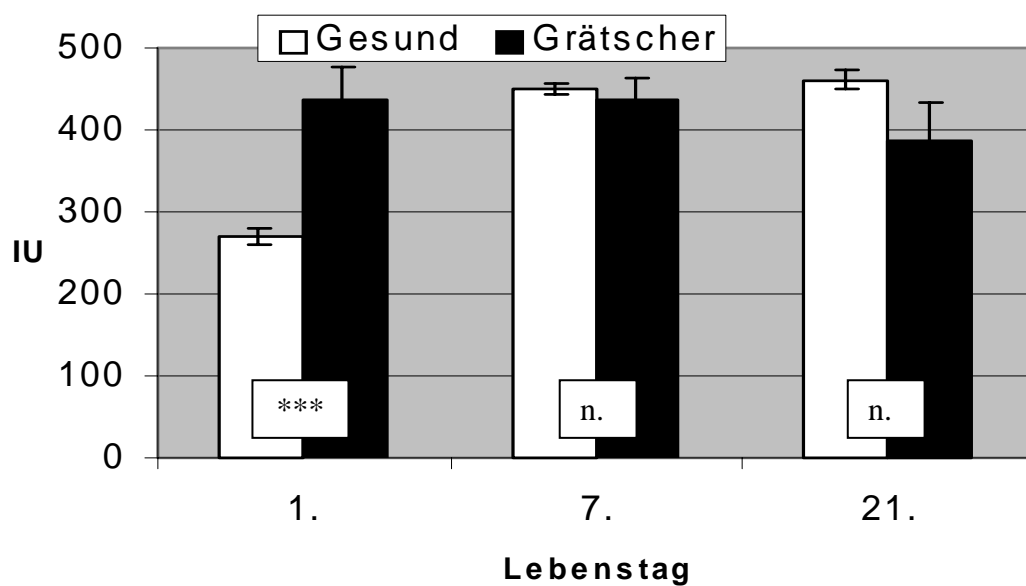


Abbildung 11: LDH-Gesamtgehalte im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln (LSM±SE) (***- $p < 0,001$; n.s. – nicht signifikant)

Auch hier ist nur am Tag der Geburt eine signifikanter Mittelwertunterschied zwischen Grätschern und Gesunden feststellbar. Vergleichend wird eine Differenz zwischen Gesund und Grätschern von 167,05 IU ermittelt. Mit fortschreitendem Lebensalter beträgt die Differenz weniger als 73,03 IU im LDH-Gehalt zwischen den beiden genannten Gruppen (Anhang Tab 14).

Auch hier wurde kein Effekt des Faktors Geschlecht auf die Aktivität festgestellt.

LDH-Isoenzyme

Bei der elektrophoretischen Darstellung erfolgte die Auftrennung der Isoenzyme. In Abbildung 12 ist ein typisches Gel dargestellt.

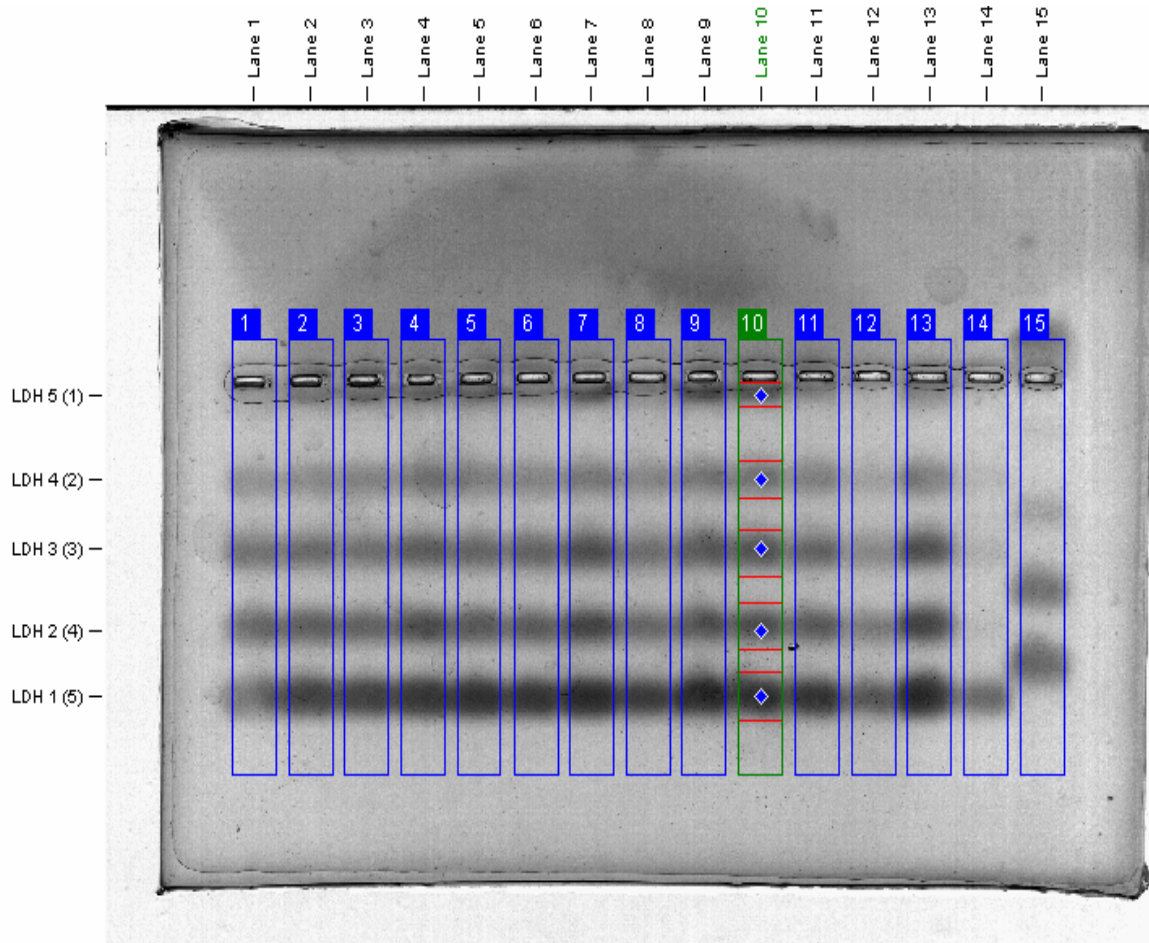


Abbildung 12: Auftrennung der LDH-Isoenzyme auf einem 1%igen Agarosegel

Lane 15 = humaner Marker Isotrol

Lane 1....14 = Einzelproben je Tier

Lane 10 = Beispiel einer Auswertung

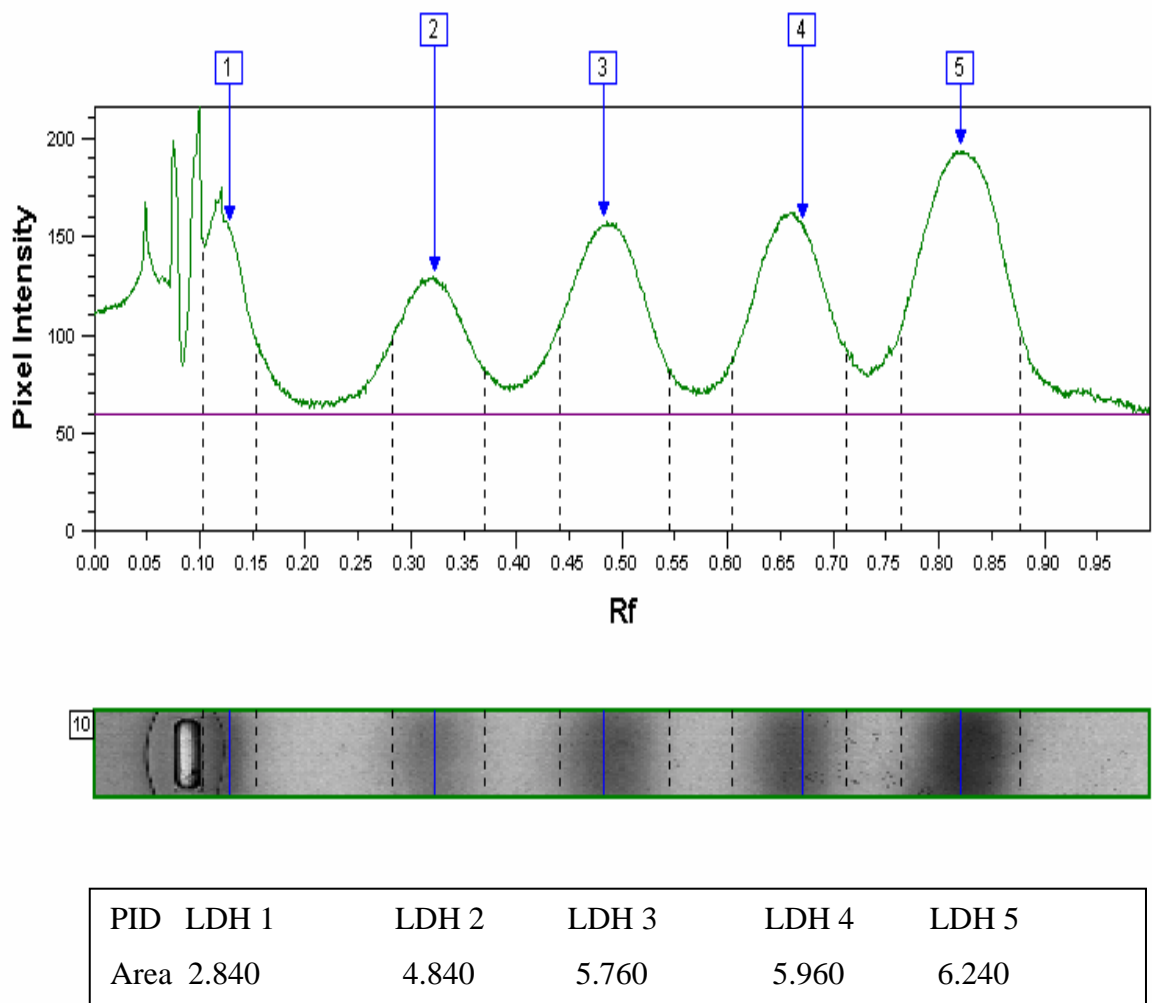


Abbildung 13: Auswertung der aufgetrennten Banden an einem Beispiel von Lane 10

Die prozentualen Werte der entsprechenden Isoenzyme werden ins Verhältnis zum spektroskopisch ermittelten LDH-gesamt gesetzt, um die Isoenzymkonzentration in Units (IU) berechnen zu können.

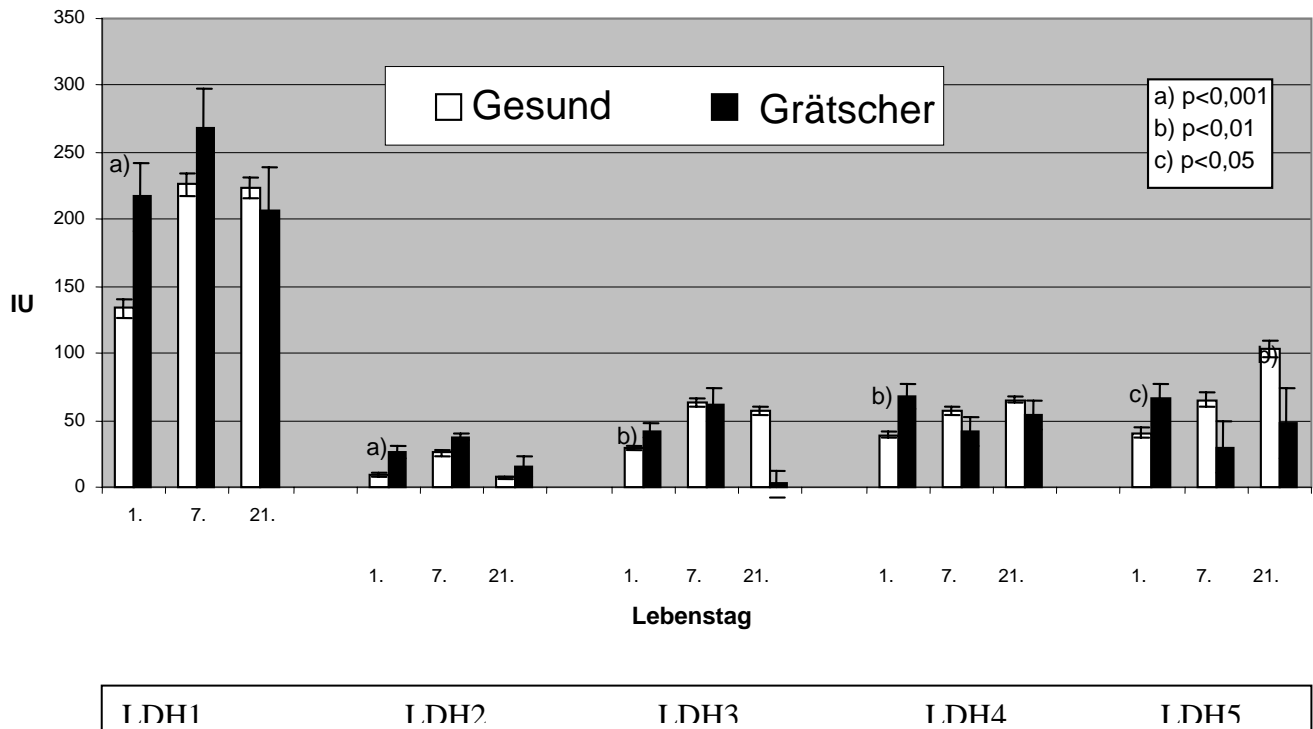


Abbildung 14: LDH-Isoenzymgehalte im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln (LSM±SE)

Die Auswertung dieser Gele ergab bei den Isoenzymen 1, 2, 3, 4 und 5 am ersten Blutentnahmetag einen signifikant nachweisbaren Zusammenhang in der Isoenzymkonzentration und dem Status Grätscher. Die Konzentration der Isoenzyme am Tag der Geburt zeigten einen enorm erhöhten Wert (28% - 63%) gegenüber den gesunden Tieren. Am 7. und 21.Tag glichen sich die Werte im Vergleich der Grätscher und der Gesunden an. Eine Ausnahme bildete dabei das Isoenzym 5. Hier verringert sich die Konzentration bei den Grätschern ab dem 7.Tag und bleibt auch am 21.Tag niedriger als bei den gesunden Ferkeln.

4.3. Elektronenmikroskopische Auswertung von Präparaten des *M.biceps femoris* im Vergleich zwischen gesunden und vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkel

Elektronenmikroskopisch wurden Gewebeproben des *Musculus biceps femoris* von 4 gesunden und 6 erkrankten Ferkeln bei 2784- bis 40 000-facher Vergrößerung verglichen. Im Querschnitt sind beim gesunden Ferkel (Abbildung 15) regelmäßig kompakt angeordnete Myofibrillenbündel erkennbar, so daß bei einer hohen Vergrößerung das bekannte stereometrische Verteilungsmuster sichtbar wird. Die Zellen weisen eine hohe Myofibrillenanzahl auf. Im Gegensatz dazu sind bei erkrankten Tieren Schwankungen im Reifegrad der Fasern ausgeprägt, der sich in ihrem geringeren Gehalt an Myofibrillen ausdrückt. Beim Grätscher (Abbildung 16) waren deutliche reduzierte Myofibrillenquerschnitte und weite zytoplasmatische Räume sichtbar. Die Fibrillen sind hier leicht kontrahiert. Das morphologische Bild der Muskelzellen beim Grätscherferkel zeigt eine auffallend hypoplastische Charakteristik.

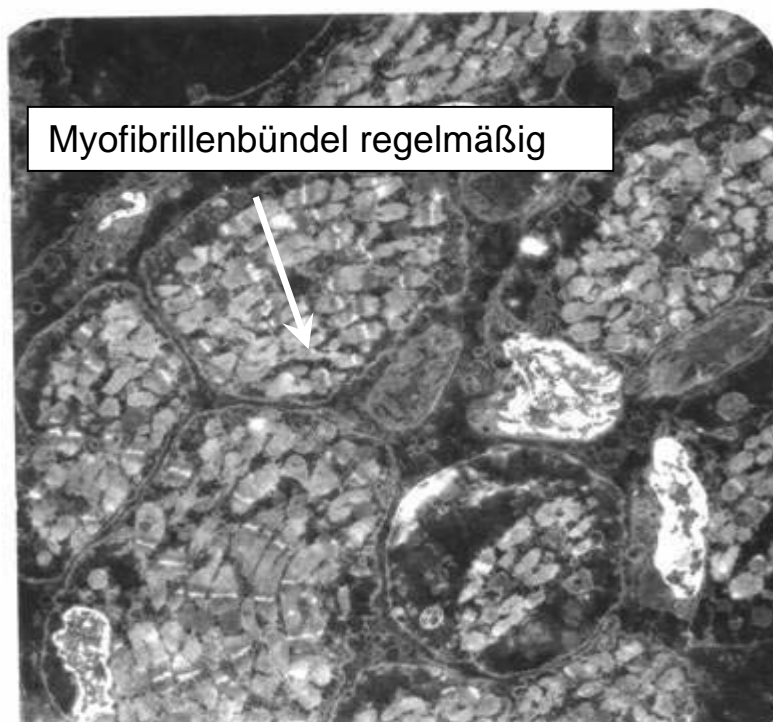


Abbildung 15: Übersicht der Muskelzellen eines gesunden Ferkels im Querschnitt (Vergrößerung 2784)

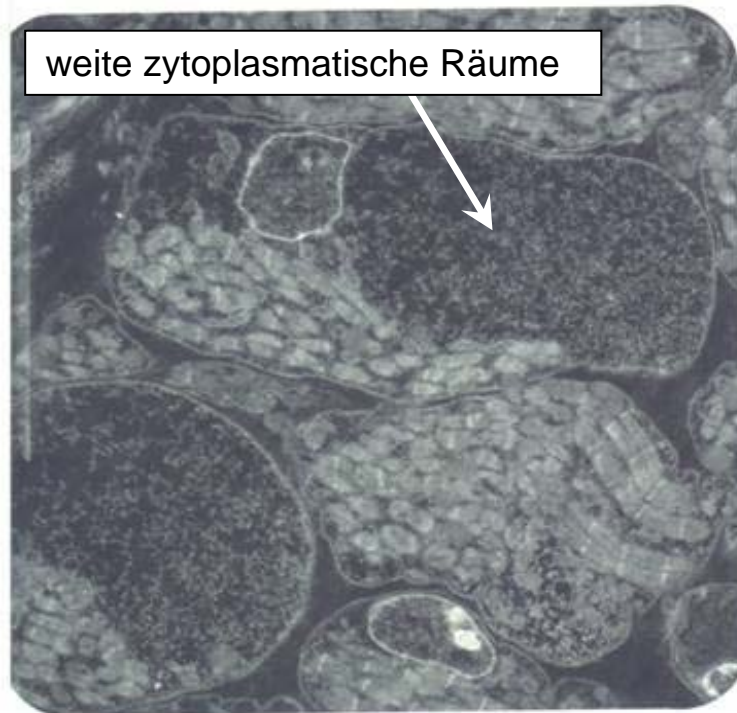


Abbildung 16: Übersicht der Muskelzellen eines Grätscherferkels im Querschnitt
(Vergrößerung 2784)

Die Längsschnitte wurden bei einer 10 000-fachen Vergrößerung verglichen. Beim gesunden Ferkel (Abbildung 17) sind deutlich die übliche Bänderung (ZIAH- Z-Streifen, I-Streifen, A-Streifen, H-Hensenzone) der Myofibrillen erkennbar. Das von Z- zu Z-Streifen reichende Segment, stellt die als Sarkomere bezeichnete Grundeinheit der Myofibrille dar. Das isotrope Segment als I-Streifen bezeichnet, enthält die Aktinfilamente der Myofibrille. Im anisotropen Segment, den A-Streifen, befinden sich die Myosinfilamente. Zahlreiche Abschnitte von sarkoplasmatischem Retikulum sowie funktionstüchtige Mitochondrien sind vorhanden.

Das Bild vom Grätscher (Abbildung 18) sieht mit dem Mitochondrienmembranzerfall, den vermehrt auftretenden Fettvakuolen, der Lyse der Fibrillen und der Granula aus Glykogen bestehend, pathologisch aus.

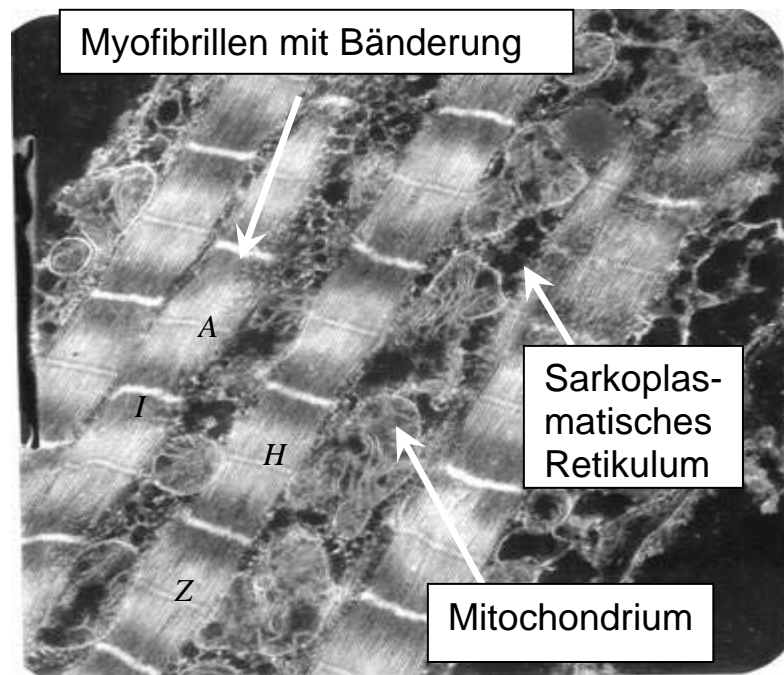


Abbildung 17: Übersicht der Muskelzellen eines gesunden Ferkels im Längsschnitt
(Vergrößerung 10000)

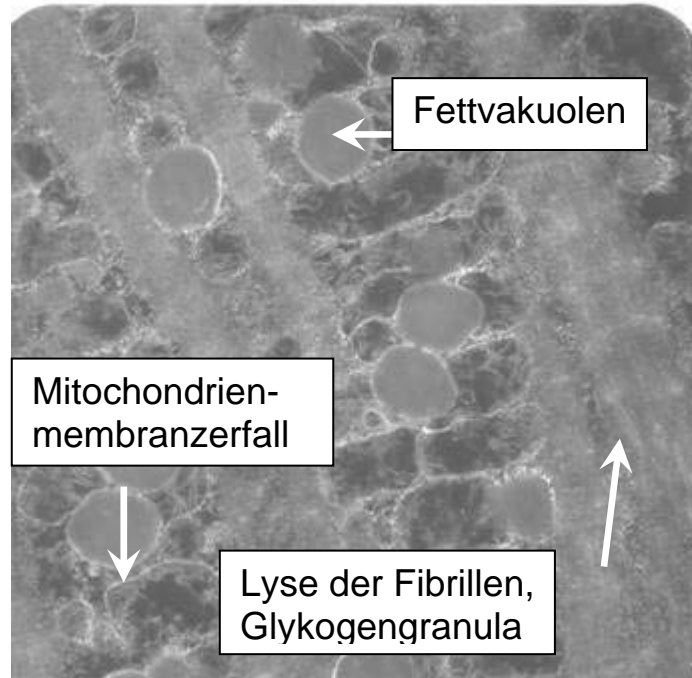


Abbildung 18: Übersicht der Muskelzellen eines Grätscherferkel im Längsschnitt
(Vergrößerung 10000)

Die pathologischen Befunde beim Grätscher traten auch vereinzelt beim gesunden Ferkel auf. Doch konnte beim Grätscher ein gehäufteres Auftreten dieser genannten Veränderungen in der Muskelzelle festgestellt werden.

Elektronenmikroskopisch waren beim Grätscher reduzierte Myofibrillenquerschnitte, Anhäufung von Fettvakuolen sowie weite zytoplasmatische Räume erkennbar. Die läßt weniger eine atrophische, sondern eine hydropische Degeneration zu, aber alles in allem sind es unspezifische Veränderungen, die bei vielen Myopathien vorkommen können.

4.4. Auswertung der Anpaarungsexperimente

In der F1-Generation fielen insgesamt 12 Würfe mit insgesamt 112 lebend geborenen Ferkeln. Davon waren 14,3 % aller lebend geborenen Ferkel vom Ausgrätschsyndrom betroffen. In der F2 Generation wurden in 24 Würfen insgesamt 214 Ferkel lebend geboren. Hier lag der prozentuale Anteil von Grätschern bei 7,5 %.

Wie aus der Tabelle 10 zu entnehmen ist, liegen die Geburtsgewichte der Grätscher aus der F1 unter dem der gesunden Ferkel. Die gewonnenen Daten zeigen ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Grätschern. Die häufig in der Literatur getroffene Aussage, das mehr männliche Tiere vom Ausgrätschsyndrom betroffenen sind, kann nicht bestätigt werden.

Tabelle 10 Vergleich der geborenen Ferkel der F1 und F2 Generation

| | | Gesund | | Grätscher | | Gesamt | | Ferkel gesamt | % Grätscher |
|----|---------------------|--------|------|-----------|------|--------|------|------------------|----------------|
| | | m | w | m | w | m | w | | |
| F1 | Anzahl | 54 | 42 | 10 | 6 | 64 | 48 | 112 | 14,3 |
| | Geburtsgewicht in g | 1666 | 1433 | 1382 | 1183 | 1621 | 1402 | | |
| F2 | Anzahl | 103 | 95 | 7 | 9 | 110 | 104 | 214 | 7,5 |
| | Geburtsgewicht in g | 1407 | 1324 | 1423 | 1238 | 1408 | 1317 | | |

Die Anzahl der lebend geborenen Ferkeln aus den gezielten Anpaarungsvarianten (siehe Abschnitt 3.5.1.) lagen in nur 6 Würfen bei 45 Ferkeln. Der prozentuale Anteil Grätscher betrug 31,1%.

Aus den gezielten Anpaarungsvarianten konnte keine gesicherte Aussage getroffen werden, ob nur bei Anpaarungen von Grätscher gegen Grätscher oder ein Grätscher mit einem phänotypisch gesunden Tier häufigere Würfe mit einem erhöhten Anteil vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln auftritt. Im Verhältnis lag hier die Häufigkeit der Grätscher höher. Die Geburtsgewichte ergaben nur geringe Abweichungen zu den gesunden Ferkeln (siehe Tabelle 11)

Tabelle 11 Variantenvergleich (1 = männlich Grätscher x weiblich Grätscher;
2 = männlich gesund x weiblich Grätscher;
3 = männlich Grätscher x weiblich gesund)

| Variante | insges.geb. Ferkel | Geburtsgewicht in g | Grätscher | | | |
|----------|-----------------------|------------------------|-----------|---|---|------------------------|
| | | | gesamt | m | w | Geburtsgewicht in g |
| 1 | 15 (7tot) | 1361 | 4 | 4 | | 1619 |
| 2 | 13 (4tot) | 1444 | 5 | 4 | 1 | 1458 |
| 3 | 27 | 1596 | 5 | 2 | 3 | 1464 |

Bei 2 Tieren, die als neugeborene Ferkel ein ausgeprägtes Ausgrätschsyndrom aufwiesen, konnten im adulten Alter (365 Tage) ähnliche Veränderungen an den Hinterextremitäten beobachtet werden.



Abbildung 19: Eber (365 Tage alt), der als Ferkel stark vom Ausgrätschsyndrom betroffen war

Es handelte sich dabei um einen Eber und eine Sau. Sie zeigten Probleme beim Aufstehen und Fortbewegen. Bei der Sitzhaltung lagen die Hinterextremitäten ebenfalls seitlich weggestreckt (Abbildung 19). Die Fortbewegung erfolgte wie im Ferkelalter halbrutschend. Im fortgeschrittenen Stadium konnten die Tiere überhaupt nicht mehr aufstehen. Nach morphologischer Untersuchungen konnte eine Arthrose ausgeschlossen werden (Prange, mündliche Mitteilung 2001).

5. Diskussion

5.1. Identifizierung Potentieller Kandidatengene

Die von LIANG & PARDEE 1992 entwickelte Methode der Differential Display/Reverse Transkriptase – PCR (DD/RT-PCR) ermöglichte die direkte Identifizierung von different exprimierten mRNAs. Das Grundprinzip beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung transkribierter Moleküle nach der RNA-Isolierung. Bei der Klonierung von Genen die entweder in verschiedenen Organen oder im gleichen Organ unterschiedlich exprimiert wurden, konnte die Methode erfolgreich eingesetzt werden (LI et al., 1994; NISHIO et al., 1994).

Beim Schwein konnten zum Beispiel im Zusammenhang mit der Aufklärung des PRRS (porcine reproduktive and respiratory syndrom) 78 porcine ESTs identifiziert und kartiert werden (WANG et al., 2000). Auch bei der Identifizierung von Genen des Muskelmetabolismus beim Rind (MOODY et al., 2000) als Parameter der Fleischleistungsmerkmale konnte die Methode positiv angewandt werden.

Eine verbreitete Anwendung ist in der Humanmedizin dokumentiert. So konnten GHADERSOHI et al. (2001) mit der Identifizierung des PDEF (prostate epithelium derived Ets transkription factor) einen weiteren wichtigen Beitrag zur Erforschung des Brustkarzinoms leisten. Im Zusammenhang mit Skelettmuskelerkrankungen wurde das cathepsin L identifiziert (DEVAL et al., 2001). KORNACKER beschreibt 1996 die Analyse von Zelllinien, die für Untersuchungen von malignen Lymphomen (Hodgkin Syndrom, HS) beim Menschen erstellt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA Populationen von gesunden und vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln verglichen. Populationsgenetischen Analysen nach deutet die Ursache auf einen di- oder oligogenen Erbgang hin. Hypothesen der Forschung vermuten, dass eine unvollständige Ausreifung von Komponenten eines oder mehrerer Organsysteme an der Pathogenese des Syndroms beteiligt sein kann. Daraus schlußfolgernd konnte von unterschiedlichen Genexpressionsmustern bei den Vergleichstieren ausgegangen werden. Nach dieser Ausgangssituation wurde die Analyse der Genexpression im *Musculus biceps femoris* von erkrankten und gesunden Ferkeln mit der Methode der DD/RT-PCR

durchgeführt. Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Anwendung des mRNA-differential display ist die exakte phänotypische Charakterisierung der ausgewählten Tiere.

Beim Vergleich der cDNA-Muster auf dem silbergefärbten Polyacrylamidgel wurden die cDNA-Banden nach verschiedenen Kriterien (Vorhandensein im Vergleich der beiden Tiergruppen, Größe, Intensität) ausgewählt. Im Unterschied zu LIANG & PARDEE (1992) wurde ein kommerzielles Primer-Set (BIOMETRA, Göttingen) eingesetzt, das 12 x 26 Primerkombinationen beinhaltet. Die Ausgangshypothese, dass bei den untersuchten Vollgeschwisterpaaren eine relativ geringe Anzahl an differenten Banden zu erwarten ist, konnte nicht bestätigt werden. Aus 71 getesteten Primerkombinationen wurden 49 differentiell exprimierte Banden ermittelt. Davon konnten 18 für die weitere Analyse verwendet werden. Auch wenn bei der Auswahl der Probanden versucht wurde, ein hohes Maß an Standardisierung zu gewährleisten, ist davon auszugehen, dass ein Anteil der differenten Banden nicht im direkten Zusammenhang mit dem Ausgrätschsyndrom stehen muß, sondern auch z.B. familienspezifisch sein kann.

Durch die begrenzte Trennschärfe bei der elektrophoretischen DNA-Auftrennung konnten nach der Klonierung einer isolierten cDNA- Bande verschieden Klone auftreten, die unterschiedliche Sequenzen repräsentieren. Aus diesem Grund wurden je klonierter cDNA-Bande 3 - 5 Klone sequenziert.

Von den 18 analysierten Fragmenten zeigten nur 4 eine signifikante Homologie zu bereits beschriebenen Genen auf:

TATA box binding protein associated factor, TAF1B (Homo sapiens)

Bedeutung zeigt der durch das TAF1B Gen kodierte Faktor bei der Transkription von Genen, d.h. bei der Regulation des Zellzyklus und dem damit verbundenen Zellwachstums. Von COMAI et al. (2000) wurde der Transkriptionsfaktor als wichtiges Zielmolekül mit der Regulation der RNA-Polymerase I-abhängigen Gentranskription während der Zelldifferenzierung identifiziert. Homologie zu Transkriptionsfaktoren zeigte erstmals bei den landwirtschaftlichen Nutztieren ein 339bp langes Fragment.

ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e, ATP5I (Bos taurus)

Das ATP5I – Gen kodiert für eine Protonenpumpe, die Bestandteil des mitochondrialen ATPase – Komplexes ist. Die Funktion des Enzyms besteht in der Katalyse der Synthese von ATP aus ADP und anorganischen Phosphat und stellt somit ein Schlüsselenzym bei der oxidativen Phosphorylierung dar. Auch wenn eine scheinbar erhöhte Expression des Gens bei den mit dem Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln erkennbar ist, kann nicht von einer funktionellen Beziehung zwischen der Expression des Gens und dem Pathogenese – Mechanismus des Ausgrätschsyndrom ausgegangen.

B cell, lymphoma 7B, BCL7B (Homo sapiens)

Das porcine cDNA-Fragment AJ404881 steht im Zusammenhang mit dem 3`-UTR des bei Mensch und bei der Maus beschriebenen BCL7B –Gen (ZANI et al., 1996; JADAYEL et al., 1998). MENG et al. (1998) vertrat die Auffassung, dass das Gen bei zellulären oder Entwicklungsprozessen von Bedeutung ist. Beim Mensch zeigt das Gen die stärksten Signale in der Skelettmuskulatur. In den eigenen Untersuchungen wurde das porcine BCL7B – Gen nur bei einem erkranktem Probanden gefunden. Der Vergleich mit verschiedenen Krankheitsbildern beim Menschen, sowie die Bedeutung des Gens bei Prozessen der Zelldifferenzierung lassen einen ursächlichen Zusammenhang zum Pathogenesemechanismus des Ausgrätschens als wahrscheinlich erscheinen.

cyclin-dependent kinase inhibitor 3 CDKN3 (Homo sapiens)

Der Zellzyklus wird in 3 Phasen unterteilt, der G1 -, S -, G2 – und der M –Phase. HANNON et al. (1994) konnte für die Regulierung der Übergänge der einzelnen Phasen eine Gruppe von Schlüsselenzymen identifizieren, die als Cyclin – abhängige Kinasen (cyclin – dependent kinase, CDK) bezeichnet wurden. Für die Aktivität und Inaktivität der CDK-Cyclin-Komplexe sind die Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (cyclin – dependent kinase inhibitor, CKI) verantwortlich. SHERR & ROBERTS (1999) unterteilen diese in zwei Gruppen : CDK4 und CDK. GYURIS et al. (1993) sowie HANNON et al. (1994) fanden

einen weiteren Inhibitor – CDK2 mit der Eigenschaft einer Tyrosin – Phosphatase. CDK2 spielt in der terminalen Differenzierung von Myoblasten eine zentrale Rolle (JAHN et al., 1994). Bei einer Überexpression von CDK2 ist ein eine Wiederbeteiligung von terminal differenzierten Muskelzellen in den Zellzyklus möglich (ZHANG et al., 1999).

In zwei unabhängigen Experimenten wurde das porcine Gen auf dem Chromosomenabschnitt 1q23-q27 lokalisiert (MAAK et al., 2001). Das humane Gen wurde auf 14q22 kartiert (DEMETRICK et al., 1995). LEEB et al. (1997) wiesen nach, dass das Homologon eines auf dem humane Chromosom 14q21 lokalisierten Gens (MGAT2) beim Schwein in der Bande 1q23-27 enthalten ist. Untermuert durch Ergebnisse von Untersuchungen PINTON et al. (2000) sowie GOUREAU et al. (2000) konnte der Beweis für die Korrespondenz zwischen Chromosom 14 und 1 bei Mensch und Schwein erbracht werden.

In den eigenen Untersuchungen zum porcinen CDKN3 – Gen konnte gezeigt werden dass:

- ⇒ eine hohe Homologie bei Protein und Gen zwischen Mensch und Schwein existiert,
- ⇒ die genomische Organisation des Gens bei beiden Spezies identisch ist,
- ⇒ bei Grätschern eine erhöhte Expression des Gens auftrat und
- ⇒ auch beim Schwein abweichende Transkripte des Gens vorkommen (MAAK, 2001).

Unter der Hypothese, dass eine unvollständige Ausreifung der Skelettmuskulatur zum Geburtzeitpunkt die Ursache des Syndroms darstellen kann (BERGMANN, 1976), den eigenen Beobachtungen und der Literatur stellt das CDKN3 ein potentielles Kandidatengen für das Ausgrätschsyndrom dar.

Die in Tabelle 4 (Seite 53) aufgelisteten 12 Fragmente konnten wegen ihrer fehlenden Homologien zu bereits bekannten Genen anderer Spezies nicht zur Klärung des Pathogenesmechanismus des Syndroms einbezogen werden. Für fortlaufende Untersuchungen wäre als erstes der Nachweis einer tatsächlich differentiellen Expression notwendig. Als Methoden dafür wären die Northern Blot – Analyse, die subtraktive Hybridisierung und eine quantitative reverse Transkription mit nachfolgender Detektion des Transkripts über ELISA – Test zu nennen. Weiterhin bildet das immer mehr wachsende Potential der Daten in der

Genbank die strukturellen Analysen der Fragmente durch Homologievergleiche fortzuführen. Durch chromosomale Zuordnung einiger Fragmente konnte z.B. das Fragment AJ133887 dem porcinen X – Chromosom zu geordnet werden, welches homolog zum gleichen Abschnitt des humanen Chromosoms ist. Hier kann das PHKA1 – Gen gefunden werden. Dieses steht als Marker für eine erbliche Phosphorylyse – Kinase – Defizienz, die eine Störung der Glykogenspeicherung im Skelettmuskel zum Zeitpunkt der Jugendentwicklung charakterisiert (GOSSSEN et al., 1995; HENDRICKX et al., 1999). DUCATELLE et al. (1986) begründet ebenfalls eine anormale Glykogenanreicherung im Muskel als Ursache für die Ausbildung des Ausgrätschsyndroms. Nach diesen Aussagen und der X – chromosomalen Lokalisation, die mit einem vermehrten Auftreten der Erkrankung bei männliche Ferkeln in Verbindung stehen könnte, ist es denkbar auch dieses Fragment als Kandidaten zu benennen.

Die Resultate der eigenen Untersuchungen belegen, dass es mit der Methode des Differential Display/Reverse Transkription – PCR möglich ist potentielle, funktionelle Kandidatengensequenzen für die Erbkrankheit „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ zu identifizieren. Fortführende Untersuchungen, um die differentielle Expression der potentiellen Kandidatengene zu verifizieren, sind notwendig.

5.2. Enzymaktivitäten von Creatinphosphokinase (CPK) und Lactatdehydrogenase (LDH) und deren Isoenzyme

Die Analysen zur CPK – Aktivität im Blutplasma zeigten am Tag der Geburt einen um den Faktor 2 bis 3 erhöhten Wert bei den erkrankten Ferkeln im Vergleich zu den gesunden Ferkeln. Die Skelettmuskulatur macht gut 40 % des Körpergewichtes aus. Daher führen schon geringe Permeabilitätsstörungen zu signifikanten Enzymanstiegen im Blut. Beim Krankheitsbild der Muskeldystrophie steht beispielsweise eine Permeabilitätsstörung im Vordergrund.

Die CPK ist für die Bereitstellung von energiereichem Phosphat aus Creatinphosphat für die Bildung von ATP bei erhöhter Aktivität der Muskel von Bedeutung. Eine erhöhte Aktivität der CPK im Homogenat aus der Muskulatur der Hintergliedmaßen von Grätscherferkeln war

bereits von PATTERSON et al. (1969) und HILLERT et al. (1992) nachgewiesen worden. Dieser Befund weist auf gewisse Unterschiede in der Größe der Synthese bzw. in der Geschwindigkeit des Abbaus der CK in einzelnen Muskeln der Hintergliedmaßen im geburtsnahen Zeitpunkt hin, die genetisch bedingt sein können. Vorliegende Befunde von SZILAGYI et al. (1978) und von KOLB et al. (1981) deuten darauf hin, dass die bei Grätscherferkeln erhöhte Aktivität der CK im Blutplasma auf eine gesteigerte Bildung des Enzyms in der Skelettmuskulatur bzw. auf eine erhöhte Freisetzung aus dieser zurückzuführen ist. Dagegen fanden TUCEK et al. (1985) in ihren Untersuchungen keinerlei Unterschiede in den CK- und LDH-Aktivitäten im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln.

Angaben der Enzymaktivität im Gewebe von Ferkeln am Tag der Geburt liegen in der Literatur nur im geringem Umfang vor. Untersuchungen von COLLIN und STARK (1977) zeigen, dass die Aktivität der CK bei 1, 5, bei 18 bis 22 und bei 113 Wochen alten Schweinen in der Leber und im Herzmuskel altersabhängig sind, jedoch in Nieren und Skelettmuskel keine Abhängigkeit vom Alter besteht. Untersuchungen von MITCHELL und HEFFRON (1975) ergaben ebenfalls Abhängigkeiten der Aktivität des CK von der Rasse, die bei der „Deutschen Landrasse“ am höchsten lag, sowie von der Geburtsmasse.

Die Konzentration der Lactatdehydrogenase im Vergleich am Tag der Geburt liegt bei den Grätscherferkeln deutlich höher als bei den gesunden Ferkeln. In den eigenen Untersuchungen wurden erhöhte Gesamt-LDH-Aktivitäten ermittelt. Jedoch zeigte sich kein für Muskelerkrankungen typisches Isoenzymmuster. Bei Annahme einer Myopathie hätte man signifikante Werte bei den Isoenzymen 4 und 5 erwartet. Hier ist aber nur eine leichte Tendenz erkennbar. Einen deutlich signifikanten nachweisbaren Zusammenhang in den Isoenzymkonzentration und dem Status Grätscher zeigten sich nur am ersten Blutentnahmetag beim Isoenzym 1 und 2.

Vorliegende Untersuchungen von KOLB et al. (1981), GRÜN et al. (1973) und BOSTED et al. (1980) erbrachten keine Unterschiede der Aktivität der LDH im Blutplasma und im Homogenat verschiedener Gewebe (ZNS, Leber, Nieren, Herz und Skelettmuskulatur). COLLIN und STARK (1977) zeigen dagegen in ihren Ergebnissen eine beträchtliche Zunahme der Aktivität von LDH im Skelettmuskel. Daraus ist abzuleiten, dass im Verlaufe des Wachstums in den einzelnen Geweben eine unterschiedlich große Aktivität der LDH

beobachtet werden kann. Zusammenfassend ist zu vermerken das sowohl CK als auch LDH am Tag der Geburt einen deutlich erhöhten Wert aufwiesen. Am 7.Tag nach der Geburt war eine vollständige Angleichung der Plasmaspiegel an CPK und LDH zwischen beiden Kontrollgruppen zu verzeichnen. Als Ursache ist dafür eine Kompensation eventueller Rückstände in der Entwicklung denkbar (BERGMANN, 1976). Auch am 21. Lebenstag waren keine Unterschiede erkennbar.

Die signifikanten Abweichungen deuten auf eine erhöhte Permeabilität der Muskelzellmembran hin (von LENGERKEN et al., 1988) und zeigen strukturelle Differenzen im *Musculus biceps femoris* bei gesunden und erkrankten Ferkeln unmittelbar nach der Geburt.

Diese Ergebnisse können wiederum mit der Hypothese von einer unvollständigen Ausreifung der Skelettmuskulatur zum Geburtszeitpunkt bei den Grätscherferkeln als möglicher Pathogenesemechanismus in Zusammenhang gebracht werden.

5.3. Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen des *Musculus biceps femoris* bei gesunden und erkrankten Ferkeln

Anhand der eigenen Präparate ließ sich eine Tendenz zu Unterschieden im Füllgrad der einzelnen Muskelzellen ableiten. Beim gesunden Ferkel sind regelmäßig kompakt angeordnete Myofibrillenbündel erkennbar. Die Zellen weisen eine hohe Myofibrillenanzahl auf. Im Gegensatz dazu sind beim Grätscher Schwankungen im Reifegrad der Fasern ausgeprägt, die sich besonders in ihrem Gehalt an Myofibrillen ausdrückt. Die Muskelzellen der Grätscherferkel zeigten dabei eine geringere Ausfüllung mit Myofibrillen und weite zytoplasmatische Räume. Dies war im Querschnitt der Muskelpräparate erkennbar. THURLEY et al. (1969) trafen nach ihren Untersuchungen ebenfalls die Aussage vom Mangel an Myofibrillen und den nur teilweise gefüllten Zellen. Ihre Untersuchungen bezogen sich dabei auf den *M. semitendineus*, *M longissimus dorsi* und dem *M.biceps brachii*. Jedoch kamen THURLEY und DONE im Jahr 1969 zu dem Resultat, dass diese Veränderungen auch bei klinisch gesunden Tieren auftreten können. Nur in schweren Fällen läßt sich ein Beziehung zwischen klinischem Bild und dem Grad der histologisch fassbaren

Veränderungen herstellen. Die fehlende Übereinstimmung zwischen klinischem und histologischem Befund führen sie auf den schon nach 24 Stunden stattfindenden Ausgleich des Fibrillenmangels zurück. Bei leichteren Erkrankungen bestand eine große Variabilität in Zahl und Anordnung der Myofibrillen und nach 3 Tagen konnte der Fibrillenmangel durch Neubildungen nicht mehr nachgewiesen werden. Ergebnisse zu Untersuchungen am *M. biceps femoris* von Ferkeln am Tag der Geburt konnten in der Literatur nicht gefunden werden. SWATLAND (1974) führt den Mangel an leistungsfähigen Myofibrillen auf eine Unterdrückung früher Stadien der fötalen Myofibrillensynthese, durch eine Verlangsamung der Fibrillenbildung oder eine Destruktion bereits gebildeter Fibrillen zurück, die genetisch bedingt sein sollen. Die schnelle Spontanheilung erklärt sich durch die Erhöhung der Fibrillensynthese infolge des verstärkten Bewegungsreizes nach der Geburt. Die ersten, zunächst homogen erscheinenden Myofibrillen treten in der Faserperipherie auf. Sie erfahren eine starke Vermehrung und füllen schließlich die Muskelfaser weitgehend aus, wobei es gleichzeitig zur Ausbildung unterschiedlich lichtbrechender Fibrillenabschnitte kommt, die das Phänomen der Querstreifung hervorrufen. Das Zytoplasma (Sarkoplasma) der Muskelfaser enthält neben dem Grundplasma, den üblichen Zellorganellen und einigen paraplastischen Substanzen die für das Muskelgewebe charakteristischen kontraktile Myofibrillen, an die die Querstreifung der Muskelfaser gebunden ist. Durch die parallele Ausrichtung der Myofibrillen kommt neben der Querstreifung auch eine feine Längsstreifung der Muskelfaser zustande, die bei reihenförmiger Anordnung der Mitochondrien und paraplastischen Einschlüsse deutlich in Erscheinung tritt (Aufnahme Längsschnitt). Die parallel zueinander liegenden, die Skelettmuskelfaser durchziehenden Myofibrillen bauen sich aus regelmäßig wechselnden dunklen und hellen Segmenten auf. Polarisationsoptisch erweisen sich die dunklen Abschnitte als anisotrop und werden deshalb A-Streifen genannt. Die hellen Segmente sind dagegen isotrop und werden als I-Streifen bezeichnet. Dadurch, dass die A- und I-Streifen in der Skelettmuskulatur ungefähr auf gleicher Höhe liegen, kommt die charakteristische Querstreifung zustande, die im Vergleich zum Herzmuskel gröber erscheint. Ein schmales Querband im Mittelbereich der I-Streifen zeichnet sich durch sein anisotropes Verhalten aus und wird Z-Streifen genannt.

Untersuchungen von DEUTSCH und DONE (1971) ergaben an hypoplastischen Fasern eine reduzierte Anzahl und exzentrische Lagerung von Myofibrillen, die schmaler und mit einer unvollkommenen Querstreifung auftraten, ähnlich denen bei 80 Tagen alten Schweineföten.

Im Ergebnis daraus sahen sie eine Entwicklungshemmung der Muskulatur als Ursache für das Ausgrätschen. Nach licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von BERGMANN (1975) an 73 und 93 Tage alten Ferkelföten bestanden nur gewisse Analogien zwischen fötaler Muskulatur und dem hypoplastischen Fasertyp bei Grätscherferkeln. Es fehlten in der fötalen Faser die Anzeichen einer nicht laufenden Myofibrillensynthese wie auch die reichlich auftretenden Glykogenabbauprodukte, gleichfalls traten keine dystrophischen Faserveränderungen und kein gehäuftes Auftreten von Muskelfasern des Primitivtyps auf.

In den eigenen untersuchten Längsschnitten zeigten sich in der Struktur der einzelnen Fasern keine erkennbaren Unterschiede zwischen Grätschern und gesunden Ferkeln. Ausgenommen war die Verteilung in der Muskelzelle. Hier war bei den vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln neben den Mitochondrien eine beträchtliche Anhäufung von Lipidpartikeln entlang der Muskelfasern sichtbar. Diese vermehrte Anhäufung traf bei den gesunden Ferkeln nicht zu. Diese Beobachtungen gleichen denen von PATTERSON und ALLEN (1972) sowie von THURLEY und DONE (1969), die ebenfalls im Skelettmuskel der Grätscherferkel Polysaccharidreichtum bzw. eine verminderte Phosphorylaseaktivität nachgewiesen haben. Nach Untersuchungen von BERGMANN (1976) handelt es sich dabei um Glykogenabbauprodukte. Die sich daraus ableitende funktionelle Insuffizienz hypoplastischer Fasern ist naheliegend.

BERGMANN (1976) unterteilte nach seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Skelettmuskulatur von neugeborenen Ferkeln mit Ausgrätschsyndrom folgende Fasertypen:

- Normtyp der juvenilen Faser,
- hypoplastische Fasertyp,
- dystrophe Fasertyp,
- Primitivtyp.

Der Normtyp kennzeichnet sich mit einer hohen Fibrillendichte aus. Im Gegensatz dazu steht der hypoplastische Fasertyp, der durch Fibrillenmangel, Defekten und Differenzierungsmangel erkennbar ist. Untersuchungen von SWATLAND (1974) deuten an, dass eine

temporäre Störung der Bildung kontraktile Proteine vorliegt, die auf eine fehlende Induktion der ribosomalen Aktivität durch RNA-Information zurückzuführen ist.

Dystrophische Fasern zeigten vielfältige Defekte in der Filament- und Fibrillenbildung sowie den Zerfall und Abbau von Fibrillen und Fasern. Diese Vorgänge beschrieben MAIR und TOME` (1972) sowie KETELSEN (1974) bei unterschiedlichen Myodystrophien und Myopathien. Ähnliche Erscheinungen beschrieben BERGMANN (1972) bei der Muskeldystrophie beim Schaf sowie KETELSEN (1974) bei der progredienten Muskeldystrophie des Menschen. Der selektive Mangel an Myosinfilamenten und intranukleäre Filamente lassen auf primäre Synthesestörungen schließen. Das Vorhandensein von intranukleären Filamenten ist auch bei der progressiven Polymyositis des Menschen erkennbar, die in der Ursache eine Störung des intranukleären Transportes von Proteinen aufweist (YUNIS und SAMAHA, 1971; CHOU, 1968).

Die Untersuchungen von BERGMANN (1976) zeigen beim Ferkel eine große Anzahl von dystrophischen Faserveränderungen, die auf Störungen der Permeabilität der Fasern und den Anstieg von Creatinphosphokinase und Lactatdehydrogenase zurückzuführen sind.

Der Primitivtyp kann als Ausdruck einer kompensatorischen Hypoplasie gesehen werden, die sich besonders nach der Geburt wegen des beginnenden Bewegungsreizes einsetzt.

BERGMANN (1976) kam in seinen Untersuchungen zum Schluß, dass bei den Grätscherferkeln nicht allein ein Mangel an Fibrillen vorliegt, sondern gleichzeitig dystrophe Prozesse an scheinbar histologisch intakten Zellen ablaufen sowie Stoffwechselstörungen vorliegen können. Somit erklärt sich auch die Tatsache, dass das Ausgrätschen auch bei Ferkeln mit negativen histologischen Befunden auftritt. Bei Grätscherferkeln liegt eine perinatale Entwicklungsstörung der Muskulatur vor, die Charakteristika einer Myopathie aufweist. Er hält eine genetische bedingte Ursache für wahrscheinlich. Die Ergebnisse der eigenen Kandidatengenuntersuchungen sowie der biochemischen Analysen der Enzymaktivitäten von CPK und LDH untermauern diese Theorie.

5.4. Anpaarungsexperimente

In den eigenen Anpaarungen verteilt über die Eltern-, F1- und F2-Generation schwankte die Anzahl an vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln zwischen 7,5 bis 31,1 %. Ein

ausgeglichenes Geschlechterverhältnis gab es in der Eltern- und F1-Generation. In der F2 lag das Verhältnis der Grätscherferkel männlichen Tiere zu weiblichen Tieren bei 10:4. Aufgrund der sehr stark variierten Wurfgröße in den einzelnen Generationen ist aber ein direkter Vergleich untereinander unangebracht. Aussagen zur Geschlechtsdisposition werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Das von van der HEYDE et al. (1989) ermittelte Geschlechterverhältnis (männlich : weiblich) von 2,1 :1 konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die Geburtsgewichte im Vergleich Grätscherferkel zu gesunden Ferkeln zeigten keine nennenswerten Unterschiede.

In den von uns vorgenommenen Anpaarungen auf der Grundlage des beschriebenen Variantenvergleiches konnte keine Aussage zur Häufigkeit des Auftretens des Ausgrätschsyndroms getroffen werden. Gründe hierfür sind die gleiche Anzahl von Grätschertieren in jeder Variante und natürlich der sehr geringe Stichprobenumfang je Variante. Untersuchungen von MAASS und SCHULZE (1979) kamen zu dem Ergebnis, das bei den Anpaarungen mit Sauen, die als Ferkel das Syndrom zeigten, ein statistisch gesichert höherer Anteil an Grätscherferkeln geboren wurde, als bei Anpaarungen mit klinisch gesunden Sauen. Der Stichprobenumfang lag hier bedeutend höher, so daß sie diese Aussage als Hinweis auf eine genetische Disposition ansehen. Wie auch in den eigenen Ergebnissen festgestellt, sahen sie keine Beziehungen des Ausgrätschsyndroms zum Geschlechterverhältnis und zur Geburtsmasse.

Während der Anpaarungsversuche nach dem Variantenvergleich (siehe Abschnitt 3.5.1.) konnten wir bei den adulten Tieren, die als neugeborene Ferkeln vom Ausgrätschsyndrom betroffen waren, ein ähnlich klinisch charakteristisches Erscheinungsbild beobachten. Diese Beobachtung konnten wir sowohl bei einem Eber als auch bei einer Sau machen. Sie zeigten eine stark geschwächte Hintergliedmaßenmuskulatur und beim Sitzen die typische Haltung der zur Seite gelegten Hinterextremitäten. Die Bewegung erfolgte halbrutschend. In der Literatur wurden dazu bis jetzt noch keine Aussagen getroffen. BICKHARDT (1984) beschreibt ähnliche Erscheinungen wie z.B. Belastungsmiopathien und Atrophie der kaudalen Oberschenkelmuskulatur, allerdings nur bei Tieren kurz nach dem Absetzen. Weitere Untersuchungen dazu wären empfehlenswert.

Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungskomplexe in der vorliegenden Arbeit zeigen , das noch weitreichende Analysen zum Ausgrätschsyndrom durchgeführt werden müssen, um endgültig den Pathogenesemechanismus dieser Erkrankung zu erklären.

6. Zusammenfassung

Der Pathogenesemechanismus des congenitalen Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel ist weitgehend ungeklärt. Ausgehend vom bisherigen Kenntnisstand wird in der vorliegenden Arbeit versucht, Kandidatengene für diese Erkrankung zu identifizieren und zu charakterisieren. Weitere Komplexe zur Aufklärung des Pathogenesemechanismus umfassten biochemische und elektronenmikroskopische Analysen bei gesunden und erkrankten Ferkeln sowie Anpaarungsexperimente. Zur Identifizierung potentieller Kandidatengene wurden das Verfahren "Differentielles Display/ Reverse Transkription und PCR (DDRT-PCR)" angewandt. Die biochemischen Analysen erfassten die Enzymaktivitäten von Creatinkinase und Lactatdehydrogenase und deren Isoenzyme. Elektronenmikroskopisch wurden Gewebeproben des *Musculus biceps femoris* zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln verglichen. Um Aussagen zum Vererbungsmodus treffen zu können, wurden in einer Versuchsstation des Institutes gerichtete Anpaarungen vorgenommen.

Von 22 in die Analyse einbezogenen Fragmenten ließen sich 18 erfolgreich klonieren und sequenzieren. Letztendlich wurden 16 cDNA-Fragmente isoliert, die im Differential Display eine Expression bei Grätschern aufwiesen. Vier dieser 16 isolierten Fragmente zeigten signifikante Homologien mit bereits beschriebenen Genen: TATA box binding protein associated factor (TAF1B); ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, ATP5I; B cell CLL, lymphoma 7B, BCL7B; cyclin-dependent kinase inhibitor 3, CDKN3. Weitere zehn Fragmente wurden als expressed sequence tags (ESTs) aus der Skelettmuskulatur neugeborener Ferkel in EMBL/GenBank registriert und erweitern die Kenntnisse zur Genexpression im *M. biceps femoris* unmittelbar nach der Geburt. Ein potentielles Kandidatengen stellt das CDKN3 dar.

Von 209 Ferkeln wurde am 1., 7. und 21. Lebensstag Blut entnommen. Bei Grätschern wurde am Tag der Geburt ein signifikant erhöhter Creatinkinase-Wert im Vergleich zu klinisch gesunden Ferkeln ermittelt. Analog verhält es sich bei den Lactatdehydrogenase-Aktivitäten. Eine für Myopathien typische Verschiebung des Isoenzymmusters der LDH wurde nicht beobachtet.

Bei den elektronenmikroskopischen Vergleichsuntersuchungen zeigten die Muskelzellen der Grätscherferkel eine auffallend hypoplastische Charakteristik. Die Ergebnisse untermauern

die Theorie einer perinatalen Entwicklungsstörung der Muskulatur, die Charakteristika einer Myopathie aufweist.

Summary

The pathogenesis of congenital splay leg in piglets is still widely unknown. On the hand, this work aims at the isolation and characterization of candidate genes for the disease, biochemical and electron microscopic investigation were performed and mating experiments were set up to contribute to the understanding of the underlying pathogenetic mechanism.

Differential Display/Reverse Transkription PCR /DD/RT-PCR) was chosen as method for the isolation of potential candidate genes. Plasma activities of creatine kinase (CK) and lactate were determined, respectively. Furthermore, samples of *Musculus biceps femoris* were comparatively analyzed by electron microscopy. Different mating combinations between healthy pigs and pigs affected by the disease immediatly after birth should elucidate the mode of inheritance of congenital splay leg. Eighteen out of 22 isolated fragments were cloned and sequenced finally leading to 16 expressed sequence tags (ESTs) which were exclusively observed in splay leg piglets. Further characterization of the fragments revealed homologies to 4 human genes (TATA-box binding protein associated factor 1B, TAF1 B; ATP Synthase ; B cell CLL, lymphoma 7, BCL7B; Cyclin-dependent kinase inhibitor 3, CDKN3). CDKN3 has a crucial function in cell cycling and thus, may be involved in the pathogenetic mechanisms. Further investigations are necessary to evaluate the candidate gencharacter of CDKN3. Further 10 fragments with no differntial expression were submitted to EMBL/genBank and provide information about gene expression in porcine *M. biceps femoris* immediatly afther birth.

Significantly increased plasma levels for CK and LDH were observed in splay leg piglets at day 1 but not at other time points. There were no shifts in the isoenzyme pattern.

Muscle cells of splay leg piglets possess hypoplastic characteristics as revealed by electron microscopy. The results of this experiment support the hypothesis that congenital splay leg is a perinatal disturbance of the skeletal muscle development with properties of different myopathies.

Literaturverzeichnis

- AIELLO L, ROBINSON GS, LIN YW, NISHIO Y, KING GL, Identification of multiple genes in bovine retinal pericytes altered by exposure to elevated levels of glucose by using mRNA differential display. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 1994:6231-6235
- ARENDAR GM, MILCH RA. Splay-leg-a recessively inherited form of femoral neck anteversion, femoral shaft torsion and subluxation of the hip in the laboratory lop rabbit: its possible relationship to factors involved in so called „congenital dislocation“ of the hip. *Clin Orthop.* 1966 **44**:221-229.
- BAUER D, MULLER H, REICH J, RIEDEL H, AHRENKIEL V, WARTHOF P, STRAUSS M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 1993 **21**:4272-4280
- BAUMGARTNER BG, DEPPE A, RETTENBERGER G, LEEB T, HAMEISTER H, BRENIG B. Molecular analysis of the porcine proteolipid (PLP) gene. *Mamm Genome.* 1999 **10**:895-899
- BERGMANN V. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathogenese der Grätschstellung neugeborener Ferkel. *Mh Vet Med.* 1975 **31**:129
- BERGMANN V. Elektronenmikroskopische Befunde an der Skelettmuskulatur von neugeborenen Ferkeln mit Grätschstellung. *Arch Exp Vet Med.* 1975 **30**:239-260
- BERGSTÖM JG. Fläksjuka (splay leg) hos spädkgrisar. En litteraturstudie. *Svensk Vet Tidn.* 1972 **24**:219
- BICKHARDT K. Pathogenese und Behandlungsmöglichkeiten der Myopathien beim Schwein. *Der praktische Tierarzt.* 1984 **10**:841-844
- BJÖRKLUND NE, SVENDSEN J, SVENDSEN LS. Histomorphical studies of the perinatal pig. Comparison of five mortality groups with the unaffected pigs. *Acta Vet Scand.* 1987 **28**:105-116
- BOLLWAHN W, PFEIFFER A. Symptomatische Behandlung des Grätschens bei Schweinen durch zeitweilige Fesselung der Hintergliedmaßen (klinische Kurzmitteilung). *Dt tierärztl Wschr.* 1969 **76**:239
- BOSTED H, REINHARDT HJ. Zur Entwicklung des Serumenzymprofils bei Ferkeln in den ersten Lebensstunden und -tagen. *Zbl Vet Med A.* 1980 **27**:85-95

- BRADLEY R. What do we know about splayleg? Pig Farming 1980 **28**:51
- CHOU SM. Myxovirus – like structures and accompanying nuclear changes in chronic polymyositis. Arch Path. 1968 **86**:649
- CLOUSCARD-MARTINATO C, MULSANT P, ROBIC A, BONNET A, GASSER F, HATEY F. Charakterization of FSH-regulated genes isolated by mRNA differential display from pig ovarian granulosa cell. Anim Genet. 1998 **29**:98-106
- COLLIN KA, STARK AJ. Enzyme activities in tissues of clinically normal large white pigs. Variations with age and sex. Res Vet Sci. 1977 **23**:326-330
- COMAI L, SONG Y, TAN C, BUI T. Inhibition of RNA polymerase I transcription in differentiated myeloid leukemia cells by inactivation of selectivity factor 1. Cell Growth Differ. 2000 **11**:63-70
- CUNHA TJ. Spraddled hindlegs may be a result of choline deficiency. Feedstuffs. 1968 **40**:25-29
- CURVERS P, DUCATELLE R, VANDERKERCKHOVE P, DE COSTER W, CAULUS A, HOORENS J. Morphometric evaluation of myofibrillar hypoplasie in splayleg piglets. Dt Tierarztl Wschr. 1989 **96**:189-191
- DAVID JC, LANDRY J, GRONGNET JF. Perinatal expression of heatshock protein 27 in brain region and nonneutral tissues of the piglets. J Mol Neurosci. 2000 **15**:109-120
- DEMETRICK DJ, MATSUMOTO S, HANNON GJ, OKAMOTO K, XIONG Y, ZHANG H, BEACH DH. Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclinC (CCNC) cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). Cytogenet Cell Genet. 1995 **69**:190-192
- DEVAL C, MORDIER S, OBLED C, BECHET D, COMBARET L, ATTAIX D, FERRARA M. Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. Biochem-J. 2001 **15**:143-150
- DEUTSCH K, DONE JT. Congenital myofibrillar hypoplasia of piglets: ultrastructure of affected fibres. Res Vet Sci. 1971 **12**:176-184
- DICKERSON JWT, WIDDOWSON EM. Chemical changes in skeletal muscle during development. Biochem J. 1960 **74**:247-257
- DOBSON KJ. Congenital splayleg of piglets. Aust Vet J. 1968 **44**:26

- DOBSON KJ. Failure of choline and methionine to prevent splayleg in piglets. Aust Vet J. 1971 **44**:26-28
- DUCATELLE R, MAENHOUT D, COUSSEMENT W, HOORENS JK. Spontaneous and experimental myofibrillar hypoplasia and its relation to splayleg in newborn pigs. J Comp Path 1986 **96**:433-445
- ELSCHNER M, KOLB E, MÜLLER I, VALLENTIN G. Untersuchungen über den Gehalt an DNA, RNA und Gesamtprotein in verschiedenen Skelettmuskeln, im Zwerchfell, in der rechten und linken Herzkammer sowie in der Muskulatur des Ösophagus, des Magens und der Harnblase von normal entwickelten Ferkeln und von Grätschferkeln unterschiedlicher Körpermasse. Arch Exp Vet Med. 1991 **45**:131-143
- ENSMINGER ME, BOWLAND JP, CUNHA TJ. Observations on the thiamine, riboflavine and choline needs of sows on reproduction. J Anim Sci. 1947 **6**:409
- FARMER JL, MACKIE SW, RITCHIE JP. Developmental changes in the biochemical composition of foetal and neonatal pig muscle special reference to DNA synthesis. J. Agric Sci Camb. 1980 **95**:563-574
- FUJII J, OTSU K, ZORZATO F, DE LEON S, KHANNA VK, WEILER JE, O'BRIEN PJ, MACLENNAN DH. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 1991 **253**:448-451
- GERBENS F, DE KONING DJ, HARDERS FL, MEUWISSEN TH, JANSSEN LL, GROENEN MA, VEERKAMP JH, VAN ARENDONK JA, TE PAS MF. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. J Anim Sci. 2000 **78**:552-559
- GHADERSOHI A, SOOD AK. Prostate epithelium-derived Ets transcription factor mRNA is over expressed in human breast tumors and is a candidate breast tumor marker and a breast tumor antigen. Clin Cancer Res. 2001 **7**:2731-2738
- GOSSEN M, WULLRICH A, KILIMANN MW. Dinucleotide repeat polymorphism within the PHKA1 gene at Xq12-q13. Hum Genet. 1995 **95**:469-470
- GOTTSCHALK W, Allgemeine Genetik. Thieme Verlag 1994
- GOUREAU A, VIGNOLES M, PINTON P, GELLIN J, YERLE M. Improvement of comparative map between porcine chromosomes 1 and 7 and human chromosomes 6, 14, and 15 by using human YACs. Mamm Genome. 2000 **11**:796-799

- GRÜN E, IX U. Serumenzyme bei neugeborenen Tieren. *Mh Vet Med.*1973 **28**:705-712
- GYURIS J, GOLEMIS E, CHERTKOV H, BRENT R. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk 2. *Cell.* 1993 **75**:791-803
- HANNON GJ, CASSO D, BEACH D. Kap: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin- dependent-kinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 **91**:1731-1735
- HENDRICKX J, LEE P, KEATING JP, CARTON D, SARDHARWALLA IB, TUCHMAN M, BAUSSAN C, WILLEMS PJ. Complete genomic structure and mutational spectrum of PHKA2 in patients with x-linked liver glycogenosis type I and II. *Am J Hum Genet.* 1999 **64**:1541-1549
- HILLERT S, KOLB E, BÜCHNER A. Untersuchungen über den Gehalt an DNA, RNA, Protein und Nichtprotein-N in Geweben von normal entwickelten Ferkeln sowie von Grätschferkeln sehr unterschiedlicher Geburtsmasse (1. bis 3. Mitteilung) *Arch Exp Vet Med.* 1987a **41**:65-77
- HILLERT S, KOLB E, BÜCHNER A, GRÜNDEL G, SCHMIDT U. Die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase, der Alanin-Aminotransferase, der Lactatdehydrogenase und der Creatinphosphokinase im Überstand der Homogenate einiger Gewebe von normal entwickelten sowie von Grätschferkeln. *Mh Vet Med.*1992 **47**:383-387
- HÖRÜGEL K, LORENZ A. Untersuchungen zum angeborenen Beinspreizen bei Ferkeln in einer industriemäßig produzierenden Zuchtanlage. *Mh Vet Med.*1979 **34**:183-184
- JACOB B, MONOD J. Zufall und Notwendigkeit. Piper 1971
- JADAYEL DM, OSBORNE LR COIGNET LJ, ZANI VJ, TSUI LC, SCHERER SW, DYER MJ. The BCL7gene family: deletion of BCL7B in Williams syndrom. *Gene.* 1998 **224**:35-44
- JAHN L, SADOSHIMA J, IZUMO S. Cyclins and cyclin-dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 muscle cells. *Exp Cell Res.* 1994 **212**:297-307
- JIRMANOVA I. The splayleg disease: a form of congenital glucocorticoid myopathy? *Vet Res Commun.* 1983 **6**:91-101
- JIRMANOVA I, LOJDA L. Dexamethasone applied to pregnant minisows induces splayleg in mini-piglets. *Zb Vet Med. A* 1985 **32**:445-458

- JOOSTEN HF, WIRTZ P, VERBEEK HO, HOEKSTRA A. Splayleg: a spontaneous limb defect in rabbits. Genetics, gross anatomy, and microscopy. Teratology. 1981 **24**:87-104
- KAZAZIAN HH. Genetics. L1 retrotransposons shape the mammalian genome. Science.2000 **289**:1152-1153
- KIJAS JM, WALES R, TORNSTEN A, CHARDON P, MOLLER M, ANDERSSON L: Melanocortin receptor1(MC1R) mutations and coat color in pigs. Genetics. 1998 **150**:1177-1185
- KIM KS, LARSEN N, SHORT T, PLASTOW G, ROTHSCHID MF. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene associated with fatness, growth, and feed intake traits. Mamm Genome. 2000 **11**:131-135
- KETELSEN UP. Möglichkeiten und Grenzen ultrastruktureller Untersuchungen bei Erkrankungen der Skelettmuskulatur.Beitr Path. 1974 **151**:1
- KÖHLER R, SEFFNER W. Angeborenes Beinspreizen beim Saugferkel. Mh Vet Med.1974 **29**:259-262
- KOLB E, MÜHE H, HÖRÜGEL K, GRÜNDEL G, SCHINEFF C, SCHMIDT U. Untersuchungen über die Aktivität von Enzymen im Blutplasma von neugeborenen Ferkeln mit normaler Beweglichkeit sowie Ferkeln mit Grätschstellung. Mh Vet Med. 1981 **36**:904-908
- KOLB E, GRODIAN A, DITTRICH H, NESTLER K. Untersuchungen über den Gehalt verschiedener Gewebe von gesunden bzw. von Grätschferkeln an Trockenmasse, an Ca, Mg, Na, K und Gesamt-P. Mh Vet Med. 1987 **41**:12-21
- KORNACKER M, MÄRZ W, VON KALLE C, EHLERS NA, JOX A, TESCH H, DIEHL V, WOLF J. Identification of differentially expressed genes in Hodgkin`s-derived B-cell lines by differential display RT-PCR. QIAGEN News. 1996 **4**:12-13
- KRUEDEWIG B. Die Behandlung der Grätschstellung neugeborener Ferkel. Vet med Diss. 1971
- LAX T. Hereditary splayleg in pigs J Heredity. 1971 **62**:250-252

- LEEB T, KRIEGESMANN B, BAUMGARTNER BG, KLETT C, YERLE M, HAMEISTER H, BRENIG B. Molecular cloning of the porcine beta-1,2-N-acetylglucosaminyl-transferase II gene and assignment to chromosome 1q23-q27. *Biochem Biophys Acta* 1997 **1336**:361-366
- LE HONG T, KOLB E, MÜLLER I, VALLENTIN G. Untersuchungen über die Aktivität der Acetylcholinesterase im zentralen Nervensystem von gesunden sowie von Grätschferkeln mit unterschiedlicher Körpermasse. *Mh Vet Med.* 1990 **45**:243-251
- LENGERKEN G VON, BERGMANN M, SCHWALBE M, HAUGWITZ T, SCHLENKER G et al. Die Halothanempfindlichkeit des Hausschweines. *Fortschrittsberichte für die Landwirtschaft und Nahrungsgüterwirtschaft.* 1988 **26/2**:3-60
- LEO M, KOLB E, ROHLAND C, SCHINEFF C, GRÜNDEL G. Untersuchungen über die Aktivität von ATPasen im Nervensystem von Feten , von gesunden Ferkeln und von Grätschferkeln *Arch Exp Vet Med.* 1986 **40**:406-408
- LI F, BARNATHAN ES, KARIKO K. Rapid method for screening and cloning cDNA`s generated in differential mRNA display: application of northern blot for affinity capturing of cDNA`s. *Nucl Acid Res.* 1994 **22**:1764-1765
- LIANG P, PARDEE AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction *Science.* 1992 **257**:967-971
- LIANG P, AVERBOUKH L, PARDEE AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucl Acids Res.* 1993 **21**:3269-3275
- LIEBERT F, LENGERKEN G VON, GEBHARDT G, PFEIFFER H. Zur Optimierung des Wachstumsverlaufes beim Schwein unter besonderer Beachtung der Nährstoffökonomie und der Qualität der Produkte. *Karl Marx Universität Leipzig 14. Wiss Tag Sektion Tierprod. und Vet Med.* 1983
- LUNDEHEIM N. Health disorders and growth performance at a swedish pig progeny testing station. *Acta Agric Scand.* 1988 **38**:77-88
- LUKAS Z, KAMAN J, PIVNIK L. Histochemical characteristics of the splayleg syndrome in newborn piglets. *Acta Vet.* 1978 **47**:51
- MAAK S. Untersuchungen zu Kandidatengeneten für Leistungseigenschaften und Erbfehler beim Schwein. *Habil.* 2001

- MAAK S, JAESERT S, NEUMANN K, YERLE M, LENGERKEN G von. Rapid communication: Chromosomal localization and partial cDNA sequence of the porcine ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F₀ complex, subunit e (ATP5I) gene. *J Anim Sci.* 2001a **79**:1352-1353
- MAASS P, SCHULZE J. Zur genetischen Disposition des angeborenen Beinspreizens bei Saugferkeln. *Mh Vet Med.* 1979 **34**:20-21
- MAIR WGP, TOME`FMS. Atlas of the ultrastructure of diseased human muscle. Churchill Livingstone, Edinburgh-London 1972
- MAY J, LEANCU M, JIVANESCU I, POP P, STUPARIU A. Congenital myofibrillar hypoplasie (splayleg) of swine. *Vet Bull.* 1978 **49**:700
- MEHLHORN I, RITTENBACH P, SEFFNER W. Kongenitale Muskelhypoplasie bei Saugferkeln (Grätschstellung) . *Mh Vet Med.* 1970 **20**:781-784
- MEIJERINK E, FRIES R, VOGELI P, MASABANDA J, WIGGER G, STRICKER C, NEUSCHWANDER S, BERTSCHWINGER HU, STRANZINGER G. Two alpha (1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF 18R) loci. *Mamm Genome.* 1997 **8**:781-784
- MENG X, LU X, LI Z, GREEN ED, MASSA H, TRASK BJ, MORRIS CA, KEATING MT. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet.* 1998 **103**:590-599
- MILAN D, JEON JT, LOOFT C, AMARGER V, ROBIC A, THELANDER M, ROGEL-GAILLARD C, PAUL S, IANNUCELLI N, RASK L, RONNE H, LUNDSTROM K, REINSCH N, GELLIN J, KALM E, ROY PL, CHARDON P, ANDERSSON L. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science.* 2000 **288**:1248-1251
- MITCHELL G, HEFRON JJA. Factors affecting serum creatine phosphokinase activity in pigs. *J South Afric Vet Ass.* 1975 **46**:148-153

- MOODY DE, TUCKER RW, RICHARDSON LF, HANCOCK DL. Identification of differentially expressed genes in response to an anabolic compound in bovine skeletal muscle. Proceedings 27th International Conference on animal Genetics 2000 Minnesota 68
- NICHOLAS W. Introduction to Veterinary Genetics. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1996
- NISHIO L, AIELLO P, KING GL. Glucose induced genes in bovine aortic smooth muscle cells identified by mRNA differential display. *Faseb J.* 1994 **8**:103-106
- NICHOLL DST. An Introduction to Genetic-Engineering. Oxford 1995
- OLSON LD, PRANGE JF. Spradle-legged baby pigs. *Vet Med Small Anim Clin.* 1968 **63**:714-718
- PARTLOW GD, FISHER KR, PAGE PD, MAC MILLAN K, WALKER AF. Prevalence and types of birth defects in Ontario swine determined by mail survey. *Can J Vet Res.* 1993 **57**:67-73
- PATTERSON DSP, ALLEN WM. Biochemical aspects of some pig muscle disorders. *Brit Vet J.* 1972 **128**:101
- PATTERSON DSP, SWEASEY D, ALLEN WM, BERRETT S, THURLEY DC. The chemical composition of neonatal piglet muscle and some observations on the biochemistry of myofibrillar hypoplasia occurring in otherwise normal litters. *Zbl Vet Med.* 1969 **16A**:741
- PINTON P, SCHIBLER L, CRIBIU E, GELLIN J, YERLE M. Localization of 113 anchor loci in pigs: improvement of the comparative map for human, pigs, and goats. *Mamm Genome.* 2000 **11**:306-315
- PIVNIK L, KAMAN J, LUKAS Z. The mass occurrence of the so-called splayleg syndrome in newborn pigs in Czechoslovakia. *Vet Bull.* 1978 **48**:279
- PONSUKSILI S, WIMMERS K, SCHMOLL F, ROBIC A, SCHELLANDER K. Porcine ESTs detected by differential display representing possible candidates for the trait 'eye muscle area'. *J Anim Breed Genet.* 2000 **117**:25-35
- RIEGER R, MICHAELIS A, GREEN MM. Glossary of Genetics and Cytogenetics. Fischer Verlag Jena 1976 **4. Aufl.**:210-217

- ROTHSCHILD MF, JACOBSON C, VASKE D, TUGGLE C, WANG L, SHORT T, ECKHARDT G, SASAKI S, VINCENT A, MCLAREN D, SOUTHWOOD O, VAN DER STEHEN H, MILEHAM A, PLASTOW G. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 **93**:201-205
- ROZMANOVA OM. Adenozyntrifosfatna aktivnost`nerve. *Ukrain Biochim*. 1966a **38**:111
- ROZMANOVA OM. Gistochimicne doslizennja ATZ`aznoj aktivnosti v regenerujucich nervach. *Ukrain Biochim*. 1966b **38**:573
- ROZMANOVA OM, PALLADIN AV. Adenozyntrifosfatna aktivnost`nerve pig cas ich degeneraci ta regeneracii. *Ukrain Biochim* 1966 **38**:117
- SCHNAPPERELLE H, KOCH J. Untersuchungen zum Auftreten und zur Therapie des angeborenen Beinspreizen bei Saugferkeln. *Mh Vet Med*. 1980 **35**:865-869
- SCHWERIN M. Genomanalyse in der Tierzucht. 14. Hülseberger Gespräche: „Biologisch-Technische Entwicklung in der Tierproduktion“ Lüneburg 1992 154-164
- SCHWERIN M, BROCKMANN G, VANSELOW J, SEYFERT HM. Perspectives of molekular genome analysis in livestock improvement-an overview. *Anim Res Dev*. 1995 **42**:14-26
- SCHWERIN M. Struktur und Funktion von Genen beim Nutztier. 18 Hülseberger Gespräche. Schriftreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung. 2000 **18**:28-34
- SELLIER P, OLLIVIER O. Etude genetique du syndrome de l`abduction des membres (splayleg) chez le porcelet nouveau-ne. Modele multifactoriel a un seuil. *Ann Genet Selec Anim*. 1982 **14**:77-92
- SHERR CJ, ROBERTS JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of the G1-phase progression. *Gene Dev*. 1999 **13**:1501-1512
- SMOLLICH A, MICHEL G. Mikroskopische Anatomie der Haustiere. Fischer Verlag 1985 **1**:82
- SOLLER M, GENIZI A. Candidate genes as QTL. *Proc XXVI Int Conf Anim Genet*. 1998 **9**
- STIGLER J, DISTL O, KRUFF B, KRÄUSSLICH H. Segretionsanalyse von Erbfehlern beim Schwein. *Züchtungskunde*. 1991 **63**:294-305

- SVENDSON LS, WESTRÖM BR, SVENDSON J, OLSON AC, KARLSON BW. Blood serum characteristics of newborn pigs: Comparison of unaffected pigs with pigs belonging to five mortality groups. *Acta Vet Scand.* 1991 **32**:287-299
- SWATLAND HJ. Fetal and neonatal development of spindle capsules and intrafusal myofibres in the porcine sartorius. *J Anim Sci.* 1974 **39**:42
- SZILAGYI M, FELKAI F. Biochemical studies on piglets with splayleg. *Mag. Allatorv. Lap.* 1978 **33**:302
- TAYLOR JF, COUTINHO LL, HERRING KL, GALLAGHER DS Jr, BRENNEMAN RA, BRUNEY N, SANDERS JO, TURNER JW, SMITH SB, MILLER RK, SAVELL JW, DAVIS SK. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim Genet.* 1998 **29**:194-201
- THURLEY DC, GILBERT FR, DONE JT. Congenital splayleg of piglets-myofibrillar hypoplasia. *Vet Rec.* 1969 **80**:302-304
- TUCEK S, SVOBODA T, RICNY J, BASS A, SOUKUP T, VITEK V. The concentration of choline and the activities of cholinesterase, creatin kinase and lactate dehydrogenase in the blood plasma of the piglets with syndrome of splayleg (Congenital Myofibrillar Hypoplasia). *Zbl Vet Med A.* 1985 **32**:1-10
- VAN DER HEYDE H, DE METS JP, PORREYE L, HENDRICKX H, CALUS A, BEKAERT H, BUYSSE F. Influence of season, litter size, parity, gestation length, birth weight, sex and farrowing pen on frequency of congenital splayleg in piglets. *Livestock Prod Sci.* 1989 **21**:143-155
- VINCENT AL, WANG L, TUGGLE CK, ROBIC A, ROTHSCHILD MF. Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. *Mamm Genome.* 1997 **8**:793-794
- VOGT DW, GIPSON TA, AKREMI B, DOVER S, ELLERSIECK MR. Associations of sire, breed, birth weight, and sex in pigs with congenital splayleg. *Am J Vet Res.* 1984 **45**:2408-2409
- WANG Z, ROHRER GA, STONE RT, TROYER D. Rapid communication: Twenty-six new porcine microsatellites from a microsatellite enriched microdissected chromosome 8 library. *J Anim Sci.* 2000 **78**:3191-3192
- WARD PS. The splayleg syndrome in new-born pigs: a review. *Vet Bull.* 1978 **48**:279-284

- WARD PS, BRADLEY R. The light microscopical morphology of the skeletal muscles of normal pigs and pigs with splayleg from birth to one week of age. *J Comp Pathol.* 1980 **90**:421-431
- WHITE P, DAUCNEY MJ. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J Mol Endocrinol.* 1999 **23**:242-254
- WITTNER S, KOLB E, JAEHNICHEN S, KLUG E. Untersuchungen über die Aktivität der Cholinacetyltransferase und der Acetylcholinesterase in verschiedenen Abschnitten Nervensystem sowie der Skelettmuskulatur der neugeborenen Ferkeln mit normalen bzw. geringer Körpermasse sowie Ferkeln mit Stehunvermögen (Ausgrätschen). *Arch Exp Vet Med.* 1982 **36**:221-235
- WRATHALL AE. The boar and congenital problems. *Pig Vet Soc Proc.* 1988 **21**:116-134
- YASUE H, WADA Y. A swine SINE (PRE-1 sequence) distribution in swine-related animal species and its phylogenetic analysis in swine genome. *Anim Genet.* 1996 **27**:95-98
- YUNIS EJ, SAMAHA FJ. Inclusion body myositis *Lab Investing* 1971 **25**:240
- ZANI VJ, ASOU N, JADAYEL D, HEWARD JM, SHIPLEY J, NACHEVA E, TAKASUKI K, CATOVSKY D, DYER MJ. Molecular cloning of complex chromosomal translocation t(8;14;12)(q24.1;Q32.3;q24:1) in a Burkitt lymphoma cell line defines a new gene (BCL7A) with homology to caldesmon. *Blood.* 1996 **87**:3124-3143
- ZELENA J, JIRMANOVA I. Degenerative changes in skeletal muscles of piglets with congenital myofibrillar hypoplasia. *Zbl Vet Med.* 1979 **26**:652-665
- ZHANG JM, ZHAO X, WIE Q, PATERSON BM. Direct inhibition of G(1) cdk kinase activity by MyoD promotes myoblast cell cycle with drawal and terminal differentiation. *EMBO J.* 1999 **18**:6983-6993
- ZRUNEK A, BILAN J, STEFAN M, Bewertung des Einflusses von Syntostigmin bei der Therapie der kongenitalen myofibrillären Hypoplasie der Saugferkel. *Veterinarstvi`* 1977 **27**:454-456

7. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

7.1. Tabellen

- Tabelle 1:** Auswahl von Mißbildungen und Erkrankungen beim Schwein
- Tabelle 2:** Zwei-Locus-Modell (Stigler et al., 1991)
- Tabelle 3:** Ausgewählte Kandidatengene für allgemeine und spezielle Leistungsmerkmale beim Schwein (Maak, 2001)
- Tabelle 4:** Verwendete Primerpaare zur Identifizierung der genomischen Sequenz des porcinen CDKN 3-Genes
- Tabelle 5:** Einsatz der Primerkombinationen für die cDNA – Synthese aus mRNA des *Musculus biceps femoris* (U-Upstream ; D-Downstream)
- Tabelle 6:** Ergebnisse aus den Homologievergleichen in der EMBL/GenBank
- Tabelle 7:** Genomische Struktur des humanen (obere Zeile) und porcinen (untere Zeile) CDKN3-Gens (Nukleotidpositionen nach Einträgen L27711(hCDKN3) und AJ404882(pCDKN3) in der GenBank)
- Tabelle 8:** Homologieabschnitte im porcinen und humanen CDKN3 – Gen (AJ404883/404884 : NT_010084)
- Tabelle 9:** Identifizierung der exprimierten Gene im *M.biceps femoris* neugeborener Ferkel
- Tabelle 10:** Vergleich der geborenen Ferkel P Generation und F1
- Tabelle 11:** Variantenvergleich (1 = männlich Grätscher x weiblich Grätscher;
2 = männlich gesund x weiblich Grätscher;
3 = männlich Grätscher x weiblich gesund)
- Tabelle 12:** CK-Gehalte in Abhängigkeit vom Blutentnahmetag und im Vergleich zwischen Grätscher (1) und gesunden Tieren (0)
- Tabelle 13:** Übersicht Vergleich Status/Geschlecht (1-männlich; 2-weiblich)
- Tabelle 14:** LDH-gesamt
- Tabelle 15:** LDH-Isoenzyme

7.2. Abbildungen

- Abbildung 1:** Ferkel mit Ausgrätschsyndrom
- Abbildung 2:** Architektur des Skelettmuskels (a Skelettmuskelfaser, b Endomysium, c Primärbündel, d Perimysium internum, e Sekundärbündel, f Perimysium externum, g Epimysium, h Faszie) (SMOLLICH et al., 1985)
- Abbildung 3:** Regulation der Genaktivität nach dem Jacob-Monodschen Modell
- Abbildung 4:** Organisation eines Genes
- Abbildung 5:** Gesamt-RNA aus dem *Musculus biceps femoris* (1, 5, 9, 13) und Kontrolle aus Lebergewebe (14, 15) (Präparation durch CsCl-Gradientenzentrifugation)
- Abbildung 6:** Plasmid-DNA Kontrolle auf einem Agarosegel
- Abbildung 7:** Beispiel eines silbernitratgefärbten Polyacrylamidgeles mit verschiedenen Fragmenten entsprechend der beschriebenen Auswahlkriterien
- Abbildung 8:** Differentielles Display von Banden mit der Primerkombination D8U17
- Abbildung 9:** Expression des CDKN3 – Gens in verschiedenen Geweben von neugeborenen Ferkeln
- Abbildung 10:** Aktivität des CK im Plasma im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln (LSM±SE) (***- p< 0,001; n.s. – nicht signifikant)
- Abbildung 11:** LDH-Gesamtgehalte im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln (LSM±SE) (***- p< 0,001; n.s. – nicht signifikant)
- Abbildung 12:** Auftrennung der LDH-Isoenzyme auf einem 1%igen Agarosegel
Lane 15 = humaner Marker Isotrol
Lane 10 = Beispiel einer Auswertung
- Abbildung 13:** Auswertung der aufgetrennten Banden an einem Beispiel von Lane 10
- Abbildung 14:** LDH-Isoenzymgehalte im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Ferkeln (LSM±SE)
- Abbildung 15:** Übersicht der Muskelzellen eines gesunden Ferkels im Querschnitt (Vergrößerung 2784)

- Abbildung 16:** Übersicht der Muskelzellen eines Grätscherferkels im Querschnitt (Vergrößerung 2784)
- Abbildung 17:** Übersicht der Muskelzellen eines gesunden Ferkels im Längsschnitt (Vergrößerung 10 000)
- Abbildung 18:** Übersicht der Muskelzellen eines Grätscherferkels im Längsschnitt (Vergrößerung 2784)
- Abbildung 19:** Eber (365 Tage alt), der als Ferkel stark vom Ausgrätschsyndrom betroffen war

1. Verwendete Geräte

Zentrifugen

μ-Centrifuge Model 10 (Nucleopore, Tübingen)

Tischzentrifuge 2K15 (Sigma, Osterode)

Microfuge E (Beckman, München)

Zentrifuge 5417 C (Eppendorf, Hamburg)

CL GS-6R Kühlzentrifuge (Beckman, München)

Microzentrifuge (Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA)

verwendete Rotoren: F 45-30-11, Festwinkelrotor, 45 Grad (Eppendorf, Hamburg)

GH-3,8 A Ausschwingrotor (Beckman, München)

12 x 1,5ml Rotor (Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA)

I. Thermostate, Wasserbäder, Heizblöcke, Inkubatoren

Thermoblock Liebsch II (Liebsch, Bielefeld)

Heizplatte (Schott, Mainz)

Wasserbad Haake K15 (Rettberg, Göttingen)

Blockthermostat BT 100 (Rettberg, Göttingen)

Test Tube Heater 7SHT 1007 (MLT, Rostock)

Schüttelinkubator GFL 3032 (GFL, Leipzig)

Mini Oven MK II (MWG Biotech, Ebersbach)

II. PCR-Geräte

Biometra UNO II (Biometra, Göttingen)

TC1 (Perkin Elmer, Überlingen)

III. Gelelektrophorese

Macrphor Sequencing System (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg)

Horizontalelektrophorese B1A (AGS, Heidelberg)

Stromversorgung Consort E 700 (AGS, Heidelberg)

Stromversorgung Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)

IV. Sequenzierung

Automatische Sequenziereinheit ALFexpress (AmershamPharmacia
Biotech, Freiburg)

GATC1500 (GATC, Konstanz)

weitere Geräte

Spektralphotometer GeneQantII (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg)

Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Berlin)

pH-Meter Modell 537 (WTW, Weilheim)

CAMAG Reprokabinett (Polariod, Offenbach)

Vakuumtrockner Univapo 100H (GETEC, Halle)

Elektronenmikroskop (TEM 906E)

2. Verwendete Lösungen und Chemikalien (die nicht im Text beschreiben sind)

RNA –Isolierung

Homogenisationspuffer

4 M Guanidiniumthiocyanat (Merck, Darmstadt)

0,1 M Tris – HCl (pH 7,5; Roth, Karlsruhe)

Agarose –Gelelektrophorese

10 x TAE – Puffer (pH 8,0; 1000ml)

Tris – Acetat (Roth, Karlsruhe)

48,46 g

EDTA (Roth, Karlsruhe)

3,72 g

Aqua bidestillata ad 1000ml

Agarose NuSieve 3:1 (Biozym, Hessisch Oldendorf)

Ladepuffer

50% Glyzerin (Fluka, Deisenhofen)

0,1% Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)

20 mM EDTA (Roth, Karlsruhe)

10 mM Tris, pH 8,0 (Roth, Karlsruhe)

Polyacrylamid – Gelelektrophorese

(alle Chemikalien von AmershamPharmacia Biotech, Freiburg)

ReadyMix DNA PAGE (30%)

PlusOne Ammoniumpresulfat (APS)

PlusOne TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamid)

PusOne Bindsilan

PlusOne Repe – Silan

| | |
|--|----------|
| 10 x TBE – Puffer (pH 7,5; 1000ml) | |
| Tris – HCl (Roth, Karlsruhe) | 108,00 g |
| 0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe) | 40,00 g |
| PlusOne Borsäure (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) | 55,00 g |
| Aqua bidestillata ad 1000 ml | |

Ladepuffer (Differential Display)
25% Glyzerin (Fluka, Deisenhofen)
0,5% Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
0,5% Xylencyanol FF (Serva, Heidelberg)

DNA-Klonierung

| | |
|--------------------------------|---------|
| Agarplatten | |
| LB – Agar (Sigma, Deisenhofen) | 37,00 g |
| Aqua bidestillata ad 1000 ml | |
| Ampicillin (Roth, Karsruhe) | 20,00 g |

3. Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der Enzymaktivitätsbestimmung Creatinphosphokinase

Tabelle 12 CK-gehalte in Abhängigkeit vom Blutentnahmetag und im Vergleich zwischen Grätscher (1) und gesunden Tieren (0) (***) $p \leq 0,001$

| | V. | N | VI. | Mittelwert | Standardfehler | p |
|------|----|-----|-----|------------|----------------|-------|
| CK 1 | | | | | | |
| 0 | | 194 | | 166,245 | 18,983 | *** |
| 1 | | 15 | | 537,598 | 68,202 | |
| CK 2 | | | | | | |
| 0 | | 187 | | 155,445 | 10,902 | 0,735 |
| 1 | | 12 | | 140,416 | 43,022 | |
| CK 3 | | | | | | |
| 0 | | 187 | | 320,898 | 27,878 | 0,391 |
| 1 | | 12 | | 223,416 | 110,013 | |

Tabelle 13 Übersicht Vergleich Status/Geschlecht (1-männlich; 2-weiblich)

| | CK1 | | CK2 | | CK3 | |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| MW | 397,434 | 306,409 | 145,156 | 150,706 | 285,743 | 258,580 |
| N | 108 | 101 | 102 | 97 | 102 | 97 |
| P | 0,200 | | 0,901 | | 0,811 | |

Lactatdehydrogenase

Tabelle 14 LDH-gesamt

| | N | Mittelwert | Standardfehler | p |
|--------------|-----|------------|----------------|---------|
| LDH-gesamt 1 | | | | |
| 0 | 187 | 271,129 U | 10,237 | < 0,001 |
| 1 | 12 | 438,187 U | 36,867 | |
| LDH-gesamt 2 | | | | |
| 0 | 187 | 450,489 U | 7,501 | 0,633 |
| 1 | 12 | 435,916 U | 26,600 | |
| LDH-gesamt 3 | | | | |
| 0 | 187 | 460,703 U | 11,322 | 0,115 |
| 1 | 12 | 387,666 U | 44,678 | |

Tabelle 16 LDH-Isoenzyme (***) $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; + $p \leq 0,1$)

| | N | Mittelwert | Standardfehler | p |
|------------------|-----------|------------------------|-----------------------|----------|
| LDH1 1 0 1 | 200 16 | 133,759 U 216,897 U | 7,091 25,251 | *** |
| LDH1 2 0 1 | 189 12 | 226,130 U 267,761 U | 8,280 32,839 | 0,220 |
| LDH1 3 0 1 | 187 12 | 223,313 U 206,331 U | 7,806 30,800 | 0,594 |
| LDH2 1 0 1 | 200 16 | 9,335 U 25,799 U | 1,331 4,739 | *** |
| LDH2 2 0 1 | 189 12 | 25,568 U 37,447 U | 2,391 9,484 | 0,226 |
| LDH2 3 0 1 | 187 12 | 7,042 U 15,581 U | 1,809 7,142 | 0,268 |
| LDH3 1 0 1 | 200 16 | 29,951 U 42,146 U | 1,586 5,650 | ** |
| LDH3 2 0 1 | 189 12 | 63,288 U 61,648 U | 2,987 11,848 | 0,893 |
| LDH3 3 0 1 | 187 12 | 57,151 U 2,613 U | 60,604 10,315 | 0,747 |
| LDH4 1 0 1 | 199 16 | 39,302 U 67,729 U | 2,767 9,829 | ** |
| LDH4 2 0 1 | 189 12 | 57,029 U 42,114 U | 2,719 10,786 | 0,182 |
| LDH4 3 0 1 | 187 12 | 65,289 U 54,366 U | 2,826 11,155 | 0,344 |
| LDH5 1 0 1 | 200 16 | 40,852 U 65,598 U | 3,257 11,598 | * |
| LDH5 2 0 1 | 189 12 | 65,356 U 29,942 U | 4,854 19,253 | + |
| LDH5 3 0 1 | 187 12 | 103,441 U 48,122 U | 6,670 26,326 | ** |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-----------|---|
| A | Adenosin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AFLP | amplified fragment length polymorphism |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAC | bacterial artificial chromosome |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| cDNA | complementary DNA |
| cM | Centimorgan |
| DD/RT-PCR | Differential Display/Reverse Transcriptase PCR |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N = A, C, G oder T) |
| EDTA | Ethylendiamineteraacetat |
| EST | expressed sequence tag |
| FISH | flourescent in-situ hybridisation |
| G | Guanosin |
| kb | Kilo-Basen(paare) |
| kDa | Kilo-Dalton |
| LINE | long interspersed element |
| MFH | myofibrillar hypoplasia |
| MHS | malignat hyperthermia susceptibility |
| mRNA | messenger RNA |
| n | Stichprobenumfang |
| PAGE | polyacrylamide gel electrophoresis |
| PCR | poymerase chain reaction |
| PSE | pale, soft, exsudative |
| QTL | quantitative trait loci |
| RAPD | random amplified polymorphic DNA |

| | |
|----------------|--|
| REN | Restriktionsendonuklease |
| PFLP | restriction fragment length polymorphism |
| RISH | radioactive in-situ hybridization |
| RNA | ribonucleic acid |
| SDS | sodium-dodecyl-sulphate |
| SINE | short interspersed element |
| SSCP | single strand conformation polymorphism |
| SNP | single nucleotide polymorphism |
| T | Thymidin |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | Tris(hydrxymethy)-aminomethan |
| U | unit |
| UTR (5`-; 3`-) | untranslated region |

Weitere verwendete Abkürzungen sind im Text erläutert.

Lebenslauf

Name: Simone Jäsert

Geburtsdatum: 18.05.1967

Geburtsort: Nordhausen

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1973 – 1983 Polytechnische Oberschule in Nordhausen
Abschluß: 1,0

Hochschulreife: 1985 – 1986 Abitur an der Bergakademie Freiberg
Abschluß: 2,1

Berufsausbildung: 1983 – 1985 Zootechniker im VEG Tierzucht Nordhausen

Studium: 1986 – 1988 Veterinärmedizin an der Karl Marx Universität in
Leipzig

1989 – 1991 Veterinärmedizin an der Fachhochschule in Beichlingen;
Abschluß: 2,6

1991 – 1996 Agrarwissenschaft an der Martin Luther Universität in
Halle; Fachrichtung: Bodenschutz- und
Landschaftsgestaltung, Abschluß: 2,6

Berufstätigkeit: 1989 Assistenz in einer Kleintierpraxis in Halle

1997 Wissenschaftliche Hilfskraft am Pflanzen-
virologischen Institut der Landwirtschaftlichen Fakultät

1997 – 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierzucht
und Tierhaltung mit Tierklinik an der
Martin Luther Universität in Halle
DfG Projekt zum Thema: „ Molekulargenetische,
biochemische und morphologische Untersuchungen zum
Syndrom Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“

2002 Angestellte im DNA-Labor des Landeskontroll-
verbandes für Leistungs- und Qualitätsprüfung Sachsen-
Anhalt e.V.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. von Lengerken sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas bedanken.

Besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Maak für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, für seine umsichtige Art der Anleitung, den anregenden Diskussionen und den wertvollen Hinweisen bei der Anfertigung meiner Dissertation. Für die vielen Ratschläge und die konstruktive Kritik bin ich ihm sehr verbunden.

Herrn Dr. Schmidt danke ich für die große Unterstützung bei der Bearbeitung des elektronenmikroskopischen Untersuchungsmaterials.

Frau Becke danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Einarbeitung von labortechnischen Arbeitsmethoden.

Den Mitarbeiter der Lehr- und Versuchsstation in Merbitz danke ich für die Betreuung des Tiermaterials und der Realisierung der Anpaarungsexperimente.

Herrn Dr. Neumann aus dem zoologischen Institut danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft zu molekulargenetischen Fragen.

Den Mitarbeiterinnen des molekulargenetischen Labors des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere unter der Leitung von Prof. Dr. Schwerin in Dummerstorf danke ich für die Hilfe bei der Bearbeitung meines Ausgangsmaterials.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Mann und meinem Sohn, die mir durch ihre stetige Unterstützung und ihr Vertrauen Kraft zum Durchhalten gegeben haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.