

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik
(Direktor: Prof. Dr. E. von Borell)

der Landwirtschaftlichen Fakultät
(Dekan: Prof. Dr. habil. W. Merbach)



der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Untersuchungen zu Kandidatengeneten für Leistungseigenschaften und Erbfehler beim Schwein

Habilitationsschrift

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

vorgelegt von

Dr. agr. Steffen Maak

geb. am 25.01.1962

in Halle (Saale).

Gutachter: 1. Prof. Dr. habil. Dr. h.c. G. von Lengerken (Univ. Halle)
2. Prof. Dr. habil. G. Reuter (Univ. Halle)
3. Prof. Dr. habil. K. Schellander (Univ. Bonn)
4. Prof. Dr. habil. M. Schwerin (FBN Dummerstorf)

Verteidigung am: 04.12.2001

Wissenschaftlicher Vortrag am: 13.12.2001

Halle (Saale), 2001

urn:nbn:de:gbv:3-000002879

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002879>]

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINFÜHRUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Genomanalyse bei landwirtschaftlichen Nutztieren	3
2.1.1	Struktur des Genoms bei Säugetieren	3
2.1.2	Ausgewählte Methoden der Genomanalyse	9
2.1.2.1	<i>Der Zusammenhang zwischen DNA – Variation und Merkmalsausprägung beim Nutztier</i>	9
2.1.2.2	<i>Strukturelle Genomanalyse</i>	11
2.1.2.3	<i>Funktionelle Genomanalyse</i>	20
2.1.2.4	<i>Markeransatz und Kandidatengenansatz in der Genomanalyse landwirtschaftlicher Nutztiere</i>	22
2.2	Das porcine Hitzeschock – Protein 70.2 (HSP70.2) – Gen als potentielles Kandidatengen für Leistungsmerkmale beim Schwein	26
2.2.1	Die Synthese von Hitzeschockproteinen als zelluläre Antwort auf Stressoren	26
2.2.2	Die HSP70 – Multigenfamilie	28
2.2.2.1	<i>Vergleich der HSP70 – Gene bei Mensch, Rind und Schwein</i>	28
2.2.2.2	<i>Funktion der HSP70 – Gene</i>	32
2.2.2.3	<i>Regulation der Expression von induzierbaren HSP70 – Genen</i>	33
2.2.2.4	<i>Polymorphismen in HSP70 – Genen und ihre Assoziationen mit phänotypischen Eigenschaften</i>	34
2.3	Potentielle Kandidatengene für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“	37
2.3.1	Begriffe und klinisches Bild	37
2.3.2	Inzidenz und Mortalität	37
2.3.3	Morphologische und biochemische Befunde	38
2.3.4	Hypothesen zum genetischen Hintergrund des Syndroms	41
3.	MATERIAL UND METHODEN	44
3.1	Untersuchungen zur Assoziation von Sequenzvarianten im Promotor des porcinen Hitzeschock – Protein 70.2 (HSP70.2) - Gens mit physiologischen Parametern und Leistungsmerkmalen beim Schwein	44
3.1.1	Tiere	44
3.1.2	DNA-Isolierung	45
3.1.3	PCR - Amplifizierung	46
3.1.4	DNA – Sequenzanalyse	47
3.1.4.1	<i>Cycle Sequencing von PCR – Produkten im halbautomatischen System</i>	47
3.1.4.2	<i>Cycle Sequencing von PCR – Produkten im automatischen System</i>	49
3.1.5	Klonierung und Sequenzierung von PCR – Produkten	49
3.1.6	PCR-RFLP – Tests	51
3.1.6.1	<i>Promotorvarianten im pHSP70.2 – Gen</i>	51
3.1.6.2	<i>Bestimmung des Genotyps in der Nukleotidposition 1843 des porcinen Ryanodinrezeptor I – Gens (MHS – Genotyp)</i>	54

Inhaltsverzeichnis

3.1.7	Definition und Erfassung von biochemischen und morphologischen Kennwerten sowie Leistungsmerkmalen beim Schwein	55
3.1.8	Statistische Auswertung	61
3.1.8.1	<i>Analyse der Effekte von Polymorphismen im Promotor des porcinen HSP70.2 – Gens auf phänotypische Merkmale</i>	61
3.1.8.2	<i>Vergleich von Allelfrequenzen</i>	63
3.2	Identifizierung potentieller Kandidatengene für das Ausgrätsch-syndrom beim neugeborenen Ferkel	64
3.2.1	Tiere und Probenmaterial	64
3.2.2	Isolierung von Gesamt - RNA aus Muskelproben	64
3.2.3	Reverse Transkription	65
3.2.4	Zweitstrang - Synthese mit „arbitrary“ Primern	66
3.2.5	Elektrophoretische Trennung und Visualisierung der Fragmentgemische	67
3.2.6	Präparation von Banden aus den Gelen	68
3.2.7	Reamplifizierung von Banden zur weiteren Analyse	69
3.2.8	Klonierung und Sequenzierung der Fragmente	69
3.2.9	Analyse der isolierten Fragmente auf Homologie zu DNA-Sequenzen im Datenbanksystem GenBank/EMBL	70
3.2.10	Ermittlung der Struktur des porcinen CDKN3 - Gens	70
3.2.10.1	<i>Primerableitung für die Ermittlung der cDNA - Sequenz</i>	70
3.2.10.2	<i>Charakterisierung der Amplifikate und Erstellung einer cDNA - Konsenssequenz</i>	71
3.2.10.3	<i>Analyse der genomischen Sequenz</i>	72
3.2.11	Physische Kartierung von porcinen ESTs mittels Analyse von somatischen Zellhybriden	73
3.2.11.1	<i>Primerableitung und Optimierung der PCR - Reaktionen</i>	73
3.2.11.2	<i>Amplifizierung porciner Fragmente aus DNA des somatischen Zellhybridpanels</i>	75
3.2.11.3	<i>Kontrolle der Authentizität der Fragmente</i>	76
3.2.11.4	<i>Analyse der Ergebnisse</i>	76
4.	ERGEBNISSE	77
4.1	Das HSP70.2 – Gen – ein funktionelles Kandidatengene für Stressempfindlichkeit und stressbeeinflussbare Leistungsmerkmale beim Schwein?	77
4.1.1	Sequenzanalyse der 5'- und 3'-nichttranslatierten Region (UTR) des porcinen HSP70.2 – Gens	77
4.1.1.1	<i>Ermittlung einer Konsenssequenz für die 5'-UTR</i>	77
4.1.1.2	<i>Ermittlung einer Konsenssequenz für die 3'-UTR</i>	79
4.1.1.3	<i>Genotypen – und Allelfrequenzen in Polymorphismen des Promotors des pHSP70.2 – Gens</i>	79
4.1.2	Assoziation zwischen Varianten des porcinen HSP 70.2 – Gens und biochemischen und morphologischen Kennwerten des <i>M. longissimus</i> sowie Leistungsmerkmalen in verschiedenen Schweinepopulationen	82
4.1.2.1	<i>Beziehungen zwischen Promotorgenotypen sowie biochemischen und morphologischen Parametern des M. longissimus</i>	82
4.1.2.2	<i>Beziehungen zwischen Promotorgenotypen und Fleischqualitätsmerkmalen</i>	86

4.1.2.3	<i>Beziehungen zwischen Promotorgenotypen und Parametern der männlichen Fruchtbarkeit</i>	92
4.1.2.4	<i>Beziehungen zwischen Promotorgenotypen und Parametern der weiblichen Fruchtbarkeit sowie dem Geburtsgewicht</i>	93
4.1.2.5	<i>Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus in der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens und Leistungsparametern in der Berlin – Bonner – Ressourcepopulation</i>	96
4.2	Identifizierung potentieller Kandidatengensequenzen für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“	100
4.2.1	Identifizierung von merkmalsassoziiert exprimierten Fragmenten durch Gelelektrophorese (Differential Display)	100
4.2.2	Charakterisierung von merkmalsassoziiert exprimierten cDNA-Sequenzen	103
4.2.2.1	<i>TATA box binding protein associated factor (TAF1B - Gen)</i>	105
4.2.2.2	<i>ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e (ATP5I - Gen)</i>	105
4.2.2.3	<i>B cell CLL, lymphoma 7B (BCL7B - Gen)</i>	107
4.2.2.4	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3 - Gen)</i>	108
4.2.3	Isolierung und Charakterisierung weiterer cDNA - Fragmente (expressed sequence tags, ESTs) aus dem M. biceps femoris neugeborener Ferkel	118
4.2.3.1	<i>Pyruvate kinase dehydrogenase, isoenzyme 4 (PDK4 – Gen)</i>	118
4.2.3.2	<i>Ribosomal protein S10 (RPS10 – Gen)</i>	120
4.2.3.3	<i>SPARC-like1 (SPARCL1 – Gen)</i>	120
4.2.3.4	<i>N-myc downstream regulated gene2 (NDRG2 – Gen)</i>	121
4.2.3.5	<i>Pleomorphic adenoma gene like2 (PLAGL2 – Gen)</i>	121
4.2.3.6	<i>Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN – Gen)</i>	121
4.2.3.7	<i>BCL-2 associated transcription factor (BTF – Gen)</i>	122
4.3	Chromosomale Zuordnung von isolierten Fragmenten durch Analyse von somatischen Zellhybridklonen (Physische Kartierung)	123
5.	DISKUSSION	128
5.1	Das porcine Hitzeschock – Protein 70.2 (HSP70.2) – Gen als potentielles Kandidatengen für Leistungsmerkmale beim Schwein	129
5.1.1	Strukturelle Analyse der 5'- und 3'- UTR des porcinen HSP70.2 – Gens und Allelfrequenzen in den untersuchten Mutationen	129
5.1.2	Assoziationen zwischen Genotypen im Promotor des porcinen HSP70.2 – Gens und phänotypischen Merkmalen beim Schwein	133
5.1.3	Auswirkungen von Polymorphismen im 5'- und 3'- UTR auf die Expression des pHSP70.2 – Gens	138
5.2	Potentielle Kandidatengene für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“	141
5.2.1	Potentielle Kandidatengene für das Syndrom	141
5.2.1.1	<i>TATA box binding protein associated factor, TAF1B</i>	142
5.2.1.2	<i>ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e, ATP5I</i>	143
5.2.1.3	<i>B cell CLL, lymphoma 7B, BCL7B</i>	145

Inhaltsverzeichnis

5.2.1.4	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 3, CDKN3</i>	146
5.2.1.5	<i>Weitere Kandidatengensequenzen</i>	148
5.3	Physische Kartierung von Kandidatengen und weiterer expressed sequence tags (ESTs) aus dem M. biceps femoris von neonatalen Ferkeln	150
5.4.	Der Kandidatengenansatz in der Genomanalyse bei Nutztieren – Grenzen und Chancen	153
6.	ZUSAMMENFASSUNG	158
7.	LITERATURVERZEICHNIS	162
8.	VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN	180
8.1	Verzeichnis der Tabellen	180
8.2	Verzeichnis der Abbildungen	182
9.	ANHANG	183

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
DIG	Digoxigenin
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N = A, C, G oder T)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EST	expressed sequence tag
FISH	fluorescent in-situ hybridisation
G	Guanosin
GSS	genomic survey sequences
kb	Kilo-Basen(paare)
kDa	Kilo-Dalton
LINE	long interspersed element
MFH	myofibrillar hypoplasia
MHC	major histocompatibility complex
MHS	malignant hyperthermia susceptibility
mRNA	messenger RNA
n	Stichprobenumfang
PAC	P1-derived artificial chromosome
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PSE	pale, soft, exsudative
QTL	quantitative trait loci
RAPD	random amplified polymorphic DNA
REN	Restriktionsendonuklease

Verzeichnis der Abkürzungen

RFLP	restriction fragment length polymorphism
RH	radiation hybrid
RISH	radioactive in-situ hybridization
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium-dodecyl-sulphate
SINE	short interspersed element
STAT	signal transducer and activator of transcription
SPI	starter protein 1
SSCP	single strand conformation polymorphism
SNP	single nucleotide polymorphism
STS	sequence tagged site
SSR	simple sequence repeats
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
UTR (5'-; 3'-)	untranslated region
YAC	yeast artificial chromosome

Weitere verwendete Abkürzungen sind in den entsprechenden Textabschnitten erläutert. Die Symbole für Gennamen entsprechen den Empfehlungen des „HUGO Gene Nomenclature Committee“ und sind hier nicht enthalten. Informationen zu den Gennamen, soweit in der Arbeit nicht aufgeführt, sind in URL 11 abrufbar (siehe S. 177).

1. EINFÜHRUNG

Die mehr als 5000-jährige Geschichte des Schweines als Haustier wurde – ähnlich wie bei anderen Nutztieren – von tiefgreifenden Veränderungen des Phänotyps und damit auch des dem zugrunde liegenden Genotyps geprägt. So ist bei einem Vergleich der Schweinerassen der Gegenwart mit der wilden Stammform, dem Wildschwein, eine deutliche Erhöhung der Leistungsfähigkeit in Merkmalskomplexen wie Wachstum, Schlachtkörperzusammensetzung und Fruchtbarkeit zu verzeichnen. Jedoch kam es auch zu unerwünschten Entwicklungen, die sich in der Manifestierung von Erbdefekten, wie der genetisch bedingten Stressempfindlichkeit, widerspiegeln. Oberste Priorität hatte in diesem Züchtungsprozess die Anpassung der tierischen Leistung an die menschlichen Bedürfnisse. Dabei kann man drei wesentliche Phasen unterscheiden. Die erste Phase, die vom Beginn der Domestikation bis vor ca. 200 Jahren gefasst werden kann, ist durch eine langsame Verbesserung der Nutzleistungen bei äußerst heterogenem Phänotyp gekennzeichnet. Bedingt durch fehlende Kenntnisse zur Vererbung sowie schlechte Haltung – und Ernährungsbedingungen, die selbst eine Ausschöpfung des geringen vorhandenen genetischen Potentials verhinderten, hatte der Selektionsprozess einen eher zufälligen Charakter. Dies schlägt sich beispielsweise in der Zunahme des Mastendgewichtes von etwa 40 kg auf lediglich 60 kg in diesem Zeitraum nieder. Als Beginn der zweiten Phase, die bis in die Gegenwart andauert, ist die Rassenbildung als Startpunkt einer systematischen Schweinezucht zu sehen. Die Optimierung der Umweltfaktoren verbunden mit der Anwendung hochentwickelter populationsgenetischer Verfahren führten zu einem schnellen Leistungsanstieg, der sich in der gegenwärtigen Zeit fortsetzt. Die dritte Phase, in deren Beginn wir uns befinden, wird neben weiteren Fortschritten in der klassischen Tierzucht von der zunehmenden Anwendung molekulargenetischer Methoden in der Tierzucht bestimmt. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Identifizierung von Genen mit Effekten auf Nutzleistungen und Tiergesundheit. Diese, Kandidatengene genannten Loci, werden auf ihren Zusammenhang mit phänotypischen Eigenschaften untersucht und können bei enger Beziehung zur Nutzleistung in Selektionsprogramme einbezogen werden.

Die vorliegende Arbeit ordnet sich in diesen methodischen Ansatz ein. Gegenstand der Untersuchungen ist einerseits die Analyse des Zusammenhanges zwischen genetischen Varianten in einem Kandidatengen und Leistungsmerkmalen sowie andererseits die Identifizierung von potentiellen Kandidatengenen für einen Erbdefekt beim Schwein.

Dazu wurden Sequenzvariationen im porcinen Hitzeschock - Protein 70.2 – Gen als funktionellem Kandidatengen für die zelluläre Stressantwort auf ihre Assoziation zu Leistungsmerkmalen mit nachgewiesener Beeinflussbarkeit durch Stress untersucht. Weiterhin wurden Gene isoliert, deren Expression mit dem Erbdefekt „Congenitales

1 Einführung

Ausgrätschen beim Saugferkel“ assoziiert ist. Diese Gene wurden teilweise strukturell charakterisiert. Im Ergebnis dieser Untersuchung isolierte Gene wurden mit Methoden der physischen Kartierung chromosomal zugeordnet.

Ziel der Untersuchungen war somit

- die Evaluierung eines bereits bekannten Genes in Hinblick auf seinen Kandidatengencharakter,
- die Identifizierung und Charakterisierung neuer Kandidatengene sowie
- die Vervollständigung der Genkarte des Schweines.

Vor dem Hintergrund der dynamischen Entwicklung in der Genomanalyse bei Mensch, Modell – und Nutztieren werden die eigenen Beiträge einer kritischen Bewertung unterzogen und eine Einordnung der Ergebnisse von Kandidatengenuntersuchungen in die zukünftige Tierzucht vorgenommen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Genomanalyse bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Analog zu anderen Spezies verfolgt die Genomanalyse bei landwirtschaftlichen Nutztieren das primäre Ziel, die Ursachen von phänotypischer Variation auf der Ebene von Struktur und Funktion der Erbinformationen zu identifizieren. Aus Sicht des Tierzüchters steht dabei die Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse zur Verbesserung der tierischen Gesundheit und Leistung im Mittelpunkt des Interesses. Darüber hinaus führen die Ergebnisse der Genomanalyse zu einer Erweiterung des Kenntnisstandes zur Biologie der Nutztiere.

2.1.1 Struktur des Genoms bei Säugetieren

Der Genotyp eines Organismus besteht aus einem kompletten Satz vererbbarer genetischer Informationen. Seine Expression ist verantwortlich für die Entstehung des Phänotyps, der physikalischen Erscheinung eines Organismus (Lewin 1991). Seit den Arbeiten von Mendel, Beadle & Tatum, Avery sowie Watson & Crick (rev. von Lewin 1991) ist bekannt, dass die Einheit der Vererbung das Gen ist. Dieses ist wiederum aus Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in einer bestimmten Sequenz und Struktur aufgebaut und verschlüsselt die Information für ein bestimmtes Polypeptid. Neben der reinen proteinkodierenden Sequenz enthalten Gene jedoch auch Sequenzen, die nicht in Aminosäuren übersetzt werden (rev. von Schwerin 2000). Aus diesem Grund soll im folgenden für den Begriff des Gens die Gleichsetzung mit einem *Chromosomenabschnitt, der in RNA übersetzt (transkribiert) werden kann sowie der für diese Übersetzung notwendigen regulatorischen Sequenzen*, gelten. Gene sind in Chromosomen linear aufgereiht. Die Gesamtheit der Chromosomen eines Organismus stellt das Genom dar. Das Genom des Menschen besteht aus ca. 3,2 Mrd. Basen, von denen nur ca. 28% im Prozess der Transkription in RNA übersetzt werden. Wiederum lediglich 5% dieser Sequenzen verschlüsseln die Proteine, so dass letztendlich nur ca. 45 Mio. Basen oder 1,1 – 1,4% des Genoms für Aminosäuren kodieren (Baltimore 2001). Mehr als die Hälfte der genomischen DNA besteht aus teilweise hochvariablen, repetitiven Sequenzen, die in verschiedene Klassen eingeteilt wird (Abbildung 2.1, Tabelle 2.2). Die Funktion dieser DNA ist noch weitgehend ungeklärt. Im Zusammenhang mit der Replikation der DNA bei der Zellteilung wird angenommen, dass die Verlängerung dieser Sequenzen (Replication Slippage) zu einer Vergrößerung des Genoms führt und somit ein zentrales Element der Evolution darstellt (Hancock 1996). Weiterhin ist bekannt, dass die Ausdehnung von einigen Trinukleotid – Wiederholungen mit Erkrankungen des Menschen in Verbindung steht bzw. Repeatmotive direkt als Bindungsorte für nukleäre Proteine dienen (Hancock & Santibanez-Koref 1998, Maueler et al. 1999, Bit-Avrgim et al. 2001). Beckers et al. (2001) konnten in solchen DNA – Strukturen ein Gen (DUX1) identifizieren und schlussfolgern daraus, dass

2 Literaturübersicht

aktive Gene von ungewöhnlicher Struktur auch in Regionen mit repetitiver heterochromatischer DNA kodiert werden können. Unter diesem Aspekt ist eine bislang oft erfolgte Bezeichnung solcher nichtkodierender DNA als „junk DNA“ („Schrott – DNA“) sicher nicht korrekt (Baltimore 2001).

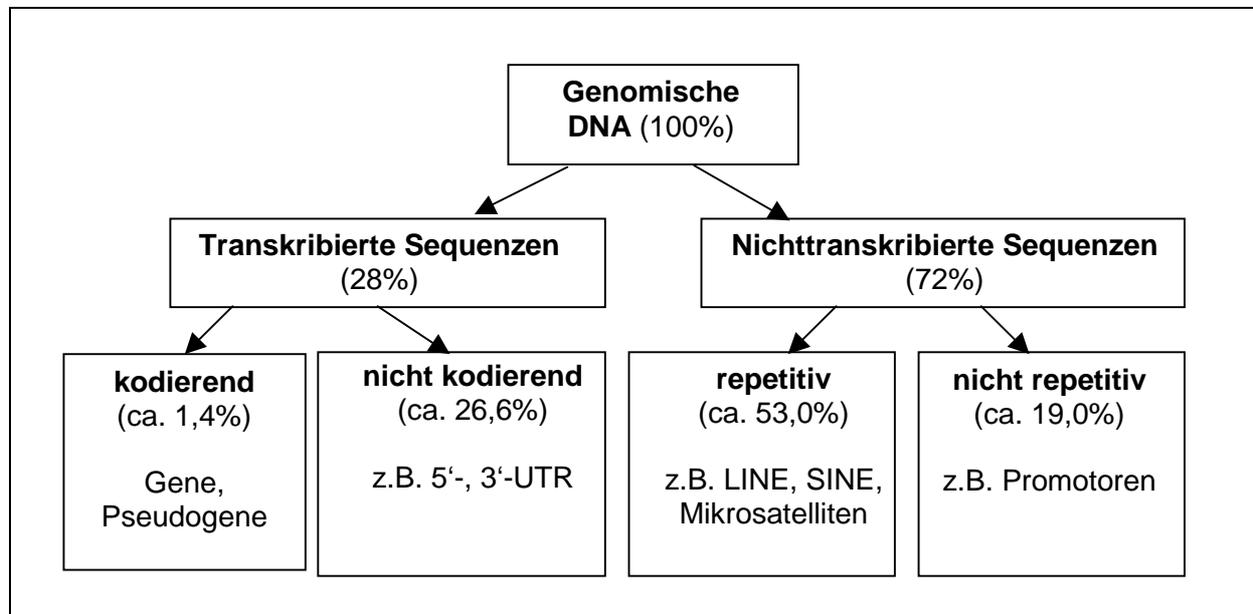


Abbildung 2.1: Schematische Struktur des Säuger-genoms. Die prozentuale Verteilung der Fraktionen bezieht sich auf das humane Genom (Baltimore 2001).

Die Größe der Genome landwirtschaftlich genutzter Säuger ist mit ca. 3 Mrd. Basen vergleichbar mit der des Menschen. So werden für das Rind 2,7 bis 3,2 Mrd. Basen (Zhu et al. 1999, Buitkamp et al. 2000) und für das Schwein 2,6 – 3,0 Mrd. Basen angegeben (Schmitz et al. 1992, Al Bayati et al. 1999). Demgegenüber liegt die Genomgröße beim Huhn nur bei geschätzten 1,2 Mrd. Basen (Crooijmans et al. 2000).

Kodierende Sequenzen

Diese, mit Abstand kleinste Fraktion des Genoms enthält nahezu alle Informationen zu den Proteinen in Form der *Gene*. Für das humane Genom existiert eine Vielzahl von Schätzungen der Anzahl an Genen (rev. von Editorial 2000, Wolfsberg et al. 2001). Auf der Basis verschiedenster Methoden kalkuliert, wurden zwischen 35.000 und 120.000 Gene erwartet. Nach Abschluss der Rohdatengenerierung für das komplette menschliche Genom deutet sich eine Anzahl im Bereich von 30.000 bis 40.000 proteinkodierender Gene an, die somit nur doppelt so hoch liegt, wie die Genanzahl bei niederen Eukaryonten (IHGSC 2001). Allerdings ist eine deutlich höhere Komplexität des Genoms beim Menschen zu beobachten, die durch alternative Spleißvarianten zu einer höheren Anzahl unterschiedlicher Proteine

führt. Diese Proteine können wiederum zu ca. 10.000 Familien zusammengefasst werden (Editorial 2000). Ohne dass entsprechende Schätzungen für landwirtschaftliche Nutztiere vorliegen, kann vermutet werden, dass aufgrund analoger Genomgröße auch eine ähnliche Genanzahl bei den landwirtschaftlich relevanten Säugern vorliegt. Beachtet werden muss, dass eine Gleichsetzung von Gen und proteinkodierender Sequenz zwar im Regelfall korrekt ist, jedoch nicht unbeträchtliche Ausnahmen bestehen (Eddy 1999). So sind im menschlichen Genom Tausende von Genen bekannt, die nichtkodierende RNAs als Endprodukt bilden. Nach dem Autor sind dabei folgende Hauptklassen zu differenzieren:

- Transfer – RNAs (tRNAs), die als Adapter bei der Übersetzung des Triplet – Kodes der RNA in die Aminosäure – Sequenz dienen
- ribosomale RNAs (rRNAs) mit vermuteter direkter katalytischer Wirkung bei der Bildung von Peptidbindungen
- kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) mit Funktionen bei der Verarbeitung der rRNAs
- kleine nukleäre RNAs (snRNAs), die an der Verarbeitung von prä-mRNAs zu mRNA (Spleißen) beteiligt sind.

Die Gene sind linear auf den Chromosomen angeordnet, wobei sich die Gendichte auf verschiedenen Chromosomenregionen stark unterscheidet (Holmquist 1992). Auch in ihrer genomischen Organisation unterscheiden sich die Gene teilweise voneinander. Beim überwiegenden Teil ist die cDNA – Sequenz in sogenannten Exons enthalten, die von Introns unterbrochen werden. Die Länge der Introns scheint mit höherer Entwicklungsstufe des Organismus zuzunehmen (Baltimore 2001, Duret 2001). Diese Introns werden in einem Spleißen genannten Prozess im Zuge der Transkription des Gens enzymatisch herausgetrennt und folglich nicht in Aminosäuren übersetzt. Die entsprechenden Schnittstellen enthalten Signalmotive. Nach Mount (1982) stellt dabei die Nukleotidfolge CAAG / GTAGAGT die Konsenssequenz für die Grenze zwischen dem 3' – Ende des Exons und dem 5' – Ende des Introns dar. In einer Arbeit von Burset et al. (2000) wurden 43.000 solcher in den Datenbanken dokumentierter Übergänge analysiert. Dabei wurden in nahezu 99% der Fälle ein AG / GT – Übergang gefunden. Ausnahmen von dieser Regel treten oft in Verbindung mit Erkrankungen auf (French et al. 1999, Timchenko & Caskey 1999, Yeh et al. 2000). Die Variabilität im Prozess des Spleißens von Genen wird als ein wesentlicher Beitrag dazu gewertet, dass z.B. das humane Genom eine höhere Komplexität als das von niederen Organismen aufweist (IHGSC 2001). Eine kleine Gruppe von Genen – ihr Anteil wird auf etwa 5% geschätzt – weist keine Introns auf. Typische Vertreter dieser Gruppe sind die Histone (Gentles & Karlin 1999). In den kodierenden Sequenzen sind nach ersten Analysen für das humane Genom bis zu 2 Polymorphismen je Gen zu erwarten (TSC 2001). Diese Sequenzvariation ist als Informationsquelle für die Genomanalyse von herausragender

2 Literaturübersicht

Bedeutung, da solche Genvarianten zu Unterschieden in den resultierenden Proteinen führen können und somit potentielle Auswirkungen auf den Phänotyp haben.

Nicht kodierende Sequenzen

Diese Sequenzen stellen 98 – 99% des Genoms beim Säuger dar (Abbildung 2.1). Für den größten Teil dieser DNA ist die Funktion unbekannt. Die Bedeutung von *Sequenzabschnitten 5' sowie 3' des eigentlichen Gens* für die Regulation der Genexpression ist demgegenüber unumstritten. Diese flankierenden Sequenzen enthalten Sequenzelemente, die mit RNA – bindenden Proteinen interagieren und damit Einfluss auf die Lokalisierung, Stabilität und Translation der mRNA nehmen (Derrigo et al 2000, Guhaniyogi & Brewer 2001). Von besonderer Bedeutung für die Transkription von Genen sind die in der 5'-UTR enthaltenen *Promotoren*. Diese Promotoren werden selbst nicht in mRNA übersetzt, enthalten jedoch Bindungsmotive für Proteine und initiieren somit die Expression eines Gens (Levin 1991).

Tabelle 2.1: Für die Initiation der Gentranskription erforderliche Promotorelemente bei Säugern (Auswahl nach Levin 1991).

Element	Konsensussequenz	gebundene DNA	bindendes Protein	Bedeutung
TATA – Box	TATAAAA	> 25 bp	TFIID	Festlegung des Transkriptionsstartpunktes
CAAT – Box	GGCCAATCT	ca. 22 bp	CTF/N1	Beeinflussung der Initiationsrate
GC – Box	GGGCGG	ca. 20 bp	SP1	Beeinflussung der Initiationsrate

Von diesen Bindungsregionen sind drei Elemente am besten erforscht – die TATA – Box, die CAAT – Box sowie die GC – Box. Sie kommen in den meisten Promotoren vor und verfügen jeweils über eine kurze Konsensussequenz. Die bindenden Faktoren decken jedoch einen längeren Bereich ab, dessen Sequenz offensichtlich von geringerer Bedeutung ist (Tabelle 2.1.). Von geringster Bedeutung für die Initiierung der Gentranskription ist die TATA – Box. Bei Fehlen dieses Elements wird lediglich der Startpunkt der Transkription verlagert, die Transkription an sich kann weiterhin stattfinden. Jedoch wird die Effektivität der Transkription bereits durch eine einzelne Basensubstitution in der TATA – Box dramatisch verringert. Einen ähnlich großen Einfluss scheint die CAAT – Box zu haben, da sie ebenfalls empfindlich auf Mutationen reagiert (Levin 1991). Dieses Element kann ebenso wie die GC – Box in unterschiedlicher Orientierung vorliegen, ohne dass ihre Funktionalität beeinflusst wird. Neben den Sequenzen in den Kernbereichen dieser Boxen haben offensichtlich auch

ihre Abstände zueinander eine Bedeutung für die Effektivität der Gentranskription. Darüber hinaus existieren eine ganze Reihe von Verstärker (Enhancer) genannten Sequenzmotiven, die oft räumlich getrennt vom Promotor angeordnet sind und die Effektivität der Transkription maßgeblich beeinflussen können. Polymorphismen in diesen Bereichen des Genoms können über Modifikationen in der Genexpression zu phänotypischen Auswirkungen führen (Derrigo et al. 2000).

Eine weitere große Gruppe von Sequenzen wird unter dem Begriff „repetitiv“ – also „sich wiederholend“ – zusammengefasst. Hierbei unterscheidet man verschiedene Klassen, die sich im Wesentlichen in ihrer Länge und durch ihre evolutionäre Geschichte unterscheiden (Tabelle 2.2). Von den in Tabelle 2.2 aufgeführten Elementen hat besonders die Mikrosatelliten – DNA eine große Bedeutung für die Genomanalyse. Auf die anderen repetitiven Sequenzelemente soll hier nur kurz eingegangen werden.

Der *Duplikation von chromosomalen Segmenten* wird allgemein eine potentielle Bedeutung im Prozess der Evolution zugesprochen (IHGSC 2001). Man unterscheidet interchromosomale Duplikationen, wo Segmente zwischen nicht – homologen Chromosomen dupliziert sind. Dies scheint häufiger in Zentromer- und Telomerregionen der Chromosomen aufzutreten.

Tabelle 2.2: Typen von repetitiver DNA im Genom von Säugern (IHGSC 2001).

Klasse	Typ	Länge	Kopienanzahl ¹	Fraktion des Genoms ¹
Duplikation von Chromosomensegmenten		10 – 300 kb	-	ca. 5%
Tandem-repetitive DNA an Zentro- und Telomeren von Chromosomen		mehrere kb	-	-
Durch Transposition (Einbau transkribierter RNA in die Chromosomen) entstandene Wiederholungen	long interspersed element (LINE)	6 – 8 kb	850.000	21%
	short interspersed element (SINE)	100 – 300 bp	1,5 Mio.	13%
	LTR retrotransposon	1,5 – 11 kb	450.000	8%
	DNA – Transposon	80 bp – 3 kb	300.000	3%
Einfache Sequenzwiederholungen	Minisatellit	14 – 500 bp	-	3%
	Mikrosatellit	1 – 13 bp	-	

¹: diese Angaben beziehen sich auf das menschliche Genom

2 Literaturübersicht

Bei intrachromosomalen Duplikationen erfolgen diese innerhalb eines Chromosoms bzw. Chromosomenarms. Durch die hohe Homologie dieser Segmente kann es zu strukturellen Rearrangements der Chromosomen kommen. Beim Menschen sind zahlreiche Erkrankungen im Zusammenhang mit diesem Phänomen beschrieben (rev. von IHGSC 2001).

Tandem – repetitive DNA an Zentro- und Telomeren der Chromosomen wurde bei zahlreichen Säugern beschrieben (Duhamel-Maestracci et al. 1979, Marsich et al. 1998). Dabei sind speziell an den Telomeren der Chromosomen mehrere tausend Wiederholungen des Sequenzmotivs „TTAGGG“ zu finden. Die enzymatisch vermittelte Stabilität dieser Region ist von großer Bedeutung für die Lebensdauer der Zellen (Kajstura et al. 2000, Shay & Wright 2001). *Repetitive Sequenzen, die durch Transposition von Fremd – DNA in das Wirtsgenom entstanden sind*, stellen mit 45% Anteil beim Menschen die größte DNA – Fraktion im Genom dar (IHGSC 2001). Ihre Bedeutung im Evolutionsprozess ist ausführlich in der angegebenen Quelle diskutiert. Die *einfachen Sequenzwiederholungen* (simple sequence repeats, SSR) entstehen durch Verschiebungen bei der DNA – Replikation (replication slippage, Kruglyak et al. 1998). Aufgrund ihrer weiten (und relativ gleichmäßigen) Verteilung im Genom sowie ihres hohen Polymorphiegrades sind sie bislang von herausragender Bedeutung für molekulargenetische Analysen gewesen. Entsprechend der Länge der sich wiederholenden Sequenz unterteilt man die Wiederholungen in Mikrosatelliten (Repeatlänge $n = 1 - 13$) sowie Minisatelliten (Repeatlänge $n = 14 - 500$, IHGSC 2001). Minisatelliten wurden erfolgreich in der Abstammungsanalyse sowie Genomkartierung bei Mensch und Nutztier eingesetzt (Jeffreys et al. 1985, Weitzel et al. 1988, Haberfeld et al. 1989). In den letzten Jahren war die Bedeutung von Minisatelliten eher abnehmend, da sie gegenüber Mikrosatelliten einige Nachteile aufweisen. So sind sie aufgrund ihrer relativ großen Länge mit PCR – basierenden Verfahren nur bedingt darstellbar und zeichnen sich in DNA – Fingerprint - Analysen häufig durch sehr komplexe, schwer auswertbare Bandenmuster aus. Demgegenüber sind Mikrosatelliten einfach, reproduzierbar und kostengünstig darzustellen. Im humanen Genom ist im Durchschnitt ein repetitives Element (Mini- oder Mikrosatellit) je 2.000 Basen zu finden (IHGSC 2001). Bezogen auf die Mikrosatelliten stellen die Dinukleotidrepeats die größte Gruppe dar (Tabelle 2.3). Auffällig ist, dass etwa 50% aller Dinukleotidrepeats das Repeatmotiv „CA“ aufweisen. Nach Bull et al. (1999) werden auch gemischte Repeats (z.B. CA_nCG_m) beobachtet. Weiterhin stellen die Motive „TAA“ und „CAA“ 54% aller Trinukleotidrepeats. Die hier aufgeführten Analysen beziehen sich auf das sequenzierte humane Genom.

Tabelle 2.3: Häufigkeit von Mikrosatelliten im humanen Genom (modifiziert nach IHGSC 2001).

Gruppe	Häufigkeit (% der erfassten Repeats)	davon	Häufigkeit (% der jeweiligen Gruppe)
Mononukleotide	18,2	-	-
Dinukleotide	21,3	- CA TA GA GC	(100) 50,0 35,0 14,9 0,1
Trinukleotide	5,8	- TAA, CAA	(100) 54,0
Tetranukleotide	16,0		
4 - < 12 Repeats	38,7		

Für die landwirtschaftlich genutzten Säuger liegen vergleichbare Daten nicht vor. Durch die zielgerichtete Isolierung vor allem von „CA“-Repeats bei Nutztieren stellt diese Klasse jedoch auch hier das häufigste bekannte Element dar. In einer Studie von Toth et al. (2000) wird darüber hinaus gezeigt, dass bei Säugern dieses Motiv auch generell am häufigsten vorkommt.

Im Sinne der Zielsetzung der Genomanalyse beim Nutztier sind die kodierenden Sequenzen von besonderem Interesse, da sie die Informationen für die Proteine beinhalten und somit für möglicherweise leistungsbeeinflussende Proteinvarianten kodieren können. Jedoch sind auch die nicht kodierenden Sequenzen – insbesondere die Mikrosatelliten – wertvolle Hilfsmittel bei der Identifizierung von Assoziationen zwischen genetischer und phänotypischer Variabilität. Im Folgenden soll an einigen ausgewählten Beispielen die Anwendung der Erkenntnisse zum Aufbau des Genoms bei landwirtschaftlichen Nutztieren dargestellt werden.

2.1.2 Ausgewählte Methoden der Genomanalyse

2.1.2.1 Der Zusammenhang zwischen DNA – Variation und Merkmalsausprägung beim Nutztier

Nach Schwerin et al. (2000) existiert ein komplexes Geflecht von Beziehungen zwischen dem Gen als primären Träger der Erbinformation und dem letztendlich für den Tierzüchter relevanten Leistungsmerkmal (Abbildung 2.2). Generell wird der Phänotyp eines Individuums durch qualitative und quantitative Merkmale bestimmt. Dabei sind die qualitativen Merkmale dadurch gekennzeichnet, dass sie von einem bzw. wenigen Genen beeinflusst werden und

2 Literaturübersicht

Umweltfaktoren an ihrer Ausprägung keinen oder nur einen geringen Anteil haben. Typische Merkmale dieser Klasse sind Erbfehler, Haut – und Haarfarbe sowie Blutgruppeneigenschaften. Die Analyse der diesen Eigenschaften zugrunde liegenden Gene ergibt einen klaren Zusammenhang zwischen ihren Allelen und der Merkmalsausprägung, d.h. nach Identifizierung der Genvarianten ist eine direkte Selektion nach ihnen in der Tierzucht möglich. Aus den aufgeführten Beispielen ist jedoch ersichtlich, dass nahezu alle wirtschaftlich bedeutsamen Merkmale der Nutztiere quantitativ determiniert sind.

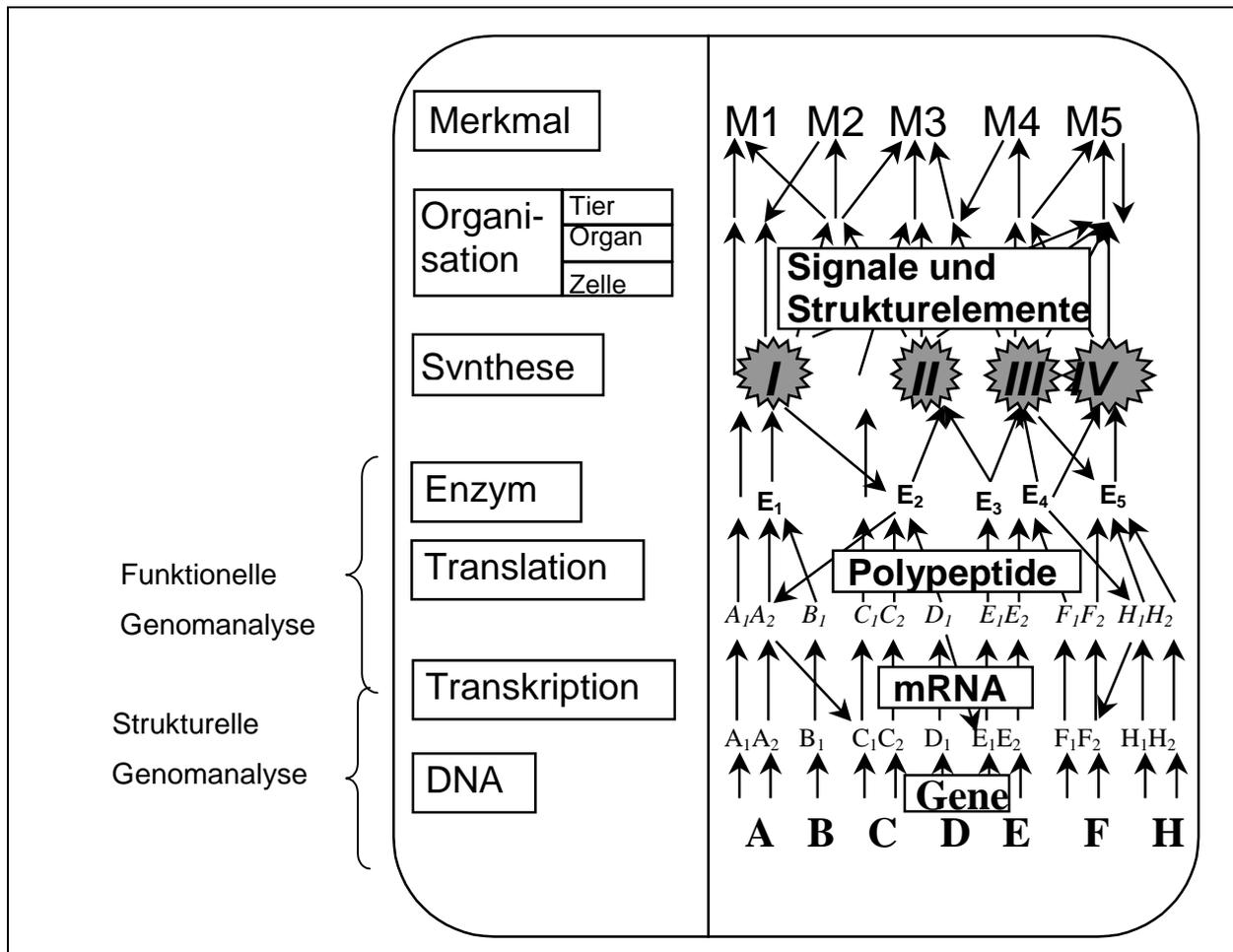


Abbildung 2.2: Einordnung von struktureller und funktioneller Genomanalyse im Weg vom Gen zur Merkmalsausprägung (Schwerin et al. 2000).

In diesem Falle wird die kontinuierliche Variation des Merkmals durch zahlreiche Gene mit unterschiedlich großen Einzeleffekten verursacht. Zudem ist ein mehr oder weniger hoher Anteil der Varianz in dem Merkmal durch Umweltfaktoren verursacht. Solche Merkmale werden als „quantitative trait loci“ (Genorte für quantitative Merkmale; QTL) bezeichnet (Geldermann 1975). Für diese Leistungsmerkmale ist das Auffinden von relevanten Genorten ungleich komplizierter, da nur in seltenen Fällen Gene mit großen Effekten auf die phänotypische Varianz auftreten (Major – oder Hauptgene). Erschwert wird die Suche oft

durch vorliegende Wechselwirkungen zwischen Genvarianten bzw. zwischen genetischen Varianten und Umweltfaktoren. Hierbei ist es überwiegend erforderlich, molekulargenetische Hilfsmerkmale – die molekularen Marker – einzusetzen (Schwerin 1993).

Mit der Genomanalyse wird das Ziel verfolgt, Varianten auf den Ebenen der Struktur und Transkription der DNA sowie der Translation der entsprechenden Informationen in Aminosäuresequenzen zu identifizieren. In Abhängigkeit vom Ansatzpunkt kann man zwischen struktureller und funktioneller Genomanalyse unterscheiden, wobei die Übergänge oft fließend sind (Abbildung 2.2). In den Abschnitten 2.1.2.2 und 2.1.2.3 werden einige Aspekte der strukturellen und funktionellen Genomanalyse in Hinblick auf landwirtschaftliche Nutztiere, insbesondere das Schwein, behandelt.

2.1.2.2 Strukturelle Genomanalyse

Genomsequenzierung

Die umfassendste Form der strukturellen Genomanalyse ist die Genomsequenzierung. Sie stellt jedoch auch in Hinblick auf die erforderlichen Ressourcen die höchsten Ansprüche. Mit der Weiterentwicklung der technischen Grundlagen für die Sequenzierung ist in den vergangenen Jahren ein rascher Fortschritt zu verzeichnen gewesen. Neben zahlreichen Genomen von niederen Organismen sind mittlerweile die Genome von 8 Eukaryonten, darunter Mensch und Maus (nahezu) vollständig entschlüsselt. Entsprechende Projekte sind unter anderem auch für das Schwein in Vorbereitung (Wimmers, pers. Mitteilung). Trotz dieser Fortschritte ist gegenwärtig noch nicht abzusehen, wann komplette Genominformationen für die landwirtschaftlichen Nutztiere vorliegen werden.

Nutzung molekulargenetischer Marker

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). Diese Marker werden allgemein in Typ I und Typ II eingeteilt. Während die Typ I – Marker Polymorphismen repräsentieren, die direkt in Genen lokalisiert sind, stellen Typ II – Marker Sequenzvariationen in nichtkodierender DNA dar. Als wichtigste Methoden zur Darstellung der Marker beider Typen sind der *DNA – Fingerprint*, 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 Einzelbasenpaar – Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism, SNP*) zu nennen. Mit diesen Verfahren werden die Variationen sichtbar gemacht und können mittels verschiedener statistischer Methoden (Kopplungs- und

2 Literaturübersicht

Assoziationsanalyse) in Beziehung zu den jeweils interessierenden Leistungsmerkmalen gebracht werden. Während bei SNPs, Mikrosatelliten und überwiegend bei RFLPs die zugrunde liegende DNA – Sequenz bekannt ist, wird bei der Fingerprint-, AFLP- und RAPD-Analyse die Sequenzveränderung nur dargestellt, nicht aber charakterisiert. Mit allen Methoden wurden jedoch Beiträge zur Genomanalyse geleistet, von denen einige am Beispiel des Schweins dargestellt werden.

DNA – Fingerprint

Der DNA – Fingerprint beruht auf der Hybridisierung von markierter DNA (Sonde) mit enzymatisch verdauter genomischer DNA des zu untersuchenden Individuums bzw. gepoolter DNA mehrerer Individuen (Jeffreys 1985). Nach elektrophoretischer Auftrennung und Sichtbarmachung der Hybriden ergeben sich Bandenmuster, die sich entsprechend der vorhandenen Polymorphismen zwischen den untersuchten Proben unterscheiden. Diese Methode eignet sich hervorragend zur Individualisierung von Probanden (Schwaiger et al. 1992, Kostia et al. 2000) und kann über Assoziationsanalysen auch zur Auffindung von Zusammenhängen zwischen Markergenotyp und Leistungseigenschaften genutzt werden (Haley 1991, Buitkamp et al. 1991). Aufgrund der bereits erwähnten Nachteile (Hybridisierung vs. PCR u.a.) ist ihre Bedeutung in der Genomanalyse geringer geworden.

RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Diese Methode basiert auf der PCR – Amplifizierung von genomischer DNA mit sogenannten degenerierten (unspezifischen) kurzen Primern (Mazurier et al. 1992). Auch hierbei werden Unterschiede in der DNA – Sequenz über die elektrophoretische Auftrennung der entstehenden PCR – Produkte detektiert, ohne dass Informationen zur Sequenz vorhanden sind. Diese Methode eignet sich unter anderem zur Untersuchung von genetischer Diversität und dem Nachweis von Tierarten in verarbeiteten Produkten (Castellanos et al. 1996, Koh et al. 1998, Oh 1999).

AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Als ein drittes Markersystem, das keine Erkenntnisse zu den zugrundeliegenden Sequenzen voraussetzt, sind die AFLP zu nennen (Vos et al. 1995). Diese Technik – eine methodische Vereinfachung des „traditionellen“ DNA – Fingerprints – besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

- Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Anlagerung (Ligation) kurzer Oligonukleotide (Adapter) an die entstandenen Fragmente,
- Amplifikation der Restriktionsfragmente mittels zu den Adaptern komplementärer Primer
- elektrophoretische Analyse der Fragmente.

Der im Namen enthaltene Begriff Längen – Polymorphismus ist insofern irreführend, da im Gegensatz zum DNA – Fingerprint im Wesentlichen Basenaustausche identifiziert werden. Diese Polymorphismen führen zur Entstehung (bzw. zum Wegfall) von Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme und damit zur nachfolgenden Amplifizierung längerer (bzw. kürzerer) Fragmente. Auch diese Methode ist gut zur Analyse von genetischer Diversität geeignet (Ovilo et al. 2000) und wird besonders beim Huhn auch für die Erstellung genetischer Karten genutzt (Knorr et al. 1999, Herbergs et al. 1999).

Mikrosatelliten

Wie bereits dargelegt, stellen Mikrosatelliten aufgrund ihrer Verteilung im Genom der Säuger und des hohen Polymorphiegrades ein ideales Markersystem dar. Basis der Untersuchungen zu QTL mit Hilfe von Mikrosatelliten ist die vorhandene Kopplung von Genotypen am Mikrosatellitenlocus mit Varianten im leistungsbeeinflussenden Genort (QTL; Dudley 1992, Bovenhuis et al. 1997). Dabei ist ein Kopplungsungleichgewicht zwischen Marker und QTL Bedingung, welches in kommerziellen Nutztierpopulationen kaum anzutreffen ist. Deswegen wurden in den meisten QTL – Studien experimentelle Kreuzungen von Rassen oder Linien vorgenommen, die sich in Leistungseigenschaften stark unterscheiden. Jedoch wurden auch statistische Verfahren beschrieben, mit denen QTL – Analysen in Auszuchtpopulationen möglich sind (Bovenhuis et al. 1997, Spelman & Bovenhuis 1998). Um zu einer genauen Identifizierung von QTL zu gelangen, ist eine möglichst enge Abdeckung des gesamten Genoms mit Markern erforderlich. Demzufolge war und ist die Isolierung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern ein wesentlicher Schwerpunkt der Genomanalyse bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Wesentliche Beiträge zur Mikrosatelliten – Isolierung und ihrer Charakterisierung beim Hausschwein leisteten beispielsweise unter anderem Brenig & Brem (1991), Johansson et al. (1992), Fredholm et al. (1993), Ellegren et al. (1993), Rohrer et al. (1994), Rettenberger et al. (1994), Robic et al. (1996) und Alexander et al. (1996a, b). Stand in den genannten Experimenten die mehr zufällige Isolierung einer möglichst hohen Markeranzahl und ihre Kartierung im Vordergrund, ist nach Erreichen einer gewissen gleichmäßigen Abdeckung des porcinen Genoms mit Markern im durchschnittlichen Abstand von weniger als 2 cM das Ziel gegenwärtiger Versuche die Schließung von vorhandenen Lücken. Dazu werden Mikrosatelliten gerichtet aus einzelnen Chromosomen bzw. deren Abschnitten (Arme oder zytogenetische Banden) isoliert (Ellegren & Basu 1995, Riquet et al. 1995, Grimm et al. 1997, Zhao et al. 1999, Wang et al. 2000). Entsprechend stellen die Mikrosatelliten auch die größte Gruppe der charakterisierten und kartierten DNA – Sequenzen innerhalb der jeweiligen Spezies dar (siehe Tabelle 2.5 im Abschnitt Genomkartierung). Mikrosatelliten sind einerseits ein geeignetes Werkzeug zur Abschätzung von genetischer Diversität von Linien, Gattungen und Arten landwirtschaftlicher Nutztiere und wurden folglich in zahlreichen Untersuchungen dazu verwendet (Paszek et al. 1998,

2 Literaturübersicht

Mattapallil et al. 1999, Edwards et al. 2000, Martinez et al. 2000, Koskinen & Bredbacka 2000, Vila et al. 2001). Andererseits wurde bereits die Verwendung von Mikrosatellitenmarkern bei der Identifizierung von QTL – Regionen erwähnt, die auch beim Schwein zu einer Vielzahl von Ergebnissen geführt hat. Ein Überblick über kartierte QTL beim Schwein ist in Tabelle 2.4 gegeben. Die Resultate verdeutlichen den polygenen Charakter der meisten untersuchten Leistungsmerkmale. Auf allen porcinen Chromosomen außer 11, 14, 17 und 18 konnten Regionen identifiziert werden, auf denen vermutlich Gene mit wesentlichen Effekten auf die untersuchten Merkmale lokalisiert sind.

Tabelle 2.4: Identifizierte QTL für allgemeine und spezielle Leistungsmerkmale beim Schwein.

Merkmalskomplex	Chromosom	Literatur
Wachstum und Mastleistung	1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 13	Andersson et al. 1994, Rothschild et al. 1995, Geldermann et al. 1996, Wang et al. 1998, Paszek et al. 1999, Jeon et al. 1999, Wada et al. 2000
Schlachtkörper – und Fleischqualität	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 12, 15, X	Geldermann et al. 1996, Andersson-Eklund et al. 1998, Rohrer & Keele 1998a, b, Wang et al. 1998, Paszek et al. 1999, Wada et al. 2000, Rohrer 2000, Grindflek et al. 2001
Fruchtbarkeit	4, 6, 7, 8, 9, 13, 15	Wilkie et al. 1996, Rathje et al. 1998, Milan et al. 1998, Wada et al. 2000
Allgemeine Leistungsmerkmale; morphologische und physiologische Parameter	1, 2, 3, 4, 5, 9, 13, 16	Andersson-Eklund et al. 1998, Paszek et al. 1999, Wada et al. 2000

Die Abdeckung des Genoms bei solchen Studien beim Schwein ist mit einem Marker je 5 – 10 cM nach wie vor gering (Wada et al. 2000). Gründe dafür sind der enorme Typisierungsaufwand sowie die begrenzte Anzahl verfügbarer Marker.

Unter der Annahme von ca. 3 Mrd. Basen (siehe Abschnitt 2.1.1) und ca. 3000 cM (Wada et al. 2000) als physische und genetische Längen des Schweinegenoms, umfasst demnach ein Intervall von 10 cM in dem ein QTL kartiert wurde, ca. 10 Mio. Basenpaare. Bei weiterer Übertragung der Daten für das humane auf das porcine Genom bedeutet dies das Vorhandensein von etwa 24 bis 30 Genen in dieser Region. Dementsprechend stellen QTL – Studien mehr Vorarbeiten für weiterführende Analysen dar, als dass sie zur direkten Identifizierung leistungsrelevanter Gene führen. Bei Vorliegen ausreichend enger Kopplung

zwischen Mikrosatellitenallel und Allel im leistungsrelevanten Genort ist jedoch eine direkte Verwendung von Mikrosatelliten in der züchterischen Selektion möglich (Schwerin 1993).

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Bei dieser Methode werden Sequenzunterschiede, die zur Entstehung bzw. zur Entfernung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (REN) führen, dargestellt. Eine Nutzung der Methode ist bereits 1980 von Botstein et al. beschrieben worden. Von einem Polymorphismus spricht man in Abgrenzung zu sehr seltenen Variationen, wenn das seltenere Allel in einer Frequenz von mindestens 0,01 auftritt (Brookes 1999). Bei der Analyse von RFLP sind zwei methodische Herangehensweisen zu unterscheiden. In einer ersten Variante wird genomische DNA mit ausgewählten REN gespalten und mit einer markierten Sonde, die einen interessierenden DNA - Abschnitt enthält, hybridisiert. Bei Sequenzunterschieden, die relevant für die Bindung der REN sind, entstehen unterschiedliche Bandenmuster im Elektrophoresegele durch die Hybridisierung der Sonde mit den resultierenden, unterschiedlich langen Restriktionsfragmenten. Ohne dass man die Sequenzveränderung kennt, ist ein solcher RFLP reproduzierbar darstellbar und kann zur Kartierung des Fragmentes genutzt werden (Flanagan et al. 1988, Jung et al. 1989, Mariani et al. 1991). Mit der Verfügbarkeit der PCR – Technik und zunehmend vorhandenen Sequenzinformationen ist eine weitere Variante der RFLP – Darstellung möglich geworden. Neue Polymorphismen werden identifiziert, indem PCR – Produkte eines interessierenden Gens mit verschiedenen REN verdaut werden und die entstehenden Fragmente zwischen verschiedenen Individuen verglichen werden. Unterschiede im Bandenmuster zeigen einen Polymorphismus an, der durch Sequenzierung der meist kurzen PCR – Produkte leicht charakterisiert werden kann (Huett et al. 1999, Knoll et al. 2000). Genfragmente mit bekanntem Polymorphismus können somit amplifiziert und das PCR – Produkt nach Verdau mit einer geeigneten REN verdaut und analysiert werden. RFLP sind di – allelische Marker und können in Assoziationsanalysen auf ihre Kopplung mit Leistungseigenschaften untersucht und zur Kartierung des Gens genutzt werden (Splan et al. 1998, te Pas et al. 1999, Cheng et al. 2000, Gerbens et al. 2001). Ein erstes Beispiel für die erfolgreiche Anwendung solcher PCR – RFLP – Tests in der Tierzucht stellt der Test auf Maligne – Hyperthermie – Empfindlichkeit (MHS) als Marker für die Stressempfindlichkeit beim Schwein dar (Fujii et al. 1991, Förster et al. 1992). Mittlerweile existieren zahlreiche solcher gendiagnostischer Tests, die teilweise auch in kommerziellen Populationen eingesetzt werden (Stranzinger & Went 1996, Georges 1999, Simianer 2000, Schwerin et al. 2000).

Detektion von Einzelbasenpaarpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) mit neuen Methoden

Das direkte oder indirekte Auffinden von Einzelbasenpaarpolymorphismen war bereits das Ziel bei einigen der vorstehend beschriebenen Methoden (RFLP –, RAPD –, AFLP –

2 Literaturübersicht

Analysen). Mit dem Vorliegen einer ersten Rohsequenz für das humane Genom erleben die sogenannten SNPs eine Renaissance. In den 90er Jahren vorwiegend durch Mikrosatelliten als Markersystem der Wahl verdrängt, wird ihnen eine große Bedeutung in der genetischen Forschung der nächsten Jahre eingeräumt (Gray et al. 2000). Im Vergleich zu Mikrosatelliten, mit denen lediglich Kopplungsanalysen zwischen Marker und Merkmal durchgeführt werden können, stellen einige der zahlreichen SNPs die Sequenzvariationen mit phänotypischen Effekten dar. Mittlerweile sind beim Menschen 1,42 Mio. SNPs identifiziert (International SNP Map Working Group 2001), die in entsprechenden Datenbanken verfügbar sind (Brookes et al. 2000, Marth et al. 2001). Die neue Herausforderung besteht nunmehr darin, Detektions – Techniken zu entwickeln, die einen hohen Durchsatz mit möglichst hoher Reproduzierbarkeit und geringen Kosten kombinieren. Bislang wurden zur Detektion von SNPs die SSCP – Analyse (Einzelstrang – Konformations – Polymorphismus), die Heteroduplexanalyse sowie die direkte Sequenzierung der Fragmente eingesetzt (Gray et al. 2000). Auch wenn letztere beiden Methoden mittlerweile hochautomatisiert durchgeführt werden können, erfordern künftige Studien zu multifaktoriellen Erkrankungen beim Menschen neue, effektivere Techniken. Nach Griffin & Smith (2000), Gray et al. (2000), Shi (2001) und Prince et al. (2001) sind folgende Systeme dabei zu nennen:

- Hybridisierungstechnologien (Microarrays [„DNA – Chips“], Beads)
- automatische ELISA – Assays
- fluorometrische Detektion der Pyrophosphatfreisetzung (Pyrosequencing)
- Fluoreszenz – Resonanz – Energie – Transfer (FRET) basierende Technologien
- Massenspektrometer – Analysen (MALDI – TOF)
- dynamische allelspezifische Hybridisierung (DASH).

Einige dieser Verfahren werden bereits in der Analyse von Nutztiergenomen eingesetzt (Heaton et al. 2001a, b, Schwerin pers. Mitteilung).

Genomkartierung

Ziel der Genomkartierung ist die vollständige Aufdeckung der Abfolge aller kodierenden und nichtkodierenden Sequenzen auf den Chromosomen. Folglich stellt die komplette Sequenz des Genoms die „perfekte“ Genkarte dar. Bis zum Erreichen dieses Zustandes bedient man sich verschiedener Verfahren der Zuordnung von Genen zueinander sowie zu Chromosomen und -abschnitten, die in die Methoden der genetischen, zytogenetischen und physischen Kartierung unterteilt werden können (Brenig 2000). Diese Einteilung wird in der Literatur uneinheitlich gehandhabt. So werden die als zytogenetische Kartierung bezeichneten Methoden oft auch unter dem Begriff der physischen Kartierung eingeordnet.

Weiterhin wird der englische Begriff *physical mapping* häufig als physikalische Kartierung übersetzt.

Genetische Kartierung

Die Methode der genetischen Kartierung ist die sogenannte Kopplungsanalyse (*linkage mapping*). Mit diesem Verfahren erfasst man die relative Position von Loci auf einem Chromosom zueinander. Für das *linkage mapping* ist die Basis der Berechnung des Abstandes von 2 Loci die Häufigkeit ihrer Rekombination während der Replikation des Erbgutes. Die Rekombinationshäufigkeit nimmt mit dem Abstand der Loci zu. Als Maßeinheit für die Rekombinationshäufigkeit wird Centimorgan (cM) verwendet. Dabei entspricht 1 cM einer Rekombinationsrate von 1%. Bezogen auf die geschätzte physische Länge des Schweinegenoms (ca. 3 Mrd. Basenpaare) umfasst ein Intervall von 1 cM dementsprechend in etwa 1 Mio. Basenpaare. Um Rekombinationsfrequenzen zu ermitteln, sind klar definierte Abstammungsstrukturen sowie polymorphe Loci erforderlich. Beim Schwein wurden zu diesem Zweck sogenannte Referenzpopulationen (F_2 – Familienstruktur bzw. R_1 – Rückkreuzung) aufgebaut (Andersson et al. 1994, Archibald et al. 1995, Rohrer et al. 1996). Um Unterschiede in den Rekombinationsfrequenzen der verschiedenen Populationen auszugleichen, wurden zahlreiche Marker in allen Populationen typisiert und die verschiedenen Genkarten bereits für einige Chromosomen zu Konsens – Genkarten zusammengefasst. Auf den genetischen Karten des Schweines sind mittlerweile 1.800 genetische Marker, darunter 1.400 Mikrosatelliten, definiert (Gellin et al. 2000).

Physische Kartierung

Die physische Kartierung beinhaltet die direkte Zuweisung der Fragmente zu Chromosomen und deren morphologisch differenzierbaren Untereinheiten – den Chromosomenbanden. Auch hier existiert eine Reihe verschiedener Methoden. Eine Gruppe von Methoden bedient sich der direkten Hybridisierung der markierten, zu untersuchenden DNA mit einer Präparation von Chromosomen – Metaphasen (in – situ Hybridisierung). Hierzu müssen Sonden mit einer Länge von mindestens 1.000 Basenpaaren verwendet werden, um die Hybridisierungssignale detektieren zu können (Chaudhary et al. 1997). Die Zuordnung zu den Banden der Chromosomen erfolgt durch deren anschließende (oder vorherige) Anfärbung. In Abhängigkeit vom verwendeten Markierungssystem spricht man von RISH (*radioactive in – situ hybridisation*) bzw. von FISH (*fluorescence in – situ hybridisation*). Mit diesen Verfahren erstellte Karten haben bereits eine Auflösung von wenigen Kilobasenpaaren (Brenig 2000). Eine weitere Erhöhung des Auflösungsvermögens ist mit dem sogenannten fiber – FISH möglich, bei dem die Hybridisierung an Interphasen - Chromosomen durchgeführt wird (Liu et al. 1998, Seyfert et al. 2000). Ein Nachteil des Verfahrens ist die Notwendigkeit, relativ lange Fragmente als Sonde einsetzen zu müssen, da hiermit nur bereits beschriebene Gene verwendet werden können. Ein Vorteil ist jedoch,

2 Literaturübersicht

dass relativ gut konservierte Gene speziesübergreifend hybridisiert werden können (heterologe Sonden). Somit war es auch möglich, ganze Chromosomen (und deren Bruchstücke) des Menschen zur Detektion homologer Chromosomenbereiche des Schweins zu verwenden. Dieses Verfahren – *chromosome painting* genannt – wurde erfolgreich von Goureau et al. (1996, 2000) und Lahbib-Mansais et al. (2000) angewandt. Beim *Radiation Hybrid (RH) mapping* wird die DNA einzelner Chromosomen (-abschnitte) der zu analysierenden Spezies durch radioaktive Strahlung fragmentiert und mit Nager – Zellen fusioniert. Hier besteht die Erwartung, dass weiter voneinander entfernte Marker eher durch die Strahlung getrennt werden als näher zueinander lokalisierte. Die entstehenden Hybrid – Klone enthalten letztendlich definierte Bruchstücke der Donoren – DNA (Newell et al. 1998). In diesem DNA – Panel werden zuzuordnende Fragmente amplifiziert und ihre Position zu anderen Markern innerhalb des Chromosoms ermittelt. Eine RH – Karte enthält somit die direkt den Fragmenten zugewiesenen Gene und ergibt bereits ein relativ detailliertes Bild von der Genreihung im Genom. Im Vergleich zum *linkage mapping* werden keine aufwendigen Tierpopulationen benötigt. Ein weiterer Vorteil ist, dass kein Polymorphismus im zuzuordnendem Locus bekannt sein muss. Somit können zahlreiche, bereits beschriebene Gene und expressed sequence tags (ESTs, exprimierte Fragmente von Genen) zugeordnet (gemappt) werden. Dies ist für die vergleichende Kartierung (siehe unten) bedeutsam, da hiermit (im Gegensatz zu gering konservierten Markern beim *linkage mapping*) konservierte Gene und – fragmente vergleichend kartiert werden können (Gellin et al. 2000). Auch für das Schwein wurde ein entsprechendes RH – Panel bereits entwickelt (Yerle et al. 1998, Hawken et al. 1999), auf dem bereits 50 Gene sowie weitere 750 Marker (vornehmlich Mikrosatelliten) zugeordnet wurden (Gellin et al. 2000). Ein weiteres Verfahren beruht in Analogie zum *radiation hybrid panel* auf der Fusion von fragmentierter Donoren – DNA mit Nagerzellen. Hierbei wurde jedoch die DNA entsprechend der zytopenetischen Bänderung (*G – banding*) fragmentiert. Die Analyse dieses sogenannten *Somatischen Zellhybrid Panels* (SCHP) erlaubt somit die Zuordnung der untersuchten DNA zu Chromosomenbanden. Die Auflösung der entstehenden Genkarte ist jedoch geringer als beim RH – Panel, da die Fragmentierung der DNA grob ist. Für das Schwein entwickelten Zijlstra et al. (1996) sowie Yerle et al. (1996) entsprechende Panels, von denen letzteres auch in den eigenen Untersuchungen zum Einsatz kam.

Die physische Kartierung führt im Endergebnis zur Ermittlung der gesamten Basenabfolge des Genoms (Brenig 2000). Als Verfahren, welches den direkten Weg dahin beinhaltet, ist die Sequenzierung von großen (mehrere 100.000 Basenpaare langen) Fragmenten, die in Mikroorganismen vermehrt werden, zu nennen. Als Wirte für diese Fragmente kommen Hefen, Bakterien und Bakteriophagen in Frage. Da durch den Einbau der Fremd – DNA künstliche Chromosomen entstehen, benennt man diese Vektoren in Abhängigkeit vom

Wirtsorganismus *yeast, bacterial* bzw. *p1-derived artificial chromosomes* (YAC, BAC, PAC). Die Klonierungskapazitäten betragen in etwa 400.000 – 500.000 bp (YAC), 300.000 bp (BAC) sowie 150.000 bp (PAC; Conelly et al. 1991, Iannou et al. 1994, Brenig 2000). Durch Auffinden überlappender Fragmente werden diese Klone schrittweise in die richtige Reihenfolge gebracht und ergeben letztendlich komplette Sequenzen ganzer Chromosomen. Beim Schwein sind mehrere solcher Bibliotheken von BACs erstellt worden (Rogel-Gaillard et al. 1999, Suzuki et al. 2000, Andersson et al. 2000, Fahrenkrug et al. 2001).

Durch Kombination der Ergebnisse aus genetischer und physischer Kartierung konnten für auch für das Schwein integrierte Karten (*integrated maps*) erstellt werden (Robic et al. 1996, Rohrer et al. 1996).

Die Erstellung von Genomkarten für landwirtschaftliche Nutztiere befindet sich im Vergleich zum Menschen jedoch noch in den Anfängen (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Kartierte Gene und Mikrosatelliten bei landwirtschaftlichen Nutztieren im Vergleich zu Daten aus dem humanen Genom (URL 1¹, IHGSC 2001², Bork & Copley 2001³).

Spezies/ Parameter	Schwein ¹	Rind ¹	Schaf ¹	Pferd ¹	Huhn ¹	Pute ¹	Mensch ⁴
kartierte Loci davon	2.133	2.557	1.464	746	2.345	100	-
<i>Gene</i>	653	639	367	102	605	8	31.780- 39.114 ³
<i>Mikrosatelliten</i>	1.335	1.244	1.097	627	1.276	69	647.000 ²

⁴: erste Analyse des sequenzierten humanen Genoms

Mittlerweile sind für die wichtigsten Nutztiere bereits jeweils über 2.000 Loci kartiert und durch Verwendung der umfangreichen Daten aus den Genomprojekten beim Menschen sind schnelle Fortschritte zu erwarten. Ein wichtiges Werkzeug dazu ist die vergleichende Genomkartierung (*comparative gene mapping*) in dem die Ergebnisse speziesübergreifend ausgetauscht und verifiziert werden (Pinton et al. 2000, Gellin et al. 2000).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die strukturelle Genomanalyse wesentliche Beiträge zum Verständnis der genetischen Grundlagen der Merkmalsausprägung bei landwirtschaftlichen Nutztieren geleistet hat und leisten wird (Schwerin et al. 2000). Jedoch wird auch bei Vorliegen der (mehr oder weniger) kompletten Genomsequenzen noch relativ wenig zu Struktur und Funktion der Genprodukte, zur Wechselwirkung verschiedener Gene untereinander und mit Umweltfaktoren sowie zu individuellen Unterschieden in der

2 Literaturübersicht

Expression der Gene bekannt sein. Hier liegen die Ansatzpunkte für Methoden der funktionellen Genomanalyse.

2.1.2.3 Funktionelle Genomanalyse

Trotz generell gleicher Ausstattung mit Genen innerhalb einer Spezies sind teilweise deutliche Unterschiede im Phänotyp zu beobachten. Ein Teil dieser Variation kann mit Unterschieden in der Struktur der Gene selbst begründet werden (Fujii et al. 1991, Collige et al. 1999, Dennis et al. 2000, Hirano et al. 2000, Ohba et al. 2000). Der weitaus größere Teil der Varianz wird wahrscheinlich durch Faktoren wie dem Expressionsmuster der Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem bestimmten Gewebe bestimmt (Combes et al. 1997, Matteri et al. 2000). Parallel zu den Arbeiten im Sinne der strukturellen Genomanalyse wurde demzufolge in zahlreichen Experimenten der Genexpressionsstatus untersucht (van den Hemel-Grooten et al. 1997, Parma et al. 1999, David et al. 2000, Tosser-Klopp 2001). Als Methode stand dabei die Northern – Blot – Analyse im Mittelpunkt früherer Untersuchungen (Lobb & Porter 1992, White et al. 1996). In diesem Verfahren werden radioaktiv markierte Sonden zur qualitativen Detektion von Transkripten eines Gens eingesetzt. Bei Vergleich mit Standards ist jedoch auch eine semiquantitative Analyse der Transkription möglich (Ding et al. 2000). Auch wenn der Northern Blot aufgrund seiner hohen Sensitivität weiterhin verwendet wird, sind neue Methoden, die z.T. auf der Anwendung der PCR – Technik basieren, entwickelt worden.

Welcher et al. (1986), Timblin et al. (1990) und Wieland et al. (1990) beschrieben Methoden, die durch mehrstufige Hybridisationsschritte zu einer starken Anreicherung (Faktor 100 bis 700) von spezifischen DNA – Sequenzen führen. Dieses Verfahren wird *subtraktive Hybridisierung* genannt und ermöglicht die Isolierung von Genen, die z.B. nur in einem von zwei zu vergleichenden Genomen vorhanden sind. Diese Methode wurde zahlreichen Modifikationen und Verbesserungen unterzogen, hat jedoch im Bereich der Genomforschung beim landwirtschaftlichen Nutztier keine größere Bedeutung erlangt (Herfort & Garber 1991, Konietzko & Kuhl 1998, Everts et al. 2000, Zhu et al. 2000). Van den Hemel-Grooten et al. (1997) beschrieben eine Methode zur Quantifizierung von Differenzen in der Genexpression, die eine quantitative reverse Transkription mit nachfolgender Detektion des Transkripts über einen ELISA – Test beinhaltet. Die Autoren konnten somit Unterschiede im mRNA – Spiegel verschiedener Gene bei unterschiedlich gefütterten Schweinen nachweisen. Eine weitere Methode, die auch in den eigenen Untersuchungen zum Einsatz kam, ist die *Differential Display/Reverse Transcriptase PCR (DD/RT-PCR)*. Dieses Verfahren wurde von Liang & Pardee (1992) erstmalig beschrieben und von Liang et al. (1992) zur Identifizierung von Genen benutzt, die differentiell in gesunden und Krebszellen exprimiert werden.

Folgende wesentliche Schritte sind Bestandteil des Differential Display:

- Reverse Transkription aller zum Untersuchungszeitpunkt in einem Gewebe exprimierten Gene. Dazu nutzt man das Phänomen, dass an die meisten eukaryontischen Gene nach Abschluss ihrer Transkription eine Sequenz aus 50 bis 250 Adenylsäure – Resten (poly[A] Schwanz) angefügt wird, der eine Rolle bei der Translation spielt (Wickens et al. 1997). Durch den Einsatz von poly(T) – Primern, die zu diesem Bereich komplementär sind, lassen sich somit alle im Gewebe vorhandenen mRNAs in die entsprechenden cDNA – Moleküle revers transkribieren. Je nach Vorhandensein von einer oder zwei spezifischer Basen am 3' – Ende der Primer entstehen somit 4 oder 12 cDNA – Populationen ($T_x - A$, $T_x - C$, $T_x - G$, T_x bzw. T_x in Kombination mit: AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA, GC, GG und GT).
- Erstellung von doppelsträngiger cDNA. Die im ersten Schritt entstandenen Pools enthalten jeweils einen Anteil der in einer Zelle exprimierten mehreren tausend Gene in Form von einzelsträngiger cDNA (Bauer et al. 1993). Die Autoren entwickelten mittels mathematischer Methoden einen Satz von 26 kurzen Zufallsprimern, mit denen sich in einem zweiten Schritt theoretisch sämtliche Gene, die in den Pools vorhanden sind, durch mehrere PCR amplifizieren lassen. Letztendlich entstehen bei Verwendung dieser Primerkombinationen (12 Pools X 26 Zufallsprimer) insgesamt 312 cDNA – Subpopulationen. Diese repräsentieren die 3' – Enden der im untersuchten Gewebe exprimierten Gene.
- Elektrophoretische Auftrennung der Fragmentgemische. Durch nicht-denaturierende Elektrophorese in einem Polyacrylamid – Gel (PAGE) werden die Gemische separiert. Je nach Fragestellung können somit Proben direkt gegenübergestellt werden (z.B. behandelt vs. unbehandelt, gesund vs. erkrankt usw.). Bei Banden, die nur in einer der Proben detektiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass das repräsentierte Gen differentiell exprimiert wird. Bei ausreichender Standardisierung der Reaktionen und der Elektrophorese sind auch quantitative Unterschiede in der Genexpression zu ermitteln.

Ein wesentlicher Vorteil der Methode gegenüber der subtraktiven Hybridisierung besteht darin, dass man entsprechende Genfragmente direkt aus dem Gel gewinnen und sequenzieren kann. Neben zahlreichen Anwendungen im Bereich der Humangenetik kommt diese Methodik zunehmend in der Genomanalyse landwirtschaftlicher Nutztiere zum Einsatz (Li et al. 1997, Clouscard-Martinato et al. 1998, White & Dauncey 1999, Ponsuksili et al. 2000).

Die vorstehend beschriebenen Methoden haben die Analyse der Expression von Genen in Zeit und Raum als gemeinsamen Inhalt. Da sie sich mit dem Ergebnis der Transkription von Genen beschäftigen, wird für diese Art von Untersuchungen auch der Begriff *transcriptomics*

2 Literaturübersicht

verwendet (Abbott 1999). Dabei wird unter dem Begriff Transkriptom - in Abgrenzung zum Genom als Gesamtheit der Erbinformationen - die Summe der aus dem Genom transkribierten mRNAs verstanden. Die Analyse des Transkriptoms wird als wesentlicher Schwerpunkt künftiger Forschung angesehen und widerspiegelt sich bereits in Untersuchungen an landwirtschaftlichen Nutztieren (Schwerin 2000). Die obengenannten Methoden zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Gen – Transkription sind relativ einfach, robust und erschließen sich einer weitgehenden Automatisierung. Jedoch treten auch hier Einschränkungen auf. So stellt das Transkriptom zwar einen Schnappschuss von den Plänen des Organismus zur Proteinsynthese dar, gibt aber nur bedingt Auskunft über die tatsächliche Realisierung dieser Pläne. Die Korrelation zwischen der mRNA - und Proteinmenge liegt nur bei etwa 0,5 (Abbot 1999). Die Begründung liegt in den unterschiedlichen Synthese – und Abbauraten von mRNA und Proteinen sowie der Möglichkeit posttranslationeller Proteinmodifikationen. So sind bereits bei einem primitiven Organismus (*Mycoplasma genitalium*) 24% mehr Proteine als proteinkodierende Gene zu finden – beim Menschen wird vermutet, dass die Proteinanzahl im Verhältnis zu den Genen dreifach höher ist (IHGSC 2001). Nach Nelson (2001) werden beim Menschen sogar 1 – 10 Millionen Proteine erwartet. Auch beim Schwein fanden Combes et al. (1997) keine engen Beziehungen zwischen mRNA – und Proteinspiegel für die untersuchten Gene.

Einen weiteren Ansatz, der nur noch bedingt der Genomanalyse zuzuordnen ist, stellt die direkte Analyse der letztendlichen Genprodukte, der Proteine dar. Dieser Komplex wird entsprechend auch als *proteomics* bezeichnet. Analog zur Automatisierung der Analyse des Genoms werden auch hier durch Anwendung neuer und Verbesserung vorhandener Verfahren („Protein-Chips“, Verwendung von Antikörpern, Massenspektroskopie u.a.) neue Horizonte erschlossen, die in absehbarer Zeit zu praktischen Anwendungen z.B. der Entwicklung hochspezifisch wirkender Medikamente führen werden (Abbott 1999, Fields 2001, Bichsel et al. 2001).

2.1.2.4 Markeransatz und Kandidatengenansatz in der Genomanalyse landwirtschaftlicher Nutztiere

In der traditionellen Tierzucht steht die Verbesserung der tierischen Leistung durch Selektion nach phänotypischen Eigenschaften im Mittelpunkt. Auch wenn mit dieser Methodik speziell im letzten Jahrhundert große Fortschritte erzielt werden konnten, sind gewisse Grenzen nicht zu übersehen (Glodek 1997). In antagonistisch gekoppelten Merkmalen werden so unerwünschte Varianten bevorzugt (z.B. mangelhafte Fleischbeschaffenheit bei Selektion auf hohen Fleischanteil) und die Effizienz der Selektion in nur indirekt erfassbaren Merkmalen (z.B. Schlachtkörperqualität) ist relativ gering. Durch die Einbeziehung molekularer

Methoden in die züchterische Selektion können solche Nachteile weitgehend umgangen werden (Schwerin 1993, Rothschild 1996).

Basierend auf den beschriebenen Methoden der Genomanalyse kann man zwei grundlegende Wege zur Identifizierung von Zusammenhängen zwischen Variation auf dem Niveau des Genoms und des Phänotyps definieren. Einerseits wäre der **Markeransatz** zu nennen. Hierbei werden die interessierenden QTL indirekt über die Analyse von möglichst eng mit dem QTL gekoppelten molekulargenetischen Markern identifiziert (Schwerin et al. 2000). Bereits 1988 beschrieb Womack potentielle Anwendungen dieses Ansatzes in der Tierzucht. Buitkamp et al. (1993) verwendeten dieses Verfahren zur Detektion immunologisch relevanter Genvarianten. Mit zunehmender Verfügbarkeit molekularer Marker für die Nutztiere und der Entwicklung adäquater statistischer Auswertungsverfahren kam es zur breiten Anwendung des Markeransatzes in der Genomanalyse der Nutztiere und Identifizierung zahlreicher QTL (siehe Abschnitt 2.1.2.2, Tabelle 2.4). Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, dass keinerlei Kenntnisse zu den dem Merkmal zugrundeliegenden Genen vorhanden sein müssen. Auch kann man in solchen Kopplungsanalysen gleichzeitig mehrere Genomregionen mit Auswirkungen auf das untersuchte Merkmal identifizieren. Die Grenzen des Ansatzes liegen wiederum in der relativ weitmaschigen und in den meisten Fällen auch ungleichmäßigen Abdeckung der Nutztiergenome mit molekularen Markern. Die identifizierten Genomregionen umfassen somit oft große Bereiche mit zahlreichen Genen, die in den meisten Fällen unbekannt sind. Weiterhin werden QTL – Studien häufig in Kreuzungspopulationen aus extremen Rassen durchgeführt, so dass die identifizierten QTL oft nicht auf die kommerziell genutzten Rassen und Linien übertragen werden können. Dem wird in den letzten Jahren zunehmend Rechnung getragen, indem QTL – Studien in geeigneten Populationsstrukturen kommerziell verwendeter Rassen und Linien durchgeführt werden (Rohrer 2000, Grindflek et al. 2001). Trotz der aufgeführten Beschränkungen sind Kopplungsanalysen auch gegenwärtig noch ein wichtiges Werkzeug zur QTL – Identifizierung und liefern einen Beitrag zur umfassenden Analyse der Nutztiergenome. In einem weiteren methodischen Ansatz wird versucht, Gene und Genvarianten mit deutlichen Auswirkungen auf den Phänotyp direkt zu isolieren und zu charakterisieren. Diese Herangehensweise wird als **Kandidatengenansatz** bezeichnet. Basis für den Kandidatengenansatz ist das Vorhandensein von Informationen zu den entsprechenden Genen. Je nach vorliegender Information kann man Kandidatengene in zwei Kategorien einteilen (Soller & Genizi 1998):

- Positionelle Kandidaten. Diese Gene liegen in Genomregionen, in denen QTL bereits kartiert wurden. Die Informationen aus Markeransätzen können somit verwendet werden. Zur Funktion des Genproduktes müssen keine Erkenntnisse vorliegen.

2 Literaturübersicht

- Funktionelle Kandidaten. Bei diesen Kandidaten handelt es sich um Gene, deren Produkte in Beziehung zum untersuchten Phänotyp stehen. Diese Beziehungen sind entweder experimentell gesichert (z.B. ein Enzym beeinflusst nachgewiesenermaßen einen Stoffwechselweg, der zur Ausprägung eines Merkmals beiträgt) oder können aufgrund von Erkenntnissen, die an anderen Spezies gewonnen worden, auf das Nutztier übertragen werden. Die Lokalisation des Gens muss nicht bekannt sein.

Diese scharfe Abgrenzung zwischen positionellen und funktionellen Kandidatengen ist jedoch nicht immer anzutreffen. In einer Studie von Linville et al. (2000) wurden 6 Kandidatengene für Fruchtbarkeitsmerkmale untersucht. Für eines der untersuchten Gene lag eine Übereinstimmung von dessen chromosomaler Lokalisation und der eines QTL für die Ovulationsrate aus einer vorangegangenen QTL – Studie vor. Das entsprechende Gen war also positioneller und funktioneller Kandidat. Hardge (1999) verwendet weiterhin den Begriff „vergleichende Kandidatengene“ für Gene, in denen merkmalsassoziierte Polymorphismen in anderen Spezies gefunden wurden und für analoge Untersuchungen bei landwirtschaftlichen Nutztieren herangezogen werden. Diese Gruppe von Genen findet sich jedoch überwiegend in den funktionellen Kandidaten wieder, so dass dieser Klassifikation nur bedingt zugestimmt werden kann.

Kandidatengenuntersuchungen führten bei verschiedenen landwirtschaftlichen Nutztieren zur Aufdeckung einer Reihe von Assoziationen zwischen genetischen Varianten sowie Leistungsmerkmalen (Fujii et al. 1991, Rothschild et al. 1996, Lagziel et al. 1996, Grobet et al. 1997, Taylor et al. 1998, Gerbens et al. 2000). Beim Schwein werden einige der identifizierten Polymorphismen in Kandidatengen bereits in der züchterischen Selektion genutzt (Tabelle 2.6). Den Hauptanteil bilden dabei Loci, die für qualitative Merkmale, wie Fellfarbe, MHS-Empfindlichkeit und Empfänglichkeit für *E. coli* – Infektionen kodieren. In diesen Fällen ist unter Beachtung von genetischen Korrelationen zu anderen Merkmalen eine schnelle Eliminierung des unerwünschten Allels möglich. Auch wenn bereits Polymorphismen in Genen mit offensichtlichen Effekten auf quantitative Merkmale in der Selektion verwendet werden, sind die Beziehungen zwischen Genort und Leistungsmerkmal oft nur auf bestimmte Populationen beschränkt oder nach wie vor nicht widerspruchsfrei geklärt (Rothschild et al. 2000, Gerbens et al. 2000). In der Diskussion wird auf diesen Punkt noch eingegangen.

Bereits Archibald et al. (1995) verwiesen auf die enge Verknüpfung von Marker – und Kandidatengenansatz. So münden Untersuchungen, die durch Markeranalysen zur Detektion von QTL führen, letztendlich in den Kandidatengenansatz, da nur dieser zur ursächlich mit dem Phänotyp verbundenen Genvariante führen kann.

Tabelle 2.6: Ausgewählte Kandidatengene für allgemeine und spezielle Leistungsmerkmale beim Schwein.

Merkmalskomplex			
Merkmal	Gensymbol	Verwendung	Referenz
Fleischqualität			
MHS-Empfindlichkeit	RYR1	Zucht	Fujii et al. (1991)
„Acid Meat“	PRKRAG3	Zucht (Einführung)	Milan et al. (2000)
Fruchtbarkeit			
Wurfgröße	ESR	Zucht	Rothschild et al. (1996)
Wurfgröße	PRLR	Zucht	Vincent et al. (1997)
Mast- und Schlachtleistung			
Intramuskuläres Fett	HFABP	-	Gerbens et al. (2000)
	AFABP	-	Gerbens et al. (2000)
Futteraufnahme, Verfettung	MC-4R	Test patentiert	Kim et al. (2000)
weitere Merkmale			
Haut-/Fellfarbe	KIT	Zucht	Johansson Moller et al. (1996)
Haut-/Fellfarbe	MC-1R	Zucht	Kijas et al. (1998)
Ferkeldurchfall (E. coli F 18)	FUT-1	Test patentiert	Meijerink et al. (1997)

Ein typisches Beispiel dafür ist die Identifizierung des Gens, das beim Schwein zum sogenannten Hampshire – Effekt führt. Monin & Sellier (1985) beschrieben diesen Fleischbeschaffenheitsmangel, der sich in niedrigen End - pH – Werten des Muskels nach der Schlachtung äußert. Dabei wird ein normaler pH – Wert – Verlauf im frühpostmortalen Zeitraum beobachtet (Estrade et al. 1993, Lundström et al. 1996). Auf der Basis populationsgenetischer Analysen postulierten Le Roy et al. (1990) das Vorhandensein eines Majorgens für dieses Merkmal. Erste molekulargenetische Untersuchungen im Sinne der Markeransatzes führten 1995 zur Identifizierung des porcinen Chromosoms 15 als Träger des postulierten Genortes durch Milan et al.. Durch eine verfeinerte Kopplungsanalyse mit 16 Markern auf dem Chromosom 15 konnte die Region eingengt werden und die Lokalisation wurde durch physische Kartierung des Gens auf Chromosom 15q21-22 bestätigt (Milan et al. 1996). Im Jahre 1999 erstellten Robic et al. eine *radiation hybrid map* der Region in der das nach wie vor unbekannte Gen lokalisiert war. Letztendlich gelang einem internationalen Konsortium durch Sequenzierung von BAC – Fragmenten dieser Region in einer Gesamtlänge von mehr als 2,5 Mio. Basenpaaren die Identifizierung eines Polymorphismus in einem bislang beim Schwein unbekanntem Gen (AMP aktivierte Proteinkinase, gamma Untereinheit; PRKRAG3; Milan et al. 2000). Nur durch Verwendung aller jeweils zur Verfügung stehenden Methoden der Genomanalyse, einschließlich vergleichender Untersuchungen zwischen Mensch und Schwein, war es möglich, die kausale Ursache für diesen Fleischbeschaffenheitsmangel zu lokalisieren und zu charakterisieren und einen

2 Literaturübersicht

züchterisch verwendbaren, molekulargenetischen Test bereitzustellen. Der mit etwa 10 Jahren recht lange Zeitraum der Untersuchungen war begleitet von der Entwicklung neuer Technologien in der Genomanalyse. Das führte schließlich dazu, dass der letzte, aufwendige Schritt der Sequenzierung mehrerer Millionen Basenpaare im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungen nur einen relativ geringen Zeitraum einnahm.

Vor dem Hintergrund der Fortschritte in der Genomanalyse beim Menschen ist zu erwarten, dass der Kandidatengenansatz unter Einbeziehung von Methoden der strukturellen und funktionellen Genomanalyse in den kommenden Jahren zu einer Vielzahl für den Tierzüchter relevanten Ergebnissen führen wird.

Die eigenen Arbeiten zum Schwein lassen sich in den Kandidatengenansatz unter Verwendung von Methoden sowohl der strukturellen als auch der funktionellen Genomanalyse einordnen.

In einem ersten Komplex stand dabei die Analyse von Polymorphismen in einem potentiellen funktionellen Kandidatengen für die Stressantwort (Hitzeschock – Protein 70.2 - Gen) in ihrer Beziehung zu durch Stress beeinflussbaren phänotypischen Merkmalen im Mittelpunkt.

Demgegenüber bestand das primäre Ziel der Untersuchungen im zweiten Teil der Arbeit in der Identifizierung von potentiellen Kandidatengen für einen Erbfehler (Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel). In den Abschnitten 2.2 und 2.3 wird auf einige Aspekte zu diesen Komplexen näher eingegangen. Eine weitere Zielsetzung der Arbeiten im zweiten Teil war die chromosomale Zuordnung der isolierten Genfragmente und somit ein Beitrag zur Erweiterung der Genkarte des Schweines.

2.2 Das porcine Hitzeschock – Protein 70.2 (HSP70.2) – Gen als potentielles Kandidatengen für Leistungsmerkmale beim Schwein

2.2.1 Die Synthese von Hitzeschockproteinen als zelluläre Antwort auf Stressoren

Das Auftreten von sogenannten *chromosome puffs* – das Aufschmelzen von chromosomalen Interphasen – Strukturen der höchsten Ordnung (Zuckerandl 1976) – wurde als Reaktion auf einen Hitzeschock erstmals bei der Spezies *Drosophila* von Ritossa im Jahre 1962 beschrieben. Tissieres et al. (1974) und Lewis et al. (1975) wiesen den zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieses Phänomens und der Synthese einer Gruppe von Proteinen nach, die als Hitzeschock - Proteine (*heat shock proteins*, HSP) bezeichnet wurden. Schon bald wurde erkannt, dass die dabei exprimierten Gene in allen untersuchten Spezies vorhanden sind und vor dem Einwirken des Stressors entweder inaktiv sind oder nur in geringen Mengen exprimiert werden (rev. von Craig 1985). Der Autor berichtet weiterhin, dass zumindest einige dieser Gene und Proteine hochkonserviert sind und teilweise enge Korrelationen zwischen dem Expressionsniveau der Gene und der Widerstandsfähigkeit des

Organismus gegenüber thermischen Stress nachweisbar sind. Lediglich für eine antarktische Fischart (*Trematomus bernacchii*) konnte bislang gezeigt werden, dass eine Hitzebelastung nicht zur erhöhten HSP – Expression führt, obwohl auch hier geringe Spiegel an HSP unter Ruhebedingungen nachweisbar waren (Hofmann et al. 2000). Entsprechend ihres Molekulargewichtes können die HSP in verschiedenen Klassen zusammengefasst werden. Bei Eukaryonten unterscheidet man im Wesentlichen HSP der Molekulargewichtsklassen von 60 kDa, 70 kDa, 90 kDa sowie 100 kDa. Darüber hinaus werden HSP geringerer Masse (17 kDa bis 27 kDa), HSP47, die sogenannten DnaJ – Proteine, GrpE (*glucose regulated protein E*) sowie Ubiquitin genannt (Craig 1985, Sharp et al. 1999). In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass neben der thermischen Belastung eine Vielzahl weiterer Stressoren wie oxidativer Stress, Schwermetalle, Chemotherapeutika, Magnetfelder, Hemmstoffe des Energiestoffwechsels, Krankheitszustände u.a. zur Induktion dieser Proteine führt. Jedoch existieren auch physiologische Zustände (Zellzyklus, Wachstum und Differenzierung u.a.), die mit der HSP – Induktion einhergehen (rev. von Lindquist & Craig 1988, Welsh 1992, Morimoto 1998, Goodman & Blank 1998). Die Funktion der HSP besteht dabei im Schutz der Struktur bzw. Wiederherstellung der (Tertiär-) Struktur zellulärer Proteine nach Einwirkung der Stressoren (Craig 1985, Langer & Neupert 1991, DeNagel & Pierce 1993). Bei vorliegender irreversibler Schädigung von zellulären Proteinen wirken einige Hitzeschock – Proteine an der Zuführung dieser zum Prozess der Proteolyse mit (Gething & Sambrook 1992). Da die HSP nur „begleitende“ Funktionen wahrnehmen, nicht aber in das korrekt gefaltete Protein integriert werden, hat sich der Begriff *chaperon* („Begleitperson“) für die Klasse der Hitzeschock – Proteine etabliert (Ellis 1990). Diese *chaperon* – Funktion ist zwar unter Stressbedingungen am stärksten ausgeprägt, jedoch auch für den normalen Lebenszyklus zellulärer Proteine von herausragender Bedeutung (rev. von Ohtsuka & Hata 2000). Feder & Hofmann (1999) fassen den Kenntnisstand zu den HSP in folgenden vier Punkten zusammen:

- die Expression von HSP erfolgt unter natürlichen Bedingungen, d.h. nicht nur bei Einwirkung experimenteller Stressoren
- alle Spezies verfügen über HSP – Gene, jedoch existieren Differenzen in ihren Expressionsmustern
- die Expression von HSP kann mit der Widerstandsfähigkeit des Organismus gegenüber Stressoren in Beziehung stehen und
- die Schwellenwerte, die zur Expression von HSP erforderlich sind, korrelieren mit dem Stressniveau, dem der Organismus unter natürlichen Bedingungen ausgesetzt ist.

Nach den Autoren herrscht weitestgehender Konsens zu diesen Fakten. Demgegenüber existieren noch große Wissenslücken zu den detaillierten Mechanismen der HSP –

2 Literaturübersicht

vermittelten Stresstoleranz und den evolutionären Mechanismen, die zu der vorhandenen Diversifizierung der HSP – Gene geführt haben.

Unter den HSP der verschiedenen Molekulargewichtsklassen nehmen die Hitzeschock – Proteine der Molekulargewichtsklasse von 70 kDa eine zentrale Rolle ein, da sie sowohl unter normalen (HSC70) als auch unter Stressbedingungen (HSP70) von allen HSP - Klassen am stärksten exprimiert werden (Sharp et al. 1999).

2.2.2 Die HSP70 – Multigenfamilie

2.2.2.1 Vergleich der HSP70 – Gene bei Mensch, Rind und Schwein

Zahlreiche HSP70 – Gene wurden bei verschiedenen Eukaryonten identifiziert und teilweise charakterisiert. Aus dem Vergleich der DNA – Sequenzen konnte abgeleitet werden, dass es sich bei den HSP70 um eine Multigen – Familie handelt, die z.B. bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* jeweils 9 Gene umfasst (Günther & Walther 1994). Beim Menschen existieren mindestens 13 funktionsfähige Gene (Tavaria et al. 1996, URL 2; Tabelle 2.7). Darüber hinaus ist ein weiteres Gen beschrieben, das als HSC70 bezeichnet wurde (Mues et al. 1986, Günther & Walther 1994). Nach den in der Datenbank LocusLink (URL 2) vorhandenen Angaben handelt es sich dabei jedoch um ein auf dem X – Chromosom lokalisiertes Pseudogen. Für die humanen HSP70 - Gene existiert mittlerweile eine einheitliche Nomenklatur und die DNA – Sequenzen sind für alle Gene bis auf HSPA3 und HSPA9A verfügbar. Nach Günther & Walther (1994) kann man die humanen HSP70 – Gene nach folgenden Kriterien gruppieren:

- Ubiquitäre gegenüber gewebespezifischer Expression. Die Mehrzahl der Gene wird jedoch offensichtlich in jeder Zelle exprimiert.
- Konstitutive gegenüber stressinduzierter Expression. Hierbei unterscheiden sich die stressinduzierbaren Gene von den konstitutiv exprimierten durch das Fehlen von Introns.
- Subzelluläre Lokalisation der Genprodukte. HSP – Gene werden teilweise im Zytosol, den Zellkernen und den Nukleoli, dem endoplasmatischen Retikulum bzw. in den Mitochondrien exprimiert.
- Proteinbindungspräferenzen bzw. funktionelle Spezifität. Zu diesem Komplex sind die Kenntnisse jedoch noch begrenzt.

Tabelle 2.7: Übersicht über die HSP70 – Multigenfamilie beim Menschen und orthologe Gene bei Rind und Schwein (ergänzt und verändert nach Günther & Walther 1994).

Offizielles Gensymbol	Alias - Namen	Accession No.	Chromosom	Gewebe Expression	Referenz	Orthologe Gene (Referenzen)	
						Rind	Schwein
HSPA1A	HSP70-1	NM_005345	6p21.3	ubiquitär konstitutiv/induzierbar	Hunt & Morimoto (1985)	HSP70-1 (Grosz et al. 1992)	HSPA1A (Peelman et al. 1996)
HSPA1B	HSP70-2	NM_005346	6p21.3	ubiquitär induzierbar	Sargent et al. (1989)	HSP70-2 (Grosz et al. 1992)	HSP70.2, HSPA1/2 (Peelman et al. 1992)
HSPA1L	HSP70-Hom	NM_005527	6p21.3	Testis konstitutiv	Milner & Campbell (1990)		HSPA3 (Nunes et al. 1993)
HSPA2	Heat Shock 70 kDa Protein-2	NM_021979	14q24.1	Testis konstitutiv	Bonnycastle et al. (1994)	HSP70-3 (Grosz 1992)	
HSPA3	Heat Shock 70 kDa Protein-3	-	21	? ?	Harrison et al. (1987)		
HSPA4	HSP70RY	L12723	5q31.1-q31.2	? konstitutiv	Fathallah et al. (1993)		

2 Literaturübersicht

Tabelle 2.7: (Fortsetzung).

HSPA5	GRP78, BiP	M19645	9q33-q34.1	ubiquitär konstitutiv/induzierbar	Ting & Lee (1988)		HSPA5 (Yasue et al. 1994)
HSPA6	HSP70B'	NM_002155	1cen-qter	ubiquitär induzierbar	Leung et al. (1990)	HSP70-4¹	HSPA4 (Dezeure et al. 1993)
HSPA7	HSP70B	AF093759 M11236	1q23.1	ubiquitär induzierbar	Voellmy et al. (1985)		
HSPA8	HSP73, HSC70, HSC71, HSPA10	NM_006597	11q23.3-q25	? konstitutiv	Dworniczak & Mirault (1987)		
HSPA9A	MOT-1	-	?	ubiquitär konstitutiv	Günther & Walther (1994)		
HSPA9B	MOT2, HSPA9, GRP75, PBP74	NM_004134	5q31.1	? konstitutiv	Domanico et al. (1993)		
STCH	-	NM_006948	21q11.1	ubiquitär konstitutiv	Otterson et al. (1994)		

¹: Angabe nach Cattle Genome Database (CGD; URL 3)

Humane HSP70 – Gene konnten bislang den Chromosomen 1, 5, 6, 9, 11, 14 und 21 zugeordnet werden. Dabei befinden sich drei Gene der Familie in enger Nachbarschaft innerhalb des MHC (*Major Histocompatibility Complex*), einer Genomregion von herausragender Bedeutung für die Herausbildung immunologischer Eigenschaften, auf dem menschlichen Chromosom 6. Für die landwirtschaftlichen Nutztiere ist der Kenntnisstand noch bedeutend geringer (Tabelle 2.7). Beim Rind sind bislang 4 HSP 70 – Gene beschrieben und chromosomal zugeordnet. Für wenigstens drei von ihnen liegen zuverlässige Daten zur genomischen Struktur vor, so dass eine klare Zuordnung als Orthologa der entsprechenden humanen Gene gegeben ist. Beim Schwein stellt sich die Situation komplizierter dar. Mit verschiedenen Methoden wurden 6 HSP70 – Gene identifiziert. Sequenzinformationen sind jedoch nur für zwei von ihnen vorhanden (HSP70.2, Peelman et al. 1992, Schwerin et al. 1995, Chen et al. 2001; HSPA4, Dezeure et al. 1993), so dass in diesen Fällen eine Zuordnung zu den humanen Genen für HSPA1B und HSPA6 möglich ist. Von Nunes et al. (1993) wurde demonstriert, dass analog zum menschlichen Genom auch beim Schwein drei eng verbundene HSP70 – Gene im MHC – Komplex (porcines Chromosom 7) lokalisiert sind. Peelman et al. (1996) konnten ein HSP70 – Gen in die sogenannte Klasse III – Region des MHC einordnen und damit einen weiteren Beweis für den hohen Konservierungsgrad im Vergleich zum menschlichen Genom liefern. Dieses HSP70 – Gen wird als HSPA1A in der Genom – Datenbank des Schweins (ARKdb; URL 1) aufgeführt. Jedoch beziehen sich die Referenzen für die porcinen Gene für HSPA1, HSPA1A sowie HSPA2 sämtlich auf Sequenzinformationen zum porcinen HSP70.2 – Gen, so dass nach wie vor kein direkter Nachweis von drei unterschiedlichen Genen in dieser Region beim Schwein vorliegt. Die beschriebene Konservierung dieser Region wurde bei Mensch, Ratte, Maus, Rind, Schwein, teilweise bei der Ziege sowie beim Frosch beobachtet. Das Vorhandensein von jeweils drei nahezu identischen Genen ist vermutlich auf Genduplikation zurückzuführen, die wegen des Vorkommens in Säugern und Amphibien demnach vor 350 Mio. Jahren stattgefunden haben könnte (Günther & Walther 1994). Die HSP70 – Gene gehören zu den Genen mit dem höchsten Konservierungsgrad überhaupt, der sich in Sequenzhomologien von bis zu 80% zwischen Eukaryonten äußern. Bei den orthologen Genen des MHC – Komplexes von Mensch und Maus erreichen die Homologien bis zu 95% auf der Ebene der Aminosäuren. Sequenzvergleiche dieser Gene führten zu der Schlussfolgerung, dass die HSP70 gemeinsam mit anderen Proteinfamilien wie alpha – ATPasen auf einen gemeinsamen Protein – Vorfahren zurückzuführen sind (Bienz & Pelham 1987, Günther & Walther 1994, Flores & Cuezva 1997, Gupta 1998, Karlin & Brocchieri 1998). Nach Günther & Walther (1994) ist jedoch nicht vollständig klar, ob die Präsenz von HSP70 – Genen im MHC – Komplex tatsächlich eine funktionelle Interaktion zwischen den Genen widerspiegelt oder ob es lediglich um einen „konservierten Unfall der Evolution“

2 Literaturübersicht

handelt. Die generelle Funktion von Hitzeschockproteinen wurde bereits im Abschnitt 2.2.1 behandelt, so dass nachfolgend einige Aspekte der Einbeziehung der HSP70 in verschiedene Stoffwechselwege und Krankheitsbilder dargestellt werden.

2.2.2.2 Funktion der HSP70 - Gene

Die biologische Funktion der HSP70 beruht auf einer grundlegenden Eigenschaft – der Fähigkeit, mit anderen Polypeptiden oder Proteinen zu interagieren (Lindquist & Craig 1988). HSP70 verfügen über eine Peptidbindungsstelle im C – terminalen Bereich, die an hydrophoben Bereichen nicht gefalteter Polypeptide binden kann (Agashe & Hartl 2000). Die Verbindung von HSP70 und Substrat ist dabei abhängig von der Aktivität seiner N – terminalen ATPase – Domäne. Der ATP – HSP70 – Komplex führt zu einer schnellen Bindung an Proteine und einer schnellen Dissoziation, wogegen der ADP – HSP70 – Komplex langsam aber stabil an Proteine bindet. Der Übergang zwischen beiden Komplexen wird durch sogenannte Co – Chaperone katalysiert (Demand et al. 1998). Durch diese Eigenschaften sind die HSP70 – Gene in der Lage, die Translokation, den Import und die koordinierte Faltung von Proteinen zu bewerkstelligen (Clarke 1996, Matouschek et al. 2000). Diese Aufgaben werden im wesentlichen von den konstitutiv exprimierten Vertretern der HSP70 – Familie (HSC70) übernommen. Die induzierbaren HSP70 treten nach der Einwirkung von Stressoren auf und können die Aggregation von Proteinen verhindern bzw. bereits denaturierte Proteine in ihrer Funktion wiederherstellen (Parsell & Lindquist 1993). Aus diesen Eigenschaften ergibt sich die Einbeziehung der HSP70 in eine Vielzahl fundamentaler Vorgänge auf zellulärem Niveau. Bereits 1986 beschrieben Yost & Lindquist die protektive Wirkung von Hitzeschockproteinen auf den Prozess des Spleißens von Genen unter der Einwirkung von Hitze und schlussfolgerten, dass die HSP eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Proteinsynthese unter Stressbedingungen spielen. Die Fähigkeit von HSP70, Proteine innerhalb der Zellen zu transferieren und die Anordnung einiger HSP70 – Gene innerhalb des immunologisch bedeutsamen MHC – Komplexes deuten auf eine Bedeutung dieser Proteine für die Immunantwort hin (Feder & Hofmann 1999, Moseley 2000). Die Bedeutung von HSP70 für die Anpassung der Skelettmuskulatur an Belastungen wird von Puntschart et al. (1996) sowie McArdle & Jackson (2000) betont. Im Zusammenhang mit der subzellulären Translokalisierung von Schlüsselproteinen der Regulation des Zellzyklus konnte eine Zellzyklus – abhängige Expression von HSP70 und vielfältige Wechselwirkungen zwischen HSP70 und Regulationsfaktoren des Zellzyklus speziell unter Stressbedingungen gefunden werden (rev. von Helmbrecht et al. 2000, Kuhl & Rensing 2000). Weiterhin ist HSP70 in die Prozesse der Embryogenese sowie der Apoptose integriert (Luft & Dix 1999, Niemann & Wrenzycki 2000, Neuer et al. 2000, Beere & Green 2001, Edwards et al. 2001).

2.2.2.3 Regulation der Expression von induzierbaren HSP70 – Genen

Die Expression der induzierbaren HSP70 – Gene wird vorrangig über ihre Transkription reguliert (Lindquist 1986, Tanguay 1988). Demzufolge spielen die in Abschnitt 2.1.1 aufgeführten transkriptionssteuernden Elemente im 5'-UTR der HSP70 – Gene eine große Rolle bei der Initiierung der Genexpression. Simon et al. (1988) beschrieben mehrere Proteinbindungsdomänen im Promotor eines humanen HSP70 – Gens, darunter ein CAAT – Element und eine TATA – Box. Nach Tanguay (1988) verfügen die HSP70 – Gene über ein nur bei den Hitzeschockproteinen vorhandenes Sequenzelement, das als Hitzeschock – Element (HSE) bezeichnet wurde. Dieses Sequenzelement enthält repetitive 5'-nGAAn-3' – Motive in unterschiedlicher Anzahl und Orientierung. Die Hitzeschockelemente sind wiederum in mehreren Kopien 5' der TATA – Box anzutreffen. Nach Tanguay (1988) besteht ein gewisser Zusammenhang zwischen der Anzahl der HSE und der Effizienz der Transkription. Jedoch sind diese Elemente auch in den nicht hitzeinduzierbaren Vertretern der HSP70 – Genfamilie vorhanden. Eine spezifische Proteinfamilie, Hitzeschock – Faktoren oder Hitzeschock – Transkriptionsfaktoren (HSF, HSTF) genannt, ist zur Bindung an die HSE befähigt und sorgt somit hauptsächlich für die schnelle und kurzfristige Initiation der Transkription der HSP70 – Gene (Shi et al. 1998). HSP70 selbst wirkt als negativer Regulator in diesem Prozess. Unter physiologischen Bedingungen liegen die HSF in inaktiver, monomerer Form, an HSP70 gebunden vor. Nach Stressoreinwirkung (z.B. Hitzestress) binden die HSP70 bevorzugt denaturierte Proteine und ermöglichen damit den Übergang von HSF – Monomeren zu transkriptionell aktiven Trimeren. Diese wiederum binden an die HSE und erhöhen somit die Transkription der HSP70 – Gene auf das bis zu 200-fache Niveau (Mason & Lis 1997). Nach Abschwächung des Stresseinflusses sorgen Co-Chaperon – Faktoren für eine Rückführung der HSF in die inaktive Form und führen die Transkription auf Basalniveau zurück (Shi et al. 1998, Morimoto et al. 1998). Um die HSP70 – DNA für die Bindung durch die HSF – Trimere zugänglich zu machen, sind weitere Transkriptionsfaktoren erforderlich. So konnten Weber et al. (1997) zeigen, dass die Bindung des sogenannten GAGA – Faktors im Promotor eines HSP70 – Gens der Fruchtfliege Voraussetzung für eine effiziente Transkription des Gens ist. Die Autoren leiten aus den Ergebnissen ab, dass erst durch diese Bindung eine offene Chromatinstruktur entsteht, die letztendlich die weiteren regulatorischen Elemente für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren wie HSF und TFIID (siehe Abschnitt 2.1.1) zugänglich macht. Im Gegensatz zum beschriebenen Mechanismus unter Stressbedingungen scheinen Transkriptionsfaktoren der STAT – Familie von besonderer Bedeutung für die Aktivierung der HSP – Gene durch Stimuli, die keinen Stress darstellen, zu sein (Stephanou & Latchman 1999). Neben der Regulation der Expression auf transkriptioneller Ebene beeinflussen jedoch weitere Faktoren deren Effizienz. So ist die Stabilität der mRNA von

2 Literaturübersicht

ausschlaggebender Bedeutung für die Menge des letztendlich gebildeten Proteins. Für eine Vielzahl von Genen sind Elemente bekannt, die die für den Abbau der jeweiligen mRNA sorgen. Diese Elemente können sowohl in der 5'-UTR, in der kodierenden Sequenz, als auch in der 3'-UTR des jeweiligen Gens lokalisiert sein (Wickens et al. 1997, Guhaniyogi & Brewer 2001). Neben solchen Sequenzelementen beeinflusst die Struktur der mRNA selbst sowie die Interaktion der mRNA mit Bindungsproteinen die Proteinsynthese maßgeblich (Gray & Hentze 1994, Derrigo et al. 2000). In einer Untersuchung von Vivinus et al. (2001) wurde ein Sequenzelement in der 5'-UTR einer humanen HSP70 – mRNA lokalisiert, das die Translation hochgradig beeinflusst. In verschiedenen in – vitro Translationssystemen konnte mit diesem Element eine 1,5 – bis 3 – fache Erhöhung der Proteinsynthese erreicht werden. Die Analysen ergaben, dass die Bildung stabiler Sekundärstrukturen in der 5'-UTR der HSP70 – mRNA für diesen Effekt verantwortlich ist. Aus den aufgeführten Faktoren lässt sich ableiten, dass eine sehr vielschichtige Regulation der Expression der HSP70 – Gene existiert.

2.2.2.4 Polymorphismen in HSP70 – Genen und ihre Assoziationen mit phänotypischen Eigenschaften

Die Messung von erhöhten HSP70 – Spiegeln unter verschiedenen Zuständen in unterschiedlichen Geweben führte zu der Erkenntnis, dass die Hitzeschockproteine dieser Molekulargewichtsklasse vielfältige Funktionen im zellulären Metabolismus ausfüllen (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Aufgrund dieses Wissens und aufgrund der Lokalisation von drei Kopien im immunologisch bedeutsamen MHC – Komplex wurden zahlreiche Untersuchungen zu den HSP70 – Genen als Kandidaten für pathophysiologische Zustände beim Menschen durchgeführt. Basis für die Untersuchungen war das Auffinden von Sequenzvariationen im Bereich dieser Gene. Milner & Campbell (1990, 1992) beschrieben die Struktur der drei im MHC des Menschen lokalisierten HSP70 – Gene sowie einen Polymorphismus im kodierenden Bereich des konstitutiv exprimierten HSPA1L – Gens (HSP70-Hom). Ein weiterer Polymorphismus, der im Gegensatz zu ersterem mit einem Aminosäureaustausch in diesem Gen verbunden ist, wird von Jenkins et al. (2000) beschrieben. In den induzierbaren HSPA1A und HSPA1B – Genen (HSP70-1; HSP70-2) wurden insgesamt drei Polymorphismen gefunden. Einer davon ist unmittelbar an einem Hitzeschock – Element (HSE) im Promotor des HSPA1A – Gens lokalisiert, kann mit der Restriktionsendonuklease (REN) NcoI nachgewiesen werden und weist drei Allele auf (Cascino et al. 1993a, Bolla et al. 1998). Cascino et al. (1993b) empfehlen die Einbeziehung dieser Allele in die Definition von MHC – Haplotypen. Im HSPA1B – Gen (HSP70-2) wurde ein mit der REN PstI nachweisbarer Polymorphismus im kodierenden Bereich sowie eine diallelische Pentanukleotid - Duplikation in der 3'-UTR nachgewiesen (Partanen et al. 1993, Dressel &

Günther et al. 1994). Assoziationsstudien zum Zusammenhang dieser Polymorphismen mit pathologischen Zuständen (verschiedene Diabetes – Typen, Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Asthma, Karzinome) erbrachten in den meisten Fällen keinen Nachweis direkter Effekte der HSP70 – Polymorphismen auf die untersuchten Krankheitsbilder (Hamet 1992, Pugliese et al. 1992, Pociot et al. 1993, Westman et al. 1994, Jarjour et al. 1996, Vinasco et al. 1997, Aron et al. 1999, Vargas-Alarcon et al. 2000). In der Mehrzahl nehmen die Autoren eine enge Kopplung bestimmter Allele mit den ursächlichen Faktoren an. Westman et al. (1994) beobachtete darüber hinaus die Segregation fester Allelkombinationen in allen drei HSP70 – Genen. Demgegenüber fanden Chouchane et al. (1997, 2001) und Mestiri et al. (2000) signifikante Assoziationen zwischen Allelen des PstI – Polymorphismus im HSPA1B – Gen und dem klinischen Verlauf von Tumoren bzw. dem Verfettungsrisiko. Die Autoren schließen einen direkten Zusammenhang von Polymorphismus und Krankheitsbild nicht aus. Zuniga et al. (1999) stellten eine von Hardy-Weinberg – Gleichgewicht abweichende Allelfrequenz im PstI – Polymorphismus in bestimmten ethnischen Gruppen fest und führen das auf einen negativen Selektionsprozess gegen ein Allel zurück. Schroeder et al. (2000) zeigten jedoch, dass kein direkter Zusammenhang zwischen dem PstI – Polymorphismus im HSPA1B – Gen und dessen Transkription in – vitro existiert. Favatier et al. (1999) konnten nachweisen, dass auch die Mutation in der Umgebung eines HSE des HSPA1A – Gens keine Auswirkungen auf die Bindung von Hitzeschockfaktor (HSF) und die Proteinsynthese hat. Demzufolge sind diese Polymorphismen vermutlich eher als genetischer Marker, denn als ursächliche Faktoren für die untersuchten Krankheitsbilder anzusehen. Neue Analysetechniken, wie Temperatur – modulierte Heteroduplexanalyse (TMHA) werden gegenwärtig zur effektiven Suche nach weiteren Mutationen in den HSP70 – Genen, hier im HSPA6, eingesetzt (Hecker et al. 2000). Auch bei den landwirtschaftlichen Nutztieren standen und stehen die HSP70 – Gene im Mittelpunkt des Interesses als funktionelle und – im Falle der im MHC lokalisierten Gene – auch als positionelle Kandidaten für allgemeine und spezielle Leistungseigenschaften. Für das Rind beschrieben Grosz et al. (1994) einen, mit der REN AluI darstellbaren Polymorphismus im HSP70-1 – Gen. In einer ersten Arbeit zum Schwein fanden Ruohonen-Lehto et al. (1993) mittels Hybridisierung mit einer humanen HSP70 – Sonde zwei Polymorphismen in den HSP70 – Genen. Aufgrund der verwendeten Sonde war es nicht möglich, die Polymorphismen einem konkreten Gen zuzuordnen. Schwerin et al. (1995) analysierten die 5'-UTR des porcinen HSP70.2 – Gens und stellten eine PCR – basierende Methode zur Darstellung von zwei Polymorphismen in zwei transkriptionssteuernden Elementen des Promotors vor. Diese Polymorphismen stellten die Basis für die eigenen Arbeiten zum HSP70.2 – Gen dar. Chen et al. (2000) konnten diese und drei weitere Sequenzvariationen in der 5'-UTR bestätigen. Analysen zur Assoziation von

2 Literaturübersicht

Polymorphismen in den HSP70 – Genen bei Rind und Schwein wurden von Schwerin et al. (1996, 1998) durchgeführt. Beim Rind wurde ein klarer Zusammenhang zwischen dem HSP70-1 – Genotyp und der Langlebigkeit gefunden. Auch beim Schwein existieren nach den Autoren statistisch gesicherte Effekte zwischen den Genotypen im Promotor des HSP70.2 – Gens und Merkmalen der Fleischbeschaffenheit. Hagendorf (1999) bestätigte diese Zusammenhänge und fand darüber hinaus signifikante Beziehungen zu Parametern der Fruchtbarkeit. In einer weiteren Gruppe von Untersuchungen stand die Expression der HSP70 – Gene im Mittelpunkt des Interesses. Bereits 1993 untersuchten van Laack et al. den Zusammenhang zwischen Stressempfindlichkeit und den Spiegeln an konstitutiv exprimiertem und induzierbarem HSP70 beim Schwein und fanden keinerlei Zusammenhänge. Demgegenüber wiesen McComb & Spurlock (1997) eine Erhöhung der HSP70 – Spiegel in einigen Geweben von Schweinen als Reaktion auf eine immunologische Belastung nach. Huang et al. (2000) berichten über niedrigere HSP70 – Spiegel in Spermien von Ebern bei hohen Umgebungstemperaturen und leiten daraus einen Zusammenhang mit der Spermaqualität ab. Insgesamt sind die wenigen dokumentierten Untersuchungen nicht frei von Widersprüchen, so dass weiterer Forschungsbedarf besteht. Über die direkte Analyse von Assoziationen zwischen HSP70 – Genotypen und – Spiegeln mit Leistungseigenschaften hinaus, dient das Schwein als Modellorganismus für Untersuchungen zu humanmedizinischen Fragestellungen im Zusammenhang mit den HSP (Knoll et al. 1994, Kojima et al. 1996, Klosterhalfen et al. 1997).

2.3 Potentielle Kandidatengene für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“

2.3.1 Begriffe und klinisches Bild

Das Syndrom „Ausgrätschen beim Saugferkel“ wurde seit den 60er Jahren in verschiedenen Schweinepopulationen beschrieben (Thurley et al. 1967, Olsen & Prange 1968; Mehlhorn et al. 1970). Synonym wurde die Krankheit auch als Spreizen, myofibrilläre Hypoplasie, congenitale Muskelhypoplasie sowie im englischen Sprachraum als *congenital splay leg*, *spraddle leg* bzw. als *congenital myofibrillar hypoplasia* bezeichnet. Nach neueren Erkenntnissen werden jedoch die myofibrilläre Hypoplasie und das Ausgrätschensyndrom nicht mehr als identisch, wenn auch als ätiologisch eng verwandt, angesehen (Ducatelle et al. 1986). Ein beim Kaninchen beschriebenes Splay – Leg – Syndrom scheint trotz einiger Ähnlichkeiten im histomorphologischen Bild nicht verwandt mit der porcinen Erkrankung zu sein (Arendar et al. 1966, Joosten et al. 1981, Jirmanova 1983). Ward (1978) charakterisiert das Ausgrätschen als multifaktorielles Syndrom, bei dem eine Anzahl variabler Umweltfaktoren in Kombination mit bestimmten Genotypen wirken und im klinischen Bild ihren Ausdruck finden. Betroffene Ferkel weisen unmittelbar nach der Geburt oder innerhalb des ersten Lebensstages eine charakteristische zehenweite Stellung der Hintergliedmaßen auf, aus der sich eine Grätschstellung mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Steh- und Fortbewegungsunvermögen entwickelt (Bergmann 1976). Aufgrund dieser klinischen Erscheinungen sind stark betroffene Ferkel unfähig zum Saugen oder werden häufig von der Sau erdrückt. Bei geringerer Ausprägung des Krankheitsbildes tritt innerhalb der ersten Lebenswoche ein Selbstheilungsprozeß ein (Bickhardt 1984). Bleibende Schäden sind dabei nicht nachweisbar und die betroffenen Ferkel unterscheiden sich nicht im Wachstumsverlauf von ihren gesunden Wurfgeschwistern (Bergmann, 1976). Als eine Behandlungsmethode bei weniger stark erkrankten Ferkeln gilt das Zusammenbinden der Hintergliedmaßen auf einen Abstand von 5 cm während der ersten Lebensstage. Eine ursächliche Therapie ist nicht möglich (Bickhardt 1984).

2.3.2 Inzidenz und Mortalität

In älteren Untersuchungen differieren die Angaben zum Auftreten dieser Erkrankung je nach Zielstellung der Erhebung und erfasstem Tiermaterial zum Teil beträchtlich. So berichten Köhler & Seffner (1974) und Maaß & Schulze (1979), dass in industriemäßig produzierenden Sauenanlagen 22% - 33% aller lebend geborenen Ferkel ($n = 19.800$; $n = 556$) vom Spreizen betroffen waren und nahezu 5% aus diesem Grund gemerzt werden mussten. Zu weniger extremen Ergebnissen kamen Hörügel & Lorenz (1979) sowie Schnapperelle & Koch (1980), die auf Anteile von 5% - 7,5% spreizender Ferkel verweisen. Jedoch waren auch in diesen Untersuchungen in vergleichbaren Zuchtanlagen 36% bzw. 21% aller gefallenen Würfe

2 Literaturübersicht

betroffen. Nach Wrathall (1988) waren in den Rassen Large White und Landrasse im Jahre 1972 in Großbritannien 0,12% bzw. 1,42% aller geborenen Ferkel betroffen. Für die Niederlande werden 0,2% - 0,5% der lebend geborenen Ferkel angegeben. Eine umfangreiche Untersuchung von Stigler et al. (1991) ergab für die Deutsche Landrasse bzw. deren Kreuzungsprodukte mit Pietrainebern eine Häufigkeit von 0,2%, bezogen auf die lebend geborenen Ferkel sowie von 1,2% der gefallen Würfe. In Australien stellt das *splay leg syndrom* mit einem Anteil von 45% an allen erfassten Erbdefekten die größte Gruppe dar (Wrathall, 1988). Auch in kanadischen Schweinebeständen ist das Syndrom als häufigster Erbfehler beschrieben (Partlow et al. 1993). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Großbestände häufiger betroffen sind. Ebenfalls übereinstimmend wird von einer erhöhten Inzidenz in den Landrassen berichtet. Vogt et al. (1984) fanden signifikant erhöhte Anteile an Grätschferkeln in Landrasseanpaarungen im Vergleich zu Nachkommen von Yorkshire und Duroc und bestätigte damit Angaben von Hörügel & Lorenz (1979). Als gesichert gilt weiterhin, dass männliche Ferkel überproportional stark betroffen sind. So fand Lax (1971) unter 30 männlichen Ferkeln 16 Grätschferkel, wogegen weibliche Tiere nicht betroffen waren. Van der Heyde et al. (1989) ermittelten ein Geschlechtsverhältnis von 2,1 : 1 (männlich : weiblich). Diese Verhältniszahlen entsprechen im Wesentlichen den von Schnapperelle & Koch (1980), Sellier & Ollivier (1982) sowie Vogt et al. (1984) angegebenen, die eine doppelt so hohe Häufigkeit im männlichen Geschlecht bzw. ein Verhältnis von 1,76 : 1 fanden. Angaben zu Einflüssen der Wurfgröße sowie der Jahreszeit und weiterer Umweltfaktoren auf die Häufigkeit des Syndroms sind oft widersprüchlich (rev. von Van der Heyde et al. 1989). Zur Mortalität unter den erkrankten Ferkeln variieren die Angaben zwischen etwa 15% und 50% (Hörügel & Lorenz, 1979; Wrathall, 1988; Svendsen et al. 1991). In einer Studie von Cunha (1968) überlebten Grätschferkel nur im Ausnahmefall, wobei hier offensichtlich eine alimentär bzw. toxisch bedingte Sonderform des Syndroms vorgelegen hat (Bergmann 1976).

2.3.3 Morphologische und biochemische Befunde

Bereits kurz nach der erstmaligen Beschreibung des Syndroms wurden umfangreiche Untersuchungen angestellt, um einerseits eine fundierte Beschreibung des Krankheitsbildes auf morphologischer und biochemischer Ebene zu erstellen und andererseits mögliche, genetisch bedingte Ursachen im Stoffwechsel bzw. der Struktur von Skelett, Bindegewebe oder Muskulatur zu identifizieren. Die Befunde sind jedoch bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt widersprüchlich. In histologisch-histochemischen sowie elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden bei Grätschferkeln die für die myofibrilläre Hypoplasie charakteristischen Veränderungen wie das Vorhandensein eines teilweise mit Glykogenpartikeln gefüllten extramyofibrillären Raumes, unregelmäßige bzw. diffuse

Querstreifung der Muskelzellen und eine erhöhte Anzahl an Ribosomen gefunden (Bergmann, 1976, Ducatelle et al. 1986, Björklund et al. 1987, Curvers et al. 1989, Antalikova et al. 1996). Deutsch & Done (1971) beschreiben darüber hinaus degenerative Erscheinungen in der Skelettmuskulatur. Aus dem verstärkten Vorhandensein von Glykogenpartikeln im extramyofibrillären Raum leiten Ducatelle et al. (1986) ab, dass eine Störung des früh-postnatalen Glykogenstoffwechsels eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Syndroms einnehmen könnte. Während einige Autoren aufgrund ihrer Befunde eine Gleichsetzung von congenitaler myofibrillärer Hypoplasie (MFH) und Ausgrätschen des Saugferkels vornehmen, wird überwiegend von einer getrennten Ätiologie beider Syndrome ausgegangen, da die MFH auch bei Ferkeln, die nicht vom Ausgrätschensyndrom betroffen sind, gefunden wurde (Cox et al. 1979, Jirmanova & Lojda 1985, Tucek et al. 1985). Jirmanova & Lojda (1985) konnten bei Minischweinen mit der Gabe des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason an tragende Sauen bei den neugeborenen Ferkeln Symptome induzieren, die für das Ausgrätschensyndrom weitgehend typisch waren. Die daraus abgeleitete Hypothese, dass diese Erkrankung eine Form der congenitalen, glucocortikoidbedingten Myopathie ist (Jirmanova 1983), wird von anderen Autoren abgelehnt (Ducatelle et al. 1986, Ohnishi et al. 1986, Curver et al. 1989). Übereinstimmung herrscht dahingehend, dass bei Ferkeln, die eine Erkrankung überstanden haben, keinerlei Unterschiede im histologischen Bild im Vergleich zu klinisch gesunden Tieren zu finden sind (Bergmann 1976, Ducatelle et al. 1986, Curver et al. 1989). Die elektronenmikroskopischen Befunde bei Spreizerferkeln entsprechen denen bei etwa 80 Tage alten Schweineföten (Deutsch & Done 1971). Diese und weitere Ergebnisse stützen die Theorie, dass eine unvollständige Ausreifung der Skelettmuskulatur bei den betroffenen Ferkeln zum Zeitpunkt der Geburt vorliegt (Elschner et al. 1991). Darüber hinaus wurden von Björklund et al. (1987) Trends zu pathologischen Organveränderungen bei Spreizerferkeln gefunden. Parallel zu morphologischen Untersuchungen wurde eine Vielzahl biochemischer Kriterien erfasst, die zur Charakterisierung unterschiedlicher Organsysteme und Regulationsmechanismen ausgewählt wurden. Die Analyse des DNA-, RNA- und Proteingehaltes verschiedener Hirnabschnitte sowie innerer Organe erbrachte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich betroffener Ferkel mit gesunden Ferkeln (Hillert et al. 1987a, b, Elschner et al. 1991). Dagegen wurden in einigen Skelettmuskeln geringere DNA-Konzentrationen sowie ein verringerter Protein : DNA-Quotient bei Spreizerferkeln mit geringer Körpermasse gefunden, was die Autoren als Zeichen einer verzögerten Muskelausreifung interpretieren (Hillert et al. 1987c, Elschner et al. 1991). Der Gehalt an Mineralstoffen und Spurenelementen war in den meisten Geweben nicht unterschiedlich; Kolb et al. (1987) fanden lediglich in einigen Muskeln der Hinterextremitäten einen im Vergleich zu normalen Ferkeln erhöhten Ca- und Na-Gehalt, der als weiterer Hinweis auf einen neuromuskulären Hintergrund der Erkrankung

2 Literaturübersicht

angesehen wurde. Die Aktivitäten muskeltypischer Enzyme (Creatinphosphokinase, CPK; Laktatdehydrogenase, LDH) im Blutplasma als Marker für eine veränderte Permeabilität der Muskelzellmembran sowie weiterer Enzyme (Aspartat – Aminotransferase, ASAT; Alanin – Aminotransferase, ALAT) sind nach Kolb et al. (1981) nur für die CPK bei Spreizerferkeln erhöht, wogegen Tucek et al. (1985) keinerlei gerichtete Unterschiede für CPK- und LDH-Aktivitäten im Blutplasma zwischen gesunden und Spreizerferkeln fanden. Hillert et al. (1992) berichten über eine gesteigerte CPK-Aktivität im Überstand von Homogenaten der Hinterextremitätenmuskeln. Das nicht durchgängige Auffinden des für andere Myopathien typisch veränderten Enzymmusters im Blutplasma wird als Hinweis angesehen, dass beim Ausgrätschsyndrom ein von bislang bei Mensch und Nutztierspezies beschriebenen Erkrankungen der Skelettmuskulatur verschiedener Pathogenesemechanismus zugrunde liegt. Bei Untersuchungen zu weiteren Enzymen (Ca-ATPase im Nervensystem, Katalase als ein Schlüsselenzym des Peroxidabbaus) sowie Metaboliten und Serumproteinen (Glukose, α 2-Makroglobuline f und s, Ascorbinsäure) wurden zum Teil signifikante Unterschiede zwischen Spreizer- und Normalferkeln gefunden, ohne dass eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse im Sinne der Ätiologie des Syndroms möglich war. Entsprechend der jeweiligen Ergebnisse werden die Störung der Ca-Regulation an den Synapsen durch verminderte Ca-ATPase-Aktivität, Störungen der Membranintegrität durch verringerten Peroxidabbau sowie erhöhte Infektionsanfälligkeit als potentielle Bestandteile des Pathogenesemechanismus bzw. als mit dem Syndrom gekoppelte Erscheinungen diskutiert (Leo et al. 1986, Kühne et al. 1986, Kolb et al. 1989, Svendsen et al. 1991). Umfangreiche Untersuchungen wurden zu Parametern des Cholinmetabolismus durchgeführt, dessen Störungen einerseits zur mangelhaften Bereitstellung von Cholinphospholipiden als Membranbaustein und andererseits zu Beeinträchtigungen in der Erregungsleitung durch veränderte Acetylcholin - Bereitstellung bzw. veränderten Abbau des Acetylcholins führen kann (Tucek et al. 1985). Indizien für eine zentrale Rolle des Cholinmetabolismus bei der Entstehung des Syndroms ergaben sich aus Experimenten von Cunha (1968), in denen durch Cholingaben an hochtragende Sauen das Auftreten von Spreizerferkeln verhindert werden konnte, sowie von Schnapperelle & Koch (1980), die über eine erfolgreiche Bekämpfung der Symptome durch Injektion des Acetylcholinesterase-Hemmers Neostigminmethylsulfat berichteten. Jedoch wurden auch diese Ergebnisse nicht durchgehend bestätigt. So waren in einem weiteren Versuch prophylaktische Cholingaben an Sauen bei der Prävention des Syndroms nicht erfolgreich (Dobson 1971). Auch Maxwell et al. (1987) fanden keinen Effekt einer präventiven Cholingabe an die Sauen auf die Häufigkeit des Auftretens von Spreizerferkeln. Nach Tucek et al. (1985) unterscheiden sich weder die Plasmaspiegel an Cholin noch die Aktivitäten verschiedener Cholinesterasen zwischen Kontroll- und Spreizerferkeln. In verschiedenen Geweben des zentralen

Nervensystems (Kleinhirn, Hirnstamm, Rückenmark) wurden demgegenüber signifikant erhöhte Acetylcholinesterase-Aktivitäten nachgewiesen (Le Hong et al. 1990), die, verbunden mit erhöhten Proteinwerten in diesen Geweben, als Indikator einer unvollständigen Ausreifung des neuromuskulären Systems interpretiert werden. Wittner et al. (1982) fanden darüber hinaus verringerte Aktivitäten der das Acetylcholin synthetisierenden Cholinacetyltransferase in verschiedenen Nervengeweben, so dass offensichtlich sowohl Synthese als auch Abbau des Acetylcholins bei Spreizerferkeln verändert sind. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass folgende Ursachen für das Ausgrätschen beim Saugferkel nicht auszuschließen sind:

- ungenügende Wirksamkeit des Acetylcholins (ACh) durch veränderte Aktivitäten ACh-synthetisierender und -abbauender Enzyme
- unvollständige Ausreifung des neuromuskulären Systems zum Geburtszeitpunkt
- Störungen in der Funktion der Synapsen durch Dysregulation ihres Ca-Haushaltes
- Störungen im frühpostnatalen Glykogenstoffwechsel.

Die teilweise diskutierte Erhöhung der Permeabilität der Muskelzellmembranen sowie die Veränderungen der Aktivitäten von Enzymen des Peroxidabbaus sind offensichtlich als sekundäre Erscheinungen des Krankheitsbildes zu betrachten. Für keinen der genannten Ursachenkomplexe existieren durchgehend eindeutige Befunde. Demzufolge ist weiterhin von einer ungeklärten Pathogenese des Syndroms „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ auszugehen.

2.3.4 Hypothesen zum genetischen Hintergrund des Syndroms

Aufgrund offensichtlich starker Einflüsse der uterinen Umwelt sowie weiterer exogener Faktoren (Christison et al. 1987) wurde ein genetischer Hintergrund des Syndroms über lange Zeit kontrovers diskutiert. Noch über 10 Jahre nach der ersten Beschreibung der Erkrankung wurde eine genetische Veranlagung zum Ausgrätschsyndrom angezweifelt und dieses lediglich als Symptom einer ungenügenden intrauterinen Ernährung der betroffenen Ferkel betrachtet (Hörügel & Lorenz 1979). Untersuchungen von Vogt et al. (1984) sowie Björklund et al. (1987) erbrachten jedoch den Nachweis, dass der Faktor „Eber“ einen hochsignifikanten Einfluss sowohl auf die Häufigkeit des Auftretens der Erkrankung als auch auf ihren Verlauf bei den betroffenen Ferkeln ausübt. Lax (1971), der bei 50 Ferkeln aus 5 Würfen 53,3% Spreizerferkel unter den männlichen Tieren und kein betroffenes weibliches fand, gelangte zu der Schlussfolgerung, dass die Erkrankung offensichtlich in enger Verbindung mit dem männlichen Geschlecht steht. Auf dieser Grundlage wurde ein hypothetischer „Splay-Leg-Locus“ dem X-Chromosomen zugeordnet. Spätere Analysen von Sellier & Ollivier (1982) führten zu der Aussage, dass eine Geschlechtsbeeinflussung des Merkmals wahrscheinlicher als eine Geschlechtsgebundenheit ist. Von diesen Autoren wird

2 Literaturübersicht

die Heritabilität für das Ausgrätschen mit $h^2 = 0.47$ angegeben. In der Mehrzahl der ausgewerteten Quellen wird ein polyfaktorieller Erbgang angenommen (Ward 1978, Sellier & Ollivier 1982, Jirmanova & Lojda 1985, Wrathall 1988), wobei eine Reihe modifizierender Faktoren in Betracht gezogen werden. Neben dem erwähnten Geschlechtseinfluss sowie einem starken Maternaleffekt (Sellier & Ollivier, 1982), wurde das Ausgrätschsyndrom als Merkmal diskutiert, das einen „Umweltschwellenwert“ erfordert, um klinisch manifest zu werden (Köhler & Seffner 1974). Die unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens des Syndroms in Abhängigkeit vom Produktionsverfahren sowie der Fütterung der tragenden Sauen stützen die Schwellenwerttheorie (Van der Heyde et al. 1989). Stigler et al. (1991) testeten anhand eines umfangreichen Datenmaterials verschiedene Vererbungsmodelle für eine Reihe von Erbfehlern. Für das Merkmal „Ausgrätschen“ konnte ein monogener Erbgang definitiv ausgeschlossen werden. In einem 2-Locusmodell wurde eine Penetranz von über 90% ermittelt, was nach den Autoren zur Annahme eines solchen Erbganges berechtigt. Demnach tritt die Erkrankung auf, wenn Homozygotie an einem rezessivem Genort vorliegt und mindestens ein dominantes Allel eines zweiten (Supressor-) Genortes vorhanden ist (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Phänogramm für das Merkmal „Ausgrätschen“ im Zwei-Locus-Modell (Stigler et al. 1991).

Genotypen	AA	Aa	aa
BB	g	g	k
Bb	g	g	k
bb	g	g	g

A, a – Allele eines rezessiven Gens
 B, b – Allele eines dominanten Supressorgens

g - gesund
 k – krank

Die Beteiligung weiterer Loci bzw. von Majorgenen wird von diesen Autoren sowie von Thaller et al. (1996) jedoch nicht ausgeschlossen.

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu verschiedenen Aspekten des Ausgrätschsyndroms beim Saugferkel in den vergangenen Jahren sind weder der Pathogenesemechanismus noch der Vererbungsmodus zweifelsfrei geklärt. Zudem existiert bis zur Gegenwart kein einheitliches Bild der Befunde bei betroffenen Ferkeln auf morphologischem und biochemischem Gebiet. Ein wesentlicher Grund für die zahlreichen widersprüchlichen Ergebnisse dürfte sein, dass die bisherigen Untersuchungen und Erhebungen meist an Stichprobenumfängen von 3 - 16 Tieren je untersuchter Gruppe, bei oft stark differenziertem bzw. unbekanntem genetischen Hintergrund des Tiermaterials sowie unter verschiedenen

Umweltbedingungen durchgeführt wurden. Da sich das Syndrom nur in einem sehr kurzen Zeitraum nach der Geburt klinisch manifestiert, in dem eine Einzeltierkennzeichnung unter praktischen Bedingungen meist noch nicht gegeben ist und darüber hinaus genesene Ferkel nicht von gesunden unterschieden werden können, ist eine effektive Selektion gegen diese Erkrankung in Zuchttierpopulationen nur stark eingeschränkt möglich. Dies erklärt auch die über eine lange Periode nahezu konstanten Angaben zur Häufigkeit ihres Auftretens.

3 Material und Methoden

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungen zur Assoziation von Sequenzvarianten im Promotor des porcinen Hitzeschock – Protein 70.2 (HSP70.2) – Gens mit physiologischen Parametern und Leistungsmerkmalen beim Schwein

3.1.1 Tiere

Die Untersuchungen am pHSP70.2 –Gen wurden in 6 separaten Versuchen, in die insgesamt 754 Schweine unterschiedlichen Alters und Geschlechts sowie unterschiedlicher genetischer Konstruktionen einbezogen wurden, durchgeführt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Struktur des Tiermaterials in den Untersuchungen zum HSP70.2-Gen

Versuch	Anzahl	genetische Konstruktion	Struktur
1	51	Amerikanische Yorkshire (AY), Amerikanische Landrasse (AL), Spotted Poland China (SPC), Duroc (Du), Hampshire (Ha)	20 Kastraten 31 Sauen
2	81	Schwerfurter Fleischrasse (SF), Pietrain (Pi), Hybriden (Pi x SF)	30 Kastraten 51 Sauen
3	45	Hybriden (Pi x DE)	18 Eber 11 Kastraten 16 Sauen
4	34	Pietrain (Pi)	34 Eber
5	182	Deutsche Landrasse (DL)	25 Sauen 157 Ferkel (davon 88 männlich 69 weiblich)
6	361	Duroc (Du), Berliner Minischwein (BM), [Hybriden F ₁ Du x BM; F ₂ (Du x BM) x (Du x BM)]	3 F ₂ – Familien (Berlin–Bonner- Ressourcepopulation; Hardge 1999)

Ein Teil der Untersuchungen wurden an Tiermaterial durchgeführt, das für Experimente anderer Arbeitsgruppen zu verschiedenen Fragestellungen zusammengestellt wurde (Versuche 1, 2, 3 und 6). Der Versuch 1 wurde während eines Forschungsaufenthaltes am Department of Animal Science (Iowa State University, Ames, USA) durchgeführt. In den Versuchen 4 und 5 wurde auf Schweine aus kommerziellen Unternehmen zurückgegriffen.

3.1.2. DNA-Isolierung

Als Ausgangsmaterial standen Blut- oder Gewebeproben der Tiere (Tabelle 3.1) zur Verfügung. Für die Isolierung von DNA aus Gewebe (Versuch 1) bzw. Vollblut (Versuch 2) kam ein Extraktions- und Ausfällungsprotokoll zur Anwendung, das die Präparation hochmolekularer DNA ohne Verwendung von Phenol und Chloroform ermöglicht. Im Wesentlichen beinhaltet es folgende Schritte (Zusammensetzung der verwendeten Lösungen siehe Anhang):

- Inkubation von 10 ml EDTA-stabilisiertem Vollblut mit 40 ml Triton – Lysepuffer bei 4° C für 30 min.
- Zentrifugation bei 1.500 x g und 4° C für 15 min, Verwerfen des Überstandes.
- Aufnahme des entstandenen Pellets in 1 ml 0,9%-iger NaCl – Lösung, Zentrifugation unter o.g. Bedingungen für 10 min.
- Wiederholung des letzten Schrittes mit 2 ml 0,9%-iger NaCl – Lösung.
- Aufnahme des Pellets in 1,5 ml Kernlysepuffer, Zusatz von 50 µl SDS und 500 µl Pronasearbeitslösung, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln.
- Zusatz von 500 µl 6M NaCl – Lösung, Zentrifugation nach Durchmischung bei 1.500 x g und 4° C für 15 min, Überführung des Überstandes in ein neues 10 ml Gefäß.
- Zusatz von 1 Volumen Isopropanol, Zentrifugation nach Durchmischung bei 4.500 x g und 4° C für 10 min, Verwerfen des Überstandes.
- Überspülen des entstandenen Pellets mit 1 ml 70%-igem Ethanol, Trocknung des Pellets bei 37° C.
- Aufnahme des getrockneten Pellets in 300 µl TE – Puffer.

Diese Lösung diente als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Reaktionen. Für einen weiteren Teil der Proben (Experimente 3 – 5) erfolgte die DNA – Präparation unter Verwendung kommerzieller Isolierungs – Kits verschiedener Anbieter (Genomix Blood Kit; Fröbel, Konstanz; BRL Genomic DNA Isolation Kit; Gibco/BRL, Berlin; QIAamp Blood Kit; QIAGEN, Hilden). In diesen Fällen wurde die Präparation exakt nach den jeweiligen Herstellervorschriften durchgeführt. Für die Analysen im Experiment 6 wurde die genomische DNA der Schweine dankenswerterweise von Herrn PD Dr. agr. habil. T. Hardge (Institut für Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt. Generell wurde die DNA bis zur weiteren Verarbeitung bei –20° C gelagert.

3 Material und Methoden

3.1.3 PCR - Amplifizierung

Die PCR – Reaktionen wurden in allen Versuchen in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt und enthielten 500 ng genomische DNA, 2 µM der entsprechenden Primer, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.01% Gelatine, je 250 µM der dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ and 1.5 U Taq Polymerase (AGS; Heidelberg, Germany). Folgende Primer wurden auf der Grundlage einer bereits beschriebenen vollständigen Sequenz des porcinen HSP 70.2 – Gens (Peelman et al. 1992; GenBank/EMBL Accession No. M69100) abgeleitet und in den eigenen Untersuchungen unter folgenden Reaktionsbedingungen verwendet.

5'-nicht translatierte Region (UTR):

forward: 5'-ACA GGT GCC GTG CAA ACG CGA AAC-3'

reverse: 5'-TCG GTG TCC GTG AAG GCC ACT GAG-3'.

Mit diesen Primern wird ein 614 bp langes Fragment des 5'-UTR des porcinen HSP70.2 – Gens amplifiziert, welches die vollständige Promotor - Region des Gens beinhaltet. Die PCR wurde mit einem Denaturierungsschritt (94 °C für 4 min) eingeleitet, und beinhaltete im weiteren Verlauf 30 Zyklen mit 94 °C für 1min (Denaturierung), 63 °C für 1 min (Primer-Annealing) und 70 °C für 2 min. (Extension). Zur Verhinderung von Verdunstungsverlusten erfolgte eine Überschichtung der Proben mit ca. 20 µl Mineralöl. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler TC1 (Perkin Elmer, Überlingen) durchgeführt.

3'-nicht translatierte Region (UTR):

forward: 5'-GTG TGT AAC CCC ATC ATC AG-3'

reverse: 5'-CAG GCA CTC AGA GAA GAA TC-3'

Mittels dieser Primer erfolgt die Amplifikation eines 490 bp langen Fragmentes des HSP70.2 – Gens, das neben 120 bp kodierender Sequenz die 3'-UTR (370 bp) enthält. Die PCR – Bedingungen sind bis auf die Temperatur im Annealing – Schritt (52° C anstelle von 63° C) identisch mit denen der 5'-UTR – Amplifikation.

Die PCR – Produkte wurden aus der Reaktionslösung mittels Microspin S-300 Säulen nach Herstellervorschrift aufgereinigt (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg).

3.1.4 DNA - Sequenzanalyse

3.1.4.1 Cycle Sequencing von PCR – Produkten im halbautomatischen System

Für die 5'-UTR wurde die Sequenz durch das Cycle Sequencing – Verfahren ermittelt. Dazu wurde teilweise der forward – PCR-Primer mit einem internen reverse Primer verwendet (5'-GGC CTG CTC TCT CCG CAA ACA-3'). Damit wird ein 451 bp langes Fragment aus dem oben beschriebenen 614 bp langem PCR – Produkt sequenziert. Für einen Teil der Sequenzanalysen wurde ein ebenfalls intern abgeleiteter forward - Sequenzierungsprimer (5'-TCC CGC GAA TCC CAG AAG AGT C-3') in Verbindung mit dem o.g. reverse – Primer verwendet. Die Konzentration beider Primer betrug abweichend von der Erstellung des ersten PCR – Produktes 40 nM. Als Annealing – Temperaturen wurden die oben angegebenen verwendet. Zur Sequenzierung wurden das DIG-Taq Cycle Sequencing System (Versuche 2 und 3) bzw. das ThermoSequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing System (Versuche 4 und 5) entsprechend der Anwendungsvorschriften der Hersteller (Roche, Mannheim und AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) zum Einsatz gebracht. Während die Sequenzierungen im Experiment 1 als Auftrag von einem zentralen Sequenzierungslabor (Sequencing Facility, Iowa State University, Ames, USA) ausgeführt wurden, erfolgten die Analysen in den Experimenten 2 – 5 im Labor des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik. Dabei kam für die Experimente 2 und 3 das halbautomatische Sequenzanalysestystem GATC 1500 (GATC, Konstanz) zum Einsatz. Hierbei wurden die zu sequenzierenden, 5'-Digoxigenin-markierten Produkte in einem 4%-igen Polyacrylamid – Gel aufgetrennt und direkt auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (geblottet). Nach kovalenter Bindung der geblotteten DNA an die Membran unter UV-Licht wurden die Digoxigenin – markierten DNA – Stränge durch einen „enzyme linked immunoassay“ unter Verwendung eines Antikörper – Konjugates (Anti – Digoxigenin Alkalische Phosphatase Konjugat) nachgewiesen. In der nachfolgenden Enzym – katalysierten Farbreaktion mit X-Phosphat und Nitroblau – Tetrazoliumsalz entsteht ein unlöslicher blauer Niederschlag, der die markierten DNA – Stränge sichtbar macht. Die detaillierten Inkubationsschritte sind in der Anwendungsvorschrift für den DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche, Mannheim) dargelegt. Die DNA – Sequenzen wurden manuell auf der Basis des Sequenzmusters ermittelt und Dateien im DNASIS – Format erstellt.

Im untersuchten Material des Versuches 2 konnten alle drei möglichen Genotypen in der GC – Box (CC – Wildtyp; CA – heterozygot mutiert; AA – homozygot mutiert) beobachtet werden, wogegen lediglich die Genotypen AA (Wildtyp) und A – (heterozygot mutiert) in der TATA – Box gefunden wurden. Homozygot mutierte Tiere traten nicht auf. In Abbildung 3.1 sind die Sequenzausschnitte dargestellt, die die entsprechenden Polymorphismen enthalten. Die Genotypisierung der C/A – Transversion in der GC – Box (oberer Teil von Abbildung 3.1) ist mit dem Cycle – Sequencing – Verfahren, d.h. mit der Sequenzierung doppelsträngiger

3 Material und Methoden

DNA problemlos möglich. Demgegenüber treten Schwierigkeiten bei der Darstellung der heterozygoten „A“ – Deletion auf, da hierbei zwei DNA – Stränge mit einem Längenunterschied von 1 bp auftreten. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierungsreaktion ergeben sich somit überlagernde Sequenzen ab dem Ort der Deletion, die in der Abbildung 3.1 am jeweiligen Rand der Sequenzen gekennzeichnet sind. Eine Sequenzierung des Fragmentes in 3' – 5' Orientierung (Abbildung 3.1, unten rechts) bestätigt jedoch das Vorliegen der Deletion und schließt Sequenzierungsfehler aus.

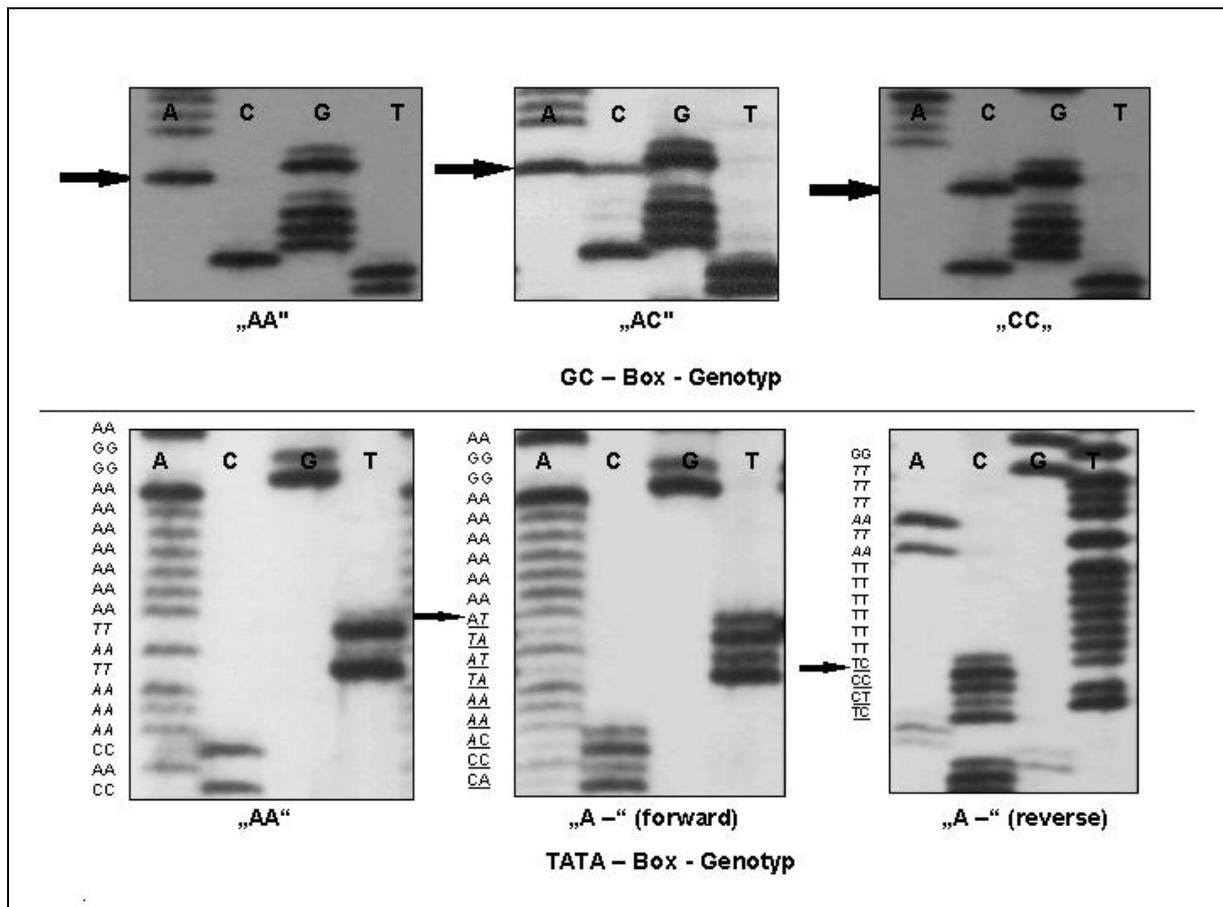


Abbildung 3.1: Darstellung der Genotypen in der GC – Box (oberer Teil) und TATA – Box (unterer Teil) des pHSP70.2 - Gens mit dem GATC 1500 Sequenzierungssystem.

3.1.4.2 Cycle Sequencing von PCR – Produkten im automatischen System

Für die Versuche 4 und 5 stand ein automatisches Sequenziersystem ALFexpress (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) zur Verfügung. Die Sequenzierung wurde wiederum mit dem ThermoSequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing System des oben genannten Herstellers exakt nach dessen Angaben durchgeführt. Der jeweilige forward – Primer ist in diesem Fall mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Nach Zusatz von je 1µl Stopp-Lösung wurden jeweils 4 µl der Reaktionsansätze zur Elektrophorese auf ein 4%-iges Polyacrylamid-Gel in einem automatischen Sequenziergerät (ALFexpress) aufgetragen. Die resultierenden Fluoreszenzsignale wurden automatisch zu Sequenzdaten verarbeitet und abgespeichert. Anhand der Elektropherogramme wurden die DNA-Sequenzen bei Erfordernis manuell editiert (Sequence Analyzer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und zur weiteren Verarbeitung im DNASIS – Format abgespeichert. Daten aus verschiedenen Klonen desselben Fragments wurden mit Hilfe des Software-Paketes DNASIS V2.1 (Hitachi Software Engineering, 1995) abgeglichen und somit eine Konsensequenz für das Fragment generiert

3.1.5 Klonierung und Sequenzierung von PCR – Produkten

Die Untersuchung der 3' nicht translatierten Region (3'UTR) des porcinen HSP70.2 Gens beschränkte sich auf 4 Tiere der Parentalgeneration der Berlin – Bonner – Ressourcepopulation (Hardge 1999). Die Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Ligation von PCR – Produkten in den pGEM-T Vektor

Dazu wurden die aufgereinigten PCR – Produkte in die EcoRV-Schnittstelle des pGEM-T-Vektors (Promega, Madison, USA) ligiert (2,0 µl DNA, 1,0 µl 10 x Ligationspuffer, 1,0 µl pGEM-T – Vektor, 1,0 µl T4-DNA-Ligase in 10 µl Gesamtvolumen; Inkubation bei 4° C über Nacht). In diesem Vektor-System wird ein Thymidin-Rest in die EcoRV-Schnittstelle synthetisiert. Da die Mehrzahl der thermostabilen DNA-Polymerasen ein unspezifisches „A“ an das PCR-Produkt anfügen, ist das System nach Herstellerangaben somit speziell für die Klonierung von nicht modifizierten PCR-Produkten geeignet.

3 Material und Methoden

Transformation kompetenter Zellen und Vermehrung

Anschließend an die Ligation erfolgte die Transformation kompetenter Zellen unter folgenden Bedingungen:

- 1,0 µl Ligationsansatz werden mit
- 50 µl JM109 High Efficiency Competent Cells nach Herstellerangaben versetzt und auf Eis für 20 min, anschließend für 45 s in 42° C, danach sofort wieder auf Eis inkubiert. Abschließend wurden 950 µl SOC – Medium (Stratagene, Heidelberg) zugesetzt und die Proben für 1,5 Stunden bei 37° C geschüttelt.

Die transformierten Zellen wurden auf Agar-Platten (Anhang) ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Das verwendete System erlaubte ein Blau-Weiß-Screening der entstandenen Kolonien (weiß: Insert vorhanden, blau: kein Insert). Nach diesem Schema scheinbar positive Klone wurden steril in jeweils 10 ml Terrific Broth (Sigma, Deisenhofen) überführt und unter leichtem Schütteln wiederum über Nacht bei 37° C zur Vermehrung inkubiert.

Isolierung von Plasmid – DNA und Sequenzierung

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den Kulturansätzen wurde der Mini-Prep-Plasmid-Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Dabei wurde exakt nach den Herstellervorschriften vorgegangen. Als Qualitätskontrolle für die Isolierung wurden jeweils 1 µl Plasmid-DNA auf einem 0,8%-igen Agarosegel (120 V, 30 min) elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Jeweils 13 µl der isolierten Plasmid-DNA für mindestens 2 Klone je untersuchtem Tier wurden zur Sequenzierung mit dem AutoReadSequencing-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Dazu wird je Probe die DNA mit 2 pmol Cy5 – markiertem Primer sowie 2 µl Annealing Puffer auf ein Gesamtvolumen von 17 µl gebracht und nach Durchmischung bei 60° C für 10 min inkubiert (Primer– Annealing). Nach Abkühlen der Reaktionen auf Raumtemperatur werden 1 µl Extensionspuffer sowie 2 µl einer T7 – DNA – Polymerase – Arbeitslösung zugesetzt und die Reaktion auf jeweils 4 vorbereitete Sequenzierungsmixe (A, C, G, T) verteilt. Diese werden abschließend für 5 min bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Stopplösung wird die Reaktion für 2 min auf 90° C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Fünf µl eines jeden Sequenzierungsmixes werden zur Elektrophorese auf ein 4%-iges Polyacrylamid-Gel in einem automatischen Sequenziergerät (ALFexpress, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Das weitere Verfahren ist unter dem Abschnitt „Cycle Sequencing von PCR – Produkten im automatischen System“ dargelegt. Zusätzlich wurden die in den Rohsequenzen enthaltenen Plasmidsequenzen manuell identifiziert und vor der Speicherung der Daten entfernt. Es erfolgte ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen für 5'- und 3'-UTR des porcinen HSP70.2 – Gens mit der im Datenbanksystem GenBank/EMBL dokumentierten Sequenz M69100 (Peelman et al. 1992).

3.1.6 PCR-RFLP – Tests

3.1.6.1 Promotorvarianten im pHSP70.2 - Gen

Bereits 1995 wurden von Schwerin et al. zwei DNA – Polymorphismen in transkriptionssteuernden Elementen (GC – Box; TATA – Box) des Promotors des porcinen HSP70.2 – Gens beschrieben. Als Nachweismöglichkeiten standen einerseits die vergleichende Sequenzierung dieses DNA – Abschnittes und andererseits ein SSCP - (Single Strand Conformation Polymorphism) Test zur Verfügung. Beide Verfahren sind durch einen relativ hohen materiellen und Zeitaufwand gekennzeichnet und stellen, besonders im Falle der SSCP – Analysen, sehr hohe Anforderungen an die Standardisierung des Tests. In den eigenen Untersuchungen (Versuche 1 – 5) kam die vergleichende Sequenzierung zum Einsatz. Von Schwerin (unveröffentlicht) wurde ein zweistufiger PCR – RFLP – Test entwickelt, der von Hagendorf (1999) erfolgreich zur routinemäßigen Detektion der beiden Polymorphismen eingesetzt wurde. Im eigenen Experiment 6 konnte dieser einfach zu handhabende Test in leicht modifizierter Form ebenfalls eingesetzt werden. Folgende Schritte sind Bestandteil des Nachweisverfahrens:

- Generierung eines PCR – Produktes, welches die beiden polymorphen Elemente enthält (erste PCR).
- A) Nachweis des Polymorphismus in der GC – Box
 - Amplifizierung eines kürzeren Fragmentes innerhalb des ersten PCR – Produktes, das die GC – Box enthält (zweite PCR).
 - Nachweis von Sequenzvarianten durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease Acil und anschließender elektrophoretische Analyse des Spaltungsmusters.
- B) Nachweis des Polymorphismus in der TATA – Box
 - Amplifizierung eines kürzeren Fragmentes innerhalb des ersten PCR – Produktes, das die TATA – Box enthält (zweite PCR). Hierbei kommen modifizierte Primer zum Einsatz, die Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease XmnI generieren.
 - Nachweis von Sequenzvarianten durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease XmnI und anschließender elektrophoretische Analyse des Spaltungsmusters.

Durch die Wahl der Primerlokalisierung (GC – Box) bzw. Sequenzmodifikationen im Primer (TATA – Box) wurde gewährleistet, dass in jedem der Primer Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen vorhanden sind und demzufolge eine interne Kontrolle der Enzymwirkung möglich ist (Ausschluss falsch negativer Resultate). Abweichend vom bei Hagendorf (1999) beschriebenen Test wurden die selbst abgeleiteten PCR – Primer für die Amplifizierung des 5'-UTR (erste PCR) verwendet, so dass anstelle des

3 Material und Methoden

659 bp langen Amplifikates eins von 614 bp Länge entsteht. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Primersequenzen für den diagnostischen Nachweis von Promotorvarianten (GC – Box, TATA – Box) mittels zweistufigem PCR – RFLP – Test (verändert nach Hagendorf 1999).

Primersequenz	Amplifikat (Länge in bp)	Annealing Temperatur (° C)
erste PCR (beide Polymorphismen) forward: 5'-ACA GGT GCC GTG CAA ACG CGA AAC-3' reverse: 5'-TCG GTG TCC GTG AAG GCC ACT GAG-3'	614	63
zweite PCR (GC – Box) forward: 5'-GAC CTG GCA GCC CCG CCG AGC T-3' reverse: 5'-TCG CTG TTT CCC TGG GGG CGG CT-3'	111	60
zweite PCR (TATA – Box) forward: 5'-GGC GAA ACC TCT GGA ATA TTt tCG ACC T-3' ¹ reverse: 5'-GGG GGC GGC TCT GTG TTT AgA aTT T-3' ¹	111	55

¹ Basen als Kleinbuchstaben im Fettdruck sind abweichend von der porcinen Sequenz und generieren Schnittstellen für das Enzym XmnI (GAANN/NNTTC)

Die Ansätze für die erste PCR sowie die Inkubationsbedingungen sind analog zu den unter Punkt 3.1.3 beschriebenen – jedoch wurden 40 Zyklen durchgeführt. Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte die Aufreinigung der PCR – Produkte mit dem MicroSpin S 300 – System (AmershamPharmacia, Freiburg) zur Entfernung von überschüssigen Primern und Primer – Dimeren aus dem Reaktionsansatz. Für die zweite PCR wurden jeweils 5 µl aus dem ersten PCR – Ansatz als Template eingesetzt. Zu einem ReadyToGo – PCR – Bead (AmershamPharmacia, Freiburg) wurden weiterhin 15 pmol der jeweiligen Primer für die entsprechende Zweit – PCR (GC – Box oder TATA – Box) zugesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 25 µl gebracht. Die folgenden Zyklusbedingungen kamen zur Anwendung:

- Denaturierung bei 94° C für 4 min
- 40 Zyklen mit
 - 94° C für 1 min (Denaturierung)
 - T_a (Tabelle 3.2) für 1 min (Primer – Annealing)
 - 70° C für 2 min (Extension).

Diese Produkte wiederum dienten als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden enzymatischen Verdauungsreaktionen. Dazu kamen jeweils 10 µl der entsprechenden Zweit – PCR – Ansätze zum Einsatz, die mit 1,5 µl der 10x Reaktionspuffer, 0,5 U (Acil) bzw. 1,0 U

(Xmnl) der Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt) sowie Aqua bidest auf 15 µl aufgefüllt wurden. Die Inkubation erfolgte bei jeweils 37° C für 2 Stunden (Acil) bzw. über Nacht (Xmnl). Der vollständige Restriktionsverdau wurde mit 5 µl Stop – Lösung versetzt und auf einem 4%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (30 min bei 110V, 200 mA). Unter UV – Licht erfolgte die Visualisierung der Banden. In Abhängigkeit vom Genotyp treten folgende Bandenmuster auf:

GC – Box:	Wildtyp (CC):	34 bp
	heterozygot (CA):	68 bp / 34 bp
	homozygot mutiert (AA):	68 bp

TATA – Box:	Wildtyp (AA):	69 bp
	heterozygot (A -):	93 bp / 69 bp
	homozygot mutiert (- -):	93 bp

Ein Beispiel für eine Analyse mit diesem Test ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

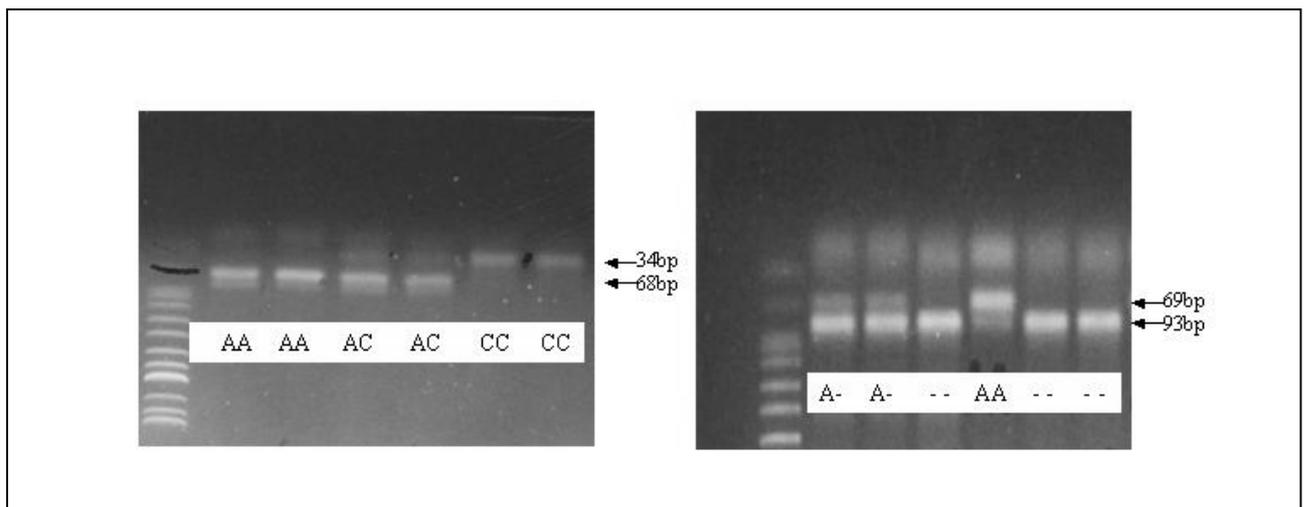


Abbildung 3.2: Darstellung der Genotypen in der GC – Box (linkes Bild) und der TATA – Box (rechtes Bild) mittels PCR – RFLP – Test (Schwerin unveröffentlicht). Die jeweiligen Genotypen sind unterhalb der Banden gekennzeichnet, in den jeweils ersten Spuren: Größenmarker No. VIII (Roche, Mannheim).

3 Material und Methoden

3.1.6.2 Bestimmung des Genotyps in der Nukleotidposition 1843 des porcinen Ryanodinrezeptor I – Gens (MHS – Genotyp)

In einer Arbeit von Fujii et al. (1991) konnte eine Punktmutation im Ryanodinrezeptor I – Gen an Nukleotidposition 1843 als kausale Ursache für das Maligne Hyperthermie Syndrom (MHS) beim Schwein nachgewiesen werden. Darauf basierend entstanden mehrere gendiagnostische Tests, von denen sich ein PCR – RFLP – Test (Förster et al. 1992) als Standardverfahren zur Genotypisierung beim Schwein in Deutschland etablierte. Die in den eigenen Untersuchungen angegebenen MHS – Genotypen basieren auf dieser Bestimmungsmethode und wurden in den Versuchen 2, 3 und 4 im Labor des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik bestimmt. Dabei wurde aus ca. 100 ng genomischer DNA ein 139 bp langes Fragment des RYRI – Gens amplifiziert und nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease Cfol (Roche Mannheim) elektrophoretisch aufgetrennt.

Folgende Bedingungen kamen zur Anwendung:

PCR – Amplifikation (Gesamtvolumen 25 µl):

- 100 ng genomische DNA
- je 200 µM der dNTPs (Perkin Elmer, Überlingen)
- je 25 pmol der Primer
(MHS1: 5'-CTG GAT GTC CTG TGT TCC CTG TGT G-3')
(MHS2: 5'-GGC CAG ACC TGG TGA CAT AGT TGA T-3')
- 1 U Taq – Polymerase (Roche, Mannheim)
- 1,5 mM MgCl₂

Nach einer Inkubation bei 94° C über 4 min schlossen sich 30 Zyklen mit 94° C (1 min), 62° C (1 min) sowie 70° C (2 min) an.

Verdau mit Cfol (Gesamtvolumen 20 µl):

- 5 µl des PCR – Produktes aus dem vorangegangenen Schritt
- 2 µl Inkubationspuffer L (Roche Mannheim)
- 4 U Cfol (Roche, Mannheim)

bei 37° C für 120 min. Die entstehenden Spaltprodukte können unter UV– Licht in einem 3%-igen Agarosegel sichtbar gemacht werden. Die Genotypen unterscheiden sich durch folgende Bandenmuster:

NN (Wildtyp):	92 bp / 47 bp
Nn (heterozygot):	139 bp / 92 bp/ 47 bp
nn (homozygot mutiert):	139 bp.

Die Genotypen der untersuchten Tiere in den Versuchen 1, 5 und 6 lagen bereits vor und wurden übernommen. Dabei erfolgte kein Test aller Nachkommen in den Versuchen 5 und 6, da die entsprechenden Eltern jeweils den Genotyp NN aufwiesen.

3.1.7 Definition und Erfassung von biochemischen und morphologischen Kennwerten sowie Leistungsmerkmalen beim Schwein

In die Untersuchungen zur Assoziation von Varianten in transkriptionssteuernden Elementen des Promotors des HSP70.2 – Gens wurden folgende Komplexe einbezogen:

- Versuch 1: Fleischqualität
- Versuch 2: Fleischqualität
morphologische und biochemische Kriterien des M. longissimus
- Versuch 3: Fleischqualität
- Versuch 4: Spermaqualität
- Versuch 5: Fruchtbarkeit (Sauen); Geburtsgewicht (Ferkel)
- Versuch 6: Mastleistung, Schlachtleistung, Fleischqualität.

Entsprechend der aufgeführten Merkmalskomplexe werden nachfolgend die verwendeten Parameter definiert.

Biochemische Parameter des M. longissimus

Die biochemischen Merkmale wurden an Biopsieproben der Schweine aus Versuch 2 ermittelt.

Tabelle 3.3: Biochemische Parameter von Biopsieproben des M. longissimus.

Merkmal	Symbol (Einheit)	Definition
Fluid Volume (Flüssigkeitsmenge)	FV (g)	Masse der nach Homogenisation und Zentrifugation ausgetretenen Flüssigkeit aus einer 45 min bei 37° C inkubierten Biopsieprobe (hochgerechnet auf 500 mg Probenfrischmasse)
pH-Wert der Flüssigkeit	pH_F	pH – Wert der unter Fluid Volume erfassten Flüssigkeit
pH-Wert der Biopsieprobe	pH_M	pH – Wert der Biopsieprobe nach Inkubation für 45 min bei 37° C
pH-Wert-Differenz	Δ pH	Differenz der pH – Werte der Biopsieprobe vor und nach der Inkubation

Die Proben wurden mittels Schussbiopsie (Schöberlein 1976) im Alter der Tiere von 133 ± 13 (1. Biopsie) und 176 ± 12 (2. Biopsie) Lebensstagen aus dem Musculus longissimus

3 Material und Methoden

entnommen. Die Bestimmung der Parameter in Tabelle 3.3 beruhen auf einer von Cheah et al. (1991) beschriebenen Methode.

Parameter der Struktur des M. longissimus

Für die Ermittlung der Parameter der Muskelstruktur wurde ein Teil der für die Bestimmung der biochemischen Parameter verwendeten Biopsieproben eingesetzt. Die histochemische Differenzierung der Muskelfasern (Diaphorase – Nachweis), sowie die Ermittlung der weiteren, in Tabelle 3.4 dargestellten Parameter erfolgte nach den Methoden, die bei Giesel (1998) beschrieben sind.

Tabelle 3.4: Merkmale der Struktur des M. longissimus.

Merkmal	Symbol (Einheit)	Definition
Mittlerer Durchmesser der roten Muskelfasern	Ø STO (µm)	Mittlerer Durchmesser von etwa 500 Fasern/Probe des Stoffwechselltyps STO (slow twitch oxidative)
Mittlerer Durchmesser der weißen Muskelfasern	Ø FTG (µm)	Mittlerer Durchmesser von etwa 500 Fasern/Probe des Stoffwechselltyps FTG (fast twitch glycolytic)
Muskelfasergesamtanzahl	MFGA (N x 10 ³)	Anzahl der Muskelfasern im Querschnitt des M. longissimus, berechnet als Produkt aus der ermittelten Anzahl der Muskelfasern je cm ² und der Fläche des M. longissimus
Anteil pathologisch veränderter Muskelfasern	pathol. Fasern (%)	Prozentualer Anteil an angulären und lila Fasern (Wicke et al. 1993) an der ermittelten Gesamtfaseranzahl je cm ²

Parameter der Lebendmasseentwicklung und Mastleistung

Die in Tabelle 3.5 aufgelisteten Parameter wurden in den Versuchen 3, 5 und 6 bestimmt. Die Wägeintervalle und die Korrektur der Werte in Versuch 6 sind bei Hardge (1999) detailliert beschrieben.

Tabelle 3.5: Merkmale der Lebendmasseentwicklung und Mastleistung.

Merkmal	Symbol (Einheit)	Definition
Geburtsgewicht	LM_G (kg)	Lebendmasse am ersten Lebenstag
Lebendmasse am 100. Lebenstag	LM_{100d} (kg)	Lebendmasse am 100. Lebenstag
Lebendmasse am 200. Lebenstag	LM_{200d} (kg)	Lebendmasse am 200. Lebenstag
Lebenstagszunahme	LTZ (g/d)	Tägliche Lebendmassezunahme im Zeitraum von Geburt bis zur Schlachtung (ca. 200 d in Versuch 6)
Prüftagszunahme	PTZ (g/d)	Tägliche Lebendmassezunahme im Prüfzeitraum
Futteraufwand	FuA (kg/kg)	Verbrauchte Futtermenge zum Erreichen von 1 kg Lebendmassezuwachs im Prüfzeitraum

3 Material und Methoden

Parameter der männlichen und weiblichen Fruchtbarkeit

Die Werte in den analysierten Spermaqualitätsmerkmalen in Versuch 4 wurden von der Besamungseberstation Fischbeck (Schweinezucht- und Produktionsverband Sachsen – Anhalt e. V.) zur Verfügung gestellt. Die Daten zur weiblichen Fruchtbarkeit in Versuch 5 wurden von Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik im Versuchsbetrieb erfasst.

Tabelle 3.6: Merkmale der männlichen und weiblichen Fruchtbarkeit.

Merkmal	Symbol (Einheit)	Definition
Ejakulatvolumen	- (ml)	Durchschnittliches Volumen der Ejakulate im Untersuchungszeitraum (3 Monate)
Spermienkonzentration	Konzentration (Mio./ml)	Berechnete durchschnittliche Konzentration an Spermien in den Ejakulaten während des Untersuchungszeitraumes
Gesamtspermienanzahl	Spermienanzahl (Mrd./Ejakulat)	Aus der Konzentration und dem Ejakulatvolumen hochgerechnete durchschnittliche Anzahl an Spermien je Ejakulat
Insgesamt geborene Ferkel je Wurf	insg. gF (n/Wurf)	Anzahl aller lebend und tot geborenen Ferkel je Wurf
Lebend geborene Ferkel je Wurf	IgF (n/Wurf)	Anzahl aller lebend geborenen Ferkel je Wurf
Wurfmasse	Wurfmasse (kg)	Gewicht aller lebend geborenen Ferkel eines Wurfes am ersten Lebenstag
Mittleres Geburtsgewicht je Wurf	Ø Geburtsgewicht der Ferkel (g)	Berechneter Wert aus Wurfmasse und der Anzahl lebend geborener Ferkel des Wurfes

Parameter der Schlachtkörperqualität

Diese Daten wurden im Versuch 6 im Rahmen der Untersuchungen von Hardge (1999) erfasst und für die eigenen Analysen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.7: Merkmale der Schlachtkörperqualität.

Merkmal	Symbol (Einheit)	Definition
Schlachtkörpermasse	SM_w (kg)	Gewicht des Schlachtkörpers mit Beckenhöhlenfett, Nieren und Flomen unmittelbar nach der Schlachtung
Magerfleischanteil	MFA (%)	Mittels Fat-O-Meater geschätzter Wert auf Basis von Speck- und Fleischmaß
Innere Länge des Schlachtkörpers	IL (cm)	Abstand zwischen 1. Halswirbel und cranialem Rand des Schloßknochens der hängenden Schlachtkörperhälfte
Kotelettfläche	Fläche_{MI} (cm ²)	Mittels Planimetrie bestimmte Fläche des M. longissimus (Anschnitt 13./14. Rippe)
FOM Speckmaß	Speckmaß_{FOM} (mm)	Mittels Fat-O-Meater gemessene Speckdicke 7 cm seitlich der Rückenmitte in Höhe der zweit-/drittletzten Rippe
FOM Fleischmaß	Fleischmaß_{FOM} (mm)	Mittels Fat-O-Meater gemessene Muskeldicke 7 cm seitlich der Rückenmitte in Höhe der zweit-/drittletzten Rippe
Fleisch : Fettverhältnis	Fleisch/ Fettverh.	Reziproker Quotient aus Fettfläche und Muskelfläche (Anschnitt 13./14. Rippe)

Parameter der Fleischqualität

Die Erfassung der Parameter der Fleischqualität erfolgte in Anlehnung an die „Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein“ (1994). Die im Versuch 1 ermittelten Werte sind bei Stalder et al. (1998) definiert und sind weitgehend mit den nach o. g. Richtlinie bestimmten Parametern vergleichbar. Eine Übersicht über die erfassten Parameter ist in Tabelle 3.8 gegeben. Für die Definition des Fleischbeschaffenheitsmangels „PSE“ - Fleisch (pale, soft, exsudative meat) kamen folgende Kriterien zum Ansatz: $pH_{1MI} < 5,80$ und $LF_{1MI} > 4,5$ mS/cm. Fleisch, das Messwerte im $pH_{1MI} \geq 5,80$ und im $LF_{1MI} \leq 4,5$ mS/cm aufwies, wurde als normalqualitativ angesehen.

3 Material und Methoden

In Abweichung von den in Tabelle 3.5 angegebenen Zeitpunkten für die Messung von pH – Wert und Leitfähigkeit wurde in den Versuchen 2 und 3 die Bestimmung von $\text{pH}_{1\text{MI}}$ und $\text{LF}_{1\text{MI}}$ nach etwa 120 min post mortem vorgenommen.

Tabelle 3.8: Merkmale der Fleischqualität.

Merkmal	Symbol (Einheit)	Definition
pH – Wert 1	$\text{pH}_{1\text{MI}}$	pH – Wert im M. longissimus (13./14. Rippe) 45 min post mortem
pH – Wert 2	$\text{pH}_{2\text{MI}}$	pH – Wert im M. longissimus (13./14. Rippe) 24 h post mortem
pH – Wert – Differenz	ΔpH	Berechnete Differenz zwischen $\text{pH}_{2\text{MI}}$ und $\text{pH}_{1\text{MI}}$
Leitfähigkeitswert 1	$\text{LF}_{1\text{MI}}$ (mS/cm)	Leitfähigkeitswert im M. longissimus (13./14. Rippe) 45 min post mortem
Leitfähigkeitswert 2	$\text{LF}_{2\text{MI}}$ (mS/cm)	Leitfähigkeitswert im M. longissimus (13./14. Rippe) 24 h post mortem
Leitfähigkeitsdifferenz	ΔLF (mS/cm)	Berechnete Differenz zwischen $\text{LF}_{2\text{MI}}$ und $\text{LF}_{1\text{MI}}$
Dripverlust	DV (%)	Prozentualer Anteil an ausgetretener Flüssigkeit aus einem Fleischstück definierter Masse nach Lagerung bei 4° C für 24 h
Farbhelligkeit des Fleisches	L*	Mit dem Gerät Minolta CR 200 (Minolta, Japan) gemessene Farbhelligkeit des M. longissimus (Anschnitt 13./14. Rippe)
	Y	Mit dem Gerät Minolta CR 200 (Minolta, Japan) gemessene Farbhelligkeit des M. longissimus (Anschnitt 13./14. Rippe) als Relativwert zu einer vollständigen Reflexion (Stalder et al. 1998)
Fleischfarbe	Farbe_{MI}	Mit dem Gerät OptoStar (Matthäus, Pöttmes) gemessene Farbe des M. longissimus (Anschnitt 13./14. Rippe)
Marmorierung des M. longissimus	Marmorierung_{MI} (Punkte)	Subjektive Benotung der Fetteinlagerung im M. longissimus (Anschnitt 13./14. Rippe) nach einer Skala von 1 (wenig) – 5 (stark marmoriert)

3.1.8. Statistische Auswertung

3.1.8.1. Analyse der Effekte von Polymorphismen im Promotor des porcinen HSP70.2 – Gens auf phänotypische Merkmale

Die Analyse der Effekte von Polymorphismen im Promotor des pHSP70.2 – Gens auf biochemische und morphologische Parameter des *M. longissimus* sowie auf Leistungsmerkmale in den Versuchen 1 bis 5 erfolgte mit Hilfe des Moduls „Allgemeines Lineares Modell – Haupteffekte - ANOVA“ des Programmpaketes STATISTICA 5.5 (StatSoft Inc. Tulsa, USA). Für die einzelnen Versuche kamen dabei unterschiedliche statistische Modelle zum Einsatz, die in der zum Teil stark differierenden Struktur des zu analysierenden Datenmaterials begründet sind. In den Versuchen 1, 2 und 4 war der Genotyp der Tiere am MHS – Locus als systematischer Effekt auf die Untersuchungsmerkmale vorhanden. Aufgrund des starken Einflusses dieses Locus auf zahlreiche Leistungsmerkmale (Übersicht bei Lengerken et al. 1988) wurden die Ergebnisse auch für diese Genotypen separat dargestellt (Tabellen 4.4, 4.5, 4.7, 4.8 und 4.10). Die LSQ – Mittelwerte wurden mit der Option „Univariate Tests für geplante Vergleiche“ auf signifikante Differenzen untersucht. Im Folgenden sind die verwendeten Modelle aufgeführt.

Versuch 1: (Merkmale der Fleischqualität)

$$y_{ijklm} = \mu + MHS_i + TATA_j + RAS_k + BEH_l + e_{ijklm}$$

mit:

y_{ijklm}	Merkmalwert des Tieres	
μ	Gesamtmittel	
MHS_i	fester Effekt des MHS – Genotyps i	$i = 1 \dots 3$
$TATA_j$	fester Effekt des Genotyps in der TATA – Box j	$j = 1, 2$
RAS_k	fester Effekt der Rasse k	$k = 1 \dots 5$
BEH_l	fester Effekt der Behandlung vor der Schlachtung l	$l = 1 \dots 4$
e_{ijklm}	Restfehler	

Versuch 2: (biochemische und morphologische Kriterien)

$$y_{ijklm} = \mu + MHS_i + TATA_j + GC_k + GK_l + X_{ijklm} + e_{ijklm}$$

mit:

y_{ijklm}	Merkmalwert des Tieres	
μ	Gesamtmittel	
MHS_i	fester Effekt des MHS – Genotyps i	$i = 1 \dots 3$
$TATA_j$	fester Effekt des Genotyps in der TATA – Box j	$j = 1, 2$
GC_k	fester Effekt des Genotyps in der GC – Box k	$k = 1 \dots 3$
GK_l	fester Effekt der genetischen Konstruktion l	$l = 1 \dots 4$
X_{ijklm}	Co – Variable Lebendmasse zur jeweiligen Biopsie	
e_{ijklm}	Restfehler	

3 Material und Methoden

Versuch 2: (Merkmale der Fleischqualität)

$$y_{ijklmn} = \mu + MHS_i + TATA_j + GC_k + GK_l + ST_m + e_{ijklmn}$$

mit:

y_{ijklmn}	Merkmalwert des Tieres	
μ	Gesamtmittel	
MHS_i	fester Effekt des MHS – Genotyps i	$i = 1 \dots 3$
$TATA_j$	fester Effekt des Genotyps in der TATA – Box j	$j = 1, 2$
GC_k	fester Effekt des Genotyps in der GC – Box k	$k = 1 \dots 3$
GK_l	fester Effekt der genetischen Konstruktion l	$l = 1 \dots 4$
ST_m	fester Effekt des Schlachttages m	$m = 1 \dots 4$
e_{ijklmn}	Restfehler	

Versuch 4: (Merkmale der männlichen Fruchtbarkeit)

$$y_{ijklm} = \mu + MHS_i + TATA_j + GC_k + GJ_l + X_{ijklm} + e_{ijklm}$$

mit:

y_{ijklm}	Merkmalwert des Tieres	
μ	Gesamtmittel	
MHS_i	fester Effekt des MHS – Genotyps i	$i = 1, 2$
$TATA_j$	fester Effekt des Genotyps in der TATA – Box j	$j = 1 \dots 3$
GC_k	fester Effekt des Genotyps in der GC – Box k	$k = 1 \dots 3$
GJ_l	fester Effekt des Geburtsjahres (Alter) l	$l = 1 \dots 3$
X_{ijklm}	Co – Variable mittleres Absamungsintervall	
e_{ijklm}	Restfehler	

Versuch 5: (Merkmale der weiblichen Fruchtbarkeit)

$$y_{ijkl} = \mu + TATA_i + GC_j + WNR_k + X_{ijkl} + e_{ijkl}$$

mit:

y_{ijkl}	Merkmalwert des Tieres	
μ	Gesamtmittel	
$TATA_i$	fester Effekt des Genotyps in der TATA – Box i	$i = 1, 2$
GC_j	fester Effekt des Genotyps in der GC – Box j	$j = 1 \dots 3$
WNR_k	fester Effekt der Wurfnummer (Jung-/Altsau) k	$k = 1, 2$
X_{ijkl}	Co – Variable Wurfgröße (nur für durchschnittliches Geburtsgewicht der Ferkel)	
e_{ijkl}	Restfehler	

Versuch 5: (Geburtsgewicht der Ferkel)

$$y_{ijk} = \mu + TATA_i + GC_j + X_{ijk} + e_{ijk}$$

mit:

y_{ijk}	Merkmalwert des Tieres	
μ	Gesamtmittel	
$TATA_i$	fester Effekt des Genotyps in der TATA – Box i	$i = 1, 2$
GC_j	fester Effekt des Genotyps in der GC – Box j	$j = 1 \dots 3$
X_{ijk}	Co – Variable Wurfgröße	
e_{ijk}	Restfehler	

Versuch 5: (Geburtsgewicht der Ferkel in Abhängigkeit vom maternalen/paternalen Allel in der GC - Box)

$$y_{ijkl} = \mu + TATA_i + ALM_j + ALP_k + X_{ijkl} + e_{ijkl}$$

mit:

y_{ijkl}	Merkmalwert des Tieres	
μ	Gesamtmittel	
$TATA_i$	fester Effekt des Genotyps in der TATA – Box i	$i = 1, 2$
ALM_j	fester Effekt des maternalen Allels in der GC – Box j	$j = 1, 2$
ALP_k	fester Effekt des paternalen Allels in der GC – Box k	$k = 1, 2$
X_{ijkl}	Co – Variable Wurfgröße	
e_{ijkl}	Restfehler	

Im Versuch 6 (Berlin – Bonner Ressourcepopulation) wurden die Analysen der Effekte der TATA – Box – Genotypen auf die untersuchten Merkmale von Herrn PD Dr. agr. habil. Hardge mit dem Programmpaket SAS (General Linear Model) vorgenommen. Die Details zu den dabei verwendeten Modellen sind bei Hardge (1999) dokumentiert.

3.1.8.2 Vergleich von Allelfrequenzen

Der Vergleich von Allelfrequenzen in den Genotypen des pHSP70.2 – Gen – Promotors wurde in 2 x 2 – Kreuztabellen vorgenommen. Dazu wurde das Modul „Nichtparametrische Verfahren/Verteilungen“ des Programmpaketes STATISTICA 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) verwendet. Signifikanzen für Unterschiede in den Allelfrequenzen wurden mit dem Chi – Squares Test in diesem Modul berechnet.

Weitere statistische Verfahren, die im Zusammenhang mit der chromosomalen Zuordnung von Genfragmenten zur Anwendung gebracht wurden, sind in den entsprechenden Abschnitten erläutert.

3 Material und Methoden

3.2 Identifizierung potentieller Kandidatengene für das Ausgrätschsyndrom beim neugeborenen Ferkel

3.2.1 Tiere und Probenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die eigenen Untersuchungen dienten Proben aus dem Musculus biceps femoris von jeweils 2 Vollgeschwisterpaaren (männlich, weiblich) der Deutschen Landrasse, die

- beide klinisch gesund waren und unter deren Wurfgeschwistern keine Spreizer auftraten (Kontrollproben), beziehungsweise
- beide stark vom Ausgrätschsyndrom betroffen waren und unter deren Wurfgeschwistern weitere Spreizer auftraten (Versuchsproben).

Alle Tiere wurden zeitgleich geboren und wiesen Geburtsgewichte zwischen 950 und 1.450 g auf. Die Probenentnahme erfolgte im Zeitraum von weniger als 1 Stunde post mortem mittels steriler chirurgischer Instrumente. Die Proben wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme in geeigneten Gefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -196°C gelagert.

3.2.2 Isolierung von Gesamt - RNA aus Muskelproben

Zur Isolierung der Gesamt - RNA aus den Muskelproben wurden zunächst Systeme von zwei Anbietern verwendet, die nach Herstellerangaben ausdrücklich für die RNA-Gewinnung aus Problemgeweben, zu denen Skelettmuskulatur aufgrund ihrer faserigen Struktur gehört, geeignet sind (ToTALLY RNA Kit, Ambion, Austin, USA; QIAGEN RNA/DNA System, QIAGEN, Hilden). In beiden Fällen wurde exakt nach den Vorschriften der Hersteller vorgegangen. Eine Qualitätskontrolle der Präparationen erfolgte einerseits durch Messung der Extinktion eines Aliquots (1 : 50 in Aqua bidest) bei 260 und 280 nm Wellenlänge sowie durch visuelle Beurteilung der Proben auf einem Agarosegel. Die beiden verwendeten Präparationsmethoden erbrachten keine, für die nachfolgenden Anwendungen (Reverse Transkription) 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 tiefkalten Muskelproben wurden unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert. Jeweils 500 mg dieses Pulvers wurden in sterile 50 ml Gefäße überführt und 7,5 ml Homogenisationspuffer (Anhang) hinzugegeben. Nach einer erneuten Homogenisation (Ultraturrax, Baudelin, Berlin) erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei $2.300 \times g$. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. In ein mit Homogenisationspuffer gespültes Gefäß wurden 3,5 ml CsCl (Merck, Darmstadt) gegeben und vorsichtig mit dem Überstand aus dem vorherigen Schritt überschichtet, ohne dass eine Durchmischung stattfindet. Die nachfolgende Ultrazentrifugation fand bei 20°C und $450.000 \times g$ für ca. 16

Stunden statt. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellett in ein frisches 50 ml Gefäß überführt und anschließend in 1 ml DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Nach Zusatz von einem Volumenanteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI; 25 : 24 : 1; Roth, Karlsruhe) und gründlicher Durchmischung folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (1.500 x g, 5 min). Der in ein neues Gefäß überführte Überstand wird mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat und 2,5% absolutem Alkohol versetzt. Nach Durchmischung wird die in der Lösung enthaltene RNA bei -20°C über 2 Stunden ausgefällt. Anschließend an einen weiteren Zentrifugationsschritt (3.200 x g, für 5 min), wird das Pellett mit 70%-igem Alkohol gewaschen und getrocknet. Die RNA wird letztendlich in 100 μl RNAse – freiem Wasser aufgenommen. Die mit dieser Präparation erreichte Qualität gewährleistete eine erfolgreiche Verwendung der Gesamt - RNA in den nachfolgenden Anwendungen (Abbildung 3.3).

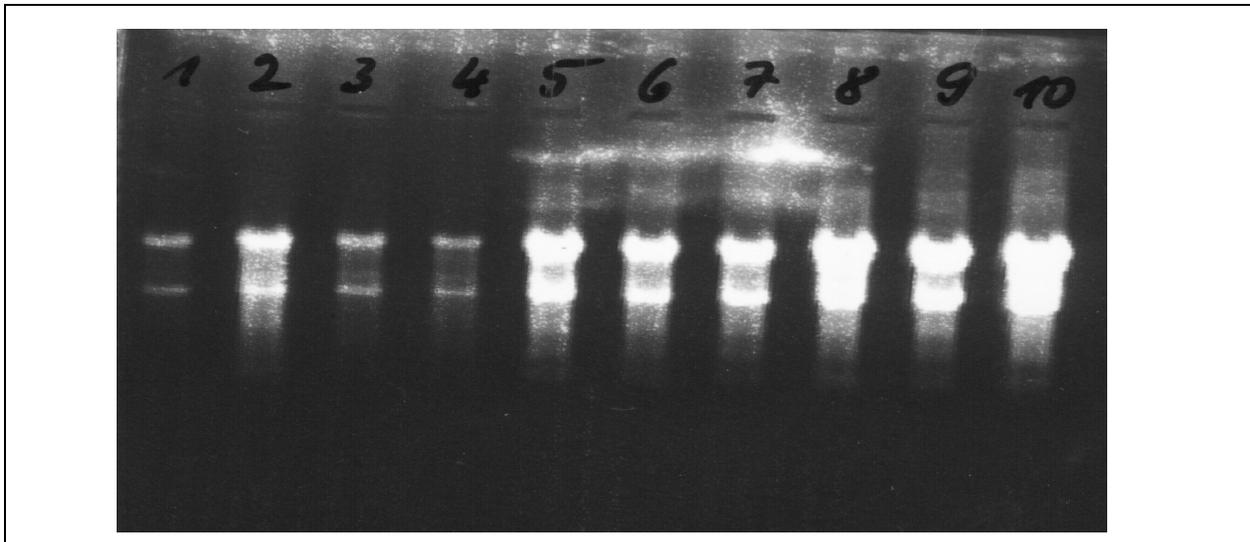


Abbildung 3.3: Gesamt – RNA aus Skelettmuskulatur (Präparation durch CsCl – Gradientenzentrifugation). Die Konzentration der dargestellten Präparationen variiert zwischen 422 ng/ μl (Spur 1) und 3.628 ng/ μl (Spur 10).

Zur Vermeidung einer Kontamination der Proben mit genomischer DNA wurden die Präparationen einem Verdau mit ca. 30 U DNase I (RNAse frei; Roche, Mannheim) bei 37°C für 1 h unterzogen. Die RNA wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3 Reverse Transkription

Für die Erstellung von cDNA aus den RNA-Präparationen wurde ein kommerziell verfügbares Primersystem (GenExScreen Kit; Biometra, Göttingen) verwendet. Dieses beinhaltet für die Erststrang - Synthese einen Satz von 12 sogenannten Downstream-Primern (D1 – D12), die die Generierung der cDNA 3'-Enden aus sämtlichen, in der RNA-Präparation vorhandenen mRNAs ermöglicht. Die Primer bestehen aus einem 11 Basen

3 Material und Methoden

langen Thymidin - Strang, der die komplementäre Anlagerung an den Poly(A) - Strang im 3'-Bereich von mRNAs gewährleistet. Im Anschluss an diesen T₁₁-Strang sind jeweils 2 weitere Basen in allen möglichen Kombinationen vorhanden (AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA, GC, GG, GT). Wegen des Poly(T) - Stranges kann auf Kombinationen beginnend mit „T“ verzichtet werden. Mit diesen 12 Primern wurden in getrennten Ansätzen 12 cDNA-Pools je Proband erzeugt. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils:

- 200 ng Gesamt-RNA
- 5 µM der jeweiligen Primer D1 – D12
- jeweils 250 µM der dNTPs
- 10 mM Dithiothreitol (DTT)
- 5 U RNase Inhibitor
- 1x cDNA Synthesepuffer
- 50 U Expand Reverse Transkriptase

in einem Gesamtvolumen von 20µl. Alle Reaktionskomponenten (außer Primer und RNA) wurden von Roche (Mannheim) bezogen. Die Reaktionsansätze wurden für

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

inkubiert. Die resultierenden einzelsträngigen cDNA - Pools wurden bis zur weiteren Analyse bei –80° C gelagert.

3.2.4 Zweitstrang - Synthese mit „arbitrary“ Primern

Zur Zweitstrang - Synthese kamen 26 „Zufalls“-Primer zum Einsatz. Diese Primer sind Bestandteil des verwendeten Kits (GenExScreen Kit, Biometra, Göttingen) und werden als Upstream - Primer U1 – U26 bezeichnet. Deren Basensequenz beruht auf Berechnungen von Bauer et al. (1993) und ermöglicht statistisch die Amplifikation sämtlicher, zum Untersuchungszeitpunkt im entsprechenden Gewebe exprimierter ca. 15.000 Gene. Informationen zur Sequenz der Upstream - Primer werden vom Hersteller nicht bereitgestellt und sind nur im hier beschriebenen Umfang bekannt. Aus Kapazitätsgründen – eine vollständige Analyse für vier Tiere in einem Gewebe führt zur Erstellung von 1248 (4 x 12 x 26) Fragmentgemischen – wurden zufällig eine begrenzte Anzahl von U-Primern für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem ExpandLongTemplate PCR System (Roche, Mannheim). Jeweils

- 1,0 µl cDNA (Pools D1 bis D12)
- 2,0 µl Primer (D1 bis D12)
- 2,0 µl Primer (U1 bis U26)
- je 0,5 µl der dNTPs

- 2,0 µl 10 x Expand Puffer 3
- 0,3 µl Enzym - Gemisch

wurden dazu mit DEPC – behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht und unter folgenden Bedingungen inkubiert:

- 120 s bei 94° C

danach für 39 Zyklen:

- 30 s bei 94° C
- 60 s bei 40° C
- 60 s bei 68° C

sowie abschließend für

- 30 s bei 94° C
- 60 s bei 40° C
- 300 s bei 68° C.

Bis zur elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proben bei 4° C gelagert.

3.2.5 Elektrophoretische Trennung und Visualisierung der Fragmentgemische

Die Auftrennung der erzeugten cDNA - Gemische wurde jeweils parallel für 4 Probanden mit identischer Primerkombination vorgenommen. Die nativen Proben wurden mit 5,0 µl Stopplösung versetzt und auf ein 4%-iges, nicht denaturierendes Polyacrylamid - Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Macrophor - System (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) bei 20° C und 60 W für ca. 90 min.

Die Sichtbarmachung der Banden im PAA - Gel erfolgte mittels Silberfärbung (Chemikalien von Roth, Karlsruhe; NaBH₄ von Fluka, Deisenhofen):

Fixierung	6 min (10% Ethanol; 0,5% Essigsäure)
Färben	14 min (1g AgNO ₃ je Liter Aqua bidest)
Entwickeln	bis zum Sichtbarwerden erster Banden (14g NaOH, 0,01 g NaBH ₄ , 4 ml HCHO je Liter Aqua bidest).

Zwischen den Schritten wurde das Gel jeweils mit Aqua bidest gespült. Der Entwicklungsprozess wurde unmittelbar mit dem Sichtbarwerden erster Banden abgebrochen, da die Gele erfahrungsgemäß stark nachdunkeln. Mit diesem Verfahren wurde eine minimale Hintergrundfärbung des Gels erreicht. Das entwickelte Gel wurde ca. 20 min unter Vakuum getrocknet und mit einem transparenten Film (Saran - Wrap; Roth, Karlsruhe) blasenfrei abgedeckt. Teilweise wurden die so behandelten Gele eingescannt und als Datei im JPEG – Format abgespeichert. Die Originalgele wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einer Plastikfolie verschweißt und bei –80° C gelagert.

3 Material und Methoden

3.2.6 Präparation von Banden aus den Gelen

Für die Gele wurden folgende Kriterien als Voraussetzung für eine weitere Analyse angesetzt:

- Auftreten von eindeutig abgegrenzten Banden bei geringer Hintergrundfärbung,
- Vorhandensein von Amplifikaten über den scheinbaren Größenbereich von etwa 100 bis > 1.000 bp,
- Vorhandensein mindestens einer gleichmäßig starken Bande über alle analysierten Proben innerhalb des o.g. Größenbereiches.

Während die ersten zwei Punkte die Bestätigung einer erfolgreichen Amplifikation darstellen, ist der dritte Punkt für den weitgehenden Ausschluß von PCR - Artefakten (ungleichmäßige Amplifikationseffektivität in verschiedenen Ansätzen) sowie von Artefakten aus der Elektrophorese (inhomogene Gele, Differenzen in der aufgetragenen Probenmenge) von Bedeutung. Aus Gelen, die diesen Ansprüchen genügten, wurden die Banden gewählt, die wiederum folgenden Anforderungen genügten:

1. Bande sichtbar nur bei einer untersuchten Kategorie (Kontrolle oder Spreizer) bzw. visuell deutlicher Unterschied in der Bandenstärke.

Aufgrund der relativ hohen Anzahl von Banden mit dieser Eigenschaft wurde weitgehend darauf verzichtet, Banden unterschiedlicher optischer Stärke in die Untersuchungen einzubeziehen. Jedoch konnte in Kontrolluntersuchungen (Amplifikation mit dem "leeren" Gelstück des Vergleichstieres als Template) gezeigt werden, dass in einigen Fällen das gleiche PCR - Produkt wie aus der eigentlichen Bande erzeugt werden kann. Dies ist ein Zeichen dafür, dass auch in diesem Falle lediglich Unterschiede in der Expressionsstärke des Gens vorliegen. Die "Unsichtbarkeit" der Bande beim Vergleichstier ist deswegen eher auf die relativ geringe Sensitivität der verwendeten Silberfärbung zurückzuführen.

2. Scharf abgegrenzte Einzelbande.

Aufgrund der relativ geringen Spezifität der verwendeten Primer ist zu erwarten, dass Banden aus mehreren Fragmenten gleicher oder ähnlicher Länge zusammengesetzt sind. Daraus resultiert ein erhöhter Aufwand für die nachfolgenden Analysen. Mit diesem Kriterium sollte der Aufwand für Klonierung und Sequenzierung minimiert werden, indem die Erfassung mehrerer unterschiedlicher Banden annähernd gleicher Größe weitgehend vermieden wird.

3. Scheinbare Größe des Fragments im Bereich von 200 – 1.000 bp .

Dieser Größenbereich ist für die Klonierung und Sequenzierung mit den verwendeten Systemen gut geeignet.

Entsprechende Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 50 µl Aqua tridest überführt. Nach mehreren Versuchen zur Eluierung der DNA (verschiedene Zerkleinerungsmethoden, verschiedene Temperaturen)

erwies sich eine Erhitzung der Probe auf 94° C für 15 Minuten und anschließender rascher Abkühlung auf 4° C ohne vorherige Zerkleinerung des Gelstückes als am besten geeignet. Die Eluate wurden bei –80° C gelagert.

3.2.7 Reamplifizierung von Banden zur weiteren Analyse

Aus den Eluaten wurden jeweils 5 µl ohne weitere Behandlung als Ausgangsmaterial in die nachfolgende PCR eingesetzt. Für die PCR wurde das ExpandLongTemplate PCR - System (Roche, Mannheim) angewandt. Als Primer kamen jeweils die gleichen zum Einsatz, die in der Zweitstrang - Synthese des entsprechenden Fragmentgemisches, aus dem die zu amplifizierende Bande stammt, verwendet wurden. Die PCR-Ansätze enthielten in einem Volumen von 50 µl jeweils:

- 5,0 µl eluierter DNA unbekannter Konzentration
- je 2,0 µl der entsprechenden D und U Primer
- je 1,25 µl der dNTPs
- 5,0 µl 10 x Expand Puffer
- 0,75 µl Enzym.

Die Amplifikationsbedingungen entsprachen exakt denen bei der Erzeugung der cDNAs (2 min bei 94° C; 39 Zyklen mit 30 sec bei 94° C, 30 sec bei 40° C, 60 sec bei 68° C, Abschluss mit 300 sec bei 68° C). Bei unzureichender Amplifikation (keine distinkte Bande) wurden in einigen Fällen 2 µl des PCR-Produktes in eine zweite, identische PCR als Template eingesetzt

3.2.8 Klonierung und Sequenzierung der Fragmente

Das hier verwendete Verfahren enthält die Schritte:

- Ligation der Fragmente in das Vektorsystem pGEM – T
- Transformation kompetenter Zellen und deren Vermehrung
- Isolierung von Plasmid – DNA
- Sequenzierung mit dem AutoRead Sequencing Kit
- Dateneditierung

Alle Schritte dieses Verfahrens sind detailliert im Abschnitt 3.1.5 (Klonierung und Sequenzierung von PCR – Produkten) beschrieben. Die in den Primärdaten enthaltenen Plasmidsequenzen, die das Insert einschließen, wurden manuell identifiziert und entfernt. Daten aus verschiedenen Klonen desselben Fragments wurden mit Hilfe des Software-Paketes DNASIS V2.1 (Hitachi Software Engineering, 1995) abgeglichen und somit eine Konsensequenz für das Fragment generiert. Ergaben mehrere Klone eines Fragments verschiedene Sequenzen, wurden diese separat gespeichert und schieden vorläufig aus den weiteren Analysen aus.

3 Material und Methoden

3.2.9 Analyse der isolierten Fragmente auf Homologie zu DNA-Sequenzen im Datenbanksystem GenBank/EMBL

Die Konsenssequenzen für alle isolierten Fragmente wurden mit der Software BLAST (Altschul et al. 1997) auf Homologie zu Sequenzen in der DNA-Datenbank GenBank/EMBL getestet. Dieser Prozess erfolgte interaktiv (URL 10) und wurde für jedes Fragment separat in den Teildatenbanken „nr“ (alle Sequenzen in den Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, jedoch ohne EST, STS, GSS sowie Phase 0, 1 oder 2 HTGS Sequenzen), „dbest“ (EST-Sequenzen) sowie „htgs“ (High Throughput Genomic Sequences: Phase 0, 1 and 2) durchgeführt. Mit dieser Datenbankauswahl ist gewährleistet, dass die eigenen Sequenzen gegen nahezu den gesamten elektronisch verfügbaren Datenbestand verglichen werden können. Die Teildatenbank „htgs“ enthält große Fragmente aus humanen Sequenzierungsprojekten. Obwohl hier ausschließlich genomische Sequenzen gespeichert werden, ist ein Vergleich mit den eigenen cDNA-Sequenzen sinnvoll, da sich in einigen Fällen aus den Ergebnissen Erkenntnisse zur Struktur der Gene (Exon – Intron – Aufbau) ableiten lassen. Als Mindestkriterien für das Vorliegen von Homologie wurden in Anlehnung an Davoli et al. (1999) folgende Werte angenommen:

- BLASTNE $< 1^{-10}$ (Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit)
- Überlappung von > 70 bp zwischen untersuchter und Datenbanksequenz
- Homologie im überlappenden Teil von $> 75\%$.

Die im Zuge der Analysen isolierten porcinen cDNA - Sequenzen wurden interaktiv (Software WEBIN; URL 12) in das Datenbanksystem EMBL eingestellt. Nach einer Qualitätskontrolle wird den übermittelten Sequenzen eine Ordnungsnummer zugeteilt (Accession No.), die im weiteren für die entsprechenden Fragmente verwendet wird.

3.2.10 Ermittlung der Struktur des porcinen CDKN3 - Gens

3.2.10.1 Primerableitung für die Ermittlung der cDNA - Sequenz

Ein aus der Primerkombination D8U17 isoliertes porcines cDNA - Fragment wies eine 86%ige Homologie zur 3'-UTR des humanen CDKN3 - Gens (cyclin - dependent kinase inhibitor 3) auf. Diese Sequenz (GenBank Accession No. L27711) enthält die vollständige kodierende Sequenz sowie Teile der 5'- und 3'- nicht translatierten Regionen (UTR). Auf Basis des isolierten porcinen Fragmentes und der humane Sequenz wurden Primerpaare abgeleitet, von denen jeweils einer in der porcinen Sequenz verankert war und der zweite Primer auf der humanen Sequenz beruhte (heterologer Primer). In Tabelle 3.9 sind die Primerpaare aufgelistet, die zur Ermittlung der cDNA - Sequenz des CDKN3 - Gens beim Schwein beitrugen.

Tabelle 3.9: Primersequenzen zur Amplifizierung der cDNA des porcinen CDKN3 - Gens.

Name	Primer forward (5'- 3') reverse (5'- 3')	Position ¹	T _a (° C) Produkt (bp)
KAP1U KAP1R	GCCCAGTTCAATACAAACAAG CATTTACATTTGATTTGATAATGCT	nt 60 (human) nt 771 (porcin)	52 - 67 736
KAP2U KAP2R	GAAGAGCCTATTGAAGATGAAC TGATTGTGAATCTCTTGATGA	nt 100 (human) nt 652 (porcin)	52 - 65 573
KAP3U KAP3R	ATAGACAGCCTGCGAGACC TTGCCAATAAAAGCTTTAGGAA	nt 553 (human) nt 810 (porcin)	50 – 69 279
GESAMTF ² GESAMTR ²	GTGAGACTGCCAGCGATGAAG TTGATGATAGATGTGCAGCTAATTT	nt 1 (porcin) nt 598 (porcin)	53-72 622

¹ Position des 5' - Primerendes in der humanen Sequenz L27711; porcin: selbst ermittelte Sequenz des porcinen Gens als Grundlage für die Primerableitung.

² Diese Primer amplifizieren die vollständige kodierende Sequenz beim Schwein und wurden zur Untersuchung von Spleißvarianten des Gens verwendet

3.2.10.2 Charakterisierung der Amplifikate und Erstellung einer cDNA – Konsenssequenz

Amplifikate wurden aus ca. 100 ng cDNA (Primerkombination D8U17) von jeweils zwei Probanden mit den jeweiligen Primern (2 µM) und einem PCR-Bead (ReadyToGo, AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) in einem Endvolumen von 25 µl erzeugt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den unter Abschnitt 3.2.7 beschriebenen. Die Amplifikate wurden entweder aus einem 3%-igen Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mittels dem QIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) exakt nach Herstellervorschrift eluiert. Bei Vorliegen eines hochspezifischen Produktes (keinerlei sichtbare Ko - Amplifikate) erfolgte die Aufreinigung durch Zentrifugation des gesamten PCR-Ansatzes mit MicroSpin S300 – Zentrifugationskartuschen (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg). Diese Abtrennung von überschüssigen Primern und deren Dimeren wurde ebenfalls exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Ligation der so erhaltenen, gereinigten Fragmente in die EcoRV – Klonierungsstelle des Vektors pGEM-T (Promega, Madison, USA) sowie alle nachfolgenden Schritte bis zur Sequenzierung der Amplifikate entsprechen exakt den Verfahren, die in Abschnitt 3.1.5 beschrieben sind. Aus überlappenden Sequenzen wurde eine Konsenssequenz für die porcine CDKN3 - cDNA ermittelt und nach Vorliegen der vollständigen kodierenden Sequenz unter der Accession No. AJ404882 in das Datenbanksystem EMBL/GenBank eingestellt.

3 Material und Methoden

3.2.10.3 Analyse der genomischen Sequenz

Die Homologiesuche in der EMBL/GenBank-Abteilung „htgs“ (high throughput genomic sequences) ergab eine Übereinstimmung der porcinen CDKN3 - cDNA - Sequenz mit Abschnitten einer genomischen Sequenz des humanen Chromosoms 14 (NM_010084) im Bereich von 82 – 98%. Aus der Verteilung der humanen und porcinen cDNA - Sequenzen über einen Bereich von 20 kb der genomischen Sequenz konnten Rückschlüsse auf die Exon – Intron – Struktur des humanen Gens gezogen werden und auf das porcine Gen übertragen werden. Entsprechend wurden Primer entwickelt, die jeweils in zwei vermutlich benachbarten Exons lokalisiert sind und ein potentielles Intron überspannen (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Primersequenzen zur Ermittlung der genomischen Sequenz des porcinen CDKN3-Gens.

Name	Primer forward 5' – 3' reverse 5' – 3'	T _a (° C)	Amplifikat
GESAMTF ¹	GTGAGACTGCCAGCGATGAAG	53 - 72	24bp Exon1 – Intron1 –
IN1R	CAGGGATCAGAAATGTCCACATA		110bp Exon2
IN2F	TCAGATGAAGAGCCTATTGAA	50 - 66	50bp Exon2 – Intron2 –
IN2R	GAAGAGCACATAAACCAAGAA		53bp Exon3
IN3F	ATTCTCAGTTTCTTGGTTTA	51 - 60	33bp Exon3 – Intron3 –
IN3R	TTGGATATTTCTTCTAACATC		35bp Exon4
IN4F	GAAATATCCAAAAAGATACAG	49 - 60	24bp Exon4 – Intron4 –
IN4R	CTGGTGCAGAAAACAAATAC		49bp Exon5
IN5F	ACCAGAGGGGAACTGTCA	53 – 67	74bp Exon5 – Intron5 –
IN5R	TCCCAAGTCCTCCGTAAC		20bp Exon6
IN6F	GTTACGGAGGACTTGGGAGAT	54 – 70	30bp Exon6 – Intron6 –
IN6R	ACACGGAACAGCAGTGG		114bp Exon7 + 422bp Intron7
KAP3U	ATAGACAGCCTGCGAGACC	54 – 70	51bp Exon7 – Intron7 –
KAP3L	TTGCCAATAAAAAGCTTTAGGAA		238bp Exon8
IN4IF ²	GTTCTTTCCTGGTCATCCTA	50 – 64	Rest Intron4
IN4IR	GCTGGTTTTTGTTCATCCTA		
IN2IF ²	TGGAGGGGAGTGGTAGGAG	53 – 72	Rest Intron2
IN2IR	GAGATGTAGGTCGCAGAGCAG		
IN1IF ²	CCTGGGGAAGCAGAAAC	53 – 68	Rest Intron1
IN1IR	TGCGAAGACCCATAAAGTAAG		
IN6F ²	GTTACGGAGGACTTGGGAGAT	55 – 70	Rest Intron6
IN6R2	CGCAATCCATCACCAGTT		

¹: Basen 1 – 15 sind zufällig ausgewählt, Basen 16 – 22 entsprechen der porcinen CDKN3 cDNA-Sequenz

²: diese Primer wurden auf der Basis der bis dahin sequenzierten jeweiligen Intron-Sequenzen abgeleitet und dienten zur Schließung von Lücken aus der ersten Intron-Sequenzierung

Die Amplifizierung erfolgte in Ansätzen sowie unter Zyklusbedingungen, die identisch zu den in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen waren. Als Annealing - Temperatur wurde jeweils die niedrigste aus der in Tabelle 3.10 angegebenen Spanne ausgewählt und bei Bedarf (Vorhandensein unspezifischer Produkte) in 2° C – Schritten bis zum Vorliegen eines spezifischen Produktes erhöht. DNA von jeweils einem gesunden Probanden und einem Spreizer wurden für die Amplifizierung eingesetzt und beide PCR – Produkte separat analysiert. Die Aufbereitungsprozedur für die Klonierung der Produkte sowie deren Sequenzierung ist im Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Die erhaltenen DNA - Sequenzen wurden auf Übereinstimmung der entsprechenden 5'- und 3'- Enden mit den jeweiligen cDNA - Sequenzen überprüft. Weiterhin wurden die Exon – Intron - Übergänge lokalisiert. Wegen der scheinbaren Länge der Fragmente von oft mehr als 2.000 bp wurde auf eine vollständige Sequenzierung der Introns im Labor des Institutes verzichtet. Bei nachgewiesener Spezifität der PCR - Produkte (siehe oben) wurde die Vervollständigung der Sequenzierung als Dienstleistung an einen kommerziellen Anbieter (SeqLab GmbH, Göttingen) vergeben. Dazu wurde präparierte Plasmid - DNA mit dem jeweils zu analysierenden Fragment in einer Konzentration von 500 ng/µl versandt. Die Übermittlung der Rohdaten aus diesen Sequenzierungen erfolgte elektronisch. Die genomischen Sequenzen des porcinen CDKN3-Gens wurden nach Erstellung einer Konsenssequenz unter den Accession Ns. AJ404883 (Exons 1 – 6, partiell Intron 6) sowie AJ404884 (partiell Intron 6, Exon 7 – Exon 8) in die EMBL/GenBank Datenbank eingestellt.

3.2.11 Physische Kartierung von porcinen ESTs mittels Analyse von somatischen Zellhybriden

Die chromosomale Zuordnung der Fragmente erfolgte als physische Kartierung. Dazu wurde ein von Yerle et al. (1996) entwickeltes somatisches Schwein - Nager - Zellhybrid – Panel (*pig - rodent somatic cell hybrid panel*, SCHP) verwendet. In diesem Panel sind definierte porcine Chromosomenabschnitte in das Genom von Hamster und Maus eingeordnet worden. Durch die von den Autoren vorgenommene Charakterisierung der insgesamt 26 Klone ist die Zuordnung von porcinen Amplifikaten zu Chromosomen und deren Abschnitten beim Schwein möglich. Nachstehend sind die Schritte in diesem Verfahren beschrieben.

3.2.11.1 Primerableitung und Optimierung der PCR-Reaktionen

Die PCR-Primer für die chromosomale Zuordnung (Mapping) ausgewählter Fragmente wurden mit Hilfe der Software OLIGO 5.0 (MedProbe Oslo, Norwegen, 1995) abgeleitet. Da das Mapping an genomischer DNA erfolgt, wurde bei der Primerableitung auf möglichst kurze Abstände (ca. 100 bp) der Primer innerhalb der cDNA - Sequenzen geachtet. Damit sollte die Wahrscheinlichkeit vermindert werden, dass sich zwischen den Primern auf der

3 Material und Methoden

Ebene der genomischen DNA mehrere Introns unbekannter Länge befinden und ein aufgrund seiner Größe schwer zu amplifizierendes Template bilden. Für die zu kartierenden Fragmente kamen die in Tabelle 3.11 aufgelisteten Primer zum Einsatz. In einem ersten Test der Primer wurden jeweils in getrennten Ansätzen 100 ng genomischer DNA vom Schwein sowie je 20 ng genomischer Hamster- bzw. Maus - DNA mit den Primern bei der jeweils optimalen Annealing - Temperatur amplifiziert.

In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden dabei die entsprechende DNA - Menge sowie je 2 µM der jeweiligen forward und reverse Primer mit einem PCR - Bead (ReadyToGo, AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) unter folgenden Bedingungen inkubiert:

- 4 min bei 94° C und nachfolgend 35 Zyklen mit
- 1 min bei 94° C
- 1 min bei T_a (Tabelle 3.11)
- 2 min bei 70° C
- abschließend 5 min bei 70° C.

Aliquots der Reaktionsansätze (5 µl) wurden auf einem 3%-igen Agarosegel unter UV - Licht analysiert. Eine für manche Fragmente erforderliche Optimierung der Reaktion umfasste eine graduelle Erhöhung (Verbesserung der Spezifität der Amplifikation) bzw. Senkung (Erhöhung des Ertrages der PCR bei ausreichender Spezifität) der Annealing - Temperatur in 2° C - Schritten, ausgehend von der kalkulierten optimalen Annealing - Temperatur für das entsprechende Primerpaar. Für 13 der getesteten 16 Primerpaare konnte – zum Teil nach Optimierung der Reaktionsbedingungen – eine erfolgreiche Amplifizierung erreicht werden.

Dabei treten folgende Varianten auf:

A) Das PCR - Produkt entspricht in seiner Größe dem erwarteten Fragment aus der Amplifizierung aus cDNA. In diesem Falle befinden sich beide Primer innerhalb eines Exons des untersuchten Gens.

B) Das PCR - Produkt ist deutlich größer als das auf Grundlage der Primerposition zu erwartende Amplifikat. Mit hoher Wahrscheinlichkeit befinden sich hier ein oder mehrere Introns unbekannter Länge zwischen den ausgewählten Primern.

Weiterhin ist für beide Fälle möglich, dass neben dem spezifischen porcinen Produkt keine Amplifikate im gleichen Größenbereich aus Maus- bzw. Hamster - DNA entstehen. Somit ist eine eindeutige chromosomale Zuordnung des porcinen Gens möglich.

Tabelle 3.11: Primersequenzen und Annealing - Temperaturen für die chromosomale Zuordnung von porcinen cDNAs mittels Analyse von somatischen Zellhybriden.

Accession No. (GenBank/EMBL)	Primer forward (5'- 3') reverse (5'- 3')	T _a (° C)	Amplifizierbarkeit/ Differenzierbarkeit ¹
AJ404882	ATTCTCAGTTTCTTGGTTTA TTGGATATTTCTTCTAACATC	60	+ / +
AJ278444	GGGCAGAAGAGGAGAGGAG GCTTTATTTGTCCACGTCCAC	64	+ / +
AJ277993	AGCAAGCAAGCGTATTGTAA GAAAGGCTTTTGAGTGTGG	60	+ / +
AJ404881	CATCCCACAGTAGTCCTTCA GGTTGCCCATTTCCATTTTCTT	64	+ / +
AJ133887	TGAGAAAAGCCCAGAGGAT CTGAAGATTTTGGTTGGTGAC	60	+ / +
AJ133889	GCGAGCAGGAAGAAGACA TTGGGCTTAGTGATTTTTGAG	60	+ / +
AJ133890	CCCCTGAGATTGGCCTGCTA TCAGCTTCCCCTCGTGTGAAT	68	+ / +
AJ133891	G TTCAGGGAGTGCTTTGGAGA GGGTTTGGGGCTCTTGACT	64	+ / +
AJ279587	GGAAAAGATGTGTAAATGAA TAATAGTCCATCAAGCAGATA	60	+ / +
AJ279590	AAACTTATCTTCCCCAAATAC GAGAACTAATTCCCTGAGTG	58	+ / +
AJ279589	AAAAGTAGTTATCTGCACACA TGGCTTTCCCTTCATT	56	+ / +
AJ279582	TGTCCTGTGATGCTGGTGGTA TGAAGGCCTCGGTCAAGTTTG	70	+ / +
AJ279591	CCGTCCCACAAGCAAAAT AGTTTAGATACGCTCCTTGTT	60	+ / +
AJ133888	GAACCCACTTCAAGAATCAGA GCTGCCTCCTTTGTTGTT	60	- / -
AJ279581	AGTCAGTGTTTTCCAGCAACG GGAATGGATTACAGGGTGT	63	+ / -
AJ279583	CCGATCCATCTTTGACC TGAATAAATGACTCCGAAGTG	55	+ / -

¹ erfolgreiche Amplifizierung: spezifisches und von Hamster und Maus differenzierbares porcines Produkt

3.2.11.2 Amplifizierung porciner Fragmente aus DNA des somatischen Zellhybridpanels

Nach der unter dem vorangegangenen Punkt beschriebenen erfolgreichen Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde das jeweils zuzuordnende Fragment im vollständigen Somatischen Schwein – Nager - Zellhybridpanel amplifiziert. Dabei bestehen die Klone mit den Ordnungsnummern 1 – 19 aus Hybrid - DNA von Schwein und Hamster, wogegen die Klone 20 – 26 porcine Chromosomenfragmente auf dem Hintergrund von Maus - DNA

3 Material und Methoden

enthalten. Die Verteilung der porcinen Chromosomenfragmente über die Hybrid – Panel - Klon ist in URL 4 dargestellt. Zur Amplifizierung jedes der isolierten Fragmente wurden in 26 getrennten Ansätzen jeweils 20 ng Hybrid - DNA mit 2 μ M der entsprechenden Primerpaare (Tabelle 3.11) und einem PCR - Bead (ReadyToGo, AmershamPharmacia Biotech, Freiburg) in einem Endvolumen von 25 μ l unter den im Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Reaktionsbedingungen inkubiert. Als Kontrollen wurden 2 Ansätze mit je 100 ng porciner genomischer DNA sowie je ein Ansatz mit 20 ng Hamster- bzw. Maus - DNA mitgeführt. Die Amplifikate wurden auf 3%-igen Agarosegelen analysiert.

3.2.11.3 Kontrolle der Authentizität der Fragmente

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den porcinen Amplifikaten tatsächlich um Fragmente des zuzuordnenden Gens handelt, wurde je Fragment eine Kontrollsequenzierung durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel (3.2.11.2) ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Die Arbeitsschritte dazu sind detailliert im Abschnitt 3.1.5 dargelegt.

3.2.11.4 Analyse der Ergebnisse

Anhand der Agarosegele wurde eine Bewertung der Amplifikation im SChP für jedes Fragment vorgenommen. Ein Klon wurde mit „+“ bewertet, wenn ein eindeutiges PCR-Produkt vorlag, das in der Größe dem aus der Kontrollreaktion mit porciner genomischer DNA entsprach und eine klare Differenzierung zu eventuell co - amplifizierten Maus- bzw. Hamster - PCR-Produkten möglich war. Ein negatives Resultat („-“) lag vor, wenn kein porcines Produkt im Erwartungsbereich entstanden war. Diese Ergebnisse wurden für jeden Klon in ein entsprechendes Eingabefenster einer von Chevalet et al. (1997) entwickelten, interaktiven Analysesoftware (URL 4) eingegeben. Als Resultat werden eine Irrtumswahrscheinlichkeit für das Kartierungsergebnis sowie die Wahrscheinlichkeiten für eine Zuordnung des untersuchten Fragments zu einem bestimmten Chromosom und für dessen subchromosomale Lokalisation ausgegeben. Prinzipiell wird eine Analyse nur für Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ durchgeführt. Im Falle diskordanter Ergebnisse für einzelne Klone wurde die Amplifizierung für diese unter Einbeziehung von Kontrollproben wiederholt. Ergebnisse, die statistisch abgesichert waren, wurden interaktiv zur Aufnahme in die entsprechende Datenbank übermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Das HSP70.2 – Gen – ein funktionelles Kandidatengen für Stressempfindlichkeit und stressbeeinflussbare Leistungsmerkmale beim Schwein?

Ausgehend von den in der Literatur dokumentierten Ergebnissen zur Funktion der HSP70 in der zellulären Stressreaktion und der auch für das Schwein beschriebenen DNA – Sequenzvariationen erfolgte eine Untersuchung des Gens im Sinne eines funktionellen Kandidaten für Leistungseigenschaften mit nachgewiesener Beeinflussbarkeit durch Stress. Als Ausgangssequenz für die eigenen Untersuchungen diente die von Peelman et al. (1992) ermittelte genomische DNA – Sequenz. Auf ihrer Basis wurden die beschriebenen Primer abgeleitet. Auftretende Diskrepanzen zwischen der selbst ermittelten und der Datenbanksequenz waren Anlass, in einem ersten Schritt Konsenssequenzen für 5'- und 3'-UTR des pHSP70.2 – Gens zu generieren.

4.1.1 Sequenzanalyse der 5'- und 3'- nichttranslatierten Region (UTR) des porcinen HSP70.2 – Gens

4.1.1.1 Ermittlung einer Konsenssequenz für die 5'-UTR

Im Experiment 1 bestand das primäre Ziel der Untersuchungen in der Detektion von Sequenzabweichungen in zwei regulatorischen Elementen (GC – Box, TATA – Box; Schwerin et al. 1995) des Promotors. Als Verfahren der Wahl kam die vergleichende Sequenzierung zur Anwendung. Insgesamt wurden Sequenzen für 51 Tiere ermittelt und eine Konsenssequenz erstellt (Abbildung 4.1). Der Promotor des pHSP70.2 – Gens enthält auf einer Länge von ca. 290 bp eine Anzahl von Sequenzelementen, die potentiell in die Gentranskription einbezogen sind. Im einzelnen sind zwei Hitzschockelemente (HSE, Positionen -120; -200) eine TATA – Box (-29), zwei invertierte CCAAT – Elemente (-69, -152) sowie 2 normal orientierte und zwei invertierte GC – Elemente (-15, -49, -84 und -171) zu finden (Peelman et al. 1992; Schwerin et al. 1999). Letztere Autoren konnten mittels Primer – Extensions – Analyse ein Cytosin – Rest 29 bp 3' der TATA - Box als den Transkriptionsstartpunkt des Gens definieren. Alle Elemente sind in Abbildung 4.1 gekennzeichnet und die Positionsangaben für die Sequenzelemente beziehen sich auf diesen Punkt. Schwerin et al. (1995) beschrieben 2 Polymorphismen in transkriptionssteuernden Elementen des Promotors – eine C/A – Transversion in einer invertierten GC – Box (Position – 49) sowie eine Deletion eines Adenosin – Nukleotids unmittelbar 5' der TATA – Box (Position – 29). Diese beiden Polymorphismen wurden in den Versuchen 1 bis 6 auf ihre Assoziationen zu verschiedenen Leistungsmerkmalen untersucht und sind in Abbildung 4.1 grau dargestellt.

4 Ergebnisse

1	CAACAGGTGC	CGTGCAAACG	CGAAACCTCC	ACAGCATCTC	TTCCCCCTC
1			****	*****	*****
					1
51	CCTTGAGGAA	CTCCGGTTTC	CTCCCGACGA	ATCCCAGAAG	AGTCTGGAGA
51	*****_	*****	*****_***	*****	*****
		2		3	
101	GTTCTGGGAG	GG-CGGCAGA	CCAGGGACGA	CTGATTGGCC	CCAGAAAGCC
101	*****	G *****	*****_**-	*****	*****
			1		
151	AGGGGGCAGA	GACG-GAGGC	GAAACCTCTG	GAATATTCCC	GACCTGG-AC
151	*****_	*** C *****	*****	*****	***** C * G
	2		3		2
201	AGACAACAGC	CGAGGGGATT	GGCTGAGGAG	GGGAAAAGGA	GGGGCTTGAG
201	CCC*GC*GAG	*TC *****	*****	**_***** C	*****
				A	
		4	2		5
251	GAAAAAATA	TAAACACAGA	GCCAGCACCC	CAAGGATAAC	AGCGAGTGCA
251	***** A ***	*****	***_**_***	***_* GA ***	*****_--_
301	CACGGGAAGA	GCTGCTAAGA	CTTCCTCTGC	GGTCTGTGAG	CGCAGCCTTG
301	*_*****	*****	*****	*****	*****
351	GCAGATCCGC	TGCCTCCGAG	GACCACACAG	CGGGCAGAAG	CGGCGCGTTC
351	***** T	*****	*****_**-*	*****	*****
401	GGTTTCCGGC	TTCAGAGCTC	TCCGTCTGGGT	CCTCCGGGAT	CCCGGTTTCG
401	*****	*****	*****_--	-----*	*****
				Start	
451	AGTCTAGAGG	CTGTTTGCGG	AGAGAGCAGG	CCAGCGACATG	
451	*****	*			

fett:	Sequenzdifferenzen	1:	Heat shock element (HSE)
grau:	untersuchte Polymorphismen	2:	(invertierte) GC Box
fett kursiv:	Sequenzierungsprimer	3:	invertierte CCAAT-Box
Start:	Startcodon	4:	TATA Box
*:	identische Nukleotide	5:	Transkriptionsstart

Abbildung 4.1: Vergleich der von Peilmann et al. (1992) ermittelten Sequenz von Promotor und 5'-UTR des pHSP70.2 – Gens (M69100, obere Zeile) mit eigenen Ergebnissen (Konsensussequenz aus n = 51; untere Zeile, Maak et al. 1998).

Von Schwerin et al. (1999) konnten weitere 3 Polymorphismen in der Promotorregion des Gens lokalisiert werden, von denen sich eine G/A – Transition in einem Sequenzabschnitt befindet, der dem Konsensmotiv einer Initiator – Region ähnelt. Weitere 2 Sequenzvariationen in der 5'- UTR werden übereinstimmend von Schwerin et al. (1999) und Chen et al. (2000) beschrieben. Diese Polymorphismen wurden in den eigenen Untersuchungen (Versuch 1) nicht beobachtet und in der Folge (Versuche 2 bis 6) nicht weiter berücksichtigt.

4.1.1.2 Ermittlung einer Konsenssequenz für die 3'- UTR

Auf der Basis der von Peelman et al. (1992) publizierten Sequenz wurden Primer abgeleitet und zur Amplifizierung eines Fragments genutzt, welches neben ca. 100 bp der kodierenden Sequenz etwa 380 bp der 3'-UTR des pHSP70.2 – Gens enthielt. Anhand der Sequenzen von 4 Großelterntieren (1 Eber, 3 Sauen) der Berlin – Bonner – Ressourcepopulation (Hardge 1999) wurde eine Konsenssequenz für diese Region ermittelt (Abbildung 4.2). Stoppkodon, Beginn der 3'-UTR sowie ein poly (A) – Signal sind in dieser Sequenz markiert.

4.1.1.3 Genotypen – und Allelfrequenzen in Polymorphismen des Promotors des pHSP70.2 – Gens

In Tabelle 4.1 sind die beobachteten Genotypenhäufigkeiten aus den Versuchen 1 bis 5 in den untersuchten Polymorphismen der GC – Box und der TATA – Box der pHSP70.2 – Gens dargestellt. Hierbei handelt es sich um kommerziell genutzte Linien (Versuche 2 – 5) sowie um eine experimentelle Population (Versuch 1) in denen eine züchterische Selektion auf unterschiedliche Leistungsmerkmale durchgeführt wurde. Demgegenüber stellen die 288 untersuchten F₂ – Tiere im Versuch 6 eine unselektierte Population dar. Die Ergebnisse aus dieser Population sind im Vergleich zu den kommerziellen Linien in der untersten Zeile der Tabelle aufgeführt.

4 Ergebnisse

```

2289 GTGTGTAACC CCATCATCAG CGGACTGTAC CAGGGGGCGG GTGGCCCCGG
1 ***** ***** *****

2339 GCCGGGCGGC TTCGGGGCTC CAGATCTCAA AGGGGGCTCT GGGTCTGGCC
51 *G*T***** **T***** AG*CC*C***** *****

1 3'UTR =>
2389 CCACCATCGA GGAGGTGGAT TAGAGGCCT- AGTT-CCT-T CTCTCTAT-C
101 ***** ***** *****T *****T**G* *****T*

2439 CTCTT-GAGA CCAAGGACT T-GACAT-GT CCTGTATTT- AGTTCTGTTC
151 *****T***** ***** ***** T*****T *****

2489 TGTATCACTT CATTCTAAGA TTAGGT-GCA AT-G-ATAAT T-ACTTGATA
201 ***** ***** *****T***** **C*C***** *G*****T**

2539 T--CTTTGTG TTATAACCAG CGTGTCTTG AGAATTATT- GCCTTTCATG
251 *AT***** ***** ***** *****T *****

2589 TAAGTTAGTA CTGTAAGGGT GGCTTTTGGT CGCCCCCACC CTGT-AATCA
301 ***** ***** ***** ***** ***** A**G*****

2639 AACTGCCAC CTTCTGTTTT TTGCTTTGTA AACACACGAA AAGTTAAGGA
351 ***** ***** ***** ***** *****

2689 ATAAAAAATC TTTTTTTTTT TGTATACTTA AGGAAATAAAT ATAAAATGTT
401 **T*****_* *****_* *****_* *****_* *****_* **T*****

2739 AAATATCTGT CTTTTTTTAT TTGTGGAGGG ATAATGGATT CTTCTCTGAG
451 *****_* *****_* *****_* *****_* *****_*

2789 TGCCTG

```

fett: Sequenzdifferenzen 1: Stop – Kodon
fett kursiv: Sequenzierungsprimer 2: poly (A) Signal
grau: Polymorphismen (Schwerin et al. 2001b) *: identische Nukleotide

Abbildung 4.2: Vergleich der von Peelman et al. (1992) ermittelten Sequenz des 3'-UTR des pHSP70.2 – Gens (M69100, obere Zeile) mit eigenen Ergebnissen (Konsensussequenz aus n = 4, untere Zeile).

Tabelle 4.1: Beobachtete Genotypenhäufigkeiten (%) in den untersuchten Promotorelementen des pHSP70.2 – Gens in unterschiedlichen Populationen.

Rassen (Versuch)	n	GC – Box – Genotyp			TATA – Box – Genotyp		
		„CC“	„AC“	„AA“	„AA“	„A -“	„- -“
US – Rassen (1)	51	100,0	0,0	0,0	80,4	19,6	0,0
SF, Pi, Pi x SF (2)	81	9,9	72,8	17,3	76,5	23,5	0,0
Pi x DE (3)	45	33,3	62,2	4,4	93,3	6,7	0,0
Pi (4)	34	32,4	52,9	14,7	55,9	35,3	8,8
DL (5)	182	36,8	47,8	15,4	84,1	15,9	0,0
gesamt (Versuche 1 - 5)	393	38,7	48,9	12,4	80,2	18,9	0,9
DuBM x DuBM (6) (nur F ₂ – Tiere)	288	100,0	0,0	0,0	27,8	49,0	23,2

Die Tiere aus Versuch 1 stammen aus einer gerichteten Verpaarung zahlreicher Eltern verschiedener Rassen entsprechend ihrer MHS – Genotypen. Hierbei war eine 100%-ige Fixierung des Wildtypallels „CC“ in der GC – Box zu beobachten. Dasselbe Phänomen trat in der Experimentalpopulation aus Versuch 6 auf, wobei jedoch die untersuchten Tiere im Gegensatz zu Versuch 1 auf nur 4 Großelterntiere (1 Eber, 3 Sauen) zurückzuführen sind. In zwei weiteren Familien dieser Population mit jedoch insgesamt nur 23 Nachkommen trat das mutierte Allel „A“ in der GC – Box auf. Diese Nachkommen entstammen einer Anpaarung von je einem Eber mit dem Genotyp „CC“ an je eine Sau mit dem Genotyp „CA“. Der Erwartungswert für die Allelfrequenzen bei dieser Anpaarung liegt bei C : A = 0,75 : 0,25. In dieser kleinen Stichprobe wurde ein dem nahekommendes Verhältnis von 0,67 : 0,33 beobachtet.

Auffällig ist die geringe Häufigkeit einer homozygot mutierten TATA – Box, die in 4 von 6 untersuchten Populationen nicht auftrat. Im Versuch 6 erfolgte in der F₁ – Generation eine Anpaarung von einem in der TATA – Box heterozygoten Eber an drei Sauen mit demselben Genotyp. Aus diesem Verpaarungsschema sind Allelfrequenzen von 0,5 für beide Allele zu erwarten. Die Ergebnisse der Nachkommen entsprechen nahezu exakt diesem Erwartungswert (Tabelle 4.2).

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2: Frequenzen für die Allele in den Polymorphismen in der GC – und TATA – Box.

Population	Allelfrequenzen			
	GC - Box		TATA – Box	
	„C“ (Wildtyp)	„A“ (Mutation)	„A“ (Wildtyp)	„ - “ (Mutation)
kommerziell (Versuche 1 - 5)	0,63 ^a	0,37 ^a	0,90 ^a	0,10 ^a
experimentell (Versuch 6)	1,00 ^b	0,00 ^b	0,52 ^b	0,48 ^b

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Differenzen ($p < 0,05$) zwischen den Populationen innerhalb eines Allels

4.1.2 Assoziation zwischen Varianten des porcinen HSP70.2 – Gens und biochemischen und morphologischen Kennwerten des *M. longissimus* sowie Leistungsmerkmalen in verschiedenen Schweinepopulationen

Für das HSP70.2 – Gen als Vertreter der sogenannten Stressprotein - Gene wurden DNA – Sequenzvarianten in potentiell transkriptionsbeeinflussenden Motiven des Promotors beschrieben (Schwerin et al. 1995). In den folgenden Assoziationanalysen (Versuche 1 – 6) wurde im Sinne des klassischen funktionellen Kandidatengenansatzes vorgegangen: Polymorphismen in einen funktionellen Kandidatengen mit zum Untersuchungszeitpunkt noch unbekanntem Auswirkungen wurden auf ihren Zusammenhang mit Leistungsmerkmalen als Bestandteil des Phänotyps untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt auf solchen Leistungsmerkmalen, die beim Schwein nachgewiesenermaßen stressbeeinflussbar sind. Hauptaugenmerk wurde demzufolge auf Parameter der Fleischqualität und in-vitro Parameter zu ihrer Vorhersage gelegt. Weiterhin wurden Merkmale der Fruchtbarkeit betrachtet, da sich aus Untersuchungen an anderen Spezies eine Einbeziehung der HSP in diesen Komplex ableiten ließ.

4.1.2.1 Beziehungen zwischen Promotorgenotypen sowie biochemischen und morphologischen Parametern des *M. longissimus*

Diese Untersuchungen wurden ausschließlich in Versuch 2 durchgeführt. Die einbezogenen Schweine wurden unter Prüfstationsbedingungen gehalten, so dass ein minimaler Einfluss von Umwelteffekten auf die Leistungsdaten zu erwarten war. Anhand von zwei Biopsieproben (Lebenstag 133 ± 13 ; Lebenstag 176 ± 12) des *M. longissimus* wurden biochemische und morphologische Kriterien bestimmt. Da ein starker Effekt des MHS – Genotyps auf die zu untersuchenden Parameter zu erwarten war (Wicke et al. 1998), muss dieser in die Auswertung einbezogen werden. Ergänzend zu den in Tabelle 4.1 dargelegten

Genotypenfrequenzen im HSP70.2 – Promotor, ist in Tabelle 4.3 deren Verteilung über die MHS – Genotypen dargestellt.

Tabelle 4.3: Verteilung der Genotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens und am MHS – Locus (Versuch 2).

MHS	Genotypen in GC – und TATA – Box									Σ MHS	
	CC/AA	CC/A-	CC/- -	CA/AA	CA/A-	CA/- -	AA/AA	AA/A-	AA/- -		
NN	1	0	0	13	5	0	3	0	0	22	
Nn	7	0	0	23	12	0	3	0	0	45	
nn	3	1	0	5	1	0	4	0	0	14	
Σ HSP	11	1	0	41	18	0	10	0	0	81	
Σ GC	CC: 12	CA: 59	AA: 10								
Σ TATA	AA: 62	A - : 19	- - : 0								

Biochemische Parameter des M. longissimus

Erwartungsgemäß bestand auf fast alle untersuchten biochemischen Parameter, unabhängig vom Biopsiezeitpunkt, ein hochsignifikanter Einfluss des MHS – Genotyps (Tabelle 4.4). Dabei wiesen die am MHS – Locus homozygot mutierten Tiere (Genotyp nn) in nahezu allen Fällen die ungünstigsten Werte auf. Zu beiden Biopsiezeitpunkten sind diese Tiere durch einen starken pH – Wertabfall nach Inkubation (Δ pH) und ein verringertes Wasserbindungsvermögen, dargestellt durch die erhöhte austretende Flüssigkeitsmenge (Fluid Volume) charakterisiert. Tiere mit dem heterozygoten Genotyp Nn nehmen eine Zwischenstellung zwischen Wildtyp und heterozygot mutiertem Typ ein, wobei die Differenzen zum Genotyp nn geringer sind als zum Wildtyp NN. Aufgrund der ungünstigen Verteilung der GC – und TATA – Box – Genotypen innerhalb der MHS – Genotypen (nicht bzw. gering besetzte Klassen), sind nur begrenzte Aussagen zu deren Effekten auf die Untersuchungsparameter möglich.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.4: Biochemische Kennwerte von Biopsieproben des *M. longissimus* (LSQ – Mittelwerte \pm SE) bei Schweinen in Abhängigkeit von Alter und Genotyp.

Merkmal/ Genotyp (n)	1. Biopsie (LM = 55,0 \pm 4,0 kg)				2. Biopsie (LM = 92,1 \pm 8,1 kg)			
	Fluid Vol. (g)	pH _F	pH _M	Δ pH	Fluid Vol. (g)	pH _F	pH _M	Δ pH
MHS								
NN (22)	0,35 ^a \pm 0,01	6,50 ^a \pm 0,08	6,50 ^a \pm 0,08	-0,84 ^a \pm 0,09	0,45 \pm 0,03	6,86 ^a \pm 0,05	6,61 ^a \pm 0,03	-0,59 ^a \pm 0,05
Nn (45)	0,49 ^b \pm 0,01	6,03 ^b \pm 0,04	6,06 ^b \pm 0,03	-1,21 ^b \pm 0,04	0,42 \pm 0,02	6,08 ^b \pm 0,06	6,03 ^b \pm 0,04	-1,00 ^b \pm 0,04
nn (14)	0,58 ^c \pm 0,01	5,90 ^b \pm 0,03	5,98 ^b \pm 0,04	-1,19 ^b \pm 0,05	0,48 \pm 0,03	5,73 ^b \pm 0,03	5,73 ^c \pm 0,02	-1,18 ^b \pm 0,02
GC-Box								
CC (8)	0,51 \pm 0,03	6,06 \pm 0,10	6,12 \pm 0,10	-1,10 \pm 0,12	0,48 \pm 0,01	6,20 \pm 0,19	5,91 \pm 0,07	-0,81 \pm 0,18
AC (59)	0,46 \pm 0,02	6,14 \pm 0,05	6,15 \pm 0,05	-1,12 \pm 0,05	0,44 \pm 0,01	6,06 \pm 0,08	6,19 \pm 0,05	-0,97 \pm 0,08
AA (14)	0,49 \pm 0,03	6,12 \pm 0,03	6,22 \pm 0,10	-1,05 \pm 0,10	0,51 \pm 0,02	6,26 \pm 0,11	6,10 \pm 0,11	-0,84 \pm 0,11
TATA-Box								
AA (62)	0,46 \pm 0,01	6,15 \pm 0,04	6,19 \pm 0,04	-0,84 ^a \pm 0,08	0,46 \pm 0,01	6,23 \pm 0,06	6,15 \pm 0,05	-0,92 \pm 0,04
A – (19)	0,49 \pm 0,03	6,08 \pm 0,03	6,06 \pm 0,08	-1,16 ^b \pm 0,10	0,44 \pm 0,01	6,23 \pm 0,12	6,13 \pm 0,09	-0,93 \pm 0,07
Haupteffekte (p)								
MHS	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,33	< 0,001	< 0,001	0,002
GC-Box	0,95	0,97	0,64	0,67	0,15	0,50	0,70	0,49
TATA-Box	0,21	0,14	0,22	0,04	0,52	0,39	0,76	0,54

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Genotypen innerhalb eines Locus

Ein gesicherter Effekt ($p < 0,05$) bestand nur für den TATA – Box – Genotyp auf den pH – Wertverlauf im Muskel nach Inkubation (Δ pH) in der ersten Biopsie. Hier ergaben sich signifikante Gruppenunterschiede zwischen dem heterozygot mutierten Genotyp („A –“ mit ungünstigerem Wert) und dem Wildtyp (AA). Diese Unterschiede traten zum Zeitpunkt der zweiten Biopsie nicht auf. Demgegenüber existieren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen in der GC – Box in allen untersuchten biochemischen Biopsiekriterien. Interessanterweise tendieren jedoch die Probanden mit dem Wildtyp in der GC – Box in einigen pH – Wert – Parametern zu den ungünstigeren Werten.

Merkmale der Struktur des M. longissimus

Anhand der zu beiden Biopsiezeitpunkten gewonnenen Proben des M. longissimus wurden Fasertypenprofil, Durchmesser der einzelnen Fasertypen sowie der Anteil pathologischer Fasern bestimmt. Der Parameter Muskelfasergesamtanzahl (MFGA) wurde berechnet.

Tabelle 4.5: Merkmale der Struktur des M. longissimus (LSQ – Mittelwerte \pm SE) bei Schweinen in Abhängigkeit von Alter und Genotyp.

Merkmal/ Genotyp (n)	1. Biopsie (LM = 55,0 \pm 4,0 kg)				2. Biopsie (LM = 92,1 \pm 8,1 kg)			
	\varnothing STO (μ m)	\varnothing FTG (μ m)	MFGA (Nx10 ³)	pathol. Fasern (%)	\varnothing STO (μ m)	\varnothing FTG (μ m)	MFGA (Nx10 ³)	pathol. Fasern (%)
MHS								
NN (22)	51,3 ^a \pm 1,4	62,3 \pm 3,4	637,9 \pm 50,8	5,14 \pm 1,34	56,5 ^a \pm 1,2	77,1 ^a \pm 2,0	722,4 ^a \pm 38,1	6,60 \pm 1,41
Nn (45)	55,9 ^b \pm 1,0	67,4 \pm 2,7	564,9 \pm 40,6	3,24 \pm 0,56	67,3 ^b \pm 1,2	91,1 ^b \pm 1,6	591,8 ^b \pm 21,0	5,07 \pm 0,63
nn (14)	66,0 ^c \pm 2,0	69,0 \pm 3,6	586,2 \pm 54,8	4,15 \pm 0,82	81,2 ^c \pm 3,9	97,6 ^b \pm 4,5	543,4 ^b \pm 42,3	5,64 \pm 0,88
GC-Box								
CC (8)	60,0 \pm 3,2	69,2 \pm 2,3	507,9 \pm 38,7	1,88 \pm 0,59	73,9 \pm 6,7	88,8 \pm 6,8	604,6 \pm 61,5	5,66 \pm 1,57
AC (59)	55,9 \pm 1,1	74,0 \pm 1,4	541,4 \pm 23,2	4,16 \pm 0,64	65,3 \pm 1,4	88,1 \pm 1,7	629,4 \pm 23,1	6,06 \pm 0,68
AA (14)	57,1 \pm 1,7	73,9 \pm 2,1	476,2 \pm 21,7	4,01 \pm 0,90	68,6 \pm 3,1	89,4 \pm 3,8	585,7 \pm 30,7	3,54 \pm 0,840
TATA-Box								
AA (62)	56,6 \pm 1,1	73,7 \pm 1,2	511,4 \pm 16,9	3,46 \pm 0,54	67,4 \pm 1,6	88,3 \pm 1,8	612,9 \pm 21,7	5,17 \pm 0,65
A – (19)	56,2 \pm 1,5	72,8 \pm 2,4	572,4 \pm 49,8	5,31 \pm 1,10	64,6 \pm 2,2	88,9 \pm 2,7	639,5 \pm 35,8	6,93 \pm 0,90
Haupteffekte (p)								
MHS	<0,001	0,15	0,47	0,60	<0,001	<0,001	0,01	0,74
GC-Box	0,58	0,15	0,94	0,16	0,64	0,61	0,73	0,76
TATA-Box	0,38	0,62	0,31	0,10	0,29	0,13	0,31	0,10

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Genotypen innerhalb eines Locus

Für einige der in Tabelle 4.5 dargestellten Parameter existieren wiederum deutliche Unterschiede zwischen Tieren mit dem MHS – Genotyp NN und den mutierten Genotypen. Die Mutation ist dabei mit erhöhten Faserdurchmessern und verringerter Faseranzahl im Muskel verbunden. Ein zusätzlicher Einfluss der Promotorgenotypen im HSP70.2 – Gen auf

4 Ergebnisse

Merkmale der Muskelstruktur war zu keinem der beiden untersuchten Biopsiezeitpunkte nachweisbar.

4.1.2.2 Beziehungen zwischen Promotorgenotypen und Fleischqualitätsmerkmalen

In den Versuchen 1, 2, 3 und 6 wurden Untersuchungen zur Beziehung zwischen den Polymorphismen sowie Fleischqualitätsmerkmalen durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur des Tiermaterials (Frequenzen in den Polymorphismen, MHS – Genotypen u.a.) sowie unterschiedlicher Parameter wird die Auswertung separat für jeden Versuch vorgenommen. Für Versuch 6 (Ressourcepopulation) werden die Ergebnisse in einem gesonderten Abschnitt (4.1.2.5) dargestellt.

Versuch 1

Die Schweine wurden in diesem Versuch in Abhängigkeit vom MHS – Genotyp unterschiedlichen Behandlungen vor der Schlachtung unterzogen. Dieser Effekt wurde im statistischen Modell berücksichtigt. Für die GC – Box – Genotypen konnten keine Aussagen getroffen werden, da ausschließlich der Genotyp „CC“ (Wildtyp) im gesamten Untersuchungsmaterial vorlag. Auch befanden sich lediglich 10 Probanden mit dem heterozygoten Genotyp A - in der TATA – Box im Untersuchungsmaterial wogegen 41 Tiere den Wildtyp in diesem Locus aufwiesen. Die Verteilung der TATA – Box – Genotypen über die MHS – Genotypen ist in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6: Verteilung der Genotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens (TATA – Box) und am MHS – Locus (Versuch 1).

TATA-Box Genotyp	MHS - Genotyp			Σ TATA-Box
	NN	Nn	nn	
AA	4	4	2	10
A -	9	25	7	41
Σ MHS	13	29	9	51

Signifikante Einflüsse übt der MHS – Genotyp auf nahezu alle untersuchten Merkmale aus, wogegen die Behandlung der Tiere vor der Schlachtung nur Effekte auf die Farbhelligkeit des Fleisches, den pH₁ – Wert und das Wasserbindungsvermögen zeigen (nicht dargestellt). Der Genotyp in der TATA – Box des HSP70.2 – Promotors steht signifikant mit der Farbhelligkeit, dem pH₂ - Wert sowie mit dem Dripverlust in Beziehung. Jedoch weisen hier die Wildtyp – Genotypen die schlechteren Werte im Vergleich zu den Heterozygoten auf. Auffällig im untersuchten Material sind die Korrelationen zwischen dem pH₁ – Wert und den Merkmalen des Wasserbindungsvermögens, die mit –0,33 bis –0,54 geringer sind als in vergleichbaren Untersuchungen (Wicke et al. 1992, 1993; Lengerken et al. 1994).

Tabelle 4.7: Merkmale der Fleischqualität (LSQ – Mittelwerte \pm SE) in Abhängigkeit von den Genotypen im MHS – Locus sowie in der TATA - Box des pHSP70.2 – Gens.

Genotyp (n)	Minolta (Y)	pH _{1MI}	pH _{2MI}	Δ pH	Dripverlust (%)
MHS					
NN (13)	28,2 ^a $\pm 1,6$	6,16 ^a $\pm 0,11$	5,73 $\pm 0,08$	-0,43 ^a $\pm 0,13$	6,48 ^a $\pm 0,82$
Nn (29)	29,9 ^a $\pm 1,1$	5,92 ^b $\pm 0,07$	5,60 $\pm 0,05$	-0,32 ^a $\pm 0,07$	8,08 ^b $\pm 0,35$
nn (9)	37,1 ^b $\pm 1,7$	5,33 ^c $\pm 0,03$	5,57 $\pm 0,08$	+0,24 ^b $\pm 0,04$	10,02 ^b $\pm 1,12$
TATA-Box					
AA (10)	33,8 ^a $\pm 1,6$	5,87 $\pm 0,14$	5,72 ^a $\pm 0,08$	-0,15 $\pm 0,15$	9,67 ^a $\pm 0,57$
A – (41)	29,7 ^b $\pm 0,8$	5,88 $\pm 0,07$	5,55 ^b $\pm 0,04$	-0,33 $\pm 0,06$	7,61 ^b $\pm 0,43$
Haupteffekte (p)					
MHS	<0,001	0,004	0,69	<0,001	<0,05
TATA	0,013	0,93	0,029	0,12	<0,05

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Genotypen innerhalb eines Locus

Bei einer Betrachtung des postmortalen pH – Wertverlaufes (Δ pH) wird deutlich, dass bei Schweinen mit dem MHS – Genotyp nn im Gegensatz zu den anderen Genotypen ein Anstieg des pH – Wertes im Bereich von 45 min p.m. bis 24 h p.m. stattfindet. Demgegenüber ist der TATA – Box – Genotyp „A –“ durch einen tendenziell stärkeren pH – Wert – Abfall gekennzeichnet. Bei einer Kreuzklassifizierung von MHS – und TATA – Box – Genotypen (Abbildung 4.3) zeigt sich demzufolge ein verstärkender Effekt des „-“ – Allels in der TATA – Box auf die Höhe des pH – Wertabfalls innerhalb der MHS – Genotypen (z.B. NN kombiniert mit AA = -0,30 vs. NN kombiniert mit A – = -0,56). Bei Schweinen mit dem MHS – Genotyp nn wird der generell beobachtete Anstieg des pH – Wertes dagegen abgeschwächt (nn/AA = +0,22 vs. nn/A – = +0,16). Aufgrund der geringen Klassenbesetzung sind die Unterschiede jedoch nur teilweise statistisch zu sichern.

4 Ergebnisse

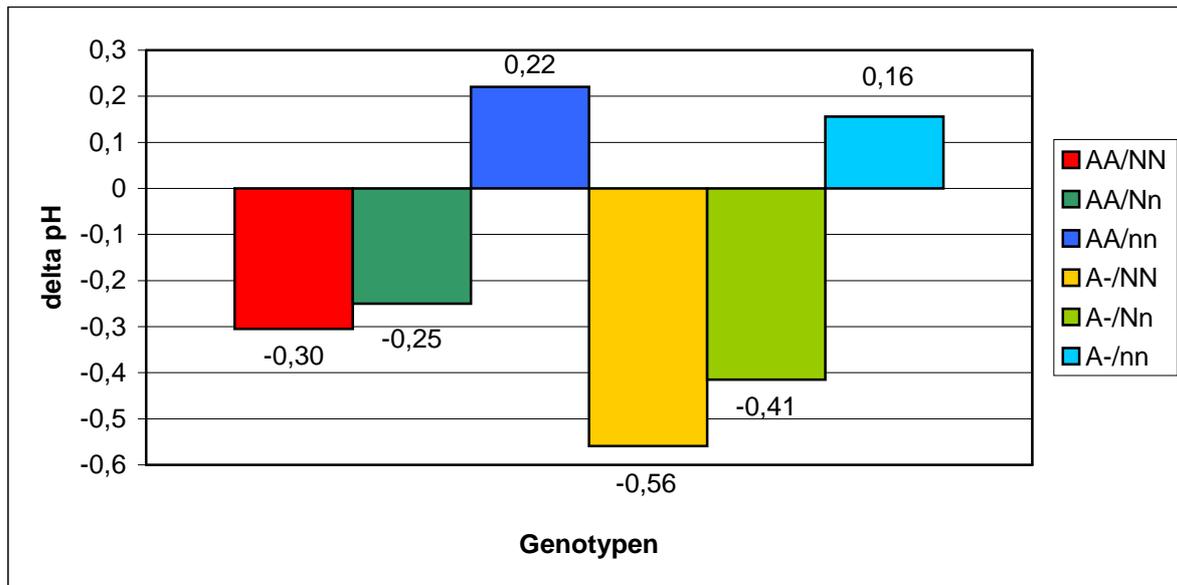


Abbildung 4.3: Effekt der Genotypen am MHS – Locus und in der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens auf den pH – Wert – Abfall im M. longissimus (45 min p.m. bis 24 h p.m.).

Versuch 2

Die Struktur der Genotypen in diesem Versuch ist in Tabelle 4.3 dargestellt. Auch hier ist ein starkes Überwiegen des Genotyps AA in der TATA – Box zu beobachten, wogegen im Vergleich zum Versuch 1 alle Genotypen in der GC – Box auftraten. Neben dem erwarteten Effekt des MHS – Genotyps auf alle untersuchten Parameter der Fleischqualität wies lediglich der GC – Box – Genotyp einen statistisch gesicherten Einfluss auf das Merkmal Leitfähigkeit 24 h p.m. auf. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Versuch 1 ist hier wiederum die Tendenz zu ungünstigeren Werten bei Probanden mit dem Wildtyp CC in der GC – Box zu verzeichnen. Tiere mit dem TATA – Box – Genotyp weisen tendenziell niedrigere pH - Werte im M. longissimus 45 min p.m. auf. Eine Messung des pH_{2MI} – Wertes fand in diesem Material nicht statt, so dass Ergebnisse aus Versuch 1 zum Effekt des TATA – Box – Genotyps auf den postmortalen pH – Wertverlauf hier nicht überprüft werden konnten.

Ein Vergleich des Verlaufes der Leitfähigkeit im M. longissimus (120 min p.m. bis 24 h p.m.) zeigt jedoch, dass der TATA – Box – Genotyp „A –“ durch einen Abfall ($\Delta LF = -0,25$) im Gegensatz zum Genotyp AA ($\Delta LF = +0,25$) gekennzeichnet ist – eine Tendenz, die gleichgerichtet zu dem im Versuch 1 beobachteten pH – Wertverlauf ist.

Tabelle 4.8: Merkmale der Fleischqualität (LSQ – Mittelwerte \pm SE) in Abhängigkeit vom Genotyp (Versuch 2).

Genotyp (n)	Minolta (L*)	pH _{1MI}	LF _{1MI} (mS/cm)	LF _{2MI} (mS/cm)	Δ LF (mS/cm)
MHS					
NN (22)	46,1 ^a $\pm 0,7$	6,53 ^a $\pm 0,09$	2,99 ^a $\pm 0,10$	3,43 ^a $\pm 0,24$	-0,44 ^a $\pm 0,21$
Nn (45)	48,3 ^b $\pm 0,5$	5,94 ^b $\pm 0,06$	4,24 ^b $\pm 0,25$	4,11 ^a $\pm 0,27$	0,13 ^{a, b} $\pm 0,24$
nn (14)	51,9 ^c $\pm 1,2$	5,78 ^b $\pm 0,08$	8,58 ^c $\pm 0,68$	7,44 ^b $\pm 0,51$	1,14 ^b $\pm 0,59$
GC-Box					
CC (12)	49,2 $\pm 1,9$	5,91 $\pm 0,12$	5,45 $\pm 1,13$	5,58 ^a $\pm 1,24$	-0,12 $\pm 0,44$
AC (59)	47,8 $\pm 0,5$	6,11 $\pm 0,06$	4,33 $\pm 0,28$	4,24 ^b $\pm 0,24$	0,09 $\pm 0,20$
AA (10)	49,5 $\pm 1,0$	6,02 $\pm 0,11$	5,09 $\pm 0,84$	4,69 ^{a, b} $\pm 0,72$	0,40 $\pm 0,54$
TATA-Box					
AA (62)	48,5 $\pm 0,5$	6,11 $\pm 0,06$	4,59 $\pm 0,32$	4,34 $\pm 0,27$	0,25 $\pm 0,19$
A – (19)	47,4 $\pm 1,0$	5,98 $\pm 0,09$	4,42 $\pm 0,44$	4,69 $\pm 0,50$	-0,26 $\pm 0,44$
Haupteffekte (p)					
MHS	0,04	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
GC	0,90	0,76	0,93	0,03	0,08
TATA	0,20	0,39	0,75	0,97	0,71

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Genotypen innerhalb eines Locus

Anhand der Daten des Versuches 2 konnte ein Vergleich zwischen biochemischen Kriterien, die an den Biopsieproben zu zwei Zeitpunkten ermittelt wurden, und Parametern der postmortalen Fleischbeschaffenheit vorgenommen werden. Die einfache, linearen Korrelationskoeffizienten zwischen dem im M. longissimus gemessenen und letztendlich die Fleischbeschaffenheit definierendem pH_{1MI} und den korrespondierenden pH_M – Werten zu den Biopsiezeitpunkten liegen im mittleren Bereich ($r = 0,30 - 0,60$). Zwischen den im Bioplat gemessenen Kriterien des Wasserbindungsvermögens (Fluid Volume) und der postmortalen Leitfähigkeit des M. longissimus liegen die Koeffizienten dagegen nur im Bereich von $r = 0,20 - 0,40$. In Bezug auf die Vorhersage von Fleischqualitätsmängeln (pale, soft, exsudative meat; PSE) am lebenden Tier sind die Biopsie – Kriterien jedoch geeignet (Maak et al. 1995; Wicke et al. 1998).

4 Ergebnisse

In einer Klassifizierung nach TATA – Box – Genotypen innerhalb der MHS – Genotypen NN und Nn zeigt sich ein tendenziell negativer Effekt des TATA – Box – Allels „-“ auf die Merkmale pH_{1MI} und LF_{1MI} (Abbildung 4.4). Dieser Trend wurde in ähnlicher Weise bereits für das Merkmal pH – Wertverlauf im Versuch 1 beobachtet.

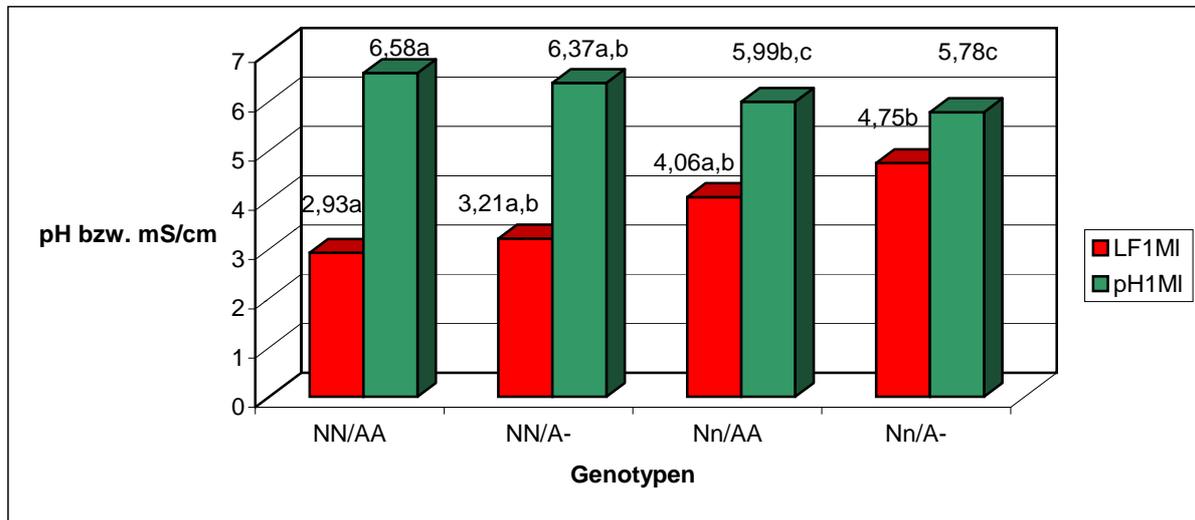


Abbildung 4.4: Fleischqualitätsparameter bei Schweinen mit unterschiedlichen Genotypen im MHS – Locus und in der TATA – Box des $pHSP70.2$ – Gens (Unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede [$p < 0,05$] zwischen den jeweiligen Genotypen).

Analog zum Versuch 1 ist auch im Versuch 2 eine korrekte Abschätzung der Effekte der Genotypen in den drei untersuchten Loci nur eingeschränkt möglich. Ursache dafür ist die ungleichmäßige Besetzung der Klassen (einschließlich nicht besetzter Klassen) in den Kombinationen der drei Genotypen. Der MHS – Locus hat bekanntermaßen einen starken phänotypischen Effekt auf nahezu alle Merkmale von Schlachtleistung und Fleischqualität, so dass weniger ausgeprägte, weitere Effekte maskiert werden können. Aus diesen Gründen wurde in den folgenden Versuchen 3 – 6 auf Tiermaterial zurückgegriffen, das im MHS – Locus möglichst nur einen Genotyp aufwies.

Versuch 3

In diesem Versuch wurden aus insgesamt 136 Schweinen des MHS – Genotyps Nn die jeweils 22 bzw. 23 Tiere mit der besten bzw. schlechtesten Fleischqualität anhand der erfassten Daten für die pH_{1MI} - und LF_{1MI} – Werte ausgewählt. In einem zweiten Schritt erfolgte die Typisierung der Tiere an den Polymorphismen im Promotor des $pHSP70.2$ – Gens, um eventuelle Häufungen bestimmter Genotypen (-kombinationen) in diesen Extremgruppen aufzudecken. In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse für das untersuchte Material dargestellt. Die Tiere beider Gruppen unterschieden sich in den Merkmalen der Fleischqualität um 0,5 (pH_{2MI}) bis 2,3 (LF_{1MI}) phänotypische Standardabweichungen. Daraus ergibt sich, dass in der positiven Gruppe alle Probanden frei vom Fleischqualitätsmangel

PSE sind wogegen die Schweine in der negativen Gruppe zu 100% PSE – Fleisch aufwiesen. Als Grenzwerte für diesen Fleischqualitätsmangel wurden ein $\text{pH}_{1\text{MI}}$ – Wert von $< 5,80$ und ein $\text{LF}_{1\text{ML}}$ – Wert von $> 4,5$ mS/cm angesetzt. Keine signifikanten Unterschiede existieren in der Mastleistung sowie im Magerfleischanteil. Auch in dieser Stichprobe waren keine Tiere mit dem TATA – Box – Genotyp „- -“ (homozygot mutiert) vorhanden. Darüber hinaus war der GC – Box – Genotyp „AA“ (homozygot mutiert) mit 4,4% (2 Probanden) unterrepräsentiert.

Tabelle 4.9: Gesamtmittelwerte (\pm SE) der untersuchten Population in ausgewählten Merkmalen der Mast- und Schlachtleistung sowie Fleischqualität, Mittelwerte (\pm SE) in den selektierten Gruppen sowie Frequenzen der Allele der Promotor – Polymorphismen (Versuch 3).

Merkmal	gesamt (n=45)	Fleischqualität	
		gut ($\text{pH}_{1\text{MI}} > 5,80$; $\text{LF}_{1\text{ML}} < 3,5$) (n=22)	schlecht ($\text{pH}_{1\text{MI}} < 5,80$; $\text{LF}_{1\text{ML}} > 4,5$) (n=23)
$\text{pH}_{1\text{MI}}$	5,72 $\pm 0,30$	5,99 ^a $\pm 0,15$	5,46 ^b $\pm 0,12$
$\text{LF}_{1\text{ML}}$ (mS/cm)	5,38 $\pm 0,41$	3,07 ^a $\pm 0,10$	7,59 ^b $\pm 0,45$
$\text{pH}_{2\text{MI}}$	5,65 $\pm 0,03$	5,55 $\pm 0,05$	5,46 $\pm 0,02$
PSE (%)	51,1	0,0	100,0
PTZ (g/d)	738 ± 13	732 ± 24	745 ± 12
MFA (%)	56,0 $\pm 0,6$	55,1 $\pm 0,6$	56,8 $\pm 0,9$
Allelfrequenz			
GC-Box	“C”	0,64	0,65
	“A”	0,36	0,35
TATA-Box	“A”	0,97	1,00
	“-“	0,03	0,00

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen

Bei der durch die Probandenauswahl bedingten extremen Differenz in der Fleischqualität sowie dem Ausschalten des Effektes des MHS – Genotyps (nur Nn – Probanden) ist in diesem Design zumindest der Effekt der GC – Box – Mutation auf die Fleischqualität ohne Störgrößen analysierbar. Die Eignung des Materials für die Analyse der TATA – Box – Mutation ist durch die geringe Frequenz des „-“ – Allels begrenzt.

Wie aus Tabelle 4.9 zu entnehmen ist, sind keinerlei Unterschiede in den Frequenzen der Allele für beide Polymorphismen zwischen den Gruppen zu verzeichnen. Demzufolge kann

4 Ergebnisse

hier ein Effekt beider Promotorgenotypen auf Fleischqualitätsmerkmale ausgeschlossen werden.

In den dargestellten Untersuchungen zu Assoziationen zwischen Promotorgenotypen und Fleischqualitätsmerkmalen traten überwiegend widersprüchliche Ergebnisse auf. Es wurden keine einheitlichen Effekte der Genotypen auf die untersuchten Parameter gefunden. In der Tendenz konnten negative Auswirkungen des mutierten Allels “ – “ in der TATA – Box auf einige Merkmale der Fleischqualität beobachtet werden. Demgegenüber war der negative Effekt von Varianten in der GC – Box überwiegend an das Wildtyp – Allel “C” gekoppelt.

4.1.2.3 Beziehungen zwischen Promotorgenotypen und Parametern der männlichen Fruchtbarkeit

Diese Untersuchungen erfolgten an insgesamt 34 Besamungsebern der Rasse Pietrain im Versuch 4. Die Verteilung der einzelnen Genotypen ist aus Tabelle 4.10 ersichtlich. Ein signifikanter Effekt auf die untersuchten Merkmale war für keinen der betrachteten Polymorphismen gegeben (Tabelle 4.10). Jedoch konnten zwischen einzelnen Genotypen innerhalb eines Locus tendenzielle Mittelwertunterschiede gefunden werden. So wiesen die 4 Eber mit dem MHS – Genotyp Nn ein höheres Ejakulatvolumen, verbunden mit höherer Spermienkonzentration, auf. Daraus errechnet sich eine tendenziell erhöhte Gesamtspermienanzahl im Ejakulat für diesen Genotyp. Im selben Merkmal unterschieden sich auch die jeweils homozygoten Genotypen in der GC – Box, wobei hier der Wildtyp „CC“ die besseren Werte aufwies. Für die TATA – Box ergaben sich tendenzielle Unterschiede im Ejakulatvolumen mit Vorteilen für den homozygoten Wildtyp sowie in der Konzentration mit höheren Werten für den homozygot mutierten Genotyp. Insgesamt waren auch hier keine eindeutig interpretierbaren Zusammenhänge zu beobachten.

Tabelle 4.10: Parameter der Spermaqualität (LSQ – Mittelwerte \pm SE) bei Besamungsebern mit unterschiedlichen Genotypen im MHS – Locus sowie dem Promotor des pHSP70.2 – Gens (Versuch 4).

Genotypen Merkmal (n)	MHS		GC - Box			TATA - Box		
	Nn (4)	nn (30)	AA (5)	AC (18)	CC (11)	AA (19)	A – (12)	- - (3)
Ejakulatvolumen (1) (ml)	197 ± 14	184 ± 13	175 ± 36	174 ± 16	210 ± 17	195 ± 14	174 ± 22	167 ± 29
Konzentration (2) (Mio./ml)	49 ± 4	44 ± 2	45 ± 6	49 ± 5	52 ± 2	47 ± 2	51 ± 5	56 ± 6
Spermienanzahl (3) (Mrd./Ejakulat)	10,4 $\pm 1,7$	8,2 $\pm 1,1$	10,0 $\pm 0,7$	8,9 $\pm 0,8$	9,0 $\pm 1,2$	9,2 $\pm 0,7$	9,7 $\pm 1,3$	9,8 $\pm 2,7$
Haupteffekte (p) (1)	0,25		0,13			0,17		
(2)	0,61		0,91			0,21		
(3)	0,16		0,12			0,15		

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Genotypen innerhalb eines Locus

4.1.2.4 Beziehungen zwischen Promotorgenotypen und Parametern der weiblichen Fruchtbarkeit sowie dem Geburtsgewicht der Ferkel

In dieser Untersuchung wurden 25 Sauen aus einer zeitgleichen Abferkelung mit insgesamt 260 Nachkommen erfasst. Alle hier einbezogenen Schweine besaßen den Genotyp NN (Wildtyp) im MHS – Locus. In Tabelle 4.11 sind die Mittelwerte für Fruchtbarkeitsparameter sowie das durchschnittliche Geburtsgewicht der Nachkommen für die Sauen, unterteilt nach Genotyp – Kombinationen im Promotor des pHSP70.2 – Gens aufgelistet. Die Effekte der beiden Polymorphismen erwiesen sich für alle Parameter als nicht signifikant. Eine Haplotypenbildung (Genotypen in TATA – und GC – Box) ergab jedoch teilweise gesicherte Mittelwertdifferenzen zwischen einzelnen Genotyp – Kombinationen.

So wiesen die Sauen mit dem Genotyp AA/AA (homozygot mutiert in der GC – Box; Wildtyp in der TATA – Box) die höchste Wurfmasse und das höchste durchschnittliche Geburtsgewicht der Ferkel auf. Bei homozygoten Vorliegen des Wildtyp- Allels „C“ in der GC – Box des HSP70.2 – Gens der Sauen war das Geburtsgewicht der Ferkel teilweise signifikant verringert.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.11: Merkmale der Fruchtbarkeit sowie Geburtsgewichte der Nachkommen bei Sauen mit unterschiedlichen Haplotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens (Mittelwerte \pm SE; Versuch 5).

Merkmal	Haplotyp der Sau (TATA-Box/GC-Box)					
	AA/AA	AA/AC	AA/CC	A-/AA	A-/AC	A-/CC
Würfe (n)	2	8	6	0	3	6
insg. gF/Wurf (n)	12,0	10,4	9,6	-	12,7	10,0
(1)	$\pm 1,4$	$\pm 2,9$	$\pm 2,9$		$\pm 1,5$	$\pm 4,0$
IgF/Wurf (n)	12,0	8,1 ^a	9,8	-	12,3 ^b	9,6
(2)	$\pm 1,0$	$\pm 0,7$	$\pm 1,2$		$\pm 0,9$	$\pm 2,0$
Wurfmasse (kg)	20,1 ^a	12,8 ^b	14,3 ^{a,b}	-	17,4 ^{a,b}	14,3 ^{a,b}
(3)	$\pm 6,9$	$\pm 1,9$	$\pm 1,3$		$\pm 2,6$	$\pm 2,3$
Ø Geburtsgewicht der Ferkel (g)	1678 ^a	1568 ^{a,b}	1479 ^{b,c}	-	1403 ^c	1475 ^{b,c}
(4)	± 85	± 50	± 55		± 69	± 52
Haupteffekte (p)	GC-Box (1)	0,79		TATA-Box (1)	0,55	
	(2)	0,47		(2)	0,26	
	(3)	0,42		(3)	0,17	
	(4)	0,79		(4)	0,43	

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Haplotypen (t-Test für die beobachteten, gewichteten Mittel der Gruppen)

In Tabelle 4.12 sind die Geburtsgewichte der Ferkel in Abhängigkeit vom Genotyp der Ferkel in den Promotormutationen dargestellt. In diese Analyse wurden 157 Ferkel als Nachkommen eines Ebers einbezogen. Erwartungsgemäß bestätigt sich die Aussage, dass mit dem Vorhandensein des Wildtypallels „C“ in der GC – Box ein niedrigeres Geburtsgewicht einhergeht. Der Effekt des Faktors GC – Box – Genotyp auf das Merkmal erreicht jedoch nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,07$). Zwischen den beiden beobachteten TATA – Box – Genotypen bestehen keine Mittelwertunterschiede im Geburtsgewicht, wogegen die beiden homozygoten GC – Box – Genotypen signifikant unterschiedlich in diesem Merkmal sind. Die höheren Geburtsmassen sind dabei mit dem homozygot mutierten Genotyp (AA) verbunden.

Tabelle 4.12: Geburtsgewichte von Ferkeln (Mittelwerte \pm SE) mit unterschiedlichen Haplotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens (Versuch 5).

Merkmal	Haplotyp der Ferkel (TATA-Box/GC-Box)					
	AA/AA	AA/AC	AA/CC	A-/AA	A-/AC	A-/CC
Anzahl	26	66	45	0	10	10
Geburtsgewicht (g)	1665 ^a ± 90	1521 ^{a,b} ± 59	1441 ^b ± 65	-	1578 ^{a,b} ± 107	1468 ^{a,b} ± 117
Anzahl (TATA-Box)		137			20	
Geburtsgewicht (g)		1522 ± 40			1523 ± 78	
Anzahl (GC-Box)	26	76	55			
Geburtsgewicht (g)	1665 ^a ± 90	1528 ^{a,b} ± 53	1446 ^b ± 57			

unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Haplotypen (t-Test für die beobachteten, gewichteten Mittel der Gruppen)

In einem weiteren Teilmaterial von insgesamt 107 Ferkeln aus 14 Altsauenwürfen konnte nachvollzogen werden, von welchem Elterntier die Allele der GC – Box auf die Ferkel vererbt wurden. Es wurden signifikante Effekte der maternalen und paternalen Allele auf das Geburtsgewicht beobachtet (väterliches Allel $p < 0,05$, mütterliches Allel $p < 0,001$). Ein Einfluss des TATA – Box – Genotyps bestand nicht. Interessanterweise unterschieden sich die maternalen und paternalen Allele in der Richtung ihrer Auswirkung. Träger des mütterlichen Allels „A“ (mutiert) wiesen gegenüber dem Durchschnitt der Stichprobe ein um ca. 250 g höheres Geburtsgewicht auf, wogegen die Träger des paternalen „A“ – Allels ein um 40 g verringertes Geburtsgewicht haben. Ein mütterliches Wildtyp – Allel „C“ war wiederum mit einem um 90 g verringerten Geburtsgewicht verbunden (paternales Allel: +40 g). Aus diesem Phänomen ergibt sich die in Abbildung 4.5 dargestellte Verteilung der Abweichungen der Geburtsmassen für die einzelnen Allelkombinationen.

4 Ergebnisse

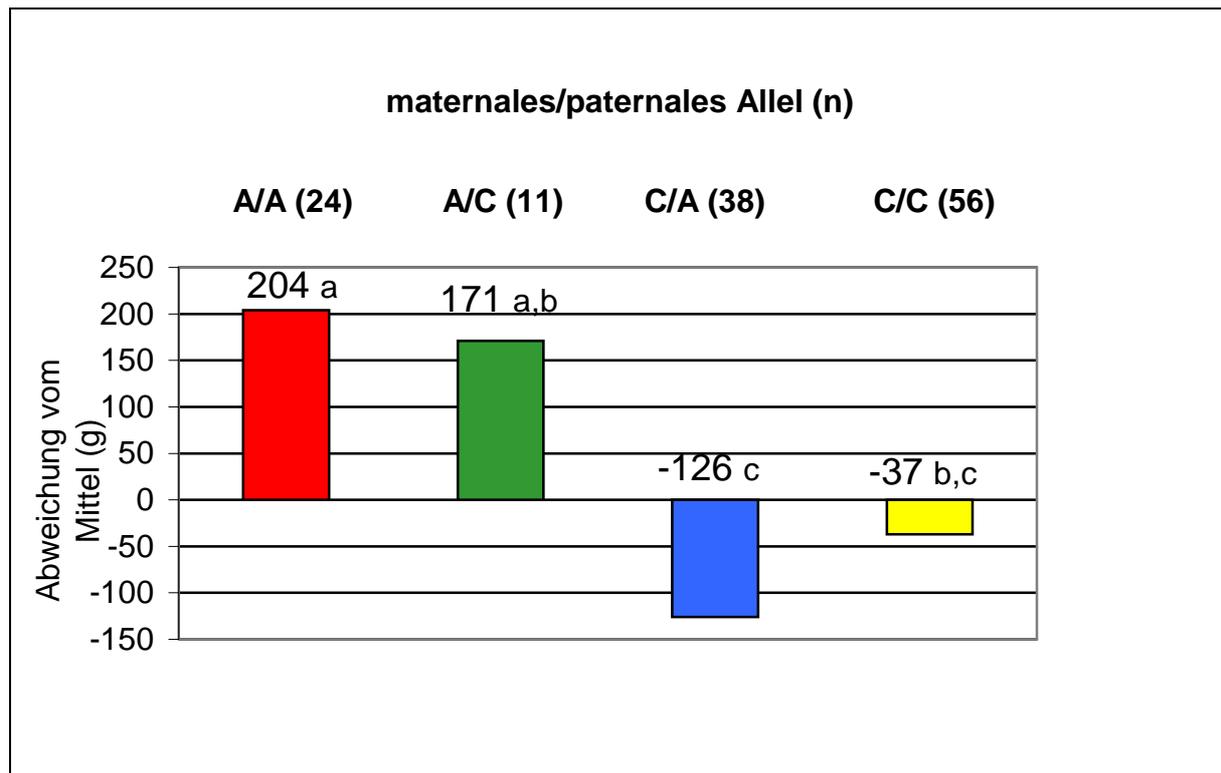


Abbildung 4.5: Mittlere Abweichung der Geburtsgewichte von Ferkeln mit unterschiedlichen maternalen und paternalen Allelen im Polymorphismus in der GC – Box des pHSP70.2 - Gens (Unterschiedliche Buchstaben: signifikante Unterschiede [$p < 0,05$] zwischen den Genotypen).

4.1.2.5 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus in der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens und Leistungsparametern in der Berlin – Bonner Ressourcepopulation

In Kooperation mit dem Institut für Nutztierwissenschaften (Fachgebiet Züchtungsbiologie und Molekulare Tierzucht) der Humboldt – Universität zu Berlin wurde eine Analyse des Effekts des TATA – Box – Genotyps auf eine Vielzahl von Leistungsmerkmalen in der Berlin – Bonner – Ressourcefamilie vorgenommen. Die Typisierung der Parentalgeneration ergab für lediglich eine der 11 Sauen den Genotyp „AA“ in der GC – Box. Alle weiteren Tiere einschließlich der beiden für die Anpaarungen verwendeten Eber wiesen den Genotyp „CC“ auf. Eine Analyse des Effektes des GC – Box – Genotyps auf Leistungsmerkmale war folglich nur in einem eingeschränkten Material (23 Nachkommen aus 2 Familien) möglich und wird hier nicht dargestellt. Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden an drei F_2 – Familien mit 288 Nachkommen vorgenommen. In allen Fällen stammen die Nachkommen aus Anpaarungen von jeweils im TATA – Box – Polymorphismus heterozygoten F_1 – Elterntieren. Die Genotypen – und Allelfrequenzen für diesen Polymorphismus sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 aufgelistet. Die untersuchten Tiere besaßen ausnahmslos den MHS – Genotyp NN. Die Ergebnisse der Analysen werden nachfolgend getrennt für die

untersuchten Leistungskomplexe aufgeführt. Für die im statistischen Modell enthaltenen Faktoren sind die Signifikanzen ausgewiesen. Weiterhin wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Effekt des untersuchten Faktors „Genotyp im TATA – Box – Polymorphismus“ sowie die LSQ – Mittelwerte für die entsprechenden Genotypen dargestellt.

Lebendmasseentwicklung und Mastleistung

Die in Tabelle 4.13 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der TATA – Box – Genotyp keinen statistisch gesicherten Effekt auf die Merkmale der Lebendmasseentwicklung und Mastleistung ausübt.

Tabelle 4.13: Effekte auf Merkmale der Lebendmasseentwicklung und Mastleistung in der Berlin – Bonner Ressourcepopulation sowie LSQ - Mittelwerte (\pm SE) für die Genotypen im Polymorphismus der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens (Versuch 6).

Merkmal	Effekte				Co-Vari- able	LSQ-Mittelwerte (\pm SE) für die TATA-Box-Genotypen		
	Familie	Saison	Ge- schlecht	TATA		AA	A-	- -
	LM _G (kg)	*	*	*		0,53	Wurfgrö- ße	0,921 \pm 0,031
LM _{100d} (kg)	*	*	n.s.	0,64	Wurfgrö- ße	30,1 \pm 0,7	30,4 \pm 0,6	30,9 \pm 0,8
LM _{200d} (kg)	*	*	n.s.	0,26	-	69,6 \pm 2,0	72,0 \pm 1,8	73,1 \pm 2,1
LTZ (g/d)	*	*	*	0,07	-	390^a \pm 20	430^b \pm 20	420^{a,b} \pm 20
FuA (kg/kg)	*	*	*	0,48	Mastend- masse	4,50 \pm 0,08	4,54 \pm 0,07	4,61 \pm 0,08

*: signifikanter Einfluss ($p < 0,05$) n.s.: Einfluss nicht signifikant ($p > 0,05$)

^{a, b}: Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Lediglich für das Merkmal Lebendtagszunahme bestehen teilweise gesicherte Mittelwertunterschiede zwischen den Genotypengruppen. Hierbei, wie auch tendenziell für die Werte der Lebendmasseentwicklung, bestehen jedoch Vorteile für die Genotypen, die das mutierte Allel „-“ enthalten.

4 Ergebnisse

Schlachtkörperqualität

Von den betrachteten Parametern der Schlachtkörperqualität wird lediglich das Merkmal „Innere Länge des Schlachtkörpers“ signifikant vom Genotyp in der TATA – Box beeinflusst.

Tabelle 4.14: Effekte auf Merkmale der Schlachtkörperqualität in der Berlin – Bonner Ressourcepopulation sowie LSQ - Mittelwerte (\pm SE) für die Genotypen im Polymorphismus der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens (Versuch 6).

Merkmal	Effekte				Co-Vari- able	LSQ-Mittelwerte (\pm SE) für die TATA-Box-Genotypen		
	Familie	Saison	Ge- schlecht	TATA		AA	A-	--
SM _w (kg)	*	*	*	0,28	-	58,5 \pm 1,6	60,6 \pm 1,4	61,0 \pm 1,6
IL (cm)	n.s.	n.s.	n.s.	0,004	Mastend- masse	79,4^a \pm 0,1	80,3^b \pm 0,1	81,1^b \pm 0,1
MFA (%)	*	*	*	0,38	Mastend- masse	32,6 \pm 1,1	32,9 \pm 1,0	34,2 \pm 1,2
Fläche _{MI} (cm ²)	*	n.s.	n.s.	0,70	Mastend- masse	22,6 \pm 0,5	22,4 \pm 0,4	22,2 \pm 0,5
Speck- maß _{FOM} (mm)	*	*	*	0,19	Mastend- masse	4,17 \pm 0,14	4,11 \pm 0,12	3,90 \pm 0,14
Fleisch- maß _{FOM} (mm)	*	n.s.	n.s.	0,71	Mastend- masse	3,79 \pm 0,15	3,71 \pm 0,13	3,65 \pm 0,15
Fleisch/ Fettverh.	n.s.	*	*	0,84	Mastend- masse	1,29 \pm 0,04	1,31 \pm 0,03	1,32 \pm 0,05

*: signifikanter Einfluss ($p < 0,05$)

n.s.: Einfluss nicht signifikant ($p > 0,05$)

^{a, b}: Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Demnach haben Schweine mit den TATA – Box – Genotypen „A –“ und „- -“ einen signifikant längeren Schlachtkörper als Tiere ohne Mutation an diesem Genort. Tendenziell bestehen gleichgerichtete Unterschiede ebenfalls für dem Magerfleischanteil sowie für Fleisch – und Speckmaße des Schlachtkörpers (Tabelle 4.14).

Fleischqualität

Im Mittelpunkt des Interesses standen die Beziehungen zwischen TATA – Box – Genotypen und Merkmalen der Fleischqualität. In dieser Population mit für alle Genotypen besetzten Klassen und ausreichendem Stichprobenumfang sollten eventuell vorhandene Effekte nachweisbar sein.

Tabelle 4.15: Effekte auf Merkmale der Fleischqualität in der Berlin – Bonner Ressourcepopulation sowie LSQ - Mittelwerte (\pm SE) für die Genotypen im Polymorphismus der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens (Versuch 6).

Merkmal	Effekte				Co-Vari- able	LSQ-Mittelwerte (\pm SE) für die TATA-Box-Genotypen		
	Familie	Saison	Ge- schlecht	TATA		AA	A-	- -
Marmo- rierung _{MI} (Punkte)	*	*	*	0,22	Mastend- masse	3,77 \pm 0,18	3,65 \pm 0,16	3,41 \pm 0,19
Farbe _{MI} (Opto-star)	*	*	*	0,08	Mastend- masse	68,0^a \pm 1,0	69,2^{a,b} \pm 0,8	70,5^b \pm 1,0
pH _{1MI}	n.s.	n.s.	n.s.	0,95	Mastend- masse	6,35 \pm 0,04	6,36 \pm 0,03	6,34 \pm 0,04
LF _{1MI} (mS/cm)	n.s.	*	*	0,90	Mastend- masse	3,44 \pm 0,08	3,47 \pm 0,07	3,45 \pm 0,08
pH _{2MI}	*	*	n.s.	0,43	Mastend- masse	5,53 \pm 0,02	5,51 \pm 0,01	5,51 \pm 0,02
LF _{2MI} (mS/cm)	*	n.s.	n.s.	0,71	Mastend- masse	3,55 \pm 0,23	3,76 \pm 0,20	3,63 \pm 0,24

*: signifikanter Einfluss ($p < 0,05$) n.s.: Einfluss nicht signifikant ($p > 0,05$)

^{a, b}: Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

Es konnten jedoch keinerlei Effekte des TATA – Box – Polymorphismus auf die untersuchten Fleischbeschaffenheitsmerkmale gesichert werden. Lediglich für das Merkmal Farbe des M. longissimus bestand ein tendenzieller Effekt ($p = 0,08$), der zu signifikant hellerer Fleischfarbe bei Schweinen mit homozygot mutierter TATA – Box im Vergleich zu denen mit der TATA – Box im Wildtyp führte. In allen anderen Merkmalen unterschieden sich die Mittelwerte zwischen den Genotypengruppen weder untereinander noch von den Werten, die von Hardge (1999) für die Gesamtpopulation mit 475 F₂ – Nachkommen beschrieben wurden.

4 Ergebnisse

4.2 Identifizierung potentieller Kandidatengensequenzen für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“

Ausgehend vom Fehlen eindeutiger Hypothesen zu Genen, die möglicherweise in den Pathogenesemechanismus der Erkrankung einbezogen sein können, war es erforderlich, potentielle Kandidatengene zu identifizieren. Das gewählte Verfahren der Differential Display/Reverse Transkriptase – PCR (DD/RT-PCR) ermöglicht die Darstellung von Genfragmenten als Momentaufnahme der Genexpression im untersuchten Gewebe. Durch den Vergleich von Proben gesunder und erkrankter Tiere können Fragmente ausgewählt werden, die in Assoziation mit dem Krankheitsbild auftreten, fehlen oder mengenmäßig differieren. Damit kann letztendlich eine Arbeitsgrundlage für sich anschließende Kandidatengenanalysen geschaffen werden.

4.2.1 Identifizierung von merkmalsassoziiert exprimierten Fragmenten durch Gelelektrophorese (Differential Display)

Während für die Erstellung der Erst-Strang cDNA aus der mRNA der vier Proben alle 12 zur Verfügung stehenden Downstream - Primer (D1 – D12) verwendet wurden, kam von den entsprechenden Upstream - Primern (U1 – U26) aus Kapazitätsgründen nur eine begrenzte Anzahl zum Einsatz (Tabelle 4.16). Aus den untersuchten Primerkombinationen ergeben sich somit 126 cDNA - Pools, die für jeweils 4 Probanden in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert wurden (504 Proben). In Abhängigkeit von den untersuchten Primerkombinationen variierte die Eignung der Präparationen für weitere Untersuchungen stark. Einige der D - Primer erbrachten in jeglicher Kombination mit den getesteten U - Primern Produktgemische, die nahezu keine differenzierbaren Banden aufwiesen bzw. durchweg durch eine hohe Hintergrundanfärbung gekennzeichnet waren. Aus diesem Grund wurde z. B. für dem Downstream - Primer D10 lediglich 4 Kombinationen mit Upstream-Primern getestet. Nach den in Abschnitt 3.2.7 erläuterten Kriterien

- eindeutig abgrenzbare Banden bei geringer Hintergrundfärbung
- Amplifikate in einem Größenbereich von scheinbar >100 bp – ca. 1000 bp und
- mindestens eine gleichstarke Bande über alle Spuren der gleichen Primerkombination

wurden 71 Primerkombinationen für weitere Analysen ausgewählt.

Tabelle 4.16: Getestete Primerkombinationen für die cDNA - Synthese aus mRNA des *Musculus biceps femoris* von gesunden und Spreizferkeln.

D-Primer Erststrang	in Kombination mit U-Primer (Zweitstrangsynthese)																										
	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	
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								
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	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												

In diesen Kombinationen wurden zwischen 8 und 23 visuell differenzierbare Banden gefunden. Rechnet man diese Werte auf eine vollständige Analyse (312 Primerkombinationen) hoch, ergibt sich somit ein Bereich von ca. 2.500 bis 7.200 distinkten Banden, die zwischen 17% und knapp 50% der vermuteten 15.000 in einem Gewebe exprimierten Gene (Liang & Pardee 1992) ausmachen. Aus den dargestellten Fragmenten kommen wiederum nur solche für weitere Untersuchungen in Frage, die aufgrund unterschiedlicher Intensität bzw. Vorhandensein in nur einer der Kategorien „gesund“ und „Spreizer“ als merkmalsassoziiert angesehen werden können. Etwa 50 solcher Banden konnten im untersuchten Material gefunden werden. Dabei war eine Häufung solcher Fragmente in Kombinationen mit bestimmten D - Primern zu finden (z. B. D1 und D2). Ein Beispiel für ein Polyacrylamid-Gel, in dem die entsprechenden Banden markiert sind, ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Demgegenüber wurden z. B. für alle 10 getesteten D7 – UX - Kombinationen keinerlei Banden identifiziert, die o.g. Kriterien erfüllten. Basierend auf der Hypothese, dass es sich beim Ausgrätschsyndrom um eine kompensatorische Hyperplasie handeln könnte (Bergmann 1976), wurde sich bei der Auswahl von weiter zu analysierenden Fragmenten auf solche konzentriert, die ausschließlich bzw. deutlich stärker bei den Spreizern gefunden wurden. Hintergrund ist dabei die Überlegung, dass bei kompensatorischen Prozessen im früh - postnatalen Bereich eine erhöhte metabolische Aktivität zu verzeichnen sein könnte, die sich wiederum in einer verstärkten Genexpression niederschlägt.

4 Ergebnisse

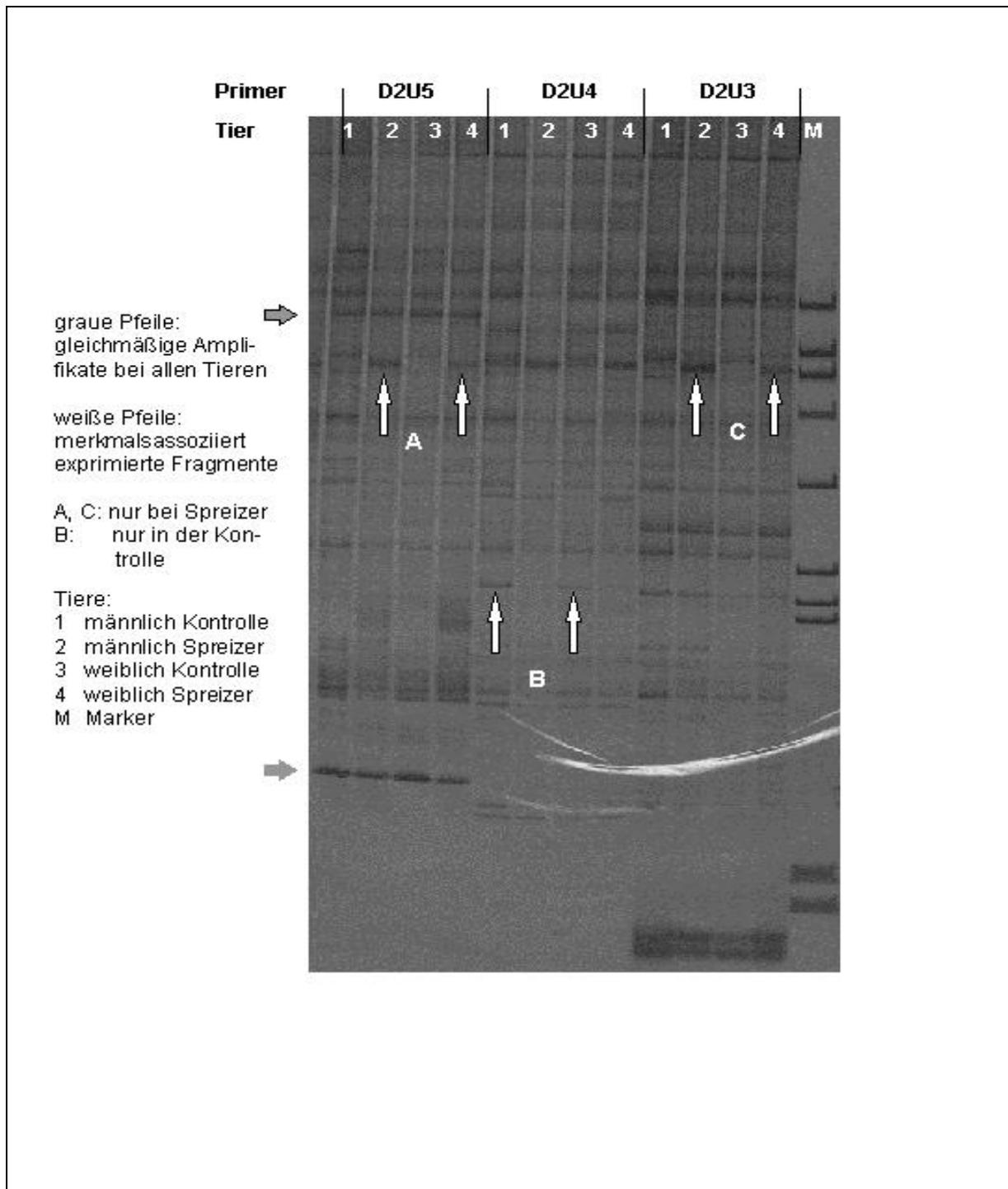


Abbildung 4.6: Beispiel für ein Polyacrylamid – Gel mit merkmalsassoziiert exprimierten Fragmenten (Differential Display; Erläuterungen siehe Text)

4.2.2 Charakterisierung von merkmalsassoziiert exprimierten cDNA-Sequenzen

Von 22 in die Analyse einbezogenen Fragmenten ließen sich 18 erfolgreich klonieren und sequenzieren. Zwei dieser Fragmente erwiesen sich als redundant, so dass letztendlich 16 cDNA-Fragmente isoliert wurden, die im Differential Display eine prominente Expression bei Spreizern aufwiesen (Tabelle 4.17). Die durchschnittliche Länge der sequenzierten Inserts variierte zwischen 135 bp und 433 bp und lag im Mittel bei 264 bp. Keins der isolierten Fragmente wies eine Homologie zu einem bereits für das Schwein beschriebenen Gen auf. Lediglich zwei Fragmente (AJ133891; AJ271016) waren homolog zu porcinen expressed sequence tags (ESTs). Diese ESTs wurden aus gepooltem embryonalen Gewebe bzw. Fettgewebe (Rückenspeck) isoliert. Vier Fragmente stellen Homologa zu bereits bekannten Genen bei Mensch und Rind dar. Das Fragment AJ278444 (ATP5I) enthält die vollständige kodierende Sequenz des entsprechenden Gens. Weitere Homologien wurden zu humanen, bovinen und murinen ESTs gefunden. Fünf der 16 Isolate wiesen keinerlei signifikante Ähnlichkeit zu bereits im Datenbank-System gespeicherten DNA-Sequenzen auf (Stand Mai 2001). Von den in Tabelle 4.17 dargestellten Fragmenten erschließen sich vor allem die mit charakterisierten Entsprechungen in anderen Spezies für weitere Untersuchungen. Im Falle der different exprimierten Fragmente betrifft das folgende Gene: TATA box binding protein associated factor (TAF1B), ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e (ATP5I), B cell CLL, lymphoma 7B (BCL7B) und cyclin - dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3). Aufgrund des merkmalsassoziierten Auftretens im Differential Display – Experiment werden diese Gene im weiteren als Kandidatengene für das Ausgrätschsyndrom betrachtet. Eine nähere Beschreibung der Funktion der jeweiligen Genprodukte wird in den entsprechenden Kapiteln der Diskussion vorgenommen. Die verbleibenden Kandidaten - cDNAs konnten wegen fehlender Informationen vorläufig nicht weiter bearbeitet werden.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.17: Ergebnisse der Homologiesuche in den Abteilungen „nr“, „dbest“ und „htgs“ des EMBL/GenBank - Systems für different exprimierte Fragmente im M. biceps femoris von gesunden und Spreizferkeln.

lfd. Nr.	GenBank/EMBL Accession No.	Primer	Länge (bp)	höchste Homologie zu: (Accession No.)	Homologie (%)	in bp	BLASTN E
1	AJ404882	D8U17	433	H S cyclin-dependent kinase inhibitor 3, CDKN3 (U02681)	86	131	7e-20
2	AJ278444	D2U16	300	B T ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e, ATP5I (M6475.1)	90	219	6e-72
3	AJ277993	D1U6	352	H S TATA box binding protein associated factor, TAF1B (L39061.1)	85	339	3e-74
4	AJ404881	D1U2	244	H S B cell CLL, lymphoma 7B, BCL7B (NM_001707.1)	93	238	4e-88
5	AJ133888	D3U12	280	B T expressed sequence tag (BE809482.1)	83	137	4e-11
6	AJ133890	D1U8	174	H S expressed sequence tag (AW968218.1)	82	168	4e-18
7	AJ133891	D1U6	175	S S expressed sequence tag (AW414679.1)	100	75	5e-34
8	AJ271016	D2U7	381	S S expressed sequence tag (AU059342.1)	97	181	9e-83
9	AJ271017	D4U7	135	B T expressed sequence tag (AW478526.1)	85	97	8e-14
10	AJ271018	D4U7	280	M M expressed sequence tag (BF134297.1)	91	176	1e-51
11	AJ271019	D6U13	208	H S expressed sequence tag (AC073520.6)	88	133	6e-28
12	AJ133887	D1U5	305	keine signifikante Homologie			
13	AJ133889	D1U8	191	keine signifikante Homologie			
14	AJ271011	D1U6	349	keine signifikante Homologie			
15	AJ271012	D1U6	166	keine signifikante Homologie			
16	AJ271015	D2U16	257	keine signifikante Homologie			

4.2.2.1 TATA box binding protein associated factor (TAF1B - Gen)

Dieses Gen kodiert für einen humanen Transkriptionsfaktor (Comai et al. 1994) und wurde bislang weiterhin für Maus und Fruchtfliege beschrieben. Das isolierte porcine Fragment von 352 bp Länge wies in einem Bereich von 339 bp eine Homologie von 85% zum humanen Genfragment auf. Die Homologie zum entsprechenden murinen Gen liegt bei 84%, erstreckt sich jedoch nur über einen Bereich von 165 bp. Für die Maus ist im Gegensatz zum Menschen die vollständige kodierende Sequenz bekannt. Informationen zur genomischen Struktur des Gens liegen bislang zu keiner Spezies vor. Das isolierte porcine Fragment enthielt einen offenen Leserahmen von 351 Basen, der zu der in Abbildung 4.7 dargestellten Aminosäuresequenz übersetzt wurde. Die Homologie beträgt 81% zum humanen TAF1B – Protein. Trotz der hohen Homologie gelang es nicht, heterologe Primer abzuleiten, die eine erfolgreiche Amplifizierung größerer Abschnitte des porcinen TAF1B – Gens ermöglichten.

hTAF1B	111	CEGFQYILYQ	QAEALKNLGV	GPELKNDVLH	NFWKRYLQKS	150
pTAF1B	-3	---**H**C*	*****QT***	*****DE***	*****	37
hTAF1B	151	KQAYCKNPVY	TTGRKPTVLE	DNLSHSDWAS	EPELLSDVSC	190
pTAF1B	38	*****H	*SR**T****	**P*****D*	*****F**	77
hTAF1B	191	PPFLESGAES	QSDIHTRKPF	PVSKASQSET	SVCSGSLDGV	230
pTAF1B	78	**IC*****	*P*V**Q***	RII***H***	*****	117

Abbildung 4.7: Vergleich der partiellen Proteinsequenzen des humanen und porcinen TAF1B – Gens. Sterne bezeichnen identische Aminosäuren. Die Nummern der Aminosäuren beziehen sich auf die jeweiligen GenBank/EMBL – Einträge.

Auf der Basis des porcinen Fragmentes wurden interne Primer für dessen chromosomale Zuordnung abgeleitet.

4.2.2.2 ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e (ATP5I - Gen)

Ein 300 bp langes PCR – Produkt aus der Primerkombination D2U16 wies eine 90%ige Homologie mit dem Gen für die ATP-Synthase (subunit e) des Rindes auf.

Eine vergleichende Sequenzanalyse ergab, dass die porcine cDNA-Sequenz aus den vollständigen Kodons sowie Teilen des 5'- bzw. 3'- nichttranslatierten Bereiches des Gens besteht. Auf der Ebene der kodierenden DNA lag die Homologie zur bovinen und zur humanen Sequenz bei 91% bzw. 89%. Weitere cDNA – Sequenzen liegen für Goldhamster, Ratte, Maus, Huhn und Drosophila vor.

4 Ergebnisse

hATP5I	GGGCTTGTGC	GGCATCCTGC	TCCGTCTGCA	GGTTGTGCTT	CCGGTGCGGA	50
pATP5I					GA	2
bATP5I			TCC	TCTTGGGCTT	CCGGCGCGAG	23
hATP5I	GGTCATGGAC	AAAATGGTGC	CACCGGTGCA	GGTCTCTCCG	CTCATCAAGC	100
		M V P	P V Q	V S P	L I K L	
pATP5I	TCCACGTACA	AGAATGGTGC	CGCCGGTGCA	GGTCTCTCCG	CTCATCAAGC	52
bATP5I	GGTCACGGAC	AGTATGGTTC	CGCCGGTGCA	GGTCTCTCCG	CTCATCAAGC	73
hATP5I	TCGGCCGCTA	CTCCGCCCTG	TTCCTCGGTG	TGGCCTACGG	AGCCACGCGC	150
	G R Y	S A L	F L G	<u>V/M</u> A Y G	A <u>K/T</u> R	
pATP5I	TCGGCCGCTA	TTCCGCCCTG	TTCCTCGGTG	TGGCCTACGG	AGCCAAGCGC	102
bATP5I	TCGGCCGTTA	CTCCGGCCTG	TTCCTCGGCA	TGGCCTACCG	CGCCAAGCGC	123
hATP5I	TACAATTACC	TAAAACCTCG	GGCAGAAGAG	GAGAGGAGGA	TAGCAGCAGA	200
	Y N Y L	K P R	A E E	E R R	<u>I/L</u> A A E	
pATP5I	TACAATTACC	TGAAACCCCG	GGCAGAAGAG	GAGAGGAGGA	TAGCAGCTGA	152
bATP5I	TACAATTACC	TGAAACCTCG	GGCAGAAGAG	GAGAGGAGGC	TTGCAGCCGA	173
hATP5I	AGAGAAGAAG	AAGCAGGATG	AACTGAAACG	GATTGCCAGA	GAATTGGCAG	250
	E K K	K <u>Q/RD</u> E	<u>L/QK</u> R	I <u>E/A</u> R	E L A E	
pATP5I	GGAGAAGAAG	AAGCAGGATG	AGCTGAAGCG	CATCGAGCGA	GAACTGGCAG	202
bATP5I	GGAGAAGAAG	AAGCGGGATG	AGCAGAAGCG	CATCGAGCGG	GAGCTGGCGG	223
hATP5I	AAG-----A	TGACAGCATA	TTAAAGTGAG	TGACCCTGCG	ACCCACTCTT	294
	<u>A/-Q/-E/D</u>	D <u>S/T/T/I</u> L	K STOPP			
pATP5I	AAGCCCAAGA	AGACAGCACA	TTAAAGTGAG	CCCCCCTTTT	TCCAGAGCAG	252
bATP5I	AAGCCCAAGA	GGATACCATA	TTGAAGTGAG	CCTGCCCTTC	TCCTGAGCAG	273
hATP5I	--TGGACCAG	CAGCGGATGA	ATAAAGCTTC	-CTGTGTTGT	GTGAT	336
						300
pATP5I	-GTGGACGTG	GACA-----A	ATAAAGCTTT	-CTGTGCTAT	GCGAAAAAAAA	AAAA
bATP5I	TGTGGATG--	-----A	ATAAAG -TTT	TCTGTGCTCT	GTAAAAAAAAA	AAAA
						317

Abbildung 4.8: Vergleich der porcinen ATP5I cDNA mit den entsprechenden humanen und bovinen Sequenzen (Maak et al. 2001a; Erläuterungen befinden sich im folgenden Text).

Ein Vergleich der porcinen Sequenz mit denen von Rind und Mensch ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Start- und Stoppkodons sind in allen Sequenzen unterstrichen, die Stoppkodons sind zusätzlich kursiv. Das Poly-A-Signal ist fett markiert. Eine Übersetzung der cDNA in entsprechende Aminosäuren ist oberhalb der porcinen Sequenz angegeben. Dabei sind Aminosäureunterschiede zwischen humanen und porcinen Gen mit Rahmen umgeben, wogegen die Unterschiede zwischen Schwein und Rind unterstrichen sind. Vertikale Striche kennzeichnen identische Nukleotide. Fehlende Basen bzw. Aminosäuren sind durch horizontale Linien dargestellt. Das porcine Protein ist analog zum Rind 71 Aminosäuren lang, während die humane ATP-Synthase (subunit e) aus 69 Aminosäuren besteht. Die Identität des porcinen Proteins sowohl mit dem des Rindes als auch dem des Menschen beträgt 91%. Informationen zur genomischen Struktur dieses Gens liegen für keine Spezies vor. Auch für dieses Gen wurden die Kartierungs – Primer aus dem vorliegenden Fragment abgeleitet

4.2.2.3 B cell CLL, lymphoma 7B (BCL7B - Gen)

Ein 244 bp langes, nur bei Spreizerferkeln gefundenes Fragment war hoch homolog zu einem humanen Gen (BCL7B; 93 % auf 238 bp) mit unbekannter Funktion. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen (1999/2000) war lediglich die cDNA dieses Gens beim Menschen beschrieben (NM_001707.1). Im Zuge der Fortschritte bei der Sequenzierung des humanen Genoms wurden zunehmend cDNAs in entsprechende große genomische Fragmente (Contigs) eingeordnet und damit Erkenntnisse über die vermutliche Exon/Intron - Architektur der Gene gewonnen. Mit dem Beginn des Jahres 2001 wurde dazu eine spezielle Datenbank eingerichtet (AceView; URL 5). Anhand dieser Daten kann man über Homologieschlüsse die potentielle genomische Organisation der isolierten Fragmente ableiten.

Tabelle 4.18: Genomische Struktur des humanen BCL7B – Gens und Einordnung des porcinen Fragmentes

Exon/Intron	Länge (bp)	porcine cDNA
partiell Exon 1	129 (37 bp 5'-UTR und 92 bp kodierend)	
Intron 1	5.244	
Exon 2	76	
Intron 2	8.522	
Exon 3	97	
Intron 3	3.495	
Exon 4	171	
Intron 4	1.868	
Exon 5	80	
Intron 5	543	
partiell Exon 6	578 (93 bp kodierend und 485 bp 3'-UTR)	244 bp des 3' - UTR

4 Ergebnisse

Für das porcine BCL7B-Fragment konnte so festgestellt werden, das es ausschließlich im 3'-UTR des Gens lokalisiert ist. Tabelle 4.18 enthält die genomische Struktur des humanen BCL7B – Gens sowie die Einordnung des entsprechenden porcinen cDNA-Fragmentes.

Versuche, die vollständige cDNA des porcinen Gens mittels heterologer Primer zu amplifizieren waren nicht erfolgreich. Für die chromosomale Zuordnung des Fragments wurden demzufolge interne Primer in der porcinen cDNA abgeleitet.

4.2.2.4 Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3 - Gen)

cDNA - Sequenz

Bei der Untersuchung einer differentiellen Bande (stärker bei Spreizer, Abbildung 4.9) aus der Primerkombination D8U17 wurden in mehreren Klonen dieses Fragments teilweise übereinstimmende Sequenzen in der Länge von 301 bis 443 bp erhalten, die in Abschnitten bis zu 86% homolog zum humanen CDKN3 - Gen (GenBank/EMBL Accession No. U02681) waren. Auf der Basis der vollständig vorhandenen kodierenden Sequenz des menschlichen Gens wurden heterologe Primer abgeleitet (Tabelle 3.9), mit deren Hilfe die kompletten Kodons für das entsprechende Gen beim Schwein ermittelt werden konnten. In diesem Bereich betrug die Homologie zwischen beiden Spezies 89%. Die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 4.10 dargestellt und stimmen zu 91,5% überein. Beide Gene kodieren ein Protein von jeweils 212 Aminosäuren.

hCDKN3	1	MEPPSSIQTS	EFDSSDEEPI	EDEQTPIHIS	WLSLSRVNCS	QFLGLCALPG
pCDKN3	1	*****	*****	*****Q**	**P*****Y*	*****
hCDKN3	51	CKFKDVRRNV	QKDTEELKSC	GIQDIFVFCT	RGELSKYRVP	NLLDLYQQCG
pCDKN3	51	*****I	*****	***V*****	*****	*****H*Y*
hCDKN3	101	IITHHHPIAD	GGTPDIASCC	EIMEELTTCL	KNYRKTLI <u>HC</u>	<u>YGGLGR</u> SCLV
pCDKN3	101	*****P*	**A*****	*****EI**	Q*N***** <u>**</u>	*****
hCDKN3	151	AACLLLYLSD	TISPEQAIDS	LRDLRGSGAI	QTIKQYNYLH	EFRDKLAAHL
pCDKN3	151	*****	*V**Q*****	*****	*****	*****
hCDKN3	201	SSRDSQRSV	SR	212		
pCDKN3	201	***E*L***	**	212		

Abbildung 4.10: Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen und porcinen CDKN3 – Gene. Sterne stehen für identische Aminosäuren. Der katalytische Kernbereich des Gens ist unterstrichen. Konservierte Aminosäuren in diesem Element (Hannon et al. 1994) sind fett dargestellt.

Insgesamt 52 Basendifferenzen sind im kodierenden Bereich zu beobachten, von denen jedoch nur 22 zur Veränderung von 17 Aminosäuren führen. Unter den 52 Unterschieden

befinden sich auch zwei im hochkonservierten Bereich eines katalytischen Motivs im porcinen Gen, die jedoch als stille Mutationen keine Auswirkungen auf dessen Aminosäuresequenz haben. Für das humane Gen ist ein Einzelbasen – Austausch (single nucleotide polymorphism, SNP) dokumentiert (TCT -> TTT), der im Exon 7 zu einem Aminosäureaustausch (Ser -> Phe) führt (Sunyaev et al. 2000).

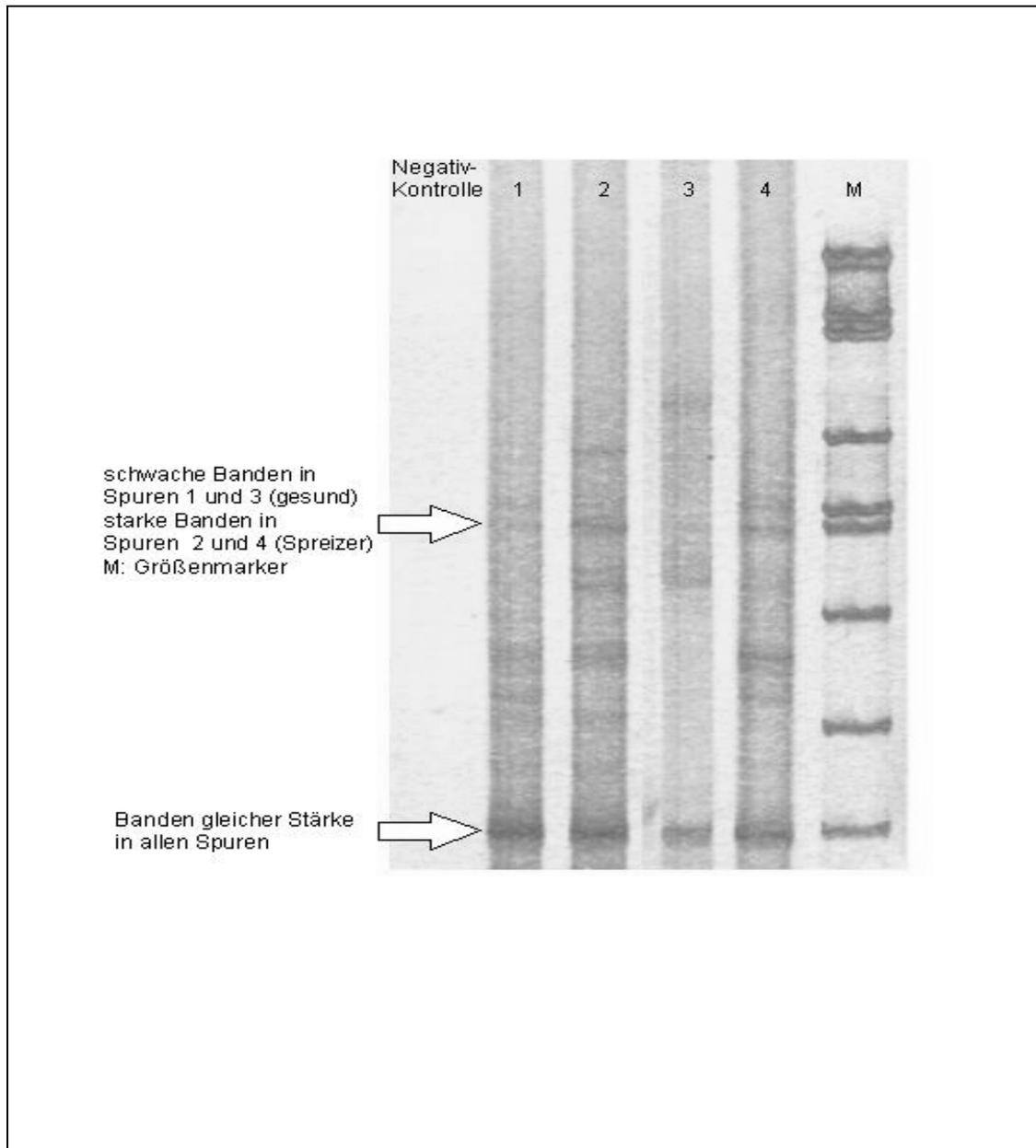


Abbildung 4.9: Differentielles Display von Banden mit der Primerkombination D8U17. Die markierte, merkmalsassoziiert auftretende Bande (oberer Teil) erwies sich als homolog zum humanen CDKN3 – Gen.

4 Ergebnisse

Genomische Organisation

Da sich bereits bei der Analyse der Bande aus dem Differential Display mehrere, nur partiell übereinstimmende cDNA – Sequenzen für das porcine CDKN3 – Gen ergaben, wurde versucht, das Gen auf genomischer Ebene zu charakterisieren. Zum Untersuchungszeitpunkt (1999/2000) lagen noch keinerlei Daten zur genomischen Struktur des CDKN3 – Gens vor. Jedoch existierte eine genomische Rohsequenz vom humanen Chromosom 14 (AL049778), die die vollständige cDNA des humane CDKN3 – Gens enthielt. Auf der Basis dieser genomischen Sequenz wurde die vermutliche Exon-Intron-Architektur des humanen Gens abgeleitet (Tabelle 4.19). Unter der Annahme einer identischen genomischen Organisation des porcinen Gens wurden Primer abgeleitet, die jeweils ein Intron überspannten (Tabelle 3.10) und somit die genomische Sequenz dieses Gens beim Schwein ermittelt.

Tabelle 4.19: Genomische Struktur des humanen (obere Zeile) und porcinen (untere Zeile) CDKN3 - Gens. Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf die GenBank Einträge L27711(hCDKN3) und AJ404882 (pCDKN3).

3' – Spleiß – Akzeptor-Sequenz		Exon No.	cDNA Nukleotid No.	Exon länge (bp)	5' – Spleiß – Donor-Sequenz		Intron (bp)
Intron	Exon				Exon	Intron	
		1	<1 - 40	>40	AAGCCG/gtgagtcgga		2.400
		1	<1 - 24	>24	*****/*****g**g		2.328
tcttttgaag/CCCAGT		2	41 - 123	83	ATCATG/gtatgtagc		1.547
*****/*****		2	25 - 107	83	*****/*****ggac		1.602
ttcttttcag/GCTATC		3	124 - 179	56	TTCCAG/gtgggtaaca		7.165
*****/*****C*		3	108 - 163	56	*****/**a***c***		507
ttacttatag/GTTGTA		4	180 - 224	45	ATACAG/gtaggtataa		2.694
ac****c**/*****		4	164 - 208	45	*****/*****g***		2.651
ctattggcag/AAGAAC		5	225 - 447	223	AATACA/gtacgttctt		4.192
g*****/*****		5	209 - 431	223	*****/*****c		1.571
tccctttcag/CTGCTA		6	448 - 479	32	GTCTTG/gtaagaaata		1.917
*****/***T**		6	432 - 464	32	*****/*****		>2.036
gttccattag/TAGCTG		7	480 - 583	104	ATCAAG/gtgaggaggt		2.040
*****/*****		7	464 - 567	104	**A***/**a**tg*ca		1.455
cttttttcag/CAATAC		8	584 - 806	223			
*****/*****		8	568 - 805	238			

Alle Exon/Intron – Übergänge folgten der „gt – ag“ – Regel (Dibb & Newman 1989). Aufgrund von Problemen in der spezifischen Amplifizierung konnte ein Teil von ca. 300 bp des Introns 6 nicht sequenziert werden. Alle anderen Introns wurden vollständig sequenziert. (Tabelle 4.19). Für die Introns 1, 2 und 4 wurden bei Mensch und Schwein nahezu identische Längen ermittelt, wogegen Introns 3 und 5 beim Menschen und Intron 6 beim Schwein deutlich länger als bei der jeweils anderen Spezies sind.

Tabelle 4.20: Homologe Abschnitte im porcinen (AJ404883 und 404884) und humanen (NT_010084) CDKN3 - Gen

lfd. Nr.	homologer Abschnitt (bp)	Homologie (%)	Lokalisation in der porcinen genomischen Sequenz
1	24	>84	partiell Exon 1 (24 bp)
2	132	84	Intron 1
3	127	81	Intron 1
4	176	75	Intron 1
5	63	85	Intron 1
6	513	80	Intron 1, komplettes Exon 2 (83 bp), Intron 2
7	117	83	Intron 2
8	107	83	Intron 2
9	50	90	Intron 2
10	76	84	Intron 2
11	92	81	Intron 2
12	89	88	Intron 2, komplettes Exon 3 (56 bp), Intron 3
13	288	75	Intron 3
14	233	84	Intron 3, komplettes Exon 4 (45bp), Intron 4
15	233	81	Intron 4
16	177	77	Intron 4
17	50	88	Intron 4
18	77	79	Intron 4
19	299	88	Intron 4, komplettes Exon 5 (223 bp), Intron 5
20	96	82	Intron 5
21	122	76	Intron 5
22	87	79	Intron 5
23	299	82	Intron 5, komplettes Exon 6 (32 bp), Intron 6
24	149	85	Intron 6
25	211	78	Intron 6
26	52	90	Intron 6
27	158	75	Intron 6
28	81	82	Intron 6
29	68	83	Intron 6
30	117	86	Intron 6, komplettes Exon 7 (104 bp), Intron 7
31	58	87	Intron 7
32	285	85	Intron 7, partiell Exon 8 (238 bp)

4 Ergebnisse

Unter dem Eintrag für das CDKN3 – Gen des Menschen in der Datenbank AceView (URL 5) ist bislang ein unvollständiges cDNA-Fragment fehlerhaft zum genomischen Contig zugeordnet (Stand Mai 2001). Dadurch ist das Intron 1 scheinbar nicht vorhanden. Die eigenen experimentellen Daten zum porcinen Gen und eine manuelle Zuordnung der humanen Sequenzen beweisen jedoch dessen Existenz. Die bereits beschriebene hohe Homologie auf cDNA - Ebene variiert zwischen 97.6% (Exon 2) und 82.3% (Exon 8, welches auch die 3'- UTR des Gens enthält). Im Gegensatz zum hCDKN3 – Gen enthält das porcine Gen einen Poly (A) - Strang, der bei den 4 untersuchten Probanden einen diallelen Längenpolymorphismus aufweist (14 bzw. 15 Adenosinreste). Wie in Tabelle 4.20 dargestellt, sind auch in den Introns beider Gene Bereiche mit hoher Ähnlichkeit zu finden, die von Baumgartner et al. (1999) auch für ein anderes Gen (Proteolipidprotein – Gen) beschrieben wurden. Ein in Intron 2 des menschlichen Gens vorhandener Mikrosatellit (GA₁₃) findet keine Entsprechung im porcinen Gen.

Außerhalb dieser homologen Bereiche in den Introns wurden in vier der sieben Introns repetitive Sequenzen, die eine 85 – 94%-ige Ähnlichkeit mit einem SINE - Motiv (single interspersed nucleotide element) PRE 1 (Yasue & Wada 1996) aufweisen (Tabelle 4.21), in unterschiedlicher Orientierung identifiziert.

Tabelle 4.21: SINEs im porcinen CDKN3 – Gen (Die Homologie bezieht sich auf die von Yasue & Wada [1996] beschriebene Konsenssequenz für das porcine SINE PRE-1).

lfd. Nr.	Länge (bp)	Homologie (%)	Lokalisation in der porcinen genomischen Sequenz
1	204	85	Intron 2, komplementärer Strang
2	36	94	Intron 4
3	222	86	Intron 5
4	92	86	Intron 6
5	220	87	Intron 6

Weitere Sequenzabschnitte der Introns ähneln einer Gruppe von repetitiven Elementen, die als L1-Elemente bezeichnet werden (Kazazian 2000). Einzelne 20 – 50 bp lange Abschnitte in den Introns weisen Homologien von bis zu 100% zum entsprechenden Segment der humanen Introns auf, was nach Baumgartner et al. (1999) eine funktionelle Bedeutung dieser Elemente – möglicherweise bei der Regulation der Gentranskription – nahe legt.

Expression in verschiedenen Geweben

Eine Expression des Gens ist in zahlreichen humanen Geweben nachgewiesen worden (URL 2). In den eigenen Untersuchungen konnte mittels Reverser Transkription die Expression des porcinen Gens qualitativ in Skelettmuskulatur sowie Leber, Niere, Herz und Dünndarm von neugeborenen Ferkeln demonstriert werden (Abbildung 4.11). Eine Quantifizierung der Genexpression erfolgte bislang nicht.

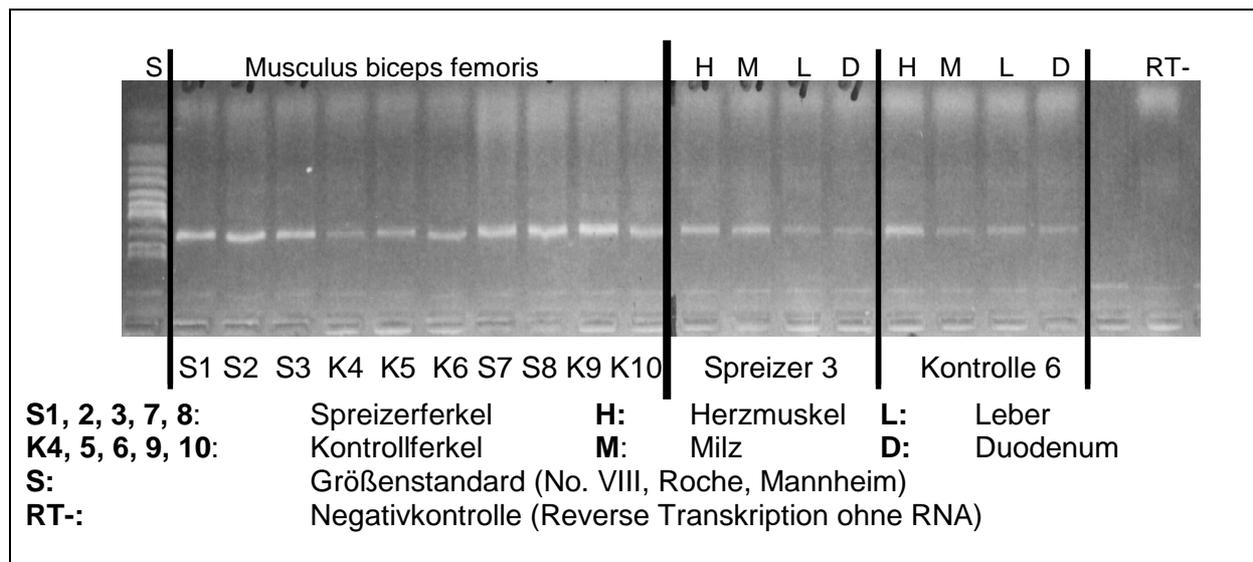


Abbildung 4.11: Nachweis der Expression des CDKN3 – Gens in verschiedenen Geweben mittels RT – PCR.

Transkriptvarianten

Bei der PCR – Amplifizierung der CDKN3 – cDNA mit Primern, die die Exons 1 bis 8 (und damit nahezu die vollständige kodierende Sequenz) amplifizieren, traten wiederholt neben der erwarteten Bande von 622 bp zusätzliche, kürzere Banden im Agarosegel auf. Die Sequenzierung dieser Banden ergab, dass es sich um spezifische PCR – Produkte handelte. Durch die Ermittlung der Exon/Intron – Struktur des porcinen CDKN3 – Gens (Tabelle 4.19) war es möglich, die Veränderungen zu den entsprechenden Exons zuzuordnen (Abbildung 4.12a - c).

4 Ergebnisse

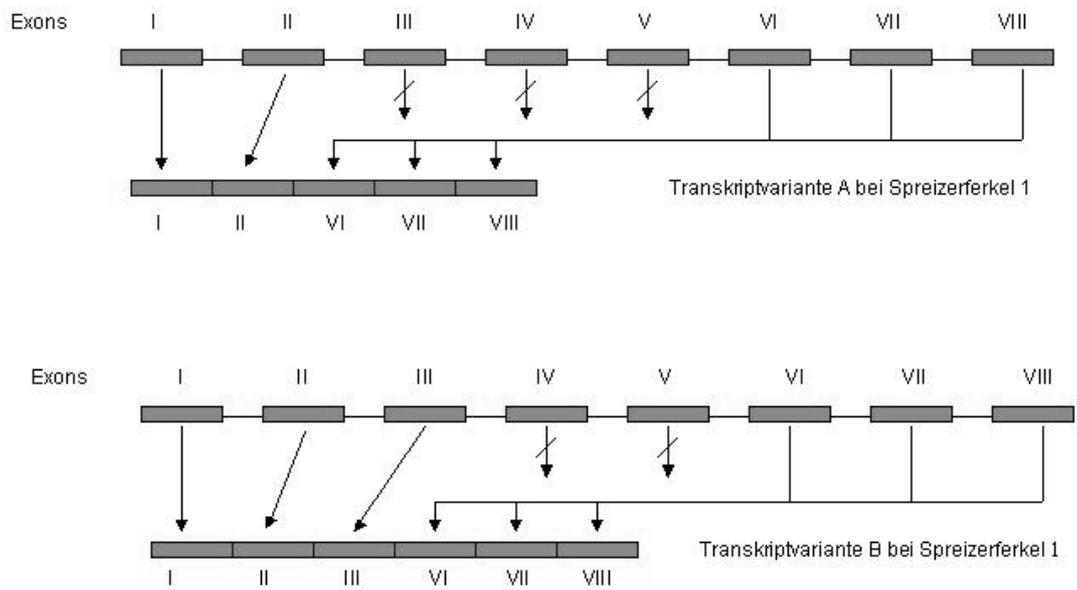


Abbildung 4.12a: Beobachtete Transkriptvarianten des CDKN3 – Gens bei einem Spreizerferkel

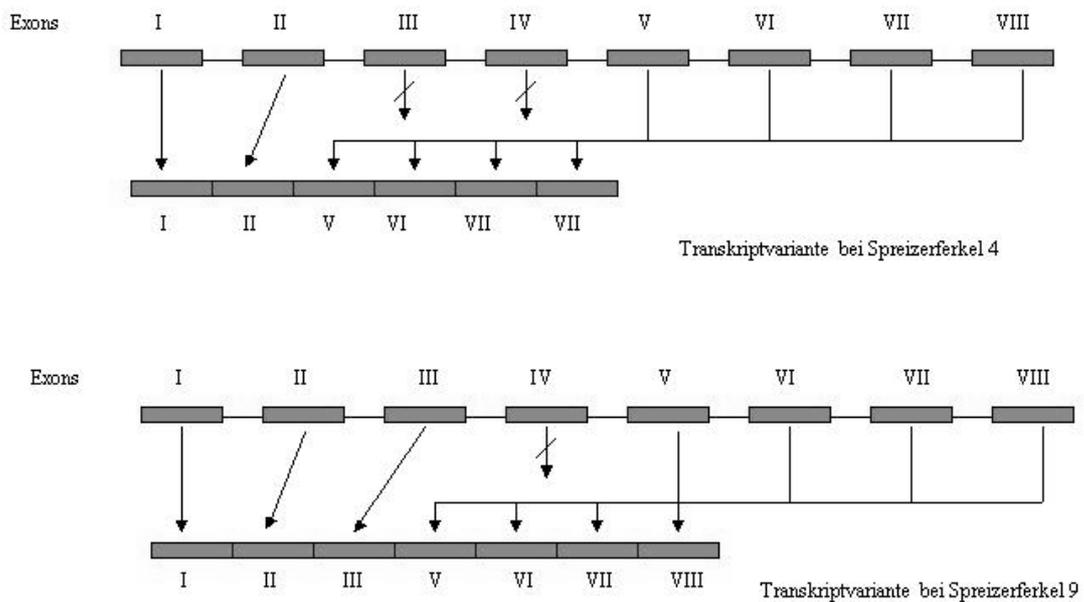


Abbildung 4.12b: Beobachtete Transkriptvarianten des CDKN3 – Gens bei zwei Spreizerferkeln

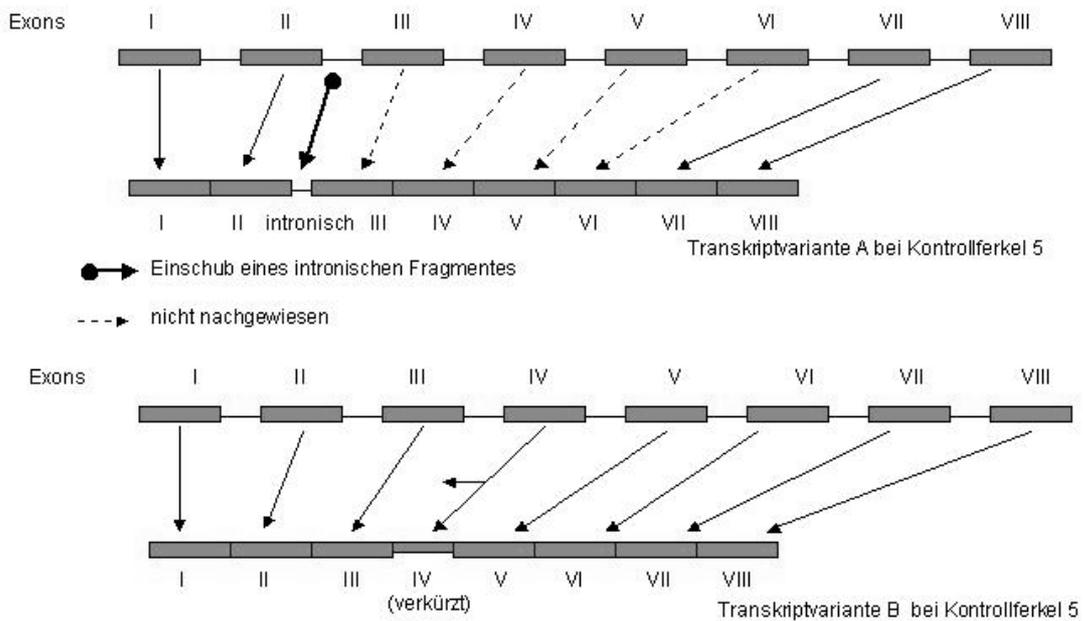


Abbildung 4.12c: Beobachtete Transkriptvarianten bei einem gesunden Ferkel

Eine Übersetzung dieser cDNAs in Proteine führte zu insgesamt 6 Varianten (Abbildung 4.13). Von diesen 6 Proteinvarianten wurden 4 bei 3 untersuchten Spreizerferkeln und 2 bei einem von 3 untersuchten Kontrolltieren gefunden. Bis auf eine Variante (S1A) führten alle Veränderungen in der cDNA letztendlich zu vorzeitigen Stoppkodons und damit zum Abbruch der Proteinsynthese.

Im einzelnen traten folgende Varianten auf:

- Spreizerferkel 1 (S1A):
Eine vollständige Deletion der Exons III, IV und V führt zu keiner Verschiebung des Leserasters. 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).
- Spreizerferkel 1 (S1B):
In einer weiteren Sequenz, die von dem oben beschriebenen Tier ermittelt wurde, sind die Exons IV und V deletiert. Durch den direkten Anschluss von Exon VI an Exon III entsteht ein verschobenes Leseraster ab der Deletionsstelle. Nach 11 Kodons für unspezifische Aminosäuren wird ein Stoppkodon abgelesen und die Aminosäurekette bricht ab.

4 Ergebnisse

- Spreizerferkel 4 (S4A):
In der Sequenz, die für dieses Tier ermittelt wurde, fehlen die Exons III und IV. Durch die Verbindung von Exon II mit Exon V wird direkt an der Verbindungsstelle ein Stoppkodon gebildet. Das entstehende Protein ist hier lediglich 30 Aminosäuren lang.
- Spreizerferkel 9 (S9A):
Bei dieser Variante führt die Deletion des vollständigen Exons IV zu einer Verkürzung des entstehenden Produktes auf 197 Aminosäurereste. Es entstehen weder Verschiebungen im Leseraster noch Veränderungen im katalytischen Zentrum.
- Kontrollferkel 5 (K5A):
Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Veränderungen wurde bei diesem Tier ein Sequenzeinschub beobachtet. Unmittelbar an die ersten beiden Exons schließt sich ein mindestens 77 bp langer Abschnitt an, der zu 100% mit der in Intron 2 desselben Gens gefundenen SINE – Sequenz übereinstimmt, an. Die Sequenzierung dieses Fragmentes vom 3'- Ende zeigte das Vorhandensein weiterer unveränderter Exons des Gens. Durch den Sequenzeinschub in das reguläre Leseraster werden zunächst weitere 50 Aminosäuren kodiert, bevor ein Stoppkodon auftritt. Das entstehende Produkt von 80 Aminosäuren ist jedoch nur noch zu 41% identisch mit dem entsprechenden Abschnitt des pCDKN3 – Gens.
- Kontrollferkel 5 (K5B):
Eine weitere Sequenz dieses Tiers war durch den Verlust von 47 bp aus dem Exon VI gekennzeichnet. Dies stellte den einzigen beobachteten Fall dar, in dem Fragmente innerhalb eines Exons fehlten. Somit ergab sich ab der Position 5 nach der letzten Aminosäure des katalytischen Kerns eine veränderte Sequenz von 21 Aminosäureresten, bevor ein Stoppkodon zum Syntheseabbruch führt.

In allen Fällen wurden für die von den Veränderungen betroffenen Tieren auch Sequenzen gefunden, die der porcinen Konsenssequenz in voller Länge entsprachen. Bei den Probanden 1, 5 und 9 wurden des weiteren Sequenzveränderungen gefunden, die in insgesamt zwei Aminosäureaustausche münden (aa 39: Tyr => Cys bei Tier 1 und 9; aa 50: Gly => Arg bei Tier 1 und 5).

```

CDKN3  1  MKPPSSIQTS  EFDSSDEEPI  EDEQTPIQIS  WLPLSRVNYS  QFLGLCALPG
S1A    1  *****    *****    *****    ////////////////
S1B    1  *****    *****    *****    *****C*  *****A
S4A    1  *****    *****    *****    #
S9A    1  *****    *****    *****    *****C*  *****/
K5A    1  *****    *****    *****    CAAPAAYS*  *ARDQTG TSA
K5B    1  *****    *****    *****    *****    *****

CDKN3  51  CKFKDVRNRI  QKDTEELKSC  GIQDVVFVCT  RGELSKYRVP  NLLDLYHQYG
S1A    51  ////////////////
S1B    51  VTEDLGDLVL  #
S4A
S9A    51  ////////////////  //*****
K5A    51  ASLHHSTIKF  *IPRLFWRNL  EEISKKIQKN  #
K5B    51  *****    *****    *****    *****    *****

CDKN3  101 IITHHHPIPD  GGAPDIASCC  EIMEELEICL  QNNRKTLIHC  YGGLGRSCLV
S1A    101 ////////////////
S1B
S4A
S9A    101 *****    *****    *****    *****    *****
K5A
K5B    101 *****    *****    *****    *****    *****A

CDKN3  151 AACLLLYLSD  TVSPQQAIDS  LRDLRGSGAI  QTIKQYNYLH  EFRDKLAAHL
S1A    151 *****    *****    *****    *****    *****
S1B
S4A
S9A    151 *****    *****    *****    *****    *****
K5A
K5B    151 GHRQPERPER  VW*HTDHKAI  #

CDKN3  201 SSRESLSRSV  SR#
S1A    201 *****    **#
S1B
S4A
S9A    201 *****    **#
K5A
K5B

```

*: identische Aminosäuren

#: vorzeitiges Stoppkodon

#: Stoppkodon

/: fehlende Aminosäuren

fett: katalytische Kernsequenz

Abbildung 4.13: Resultierende Polypeptide aus veränderten Transkripten des porcinen CDKN3 – Gens bei Spreizerferkeln (S1, S4 und S9) sowie einem Kontrollferkel (K5)

4 Ergebnisse

4.2.3 Isolierung und Charakterisierung weiterer cDNA - Fragmente (expressed sequence tags, ESTs) aus dem M. biceps femoris neugeborener Ferkel

Im Zuge der Reamplifizierung der isolierten, merkmalsassoziierten Fragmente unter veränderten PCR-Bedingungen (z.B. veränderte cDNA – Mengen) wurden mehrfach unspezifische Produkte erzeugt. Diese Amplifikate entstammen den cDNA - Pools aus den Primerkombinationen, die in Tabelle 4.17 aufgelistet sind. Eine differentielle Expression dieser Fragmente muss nicht angenommen werden, jedoch stellen diese Fragmente expressed sequence tags (ESTs) aus der Skelettmuskulatur neugeborener Ferkel dar. Insgesamt 10 solcher Produkte sind in Tabelle 4.22 zusammengefasst. In sieben Fällen wurden Homologien zu humanen Genen gefunden. Weiterhin bestand Homologie zwischen einem der Fragmente und einem porcinen EST aus einer embryonalen Gewebe – Bibliothek, während die verbleibenden 2 cDNAs keine Entsprechung zu Datenbanksequenzen hatten. Aufgrund der geringen Kenntnisse zu Genen, die in der Skelettmuskulatur von (neonatalen) Schweinen exprimiert werden, wurden diese Fragmente sowohl in das EMBL/GenBank – System eingestellt, als auch teilweise charakterisiert und chromosomal zugeordnet. Da auf diese – nicht notwendigerweise differentiell exprimierten Gene – im weiteren Verlauf nicht eingegangen wird, erfolgt an dieser Stelle eine kurze Beschreibung zur Funktion der Genprodukte.

4.2.3.1 Pyruvate kinase dehydrogenase, isoenzyme 4 (PDK4 – Gen)

Das Gen für PDK4 kodiert für ein Protein von 411 Aminosäuren, das ubiquitär exprimiert wird. Dabei wurde die höchste Expressionsrate in quergestreifter Muskulatur beobachtet (Rowles et al. (1996)). Subzellulär ist das Protein in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Die Autoren beschreiben als Funktion des Genproduktes die Hemmung des mitochondrialen Pyruvat – Dehydrogenase - Komplexes durch Phosphorylierung der e1 alpha - Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase und damit dessen Einbeziehung in den Regulationsmechanismus des Glukosemetabolismus. Diese Hemmung ist von Bedeutung für die Reaktion des Organismus auf Hungerperioden (Sugden et al. 2000, Wu et al. 2000). Das humane Gen erstreckt sich über eine Länge von über 11 kb und besteht aus 11 Exons. Das in den eigenen Untersuchungen isolierte Fragment korrespondiert auf 53 bp Länge mit Exon 3 und auf 170 bp mit Exon 4 des humanen Gens. Beide Exons sind beim humanen Gen durch ein 754 bp langes Intron getrennt. Für die chromosomale Zuordnung wurden interne Primer im porcinen Fragment abgeleitet. Das in porciner genomischer DNA erzeugte PCR-Produkt stimmt mit einer vermeintlichen Länge von ca. 900 bp gut mit dem entsprechendem Abschnitt des humanen Gens überein. Demzufolge ist das amplifizierte Intron beim Schwein von ähnlicher Länge wie das humane.

Tabelle 4.22: Identifizierung von Genen, die im M. biceps femoris neugeborener Ferkel exprimiert werden

lfd. Nr.	GenBank/EMBL Accession No.	Primer	Länge (bp)	höchste Homologie zu: (Accession No.)	Homologie (%)	in bp	BLASTN E
1	AJ279587	D1U6	223	H S pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4, PDK4 (NM_002612.1)	93	219	4e-84
2	AJ279590	D1U6	354	H S ribosomal protein S10, RPS10 (NM_001014.1)	90	346	1e-119
3	AJ279589	D1U6	257	H S SPARC-like1, SPARCL1 (NM_004684.1)	83	202	2e-27
4	AJ279582	D8U17	261	H S N-myc downstream regulated gene2, NDRG2 (NM_016250.1)	94	259	1e-108
5	AJ279581	D8U17	262	H S pleomorphic adenoma gene like2, PLAGL2 (NM_002657.2)	91	159	2e-50
6	AJ279591	D1U6	284	H S epithelial protein lost in neoplasm, EPLIN (NM_016357.1)	86	281	1e-63
7	AJ279583	D8U17	178	H S BCL-2 associated transcription factor, BTF (NM_014739.1)	96	178	6e-67
8	AJ279588	D1U6	335	S S expressed sequence tag (BE033234)	91	247	5e-79
9	AJ279580	D8U17	225	keine signifikante Homologie	-	-	-
10	AJ279584	D8U17	277	keine signifikante Homologie	-	-	-

4 Ergebnisse

Davoli et al. (1999) isolierten einen weiteren EST, der als porcines Homologon des PDK4-Gens identifiziert wurde, wobei dieser EST jedoch mit dem 3'-UTR des Gens korrespondiert und demzufolge keine Überlappung mit dem hier isolierten Fragment aufweist.

4.2.3.2 Ribosomal protein S10 (RPS10 – Gen)

Das ribosomale Protein S10 ist eins der Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit S40 beim Menschen und im Zytoplasma lokalisiert. In verschiedenen Organismen wird eine Einbeziehung der Proteine in die Bindung von tRNAs an die Ribosomen und damit in die Übersetzung von mRNAs in Proteine berichtet (Frigiero et al. 1995). Beim Menschen wird das Protein von einem aus 6 Exons bestehendem Gen kodiert. Die Gesamtlänge des Gens beträgt ca. 9 kb. Das porcine cDNA – Fragment ist homolog zu einem Teil des Exons 2, den Exons 3, 4, 5 sowie einem Teil des Exons 6 des humanen Gens. Die internen Primer für die chromosomale Zuordnung dieses Fragmentes beim Schwein sind in den Exons 3 und 4 verankert und überspannen ein Intron, das beim menschlichen Gen 3.343 bp lang ist. Aufgrund des verwendeten Molekulargewichtsmarkers kann für das porcine genomische Fragment keine genaue Größenabschätzung vorgenommen werden, jedoch ist das beobachtete PCR – Produkt deutlich größer als 2 kb. Demzufolge kann auch für das porcine Gen ein ähnlich großes Intron angenommen werden.

4.2.3.3 SPARC-like1 (SPARCL1 – Gen)

Dieses Gen (SPARC: **S**ecreted **P**rotein, **A**cidic, **R**ich in **C**ysteine) wird in ein Protein übersetzt, das zur Gruppe der antiadhäsiven, extrazellulären Matrixproteine gehört. Aufgrund seiner bevorzugten Expression in sogenannten "high endothelial venules; HEV" wurde als Name des Genproduktes auch "Hevin" abgeleitet. Als Funktion des Proteins wird eine Rolle bei der Induktion oder der Aufrechterhaltung der Eigenschaften des HEV-Endothels angenommen. Über diese Form des Endothels erfolgt die Migration von Lymphozyten (Girard & Springer 1995). Nach Brekken & Sage (2000) modulieren Proteine dieser Gruppe die zelluläre Interaktion mit der extrazellulären Matrix durch Bindung an strukturelle Matrixproteine wie Kollagen und Vitronectin. Die Expression des Gens in adulten Geweben ist auf Reparaturprozesse beschränkt (z.B. bei der Wundheilung). Die cDNA des SPARCL1 – Gens kodiert ein sezerniertes, saures, Calcium-bindendes Glycoprotein von 664 Aminosäuren, die von mindestens 6 Exons kodiert werden. Das Gen besitzt eine Gesamtlänge von ca. 38 kb. Das porcine Fragment ist ausschließlich im Exon 4 des humanen Gens lokalisiert, das sich über eine Länge von 1.017 bp erstreckt. Daraus erklärt sich auch, dass das porcine genomische PCR – Produkt längenmäßig dem Fragment aus der PCR mit cDNA entspricht.

4.2.3.4 N-myc downstream regulated gene2 (NDRG2 – Gen)

Für dieses Gen ist bislang noch keine Funktion bekannt. Es gehört jedoch offensichtlich zu einer hochkonservierten Genfamilie (Kalaydjieva et al. 2000). Die Autoren vermuten eine Rolle der Gene dieser Familie in der Zelldifferenzierung während des Entwicklungsprozesses und in der Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes der Zellen im adulten Organismus – möglicherweise als Signalprotein zwischen Zytoplasma und Zellkern. Das 357 Aminosäuren lange Protein wird durch 16 Exons, die in Ihrer Länge zwischen 36 bp und 167 bp variieren, kodiert. Das entsprechende porcine cDNA – Fragment enthält die Exons 11 (partiell), 12, 13, 14 und 15 (partiell). Das Primer für das genomische PCR – Produkt sind in den Exons 12 und 15 des Gens verankert und amplifizieren in porciner DNA ein Produkt von ca. 700 – 800 bp. Bezogen auf humane genomische DNA wäre ein Produkt von ca. 800 bp zu erwarten, so dass auch für dieses Gen eine ähnliche Exon/Intron – Struktur bei Mensch und Schwein anzunehmen ist.

4.2.3.5 Pleomorphic adenoma gene like2 (PLAGL2 – Gen)

PLAGL2 ist Bestandteil der Familie von sogenannten „zinc finger“ Proteinen, die vermutlich von mehr als 1000 verschiedenen Genen kodiert werden. Diesen RNA – und DNA – bindenden Proteinen wurde in zahlreichen Studien ein Einfluss bei der Entstehung von verschiedenen Tumoren nachgewiesen (Kas et al. 1998). Nach diesen Autoren ist die Expression des PLAGL2 – Gens beim Menschen auf fetale Gewebe beschränkt. Das PLAGL2 – Gen kodiert 564 Aminosäuren in 3 Exons. Das gesamte Gen weist eine Länge von ca. 15 kb auf. Das porcine cDNA - Fragment ist ausschließlich in der 3'- UTR lokalisiert, die im humanen Gen mit 3.946 bp angegeben ist. Demzufolge ist hier eine identische Länge von PCR – Produkten aus cDNA und genomischer DNA zu erwarten. So wurde in den eigenen Untersuchungen auch ein den Erwartungen entsprechendes genomisches Produkt von 128 bp erhalten.

4.2.3.6 Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN – Gen)

EPLIN kodiert ein zytosketales Protein und wird beim Menschen bevorzugt in Epithelzellen exprimiert (Maul & Chang 1999). Die Autoren beschreiben zwei Isoformen (alpha mit 600 Aminosäuren und beta mit 759 Aminosäuren), von denen die alpha-Isoform bei verschiedenen Tumoren negativ reguliert wird. Aus ein und dem selben Gen werden beide Isoformen durch zwei, voneinander unabhängige Promotoren transkribiert (Chen et al. 2000a). Das Gen erstreckt sich über 100 kb und besteht aus 11 Exons. Während für EPLIN – alpha das Startkodon in Exon 4 lokalisiert ist, befindet sich das für die beta – Isoform in Exon 2. Die Exons 9 und 10 kodieren eine LIM - Domain, ein etwa 55 Aminosäuren langes Cystein – reiches, konserviertes, Zink - bindendes Motiv. Das isolierte porcine Fragment

4 Ergebnisse

korrespondiert mit dem letztem Exon des humanen Gens, das mit mehr als 2 kb sehr lang ist und nahezu zwei Drittel der Kodons des Gens enthält (Chen et al. 2000a). Auch hier ergibt sich ein identischer Erwartungswert für die Länge der PCR – Produkte aus cDNA und genomischer DNA beim Schwein, der in dem entsprechendem Kartierungs – Experiment bestätigt werden konnte.

4.2.3.7 BCL-2 associated transcription factor (BTF – Gen)

In Zusammenhang mit Untersuchungen zu apoptosehemmenden Faktoren wurde von Kasof et al. (1999) ein neues Gen beschrieben, das als BTF – Gen bezeichnet wurde. Das Gen erstreckt sich über mehr als 30 kb und ist in 13 Exon gegliedert. Die Autoren identifizierten zwei Proteine, die 846 und 797 Aminosäuren lang sind (BTF und BTFs). In der kurzen Form des Proteins (BTFs) fehlten 49 Aminosäuren, die nach eigenen Analysen auf eine fehlende Transkription des Exons 11 (147 bp) zurückzuführen sind. Eine Überexpression dieses Gens führt zur Induktion der Apoptose, dem genetisch programmierten Zelltod. Aufgrund der experimentellen Daten nehmen die Autoren eine Rolle des Gens entweder bei der Blockade des Zellzyklus oder bei der Induktion der Apoptose an. Das identifizierte porcine Fragment enthält Teile der humanen Exons 5 und 6, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob das porcine Fragment mit der kurzen oder lange Form des humanen Proteins korrespondiert. Die Primer für die chromosomale Zuordnung sind dagegen beide im Exon 6 lokalisiert und amplifizieren ein identisches < 100 bp langes Fragment in cDNA bzw. genomischer DNA.

4.3 Chromosomale Zuordnung von isolierten Fragmenten durch Analyse von somatischen Zellhybridklonen (Physische Kartierung)

Die Zuordnung der Fragmente zu den Chromosomen und ihren Unterabschnitten (physische Kartierung) erfolgte unter Verwendung des von Yerle et al. (1996) entwickelten Schwein – Nager Somatischen Zellhybrid – Panels. Neben den vier Fragmenten mit Entsprechungen zu Genen bei anderen Spezies wurde versucht, die weiteren Fragmente mit Homologien zu expressed sequence tags (ESTs) zu mappen. Von den so in Frage kommenden 11 cDNAs konnten 8 erfolgreich zugeordnet werden (Tabelle 4.23). Für alle 8 cDNAs wurden Wahrscheinlichkeiten für eine korrekte Zuordnung zu den Chromosomen von 1,00 bzw. von $> 0,80$ für die Korrektheit der subchromosomalen Lokalisation erreicht. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten lagen in allen Fällen bei $p < 0,05$. Die potentiellen Kandidatengensequenzen sind demzufolge auf den Chromosomen 1, 3, 4, 8, 9 und X lokalisiert. Je zwei Fragmente konnten den Chromosomen 1 und 3, wenn auch auf unterschiedlichen Banden, zugewiesen werden. Mit chromosomalen Painting – Proben wurden von Goureau et al. (1996) homologe Bereiche zwischen humanen und porcinen Chromosomen identifiziert. Unter Einbeziehung weiterer Literaturinformationen sind diese Ergebnisse unter URL 5 verfügbar. Unter Zuhilfenahme dieser Ergebnisse wurden für die eigenen Mapping – Resultate die jeweils korrespondierenden Regionen im menschlichen Genom in der Tabelle 4.22 eingefügt. Für die 4 identifizierten Gene lagen Daten zu deren chromosomaler Lokalisation vor (URL 2). Neben der zytogenetischen Zuordnung sind im Zuge der Sequenzierung des humanen Genoms für alle vier Gene bereits Informationen zur exakten physischen Position, angegeben als Entfernung in Basen vom Terminus des p-Arms (pter) des jeweiligen Chromosoms vorhanden. Diese Daten sind in der letzten Spalte von Tabelle 4.23 verzeichnet.

Für die Gene für ATP5I, TAF1B und BCL7B stimmen die eigenen Mapping – Ergebnisse mit den beschriebenen Korrespondenzen zwischen chromosomalen Banden von Schwein und Mensch überein.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.23: Chromosomale Lokalisation potentieller Kandidatengensequenzen für das Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel.

lfd. Nr.	GenBank/EMBL Accession No.	Symbol	Chromosomale Lokalisation beim Schwein	Wahrscheinlichkeit Chromosom/Ab-schnitt	Korrespondierende Region im humanen Genom	Chromosomale Lokalisation des humanen Gens (Basen von pter)
1	AJ404882	CDKN3	1q23-q27	1,0/0,87	14q21 und 9	14q22 (48.687.104)
2	AJ278444	ATP5I	8q11-q12	1,00/0,88	4p – q31.3	4p (4.505.794)
3	AJ277993	TAF1B	3q21-q27	1,00/0,80	2p – q21.2	2p25 (14.984.550)
4	AJ404881	BCL7B	3p16-p17	1,00/0,88	7q11.1 – q22.1	7q11.23 (103.928.291 ±285.629)
5	AJ133887	-	Xq13	1,00/0,82	X	-
6	AJ133889	-	1q18 oder 1q28-q213	1,00/0,88	15 oder 9	-
7	AJ133890	-	4q15-q16	1,00/0,88	1	-
8	AJ133891	-	91/3p21-p24	1,00/0,89	1 oder 3	-

Demgegenüber ergibt sich ein Widerspruch bei der chromosomalen Zuordnung einerseits des porcinen CDKN3 – Gens zu SSC 1q23–q27 sowie andererseits des humanen Gens zu HSA 14q22, da nach Goureau et al. (1996) eine Korrespondenz zwischen dieser humanen Bande und dem porcinen Chromosom 7 besteht. Hierauf wird in der Diskussion eingegangen. Die Ergebnisse dieses Teils der physischen Kartierung definieren Genomregionen, die potentiell mit dem Syndrom in Verbindung stehen.

Die chromosomale Zuordnung der weiteren porcinen Genfragmente erfolgte analog zu dem oben angegebenen Verfahren. Es wurde sich von vornherein auf die Fragmente mit Homologien zu humanen Genen beschränkt, um Aussagen über Korrespondenzen zwischen humanen und porcinen Chromosomenabschnitten treffen zu können. Dementsprechend wurden für 7 der 10 isolierten Fragmente interne Primer abgeleitet. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen noch keine Informationen zur genomischen Organisation der entsprechenden humanen Gene vor, so dass ungewiss war, inwieweit Introns in den porcinen, genomischen Sequenzen integriert sind. Die erhaltenen PCR – Produkte wurden für die einzelnen Gene in den jeweiligen Abschnitten kurz charakterisiert. Zwei der sieben Genfragmente konnten mit dem verwendeten Zellhybridpanel nicht zugeordnet werden. Für PLAGL und BTF wurden gleichgroße PCR – Produkte bei Schwein, Maus und Hamster erhalten, die eine Differenzierung zwischen den Spezies unmöglich machten. Für beide Gene waren die entsprechenden Primer jeweils innerhalb eines Exons lokalisiert. Die Identität der Produkte in den drei Spezies deutet auf einen hohen Konservierungsgrad der kodierenden Sequenzen hin. Für die verbleibenden 5 Gene sind die Ergebnisse in Tabelle 4.24 zusammengefasst. Auch hierbei sind alle Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mindestens $p < 0,05$ abgesichert.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.24: Chromosomale Lokalisation von Genen die im M. biceps femoris neugeborener Ferkel exprimiert werden.

lfd. Nr.	GenBank/EMBL Accession No.	Symbol	Chromosomale Lokalisation beim Schwein	Wahrscheinlichkeit Chromosom/Ab-schnitt	Korrespondierende Region im humanen Genom	Chromosomale Lokali-sation des humanen Gens (Basen von pter)
1	AJ279587	PDK4	9q12-1/3q21	1,00/0,98	7	7q21.3-q22.1 (124.341.304 ± 2.640.464)
2	AJ279590	RPS10	7q12-q23 oder q26	1,00/0,98	6 oder 14 oder 15	6p21.3 (-)
3	AJ279589	SPARCL1	8q23-27	1,00/0,81	4	4q21-q22 (-)
4	AJ279582	NDRG2	7q12-q23 oder q26	1,00/0,90	14	14q11-q2 (3.968.094 ± 11)
5	AJ279591	EPLIN	5p11-p15	1,00/1,00	12 oder 22	12q13 (62.556.153 ± 318.259)

Die in Tabelle 4.24 aufgelisteten Gene konnten zu Banden der porcinen Chromosomen 5, 7, 8 und 9 zugeordnet werden. Dabei befinden sich die Gene für RPS10 und NDRG2 in derselben Region des Chromosom 7. Die von Goureau et al. (1996) beschriebenen Übereinstimmungen von humanen und porcinen Chromosomenabschnitten weisen keine Widersprüche in Bezug auf die Lokalisation der Gene bei Mensch und Schwein auf.

Es wurden insgesamt 16 cDNAs isoliert, für die im Differential Display eine differente Expression zwischen gesunden und vom Ausgrätschsyndrom betroffenen Ferkeln auftrat. Alle Fragmente sind Genen zuzuordnen, die bislang für das Schwein noch nicht beschrieben wurden. Aufgrund von Homologiedaten wurden 4 Gene identifiziert, die als potentielle Kandidatengene für die Erkrankung betrachtet werden können.

Für das porcine CDKN3 – Gen wurde die genomische Struktur analysiert und für das pATP5I – Gen die vollständige kodierende Sequenz beschrieben. Des weiteren wurden 10 Genfragmente beschrieben, die im Skelettmuskel von neugeborenen Ferkeln exprimiert werden.

Von diesen 26 ESTs konnten insgesamt 13 chromosomal zugeordnet und somit ein Beitrag zur weiteren Charakterisierung des Genoms des Schweines geleistet werden.

5. DISKUSSION

Das Ziel der Genomanalyse beim Nutztier ist die Identifizierung genetischer Variabilität als Ursache phänotypischer Variation und ihre Nutzung zur Verbesserung der tierischen Gesundheit und Leistung. Obwohl das Schwein zu den auf molekularbiologischer Ebene am besten charakterisierten Nutztierspezies gehört, ist das Wissen im Vergleich z.B. zum Menschen noch ausgesprochen gering. Das geht schon aus einem Vergleich der ca. 650 beschriebenen Gene beim Schwein mit den zumindest bereits sequenzierten 30.000 - 40.000 Genen beim Menschen hervor. Brenig (2000) bezeichnet den Stand der Genomanalyse bei Haustieren dementsprechend auch als „in statu nascendi“. Speziell im letzten Jahrzehnt wurde jedoch eine Vielzahl von Anstrengungen unternommen, diesen Kenntnisstand zu erweitern. In der strukturellen Genomanalyse steht dabei die Identifizierung von Genen und die Aufklärung ihrer DNA – Sequenzen einschließlich von Sequenzvariationen im Mittelpunkt. Dazu können sowohl der Marker- als auch der Kandidatengenansatz zur Anwendung kommen. Die funktionelle Genomanalyse beinhaltet demgegenüber die Aufdeckung der Unterschiede in der Regulation der komplexen Prozesse, die den Weg von der DNA – Sequenz zum letztendlich biologisch wirksamen Protein begleiten. Hierbei wird auf den Erkenntnissen der strukturellen Genomanalyse aufgebaut und im Sinne des Kandidatengenansatzes vorgegangen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand einerseits in der Untersuchung der Merkmalsassoziation von Varianten des Hitzeschock – Protein 70.2 – Gens. Das untersuchte Kandidatengen HSP70.2 kodiert für ein Hitzeschockprotein mit großer Bedeutung für die zelluläre Reaktion auf Stress (Lindquist & Craig 1988). Diese Erkenntnis wurde in Untersuchungen an verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Ratte) gewonnen und rechtfertigt somit die Betrachtung des HSP70.2 – Gens als funktionelles Kandidatengen für Leistungseigenschaften beim Schwein, die durch Stress beeinflussbar sind. Die Lokalisation des Gens im immunologisch bedeutsamen MHC – Komplex, sowie die Detektion von QTL für Mast – und Schlachtleistungsmerkmale in dieser Region beim Schwein (Wang et al. 1998) machen es darüber hinaus zu einem positionellen Kandidatengen.

Der zweite Komplex der Arbeit beinhaltet die Suche nach Kandidatengen für einen Erbfehler beim Schwein. Für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ ist bislang weder ein vergleichbares Krankheitsbild in einer anderen Spezies beschrieben, noch existieren gesicherte Hypothesen zu den Ursachen der Erkrankung. Dementsprechend musste versucht werden, bislang beim Schwein unbekannte Gene zu identifizieren, um sie anschließend im Sinne potentieller funktioneller Kandidatengene zu charakterisieren. Mit dem Verfahren der Differential Display/Reverse Transkriptase – PCR kam eine Methodik zum Einsatz, die der funktionellen Genomanalyse zuzurechnen ist. Die anschließende

Charakterisierung und chromosomale Zuordnung von einigen der isolierten Gene entspricht wiederum dem Ansatz der strukturellen Genomanalyse.

5.1 Das porcine Hitzeschock – Protein 70.2 (HSP70.2) – Gen als potentielles Kandidatengen für Leistungsmerkmale beim Schwein

Ausgehend von Untersuchungen zur Struktur der nichttranslatierten Regionen des pHSP70.2 – Gens wurden zwei der identifizierten Polymorphismen in mehreren Studien auf ihre Assoziation mit Leistungseigenschaften untersucht. Vor dem Hintergrund mittlerweile existenten Wissens zu funktionellen Auswirkungen dieser Polymorphismen müssen die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse der Assoziationsanalysen einer erneuten Bewertung unterzogen werden.

5.1.1 Strukturelle Analyse der 5'- und 3'- UTR des porcinen HSP70.2 – Gens und Allelfrequenzen in den untersuchten Mutationen

Für die Untersuchung der 5'- und 3'- UTR wurde eine vergleichende Sequenzierung an 51 (5'- UTR) bzw. 4 Schweinen (3'- UTR) vorgenommen. Als Grundlage für einen Vergleich diente die von Peelman et al. (1992) publizierte Sequenz des vollständigen Gens. In den sequenzierten 451 bp der 5'- UTR wurden 41 Abweichungen zur Vergleichssequenz gefunden (Maak et al. 1998). Die mit den eigenen Ergebnissen übereinstimmenden Daten von Schwerin et al. (1995) und Chen et al. (2000b) zeigen jedoch, dass die von Peelman et al. (1992) publizierte Sequenz mit zahlreichen Fehlern behaftet ist. Der Promotor des porcinen HSP70.2 – Gens wurde von Peelman et al. (1992) teilweise charakterisiert. Milner & Campbell (1990) beschreiben zwei Sequenzen (M59828 und M59830), die zu 97% identisch sind und als HSP70-1 und HSP70-2 bezeichnet werden. Hierbei ist die Position eines Hitzeschockelements im Promotor des HSP70-1 – Gens angegeben. Nach Günther & Walther (1994) stellen das humane HSP70-2 – Gen und das porcine HSP70.2 – Gen orthologe Genorte dar und werden deswegen in den Vergleich der Promotorregionen einbezogen. Für das Rind liegen zwei zu 98% identische Sequenzen vor, die analog zur Nomenklatur beim Menschen mit HSP70-1 sowie HSP70-2 bezeichnet werden (Gutierrez & Guerriero 1995, U09861; Grosz et al. 1992, U02896). Darüber hinaus ist in einer weiteren Sequenz (Kowalski et al. 1993, M98823) der Promotor eines bovinen HSP70 – Gens enthalten. Im bovinen HSP70-1 – Gen- Promotor wurden 2 Polymorphismen gefunden, von denen eine Cytosin – Deletion zu einer Veränderung eines AP2 – Box – Motivs führt (Schwerin et al. 1998). In Abbildung 5.1 werden die Promotoren der drei orthologen Gene pHSP70.2, bHSP70-2 sowie hHSP70-2 verglichen.

5 Diskussion

			1		2
pHSP70.2	68	cctcccgga	at CCCAGAAG	AGTCTGGAGA	GTTCTGG gag
bHSP70-2	16	*****a****	*** T *****	*****	*****a*a-g****t
hHSP70-2	61	*****a*t**	*****	C *****	*****-** ca*a G**G*
			3		
pHSP70.2	117	cc---agggc	gct GATTGG-	CCCCAGAAAG	CCAGGGGGCA
bHSP70-2	65	**---*****	*** ***** t	-t*****c	*tg****-** *****t****
hHSP70-2	109	*accct*cc*	t** ***** t	**aag***g*	*tg***** *****g****
			1	2	3
pHSP70.2	162	CGAAACCTCT	GGAATATTCC	Cgacctggca	gc CCCGCC ga
bHSP70-2	111	***** C **	*****	*****	*****a*t** *****t**
hHSP70-2	150	***** C **	*****	*****	***t*at*** ***t**t***
			2	4	
pHSP70.2	212	TGG ctgagga	gggaaaa---	GGCGGG gct	tgaggaaaa aa TATAAA ca
bHSP70-2	161	*****c**	a**g***agg	c*****	***t***-g* *t*****
hHSP70-2	200	*****c*a*	***g***---	***** t**	cc*c**cg-* ct*****ag
			5		
pHSP70.2	258	cagagccgcc	cccagg----	gaaa C	
bHSP70-2	200	*****	tgag*a----	*****	
hHSP70-2	245	*c***gg**g	*g*g*tccgg	a*****	

*: identische Nukleotide

1: Heat shock element (HSE)

2: (invertierte) GC Box

3: invertierte CCAAT-Box

4: TATA Box

5: Transkriptionsstart

Die regulatorischen Sequenzmotive sind grau hinterlegt und in Großbuchstaben dargestellt. Striche kennzeichnen fehlende Nukleotide.

Abbildung 5.1: Vergleich der Promotor – Region zwischen dem pHSP70.2 – (eigene Daten), dem bHSP70-2 – (U02896) sowie dem hHSP70-2 – Gen (M59830).

Von den in Abschnitt 4.1.1.1 beschriebenen transkriptionssteuernden Elementen des porcinen Promotors sind die beiden Hitzeschockelemente, eine der beiden CAAT – Boxen, eine GC - Box sowie die TATA – Box zwischen den drei Spezies sowohl in ihrer Position innerhalb des Promotors als auch auf Nukleotidebene konserviert.

Zwischen dem porcinen und dem humanen Promotor stimmen weiterhin eine zweite GC – Box und die zweite CAAT – Box überein. Zusätzlich besitzt der porcine Promotor eine weitere GC – Box, die weder bei Rind und Mensch vorhanden ist. Die generelle Übereinstimmung beträgt zwischen den untersuchten Abschnitten des Promotors 80,9% (Schwein – Rind) bzw. 74,7% (Schwein – Mensch).

Insgesamt sind von Schwerin et al. (1995, 1999) 13 Polymorphismen (SNPs) im sequenzierten Abschnitt beschrieben worden, von denen 7 in der 5'- UTR und 6 innerhalb von 162 bp kodierender Sequenz lokalisiert sind. Die SNP im kodierenden Bereich sind durchweg sogenannte stille Mutationen, die zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führen. In den eigenen Untersuchungen an 51 Schweinen einer Population wurde lediglich

einer der beiden von Schwerin et al. (1995) im Promotor des Gens beschriebenen SNPs gefunden. In allen anderen Nukleotidpositionen war das Wildtyp – Allel fixiert. Aus den Daten von Schwerin et al. (1999) und den eigenen Ergebnissen wurde eine Konsenssequenz von 624 bp generiert, die in das Datenbanksystem GenBank (Accession No. AJ309021) eingestellt wurde. Analog zu dieser Vorgehensweise wurde aus den Sequenzen der 4 selbst analysierten Schweine sowie Daten von Schwerin et al. (2001b) eine 505 bp lange Konsenssequenz des 3'- Endes des pHSP70.2 – Gens (123 bp kodierende Sequenz, 382 bp 3'- UTR) erstellt (GenBank Accession No. AJ310378). Auch hierbei ergaben sich insgesamt 34 Unterschiede zwischen publizierter und ermittelter Sequenz.

```

Schwein (1)602 VCNPIISGLY QGAGGPGAGGF GAQAPKGGSG SGPTIEEVD#
Schwein (2)602 *****P*** **PDL*****#
Rind      602 *****R** *****G*****#
Ratte     602 *****A*****#

```

#: Stoppkodon

*: identische Aminosäuren

Abbildung 5.2: Vergleich der partiellen Aminosäuresequenzen des HSP70.2 von Schwein (1: Maak et al. 1999; 2: Peelman et al. 1992) und Rind (Grosz et al. 1992) mit dem HSP70-1 der Ratte (Walther et al. 1994).

Acht dieser Abweichungen befinden sich innerhalb der kodierenden Sequenz und führen zu 4 Aminosäureaustauschen im Vergleich zu der aus der publizierten DNA – Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz für das porcine HSP70.2 – Gen.

Ein Vergleich dieser abgeleiteten 40 Aminosäuren zeigt, dass eine höhere Ähnlichkeit zum HSP70-2 des Rindes und zum HSP70-1 der Ratte als zum HSP70.2 des Schweins, wie von Peelman et al. (1992) publiziert, besteht (Abbildung 5.2).

Aus diesen Resultaten wird deutlich, dass fehlerhafte Angaben in DNA - Sequenzdatenbanken zu Problemen, z.B. bei der PCR – Primerableitung für eigene Untersuchungen, führen können.

Schwerin et al. (2001b) beschreiben zwei gekoppelte Polymorphismen in der 3'-UTR des Gens, die in allen vier selbst sequenzierten Proben monomorph waren. Dabei ist eine Insertion von zwei Thymidin – Resten (Position 218) mit einer C/T – Transition (Position 463) gekoppelt. Auch für das orthologe humane Gen HSPA1B sind im Zuge des automatischen Abgleichs von Sequenzen aus dem humanen Genomprojekt Polymorphismen nachgewiesen worden (URL 7). Von den insgesamt 11 SNPs sind 8 in der kodierenden Sequenz lokalisiert, die jedoch nur zu zwei Aminosäureaustauschen führen. Zwei Polymorphismen befinden sich in der 3'- UTR und ein weiterer wurde in der 5'- UTR dokumentiert. Interessanterweise ist

5 Diskussion

letzterer SNP in einem Hitzeschockelement des Promotors lokalisiert, welches zwischen Mensch, Rind und Schwein ansonsten in 24 von 25 bp konserviert ist (Abbildung 5.1). Die höhere Zahl beschriebener Polymorphismen in den beim Schwein untersuchten Regionen des Gens im Vergleich zur humanen Sequenz beruht sicher auf der Anzahl der verglichenen Individuen. Während die Angaben zum Menschen aus Sequenzen von 6 bis 7 Probanden abgeleitet wurden, liegen beim Schwein mehrere hundert Datensätze, die bei teilweise phänotypisch sehr differenzierten Schweinerassen ermittelt wurden, vor (Schwerin et al. 1995, 1999, 2001a, b, Maak et al. 1998, Chen et al. 2000b). Auch wenn die HSP70 – Gene zu den evolutionär am stärksten konservierten Genen gehören (Craig 1985), zeigen die vorliegenden Daten bei Mensch und Schwein, dass die durchschnittlich für das humane Genom ermittelte Anzahl von 1 SNP je 1,91 kbp oder zwei SNPs je Gen einschließlich 5'- und 3'- flankierender Sequenzen (TSC 2001) hier deutlich übertroffen wird. Unter den Voraussetzungen des Hardy – Weinberg – Gesetzes ist eine Verteilung der Genotypen in den Polymorphismen im Verhältnis von 1:2:1 (homozygoter Wildtyp, Heterozygote, homozygote Mutanten) zu erwarten. In den eigenen Beobachtungen (Tabelle 4.1) sowie bei Schwerin et al. (1995, 2001a) und Chen et al. (2000b) traten jedoch populationsspezifische, signifikante Abweichungen von diesem Verhältnis auf. In Tabelle 5.1 sind die entsprechenden Angaben für die beiden hier untersuchten Polymorphismen zusammengestellt.

Tabelle 5.1: Beobachtete Genotypenfrequenzen (%; von – bis) in zwei Polymorphismen des pHSP70.2 – Gen – Promotors.

Material	n	GC – Box – Genotyp			TATA – Box – Genotyp		
		„CC“	„AC“	„AA“	„AA“	„A -“	„- -“
kommerzielle Populationen							
Maak et al. (1998)	393	38,7 9,9-100,0	48,9 0,0-72,8	12,4 0,0-17,3	80,2 55,9-93,3	18,9 6,7-35,3	0,9 0,0-8,8
Schwerin et al. (2001a)	299	40,3 20,0-59,0	29,6 20,0-35,0	30,1 16,0-60,0	45,2 26,0-82,0	54,1 18,0-74,0	0,7 0,0-2,0
Chen et al. (2000b)	126	75,4 6,3-95,3	16,6 3,5-50,0	8,0 1,2-43,8	61,0 48,2-93,8	35,8 6,3-47,1	3,2 0,0-4,7
Ressource – Population							
Maak et al. (1999)	288	100,0	0,0	0,0	27,8	49,0	23,2

Es existieren klare Differenzen in der Genotypenverteilung in beiden Polymorphismen sowohl zwischen kommerziellen und Experimentalpopulationen als auch zwischen verschiedenen kommerziell verwendeten Rassen und Linien. Im GC – Box Polymorphismus dominiert der Wildtyp, wobei eine Fixierung dieses Allels in einer kommerziellen und der Experimentalpopulation beobachtet wurden. Im TATA – Box – Polymorphismus ist der homozygot mutierte Genotyp in kommerziellen Rassen extrem selten, obwohl Heterozygote in einer Frequenz von ca. 5 bis 75% beobachtet wurden. In allen dokumentierten Untersuchungen in kommerziell genutzten Herkünften wurde der Genotyp „-“ lediglich bei 9 von 818 typisierten Tieren gefunden. Andererseits wurde in keiner der bisher untersuchten Populationen eine Fixierung des Wildtyp – Allels beobachtet. Diese Genotypenverteilung legt den Schluss nahe, dass der homozygot mutierte Genotyp mit Merkmalen gekoppelt sein muss, gegen die in der praktischen Zucht selektiert wird (Maak et al. 1998). Diese Vermutung wird unterstützt durch die aus einer Heterozygoten – Verpaarung stammenden Nachkommen der Ressourcepopulation, die nahezu exakt der theoretisch zu erwartenden Genotypenverteilung folgen. In dieser Population fand keinerlei züchterische Selektion statt. Nach der Verteilung in dieser Population kann wiederum ausgeschlossen werden, dass die TATA – Box – Mutation ursächlich für eine verringerte Vitalität verantwortlich ist, da sich die ca. 25 % homozygot mutierte Genotypen in ihren Eigenschaften nicht von den anderen Varianten unterscheiden. Um zu weiterführenden Bewertungen des pHSP70.2 – Gens als Kandidatengen zu gelangen, sind Untersuchungen im Sinne der funktionellen Genomanalyse notwendig, die mittlerweile vorliegen (siehe Abschnitt 5.1.3) jedoch zum Zeitpunkt der durchgeführten Assoziationsanalysen noch nicht zur Verfügung standen.

5.1.2 Assoziationen zwischen Genotypen im Promotor des porcinen HSP70.2 – Gens und phänotypischen Merkmalen beim Schwein

Für das porcine HSP70.2 – Gen standen bereits zu Beginn der eigenen Untersuchungen Sequenzinformationen sowie die Beschreibung von zwei Polymorphismen im Promotor zur Verfügung (Peelman et al. 1992, Schwerin et al. 1995). Diese Polymorphismen sind direkt innerhalb bzw. unmittelbar 5' von transkriptionssteuernden Elementen des Promotors lokalisiert. Aus diesem Grund konnten Effekte dieser Mutationen auf die Expression des Gens angenommen werden, was wiederum phänotypische Auswirkungen haben kann. Unter diesen Annahmen erfolgten die Untersuchungen in den 6 beschriebenen Experimenten. Die statistisch gesicherten ($p < 0,05$) Assoziationen zwischen den untersuchten Polymorphismen sowie phänotypischen Eigenschaften sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Lediglich auf 6 von insgesamt 39 analysierten Merkmalen aus den untersuchten Komplexen Mast- und Schlachtleistung, Fruchtbarkeit, Fleischqualität sowie biochemische und morphologische Kennwerte der Skelettmuskulatur ließen sich Effekte der Promotorvarianten des pHSP70.2 –

5 Diskussion

Gens statistisch sichern. Im Falle des Zusammenhanges zwischen TATA – Box – Genotyp und der inneren Länge des Schlachtkörpers bei Tieren der Ressourcepopulation ist eine Interpretation aus biologischer Sicht wenig sinnvoll.

Da die Fleischqualität des Schweines stark von einer genetisch determinierten Stressanfälligkeit beeinflusst wird (Lengerken et al. 1988), wurden die stärksten Zusammenhänge zwischen den Polymorphismen und Merkmalen aus diesem Komplex erwartet.

Tabelle 5.2: Assoziationen zwischen Polymorphismen im Promotor des pHSP70.2 – Gens und physiologischen Parametern sowie Leistungsmerkmalen beim Schwein.

Polymorphismus	Leistungskomplex (Versuch)	assoziiert mit dem Merkmal	Richtung des Effektes
GC – Box	Fleischqualität (2)	LF _{2MI}	Wildtyp – Allel mit negativem Einfluss
TATA – Box	physiologische Parameter (2)	Δ pH _{MI} (1. Biopsie)	mutiertes Allel mit negativem Einfluss
	Fleischqualität (1)	pH _{2MI} , Minolta (Y), DV	mutiertes Allel mit negativem Einfluss Wildtyp – Allel mit negativem Einfluss
	Schlachtkörperqualität (6)	IL	Wildtyp – Allel mit negativem Einfluss

Entsprechend lassen sich auch 5 der 6 signifikanten Assoziationen direkt (LF_{2MI}, pH_{2MI}, Minolta, DV) bzw. indirekt (Δ pH_{MI} als in – vitro Parameter) der Fleischqualität zuordnen. Schwerin et al. (1996) fanden gesicherte Effekte für beide untersuchten Mutationen auf die die Fleischqualität maßgeblich beschreibenden Parameter pH_{1MI} und LF_{1MI}. Dabei war der Effekt des TATA – Box – Genotyps auf den LF_{1MI} – Wert von gleicher Höhe wie der bekanntermaßen starke Effekt des MHS – Genotyps. Der GC – Box – Genotyp wies einen Einfluss in Höhe von etwa 50% des Effektes des MHS – Locus auf den pH_{1MI} – Wert auf. Die Autoren fanden eine Assoziation des mutierten Allels der TATA – Box mit ungünstiger Fleischbeschaffenheit, wogegen das mutierte Allel in der GC – Box mit besseren Werten gekoppelt war. Hagendorf (1999) konnte diese Effekte in zwei weiteren Populationen prinzipiell bestätigen, jedoch waren die Mittelwertunterschiede zwischen den Genotypengruppen nicht durchgängig statistisch zu sichern. Der Anteil von Schweinen mit dem Beschaffenheitsmangel PSE – Fleisch war in der Gruppe mit homozygot mutierter GC – Box (AA) mit 7,1% deutlich geringer als in den Gruppen der Heterozygoten (AC; 17,9%) bzw. der homozygoten Wildtyp – Genotypen (CC; 36,2%). Die eigenen Ergebnisse unterstützen

die Beobachtung, dass das mutierte TATA – Box – Allel und das GC – Box – Wildtypallel überwiegend (Ausnahme Dripverlust [DV] in Versuch 1) mit ungünstigen Werten in der Fleischbeschaffenheit bei Schweinen in den untersuchten kommerziellen Beständen verbunden ist.

Auch für die morphologischen und biochemischen Parameter war dieser Trend erkennbar. Jedoch konnten statistisch gesicherte Effekte der Mutationen auf die Fleischbeschaffenheit (Versuche 1 und 2) nicht bei Wiederholung der Untersuchungen in anderen Populationen (Versuche 3 und 6) bestätigt werden. Van Laack et al. (1993) ermittelten die Spiegel an HSP70 in verschiedenen Geweben von Schweinen in Abhängigkeit vom MHS – Genotyp und der Belastung vor der Schlachtung und fand keinerlei Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die eigenen Untersuchungen im Versuch 1 wurden an Schweinen desselben Bestandes („ISU Stress Herd“, Iowa State University, Ames, USA) durchgeführt und zeigten, dass die GC – Box – Mutation hier nicht vorkommt und die TATA – Box – Mutation nur in einer geringen Frequenz („–“ – Allel = 0,09) vorhanden ist. Dementsprechend war nur eine geringe genetische Variabilität im HSP70.2 – Locus vorhanden, was zur Erklärung der Ergebnisse von van Laack (1993) beitragen könnte, zumal noch keine Erkenntnisse zu funktionellen Auswirkungen der untersuchten sowie weiterer genetischer Varianten vorlagen.

Ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen und Parametern der männlichen Fruchtbarkeit (Versuch 4) wurde nicht gefunden (Maak et al. 1998). Vergleichbare Untersuchungen sind bislang nicht dokumentiert. Huang et al. (2000) konnten zeigen, dass sowohl die konstitutiv exprimierte als auch die induzierbare Form von HSP70 in Spermatozoen von Ebern nachweisbar sind. Die Autoren fanden dabei keine Differenzen zwischen verschiedenen Rassen, jedoch signifikant geringere Spiegel während der warmen Jahreszeit. Tendenziell war die Spermaqualität bei den Tieren am schlechtesten, die auch die geringsten HSP70 – Spiegel aufwiesen.

In Bezug auf die weibliche Fruchtbarkeit waren tendenziell bessere Leistungen mit dem Vorhandensein des mutierten Allels „A“ in der GC – Box verbunden, wogegen der TATA – Box – Genotyp keinen Effekt hatte. Hagendorf (1999) fand ebenfalls einen signifikanten Einfluss des GC – Box – Genotyps auf einige der untersuchten Fruchtbarkeitsmerkmale. Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen war hierbei das mutierte Allel mit den ungünstigeren Werten im Leistungsmerkmal verbunden. Darüber hinaus waren in diesem Tiermaterial teilweise gesicherte Unterschiede in Fruchtbarkeitsmerkmalen in Abhängigkeit vom TATA – Box – Genotyp nachweisbar, die in den eigenen Untersuchungen nicht auftraten.

Signifikante Mittelwertunterschiede im Geburtsgewicht der Ferkel wurden zwischen den beiden homozygoten GC – Box Genotypen gefunden, wobei wiederum der homozygot mutierte Genotyp die höchsten Werte aufwies (Maak et al. 1998). Keinerlei Effekte gingen

5 Diskussion

dagegen vom TATA – Box – Genotyp der Ferkel aus. Die pränatale Expression von Stressproteinen der Größenklasse von ca. 70 kDa wurde beim Schwein erstmalig von Trebichavsky et al. (1993) beschrieben. Kojima et al. (1996) fanden eine konstitutive Expression dieser Proteine bereits in 6 Tage alten Embryonen. Eine Hitzebelastung der Embryonen in - vitro führte jedoch nicht zu einer erhöhten HSP70 – Expression. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen McComb & Spurlock (1997). Hierbei konnte durch Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden, dass in embryonalen Geweben ausschließlich die konstitutive Form nachweisbar ist. Für den postnatalen Zeitraum berichten die Autoren von einer Erhöhung des Spiegels an induzierbarem HSP70 bei zwei der 4 untersuchten Proben (Tag 4), die zu einem späterem Zeitpunkt (Tag 18) nicht mehr nachweisbar war. Diese zeitweilige Expression wird von den Autoren mit erhöhter muskulärer und metabolischer Aktivität erklärt. Entsprechend dieser Ergebnisse ist ein Effekt des Genotyps der Ferkel im stressinduzierbaren HSP70.2 – Gen auf das Geburtsgewicht als Resultante der embryonalen Entwicklung auszuschließen.

Vielmehr ist anzunehmen, dass der Genotyp der Eltern an diesem Locus mit dem Geburtsgewicht der Ferkel in Verbindung steht. Unterstützt wird das durch die in Abbildung 4.5 dargestellten Ergebnisse. In dieser Analyse wurde ein hochsignifikanter positiver Effekt des maternal übertragenen mutierten Allels im GC – Box Polymorphismus auf das Geburtsgewicht der Ferkel gefunden, während das paternale Allel keinen Effekt aufwies.

Im Versuch 6 konnte für eine der beiden Mutationen (TATA – Box) ihre Assoziation mit Leistungsmerkmalen aller Komplexe in einer Ressourcepopulation überprüft werden. Diese wurde aus einer kommerziell verwendeten Rasse (Duroc) und einer Experimentallinie (Berliner Minischwein) erstellt und unterschied sich somit sowohl in Genotyp als auch im Phänotyp deutlich von kommerziellen Masthybriden. Die Analyse dieser Population ergab keinerlei biologisch interpretierbare Zusammenhänge zwischen den HSP70.2 – Genotypen und phänotypischen Eigenschaften (Maak et al. 1999) und steht damit im Widerspruch zu den aufgeführten Ergebnissen aus Untersuchungen in kommerziellen Populationen (Schwerin et al. 1996, Maak et al. 1998, Hagendorf 1999). Auch hierzu muss festgehalten werden, dass diese Ergebnisse ohne Wissen um eventuelle funktionelle Auswirkungen der untersuchten Mutationen ermittelt wurden.

Im Ergebnis der eigenen Assoziationsanalysen sowie weiterer publizierter Untersuchungen kann festgestellt werden,

- dass teilweise statistisch gesicherte Beziehungen zwischen den untersuchten Genotypen im Promotor des HSP70.2 – Gen und Leistungsmerkmalen beim Schwein bestehen und
- dass diese Zusammenhänge nicht in allen Populationen einheitlich nachweisbar sind.

Bei vergleichbaren Untersuchungen zu funktionellen Kandidatengenomen für die Fruchtbarkeit beim Schwein wurden analoge Beobachtungen gemacht. In Untersuchungen zum Östrogenrezeptor (ESR) – Gen fanden Rothschild et al. (1996) einen hochsignifikanten Effekt des Locus auf Merkmale der Fruchtbarkeit. So war das Vorhandensein des Allels „B“ in homozygoter Form mit 1,5 bis 2,3 mehr lebend geborenen Ferkeln bei Sauen mit Meishan – Genanteilen verbunden. In amerikanischen Large White – Populationen betrug der Effekt immerhin noch 0,9 bis 1,2 Ferkel. Dagegen wurden in 3 von 4 europäischen Large White – Linien keinerlei positive Effekte des „B“ – Allels beobachtet (Southwood et al. 1995) und Legault et al. (1996) fanden nur tendenzielle Effekte in weiteren Large White – Linien. Short et al. (1997) bestätigten dagegen die Ergebnisse von Rothschild et al. (1996) auch für kommerzielle Linien, fanden jedoch auch eine Linie, in der das „negative“ Allel fixiert war. Die Autoren führen die Widersprüche auf die teilweise zu geringen Stichprobenumfänge zurück und postulieren einen Mindestumfang von 1.000 Tieren für die untersuchten, gering heritablen Fruchtbarkeitsmerkmale. Auch wenn die Merkmale der Fleischbeschaffenheit eine höhere Heritabilität als Fruchtbarkeitsleistungen aufweisen, sind die eigenen widersprüchlichen Ergebnisse sicherlich teilweise auf den geringen Umfang und die heterogene Genotypenstruktur der untersuchten Stichproben zurückzuführen. Chen et al. (2000c) fanden wiederum bei verschiedenen chinesischen Rassen Effekte, die teilweise noch höher als die von Rothschild et al. (1996) beschriebenen waren.

Rothschild et al. (1996) führen die unterschiedlich starken Effekte in verschiedenen Linien entweder auf die Beeinflussung der Expression des ESR – Gens durch weitere genetische Faktoren oder auf die Tatsache, dass das ESR – Gen selbst nicht Majorgen, sondern nur mit einem Majorgen gekoppelt ist, zurück.

Linville et al. (2001) untersuchten die Effekte mehrerer Kandidatengene auf die Fruchtbarkeit in Schweinelinien, die über 7 und mehr Generationen auf verschiedene Fruchtbarkeitsparameter selektiert wurden, im Vergleich zu einer Kontrolllinie. Für keines der Gene (einschließlich ESR) konnten signifikante Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen Selektions – und Kontrolllinien gefunden werden, trotz großer phänotypischer Differenzen in den Fruchtbarkeitsmerkmalen. Dieses Ergebnis entspricht den eigenen Resultaten aus Versuch 3 zur Fleischqualität (Tabelle 4.9). Die Autoren schlussfolgern, dass kleine Effekte zahlreicher Gene zu den vorhandenen Differenzen von 20 – 50% in den Fruchtbarkeitsmerkmalen beigetragen haben, keines der untersuchten Kandidatengene im Sinne eines Majorgens in den untersuchten Populationen wirkt bzw. weitere Mutationen in den untersuchten oder mit ihnen gekoppelten Genen für die phänotypischen Differenzen verantwortlich sind.

Auch in den eigenen Untersuchungen wurden entsprechend dem Prinzip der klassischen Assoziationsanalyse Polymorphismen mit bis dahin unbekannter funktioneller Auswirkung

5 Diskussion

isoliert auf ihre Kopplung mit phänotypischer Variation untersucht. Mit dieser Herangehensweise lassen sich kausale Zusammenhänge zwischen Polymorphismus und Leistungsmerkmal bereits in kleinen, jedoch auch geringere Effekte in ausreichend großen Stichproben finden (Short et al. 1997, Rothschild et al. 2000, Linville et al. 2001). Nach den Autoren sind widersprüchliche Ergebnisse aus verschiedenen Populationen als Indiz dafür anzusehen, dass es sich beim untersuchten Gen nicht um das kausal verantwortliche handelt, sondern um einen Marker für ein gekoppeltes Gen. Dieser Marker kann wiederum in verschiedenem Kopplungsungleichgewicht zum ursächlich verantwortlichen Gen in unterschiedlichen Populationen stehen (Linville et al. 2001). Diese Erklärung berücksichtigt nicht eventuelle funktionelle Effekte von genetischen Varianten. Für die meisten untersuchten Kandidatengene liegen jedoch auch keine Erkenntnisse dazu vor. Hier stellt das pHSP70.2 – Gen einen Sonderfall dar, da mittlerweile Daten zu Auswirkungen von Polymorphismen im 5'- und 3'- UTR auf die Genexpression vorliegen.

5.1.3 Auswirkungen von Polymorphismen im 5'- und 3'- UTR auf die Expression des pHSP70.2 – Gens

Die Lokalisation von Polymorphismen im Promotor des pHSP70.2 – Gens (Schwerin et al. 1999) und die vorwiegend transkriptionelle Regulation der Genexpression der HSP im Allgemeinen (Lindquist 1986), lassen funktionelle Auswirkungen auf die Genexpression als möglich erscheinen. Der Einfluss von Sequenzen im 3'- UTR von Genen auf die mRNA – Stabilität (Wickens et al. 1997, Guhaniyogi & Brewer 2001) lässt wiederum Mutationen in diesem Bereich eine potentielle funktionelle Bedeutung zukommen. Folgerichtig wurden von Schwerin et al. (2001a, b) umfangreiche Experimente zur Aufklärung der funktionellen Auswirkungen der identifizierten Mutationen auf die Genexpression des pHSP70.2 durchgeführt. Im Mittelpunkt standen dabei die auch in den hier beschriebenen Untersuchungen betrachteten Polymorphismen in einer GC – Box und unmittelbar 5' der TATA – Box sowie eine G/A – Transition in einem potentiellen Initiatorelement (INR; Schwerin et al. 2001a). Es konnte demonstriert werden, dass die drei regulatorischen Elemente in – vitro zur Bindung der jeweiligen spezifischen Transkriptionsfaktoren (SP1 für die GC – Box, TFIID für die TATA – Box) bzw. zur Bindung von nukleären Proteinen (INR) befähigt sind und die Bindungsfähigkeit zwischen mutierter und Wildtypvariante teilweise variiert. In einem Reportergen – Assay konnte weiterhin die starke Hitzeinduzierbarkeit des Wildtyp – Promotors beobachtet werden, die in verschiedenen mutierten Promotorvarianten signifikant verringert war. Javahery et al. (1994) sowie Colgan & Manley (1995) zeigten, dass TATA – Box und INR in - vivo kooperieren können und Promotoren, in denen beide Elemente vorhanden sind, die Effektivität der Transkription erhöhen. Wu et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen von Mutationen in Sequenzen zwischen TATA – Box und

Transkriptionsstartpunkt in einem HSP70 – Gen – Promotor bei der Fruchtfliege. Neben mehreren Mutationen mit relativ geringen Effekten, führte eine Mutation der INR zu einer 8-fachen Reduktion der Bindung von TFIID mit nachfolgender 4-facher Reduktion der Transkription in-vitro. In den Untersuchungen von Schwerin et al. (2001a) zeigte die mutierte Variante im INR jedoch eine starke Erhöhung der Transkription bei signifikant reduzierter Proteinbindung. Während die A – Deletion 5' der TATA – Box in Verbindung mit der INR – Variante keinen Effekt auf die Genexpression hatte, war diese stark verringert, wenn die mutierte GC – Box – Variante vorhanden war. Diese Ergebnisse deuten auf eine potentiell gegenläufige Wirkung der Mutationen in GC – Box und INR hin. Die Beobachtung eines häufigeren Auftretens von mutierter, negativ wirkender GC – Box – Variante in Verbindung mit mutierter, positiv wirkender INR – Variante könnte auf einen Selektionsvorteil dieser Kombination gegenüber Individuen mit mutierter GC – Box hindeuten.

In weiteren Untersuchungen standen die Auswirkungen von identifizierten Polymorphismen in der 3'-UTR auf die Stabilität der mRNA im Mittelpunkt (Schwerin et al. 2001b). Im Zusammenhang mit der Genexpression spielt nicht nur die Generation von mRNA im Zuge der Transkription eine Rolle. Die Transkription wird begleitet von Abbauprozessen der gebildeten mRNA. Veränderungen in der Geschwindigkeit dieses Abbaus beeinflussen dementsprechend die Expressionsrate des Gens. In einigen Organismen konnte gezeigt werden, dass von diesem Abbau vor allem mutierte mRNAs betroffen sind, deren Varianten entweder durch somatische Mutationen oder Fehler in der Transkription entstanden sind (rev. von Wickens et al. 1997). Darüber hinaus wird der mRNA – Abbau mittlerweile als ein wesentliches Element im Prozess der Genexpression unter physiologischen Bedingungen betrachtet (Guahaniyogi & Brewer 2001). Die Autoren beschreiben eine Reihe von proteinbindenden Sequenzelementen in der 3'- UTR und diskutieren die Bedeutung von Veränderungen in diesen Bereichen für eine Deregulation der mRNA – Spiegel in verschiedenen Krankheitsbildern beim Menschen. Schwerin et al. (2001b) konnten feststellen, dass die beim Schwein beobachteten Polymorphismen nicht in Beziehung zu diesen bekannten regulatorischen Sequenzmotiven stehen. Jedoch fanden die Autoren einen systematischen, wenn auch nur teilweise signifikanten Anstieg der mRNA – Spiegel sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Einwirkung von Hitzestress in der Rangfolge homozygoter Wildtyp < Heterozygote < homozygot mutiert. Nach chemischer Blockade der mRNA – Synthese in einem Reportergensystem waren Konstrukte mit einem mutierten 3'- UTR durch eine deutlich geringere Halbwertszeit der mRNA gekennzeichnet. Die Autoren schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass Varianten im 3'- UTR des pHSP70.2 – Gens natürlich vorkommen und diese funktionell wirksam sind. Unterstützt durch die Beobachtung unterschiedlicher Genotypenfrequenzen in verschiedenen Rassen, lassen

5 Diskussion

diese Ergebnisse vermuten, dass die Polymorphismen zumindest indirekt über die züchterische Selektion beeinflusst werden (Schwerin et al. 2001b).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass

- auch in den evolutionär hoch konservierten HSP70 – Genen genetische Variabilität innerhalb von Spezies (Mensch, Schwein) existiert,
- diese strukturelle Variabilität beim porcinen HSP70.2 – Gen nachgewiesenermaßen mit funktioneller Variabilität (Beeinflussung der Genexpression) einhergeht und
- genetische Varianten innerhalb dieses Gens offensichtlich zumindest zum Teil gegenläufige funktionelle Auswirkungen haben (Schwerin et al. 2001a, b).

Bei Berücksichtigung dieser Erkenntnisse erscheinen die hier dargelegten Ergebnisse der Assoziationsanalysen in einem anderen Licht. Linville et al. (2001) gehen davon aus, dass widersprüchliche Resultate zu Assoziationen von Kandidatengenvarianten mit phänotypischen Merkmalen eine fehlende Kausalität des Zusammenhanges anzeigen. Diese Annahme mag für einen großen Teil der Kandidatengene zutreffen, besonders wenn nachgewiesenermaßen nichtfunktionelle Mutationen betrachtet werden. Die funktionelle Charakterisierung von Varianten eines Kandidatengens kann, wie hier dargelegt, zu weiteren Erklärungsmöglichkeiten führen. Kompensatorische Effekte von Mutationen können für widersprüchliche Ergebnisse von Assoziationsstudien verantwortlich sein, sofern nur eine Mutation betrachtet wird. Dies ist der Regelfall in solchen Untersuchungen (Hardge 1999, Linville et al. 2001). Auch für die eigenen Ergebnisse ist eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unbekannte, weil nicht typisierte Varianten im beschriebenen INR – Polymorphismus nicht auszuschließen.

Aus dieser Sicht ist die Betrachtung des pHSP70.2 – Gens als funktioneller Kandidatenlocus für durch Stress beeinflussbare Leistungsmerkmale nach wie vor legitim. Weitere Untersuchungen unter Einbeziehung des Genotyps in allen funktionell wirksamen Polymorphismen durch Haplotypenbildung können zur Aufklärung der Zusammenhänge beitragen.

5.2 Potentielle Kandidatengene für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“

Für den untersuchten Erbfehler „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ bestand folgende Ausgangslage:

- Populationsgenetische Analysen deuten auf einen di- oder oligogenen Erbgang hin. Dementsprechend sollten wenige Gene mit deutlichem Effekt einbezogen sein.
- Trotz insgesamt widersprüchlicher Befunde herrscht weitgehender Konsens, dass eine unvollständige Ausreifung von Komponenten eines oder mehrerer Organsysteme an der Pathogenese des Syndrom beteiligt sein kann. Deswegen konnte erwartet werden, dass erkrankte Tiere in ihrem Genexpressionsmuster Abweichungen von Vergleichstieren aufweisen.

Unter diesen Prämissen wurde die Analyse der Genexpression in einem Skelettmuskel (M. biceps femoris) von erkrankten und gesunden neonatalen Ferkeln mit der Methode der Differential Display/Reverse Transkriptase – PCR (DD/RT-PCR) durchgeführt. Die verwendete Methodik ermöglicht es, eine „Momentaufnahme“ der Genexpression in einem Gewebe zu machen. Durch Vergleich der Muster von Individuen, die zu verschiedenen Gruppen gehören, kann man Gene identifizieren, deren Expression auf eine der Gruppen beschränkt ist bzw. zwischen den Gruppen differiert. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Individuen können die identifizierten Unterschiede in der Genexpression ursächlich mit diesen Eigenschaften in Beziehung stehen. So beschreiben Kornacker et al. (1996) die Analyse von Zelllinien, die für Untersuchungen von malignen Lymphomen (Hodgkin Syndrom, HS) beim Menschen erstellt wurden, mittels DD/RT – PCR. Es konnten insgesamt 6 differentiell exprimierte Fragmente zwischen HS- und Kontroll – Zelllinien identifiziert werden. Nur eins der Fragmente war homolog zu bereits beschriebenen Genen. Die Analyse der Expression dieses Gens, einer mitochondrialen Creatinkinase, bestätigte die Beschränkung der Expression auf die HS – Zelllinie. Da bereits Hinweise bestanden, dass das Genprodukt in Verbindung mit der Karzinombildung steht, wurde dieses Gen als funktionelles Kandidatengene für die Erkrankung angesehen. Die Autoren betonten jedoch die Notwendigkeit der Bestätigung der funktionellen Einbeziehung des Gens in die Erkrankung.

5.2.1 Potentielle Kandidatengene für das Syndrom

Kornacker et al. (1996) verwendeten Primer, die aufgrund ihrer Struktur (nur eine spezifische Base am 3'-Ende) zu einem weniger komplexen Bandenmuster als in den eigenen Untersuchungen führen. So gaben die Autoren an, dass insgesamt 18 Banden für weitere Untersuchungen in Frage kamen. Hierbei ist jedoch die Wahrscheinlichkeit höher, durch sich überlagernde Banden zu falsch positiven Resultaten zu gelangen. Aus diesem Grund kamen in den eigenen Untersuchungen spezifischere Primer (zwei spezifische Basen am 3'-Ende)

5 Diskussion

zum Einsatz. Die Ausgangshypothese, dass bei den untersuchten Vollgeschwisterpaaren eine relativ geringe Anzahl differenter Banden zu erwarten ist, wurde nicht bestätigt. Bereits in den getesteten 71 Primerkombinationen wurden über 50 scheinbar differentiell exprimierte Banden gefunden, von denen letztendlich 16 analysiert wurden. Ponsuksili et al. (2000) fanden bei 60 Primerkombinationen, die an Skelettmuskelproben leistungsdifferenzierter, adulter und verwandter Schweine untersucht wurden, 27 differenzierbare Fragmente, von denen wiederum 7 näher charakterisiert wurden. Demgegenüber beschreiben Czernak-Schäfer & Schwerin (2000) 532 differente Banden in gesundem und erkranktem Eutergewebe ein und derselben untersuchten Kuh. Daraus ist abzuleiten, dass neben der Spezifität der verwendeten Primer vor allem die metabolische Aktivität und der Zustand des untersuchten Gewebes einen starken Einfluss auf die Ergebnisse der Analyse ausübt.

Von den 16 analysierten Fragmenten der eigene Untersuchungen wiesen lediglich 4 eine signifikante Homologie mit bereits beschriebenen Genen auf:

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

Im Folgenden wird eine Bewertung der Funktion dieser vier Gene und ihrer Produkte aus Sicht ihrer möglichen Einbeziehung in das untersuchte Krankheitsbild vorgenommen.

5.2.1.1 TATA box binding protein associated factor, **TAF1B**

Comai et al. (1992) zeigten, dass ein Selektivitätsfaktor 1 (SL1) genannter Komplex Bedingung für Initiation der Transkription von Genen durch die RNA – Polymerase I ist. Dieser Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, von denen eine das TATA – box – bindende Protein (TBP) ist. Bei Mensch und Maus sind jeweils drei TBP – assoziierte Faktoren (TAFs) mit Molekülmassen von 48, 63 und 110 kDa weitere Bestandteile des Transkriptionsfaktors SL1 (Comai et al. 1992, Eberhard et al. 1993). Dabei wird der Faktor mit der Masse von 63 kDa vom TAF1B – Gen kodiert. Diese Untereinheit ist in der Lage, sowohl an den für die RNA – Polymerase I spezifischen Transkriptionsfaktor SL1 als auch an den für die Aktivität der RNA – Polymerase II erforderlichen Faktor TFIID zu binden. Reguliert wird die Bindung über Wechselwirkungen mit weiteren TAFs, die durch die Reihenfolge ihrer Bindung an das TBP die Promotor – und RNA – Polymerase – Spezifität des TBP – TAF – Komplexes festlegen (Comai et al. 1994). Dementsprechend hat der durch das TAF1B – Gen kodierte Faktor potentielle Effekte auf die Trankription von Genen durch die RNA – Polymerasen vom Typ I und II. Der generelle Transkriptionsfaktor SL1 wurde von Comai et al. (2000) als wichtiges Zielmolekül in Zusammenhang mit der Regulation der RNA

– Polymerase I – abhängigen Gentranskription während der Zelldifferenzierung identifiziert. Als Mechanismus für die Regulierung der Bindung von TAF1B an Promotoren der Klasse I konnte eine reversible Azetylierung des Faktors nachgewiesen werden (Muth et al. 2001). Heix et al. (1998) sowie Klein & Grummt (1999) untersuchten die zellzyklusabhängige, oszillierende Aktivität der RNA – Polymerase I – abhängigen Transkription der ribosomalen RNA - Gene (rRNA) beim Menschen. Die Autoren fanden in der Inaktivierung des SL1 – Komplexes durch Phosphorylierung des TBP und einer weiteren Untereinheit die basale Ursache für das Ausschalten der rRNA – Gen – Transkription während der Mitose und der frühen G1 – Phase des Zellzyklus. Diese Phosphorylierung wird durch den cdc/Cyclin B – Komplex vermittelt (siehe auch Abschnitt 5.2.1.4). Di Pietro et al. (2001) ordneten die Faktoren TAF1A, B, und C den menschlichen Chromosomenabschnitten 1q45, 2p25 sowie 16q24 zu. Alle drei Gene liegen als Einzelkopie im menschlichen Genom vor. Das isolierte, 339bp lange Fragment stellt demgegenüber das erste bei landwirtschaftlichen Nutztieren bekannte Homologon aus dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar. Die chromosomale Lokalisation des porcinen Gens auf 3q21-q27 steht in Übereinstimmung mit der beschriebenen Homologie zwischen Abschnitten des humanen Chromosoms 2 und des porcinen Chromosoms 3 (3q13-qter korrespondiert mit der Region 2p-q21.2 beim Menschen, Goureau et al. 1996). Das Gen für TAF1B kann in verschiedene Transkripte übersetzt werden. Falls diese Transkripte zu verschiedenartigen Polypeptiden verarbeitet werden, ist die Entstehung von SL1 – Varianten mit unterschiedlichem Aktivierungspotential wahrscheinlich (Di Pietro et al. 2000). Dementsprechend können Varianten im TAF1B – Protein modulierend auf die Effektivität des generellen Transkriptionsfaktors SL1 wirken. Für das humane Genfragment sind zwei nicht näher klassifizierte SNPs in der kodierenden Sequenz dokumentiert.

Das merkmalsassoziierte Auftreten des entsprechenden Genfragments im Differential Display sowie seine Bedeutung für die Regulation des Zellzyklus und damit des Zellwachstums (Comai et al. 2000) lassen das porcine TAF1B – Gen weiterhin als potentiell Kandidatengen für das untersuchte Syndrom erscheinen.

5.2.1.2 ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e, *ATP5I*

Das ATP5I – Gen kodiert für eine Protonenpumpe, die Bestandteil des mitochondrialen ATPase – Komplexes ist. Der Enzymkomplex besteht aus einem katalytischen Zentrum (Untereinheit cf[1]) sowie der Untereinheit cf(0), die den Protonenkanal in der Zellmembran darstellt. Das Enzym katalysiert die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat unter Verwendung der Energie eines durch Elektronentransport erzeugten elektrochemischen Protonengradienten. Dementsprechend stellt die F1F0 – ATPase ein Schlüsselenzym in der oxidativen Phosphorylierung dar (Karrasch & Walker 1999). Speziell

5 Diskussion

in Geweben, die wie die Skelettmuskulatur häufige Wechsel zwischen aeroben und anaeroben Zuständen durchlaufen, ist die reversible Inhibierung des Enzyms von Bedeutung für das Überleben der Zellen unter anaeroben Bedingungen (Rouslin 1991). Die cf(0) – Membransektion des Enzyms besteht wiederum aus zahlreichen Untereinheiten. Beim Rind wurden bereits 1991 14 immunologisch unterscheidbare Untereinheiten beschrieben, die zum Teil kreuzreaktiv mit denen von anderen Spezies waren (Walker et al. 1991, Hekman & Hatefi 1991). Sequenzdaten existieren jedoch nur für die Untereinheit epsilon, die durch das ATP5I – Gen kodiert wird. Homologe Gene zum bovinen ATP5I sind weiterhin für Maus und Ratte beschrieben (Higuti et al. 1992, Swartz et al. 1996). Für den Menschen existieren Daten zu Genen für mindestens 17 Untereinheiten, darunter auch für die epsilon – Untereinheit, und weiteren 6 Pseudogenen (URL 2). Die Gene für die 17 beschriebenen Untereinheiten beim Menschen sind auf 11 verschiedene Autosomen verteilt. Das ATP5I – Gen befindet sich dabei auf dem p – Arm des Chromosoms 4. Die Lokalisation des isolierten porcinen Gens auf Chromosom 8 entspricht der Beobachtung von Goureau et al. (1996), dass das vollständige porcine Chromosom 8 homolog zu einem großen Bereich des humanen Chromosoms 4 ist. Rohrer (1999) zeigte, dass jedoch in der Reihenfolge der Gene innerhalb der jeweiligen Arme der beiden Chromosomen Unterschiede existieren. Die Lokalisation des porcinen ATP5I – Gens in der Region 8q11-q12 im Vergleich zu 4p beim Menschen zeigt dabei auf, dass offensichtlich weitergehende Differenzen bestehen, die auch Rearrangements der Gene über die p – und q – Arme der homologen Chromosomen bei Mensch und Schwein beinhalten (Maak et al. 2001a). Die Regulation der Expression der Gene für die F1F0 – ATPase – Untereinheiten erfolgt vermutlich vornehmlich auf transkriptioneller Ebene, wie von Breen & Jordan (1997, 1998, 1999) für die alpha – Untereinheit demonstriert werden konnte. Die selbst isolierte Sequenz korrespondiert mit einem EST aus einer Bibliothek, die aus gepoolten reproduktiven und endokrinologisch aktiven Geweben des Schweines erstellt wurde. Daraus und aus der generellen Bedeutung des Enzyms für die mitochondriale Atmung kann geschlossen werden, dass die Genexpression nicht auf bestimmte Gewebe beschränkt ist.

Auch für die kodierende Sequenz dieses Gens sind beim Menschen 2 SNPs beschrieben, von denen einer zu einer Variation der Aminosäuresequenz führt. In der Literatur finden sich keine Hinweise auf eine Verbindung zwischen dem ATP5I – Gen mit Erkrankungen bei Säugern. Allerdings sind bei Bakterien Mutationen in Genen für die F1F0 – ATPase – Untereinheit C beschrieben, die mit einer Antibiotikaresistenz verbunden sein sollen (Cogne et al. 2000). Trotz der beobachteten scheinbar erhöhten Expression des Gens bei den erkrankten Probanden gibt es bislang keine konkreten Hinweise auf eine mögliche funktionelle Beziehung zwischen der Expression des Gens und den diskutierten Pathogenese – Mechanismen für das Ausgrätschen beim Saugferkel.

5.2.1.3 B cell CLL, lymphoma 7B, *BCL7B*

Das isolierte porcine cDNA – Fragment AJ404881 korrespondiert mit dem 3'- UTR des bei Mensch und Maus beschriebenen *BCL7B* – Gens (Zani et al. 1996, Jadayel et al.1998). Ursprünglich fanden Zani et al. (1996) mit *BCL7A* ein Gen, dass im Bereich einer chromosomalen Translokation bei bestimmten Formen von B – Zell – Lymphomen des Menschen liegt. Funktionelle Motive konnten in dem Gen nicht identifiziert werden, jedoch bestand Homologie zu dem aktinbindenden Protein Caldesmon. In einer Burkitt – Lymphom – Zelllinie wurde ein chromosomaler Bruchpunkt innerhalb des ersten Introns des *BCL7A* – Gens gefunden, der zu einem Fusionstranskript mit dem *MYC* – Gen führt. Diese Unterbrechung der Aminosäuresequenz im aminoterminalen Ende des Proteins wird als Bestandteil des Pathogenesemechanismus bei einigen hochgradigen Lymphomen des Menschen angesehen. Jadayel et al. (1998) sowie Meng et al. (1998) untersuchten eine chromosomale Region (7q11.23), die bei Auftreten eines Entwicklungsstörungs – Syndroms (Williams – Syndrom) deletiert ist. In dieser Region wurde unter anderem zwei Gene beschrieben, die in Teilen homolog zu dem auf Chromosom 12 befindlichen *BCL7A* – Gen sind und folglich als *BCL7B* und *BCL7C* bezeichnet wurden. Jadayel et al. (1998) schlussfolgerten aus dieser Homologie, dass die drei Gene zu einer Familie mit unbekannter Funktion gehören. Durch das Fehlen funktioneller Proteinmotive ist es schwierig, die Bedeutung des Genproduktes einzuschätzen. Wegen des hohen Konservierungsgrades des Gens bei evolutionär weit auseinander stehenden Spezies vermuteten Meng et al. (1998) jedoch eine wichtige Rolle bei zellulären oder Entwicklungsprozessen. Natter et al. (1998) wiesen eine Funktion des *BCL7B* als Autoantigen im Zusammenhang mit einer Form von Dermatitis beim Menschen nach. Das Gen wird beim Menschen in zahlreichen adulten Geweben, einschließlich Skelettmuskulatur, wo die stärksten Signale beobachtet wurden, exprimiert. Eine Expression wurde darüber hinaus auch in fetalen Geweben (Hirn, Lunge, Leber, Niere) beobachtet (Meng et al. 1998). Die Autoren fanden ein weiteres, größeres Fragment, welches ausschließlich in fetaler Leber erschien. Entsprechend sind auch zwei Einträge für die humane mRNA des Gens in GenBank vorhanden (*BCL7B*, 1.580 bp sowie *BCL7B*, kurze Isoform, 1.101 bp). In der kurzen Variante fehlen offensichtlich einige Exons, die zu einem verkürzten Protein führen. Im Zuge der Genomsequenzierung wurden im *BCL7B* – Gen 2 SNPs in der kodierenden Region gefunden. Neben der in den eigenen Untersuchungen beobachteten Expression in der Skelettmuskulatur beim Schwein, ist aus Angaben im Datenbanksystem GenBank (URL 8) eine Expression des Gens in fetalen Geweben anzunehmen. Ein EST aus einer entsprechenden cDNA – Bibliothek ist identisch mit dem aus der Skelettmuskulatur des neonatalen Ferkels isolierten Fragment.

Die chromosomale Zuordnung des *BCL7B* – Gens zu den Chromosomenabschnitten 7q11.23 bzw. 6p16-p17 bei Mensch und Schwein ist wiederum in Übereinstimmung mit den

5 Diskussion

Ergebnissen des heterologen Chromosomen – Paintings von Goureau et al. (1996). Auch das porcine BCL7B – Gen wurde aus einem Fragment isoliert, das scheinbar nur bei einem erkrankten Ferkel vorhanden war.

Die Einbeziehung des humanen Gens in verschiedene Krankheitsbilder beim Menschen, seine vermutete Bedeutung für Prozesse der Zelldifferenzierung und – entwicklung sowie das Vorhandensein von Variation in Struktur und Expression lassen es möglich erscheinen, dass das porcine Homologon in die Pathogenese des Ausgrätschens einbezogen sein kann.

5.2.1.4 Cyclin-dependent kinase inhibitor 3, *CDKN3*

Im Gegensatz zu den bislang diskutierten potentiellen Kandidatengenen, ist das *CDKN3* – Gen sowie die Funktion des Genproduktes im Zusammenhang mit dem Zellzyklus relativ gut untersucht. Der ca. 22 bis 24 Stunden lange Zellzyklus bei Eukaryonten kennzeichnet die Zeitdauer zwischen zwei Mitosen und kann in verschiedene Phasen unterteilt werden (Lewin 1991). Der Zellzyklus beginnt mit der G1 – Phase, in der die Zelle ihren normalen diploiden Zustand aufweist und der mit 12 oder mehr Stunden die größte Zeitspanne aufweist. Gefolgt wird dieser Abschnitt von der S – Phase, in der die Replikation der DNA einer Zelle innerhalb von ca. 6 – 8 Stunden vonstatten geht. In dem sich anschließendem G2 – Abschnitt liegt ein tetraploider Chromosomensatz vor, der in der nachfolgenden M – Phase auf die Eltern- und Tochterzelle verteilt wird. Das Durchlaufen des Zellzyklus erfordert die zeitlich koordinierte Aktion einer Vielzahl von Regelsystemen, Störungen führen zu abnormalen Entwicklungen (Lewin 1991).

Speziell für die Steuerung der Übergänge zwischen den einzelnen Phasen (G1/S, G2/M) wurde eine Gruppe von Schlüsselproteinen identifiziert, die als Cyclin – abhängige Kinasen (*cyclin – dependent kinase, CDK*) bezeichnet werden (Hannon et al. 1994). Jede dieser CDK interagiert spezifisch mit Vertretern einer ebenso diversen Proteinfamilie – den Cyclinen. Für die G1/S – Übergänge sind die eng verwandten CDK4 und 6 mit den assoziierten Cyclinen D1 bis D3 sowie das mit Cyclin E interagierende CDK 2 von Bedeutung (Ekholm & Reed 2000). Speziell die exakte Regulierung des Überganges von der G1 – zur S – Phase ist nach den Autoren von ausschlaggebender Bedeutung für das Überleben eines Organismus.

Ein Bestandteil des komplexen Regulationsmechanismus von Aktivität und Inaktivität der CDK-Cyclin – Komplexe sind die Cyclin – abhängigen Kinase Inhibitoren (*cyclin – dependent kinase inhibitor, CKI*). Diese Inhibitoren sind nach Sherr & Roberts (1999) prinzipiell in zwei Klassen einteilbar: Inhibitoren von CDK4 (INK4) mit den Proteinen p15, p16, p18 und p19, sowie Inhibitoren mit geringerer Spezifität für bestimmte CDK (p21, p27 und p57).

Von Gyuris et al. (1993) sowie Hannon et al. (1994) wurde ein weiterer, mit CDK2 interagierender Inhibitor gefunden (*cdi1*), der Eigenschaften einer Protein - Tyrosin – Phosphatase aufwies und von Hannon et al. (1994) als CDK – assoziierte Phosphatase

(KAP) bezeichnet wurde. In den eigenen Untersuchungen wird der mittlerweile etablierte offizielle Genname CDKN3 verwendet.

Gyuris et al. (1993) zeigten, dass eine Überexpression des Gens zu einem verzögerten Ablauf des Zellzyklus *in vitro* führt. Mutationen, die eine Veränderung des Cystein – Restes im katalytischen Zentrum des Proteins zur Folge haben, zerstören die katalytische Aktivität des Enzyms. Poon & Hunter (1995) beschreiben die Dephosphorylierung eines Threonin – Restes bei CDK2 durch CDKN3 als Ursache für die Hemmung von CDK2. Nach Cohen et al. (1999) ist CDKN3 in der Lage, auch effektiv an mutierte Formen von CDK2 zu binden. Generell wird die Regulationsachse MyoD – CDK2 – Cyclin E als zentrales Element in der terminalen Differenzierung von Myoblasten angesehen (Jahn et al. 1994, Song et al. 1998). Dabei kann eine induzierte Überexpression von CDK2 und Cyclin E zu einem Wiedereintritt an sich terminal differenzierter Muskelzellen in den Zellzyklus führen (Zhang et al. 1999).

In zwei unabhängigen Experimenten wurde das porcine Gen auf dem Chromosomenabschnitt 1q23-q27 lokalisiert (Maak et al. 2000, 2001b). Das humane Gen wurde auf 14q22 kartiert (Demetrick et al. 1995). Diese Lokalisation beim Schwein stand im Widerspruch zu den Angaben von Goureau et al. (1996), der eine Homologie zwischen 14q22 beim Menschen und dem porcinen Chromosom 7 angab. Bereits Leeb et al. (1997) wies jedoch nach, dass das Homologon eines auf dem humanen Chromosom 14q21 lokalisierten Gens (MGAT2) beim Schwein in der Bande 1q23-27 enthalten ist. Die eigenen Befunde erweitern diese homologe Region auf (Teile von) 14q22. Ergebnisse von Pinton et al. (2000) sowie Goureau et al. (2000) lieferten den endgültigen Beweis für die obengenannten Korrespondenzen zwischen den Chromosomen 14 und 1 bei Mensch und Schwein.

In neueren Untersuchungen konnte durch eine Differential – Display – Analyse gezeigt werden, dass CDKN3 – Überexpression stark mit der Entstehung von Brust- und Prostatakrebs assoziiert ist. Eine Antisense – Expression des Gens hemmte diesen Prozess (Lee et al. 2000). Die Autoren halten eine direkte Wirkung von CDKN3 als Onkogen mit allerdings noch zu klärenden Mechanismus als wahrscheinlich. Yeh et al. (2000) fanden in Leberkarzinomzellen mindestens 7 verschiedene Transkripte des CDKN3 – Gens, von denen 5 funktionell unwirksam waren. Alle veränderten Transkripte koexistierten mit Wildtyp – Transkripten. Auch in gesunden Zellen waren in geringem Umfang veränderte Transkripte auffindbar. Eine Beteiligung von mutierten Varianten im CDKN3 – Gen an der Entstehung von Leberkrebs wird als wahrscheinlich angesehen.

5 Diskussion

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

- eine hohe Homologie bei Protein und Gen zwischen Mensch und Schwein besteht,
- die genomische Organisation des Gens bei beiden Spezies identisch ist
- bei Spreizern eine offensichtlich erhöhte Expression des Gens auftrat und
- auch beim Schwein abweichende Transkripte des Gens vorkommen.

Vor dem Hintergrund der Hypothese, dass eine unvollständige Ausreifung der Skelettmuskulatur zum Geburtszeitpunkt die Ursache des Syndroms darstellen kann (Deutsch & Done 1971, Bergmann 1976), den eigenen Beobachtungen und den Literaturbefunden stellt CDKN3 ein funktionelles Kandidatengen für das Krankheitsbild dar. Vor allem die Frequenz von veränderten Transkripten bei Gesunden und Erkrankten, die mögliche Verbindung von Transkriptvarianten mit noch zu identifizierenden Intronvarianten sowie die quantitative Expression des Gens in beiden Probandengruppen werden im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen stehen.

Für drei der vier beschriebenen potentiellen Kandidatengene (TAF1B, BCL7B und CDKN3) werden Funktionen im Zusammenhang mit Entwicklungs – und Differenzierungsprozessen diskutiert. Ihre merkmalsassoziierte Expression könnte im Zusammenhang mit kompensatorischen Prozessen bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur im früh – postnatalen Zeitraum stehen. Aus diesem Grund liefern die eigenen Ergebnisse weitere Indizien für eine unvollständige Ausreifung der Skelettmuskulatur zum Geburtszeitpunkt bei Spreizerferkeln, die als möglicher Pathogenesemechanismus diskutiert wird. Weitere Unterstützung erhält diese Theorie von hier nicht behandelten biochemischen Analysen (Prange et al. 2000, 2001), die bei Spreizerferkeln einen um den Faktor 2 bis 3 erhöhten Plasmaspiegel an Laktatdehydrogenase (LDH) und Creatinphosphokinase (CPK) unmittelbar nach der Geburt fanden. Diese hochsignifikanten Unterschiede sind als Marker für eine erhöhte Permeabilität der Muskelzellmembran anzusehen (Lengerken et al. 1988) und verdeutlichen somit strukturelle Differenzen im untersuchten Muskel bei gesunden und erkrankten Ferkeln unmittelbar nach der Geburt. Die offensichtliche Kompensation möglicher Rückstände in der Entwicklung (Deutsch & Done 1971, Bergmann 1976) findet seine Widerspiegelung in der vollständigen Angleichung der Plasmaspiegel an LDH und CPK am 7. Lebenstag bei Spreizerferkeln im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch zu einem späteren Messzeitpunkt (21. Lebenstag) konnten keine Unterschiede mehr zu gesunden Tieren nachgewiesen werden.

5.2.1.5 Weitere Kandidatengensequenzen

Neben den 4 porcinen Genen mit Homologien zu humanen Genen wurden weitere 12 Fragmente mit merkmalsassoziierte Expression gefunden (Tabelle 4.17). Wegen fehlender Homologien zu beschriebenen Genen bei anderen Spezies entziehen sich diese Fragmente einer Beurteilung in Hinblick auf ihre potentielle Einbeziehung in das Syndrom. Für weiterführende Untersuchungen wäre als erster Schritt der Nachweis einer tatsächlich differentiellen Expression notwendig, die über Northern Blot – Analyse oder andere Methoden (siehe Abschnitt 2.1.2.3) erfolgen kann. Auch bietet der exponentielle Zuwachs an Daten zum humanen Genom die Chance zu weiterführenden strukturellen Analysen der Fragmente durch Vergleiche. Aus den Ergebnissen zur chromosomalen Zuordnung für einige dieser Fragmente lassen sich ebenfalls Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen ableiten. So konnte das Fragment AJ133887 dem porcinen X – Chromosom (Xq13) zugeordnet werden. Dieser Bereich ist homolog zum gleichen Abschnitt des humanen Chromosoms. Der wiederum enthält mit dem PHKA1 – Gen einen Marker für eine erbliche Phosphorylase – Kinase – Defizienz, die in eine Störung der Glykogenspeicherung im Skelettmuskel während der frühen Jugendentwicklung mündet (Gossen et al. 1995, Hendrickx et al. 1999). Auch für das Ausgrätschen wurde aus histomorphologischen Befunden geschlussfolgert, dass eine anormale Glykogenanreicherung im Muskel an der Pathogenese beteiligt sein kann (Ducatelle et al. 1986). Aus dieser Sicht ist ein Kandidatengencharakter für dieses Fragment denkbar. Unterstützt wird dieses durch die X – chromosomale Lokalisation, die wiederum mit dem gehäuften Auftreten der Erkrankung bei männlichen Ferkeln in Verbindung stehen könnte.

Die in diesem Untersuchungskomplex erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Methode des Differential Display/Reverse Transkription – PCR geeignet ist, potentielle, funktionelle Kandidatengensequenzen für die Erbkrankheit „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ zu identifizieren. Weiterführende Untersuchungen haben das Ziel, die differentielle Expression der potentiellen Kandidatengene zu verifizieren und Ursachen dieser Expressionsunterschiede aufzuklären. In Verbindung mit biochemischen, histologischen und elektronenmikroskopischen Analysen soll somit ein möglichst umfassendes Bild von der Pathogenese dieser Erkrankung erarbeitet werden.

5.3 Physische Kartierung von Kandidatengen und weiterer expressed sequence tags (ESTs) aus dem *M. biceps femoris* von neonatalen Ferkeln

Bedingt durch die geringe Spezifität der Primer, die in Differential Display – Experimenten zum Einsatz kommen, ist eine Amplifikation mehrerer Fragmente aus ein und derselben isolierten Bande ein häufiges Phänomen. Nach Sequenzierung mehrerer Klone einer Bande wird anhand der Häufigkeit der erhaltenen Sequenzen das Fragment identifiziert, das für das differente Erscheinungsbild der Bande verantwortlich ist (Czernek-Schäfer & Schwerin 2000). Für die weiteren Sequenzen kann eine differente Expression weder angenommen noch verneint werden. Da diese Genfragmente jedoch aus einem mRNA – Pool aus dem untersuchten Gewebe amplifizierbar sind, ist die Expression des Gens im entsprechenden Gewebe nachgewiesen. Auch wenn nur „Nebenprodukt“ der eigentlichen Untersuchung, tragen solche ESTs zur Erweiterung des Kenntnisstandes zur Expression von Genen im untersuchten Gewebe bei. Nach Gellin et al. (2000) stellt die Generierung von sogenannten Expressions – Bibliotheken von verschiedenen Geweben unter verschiedenen physiologischen Zuständen und in verschiedenen Stadien der Entwicklung einen zentralen Punkt in der zukünftigen Nutzung molekularer Methoden in der Tierzucht dar. Sowohl die beschriebenen 16 differentiell exprimierten als auch die weiterhin identifizierten 10 Genfragmente sind Bestandteil einer solchen Bibliothek. Hierbei handelt es sich um erste Angaben zur Genexpression in einem Skelettmuskel neugeborener Ferkel. Obwohl die Skelettmuskulatur beim Schwein im Sinne der Nutzleistung das wichtigste Gewebe darstellt, sind die Erkenntnisse zur Expression von Genen in diesem Gewebe relativ begrenzt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind lediglich 4 Untersuchungen dokumentiert, in denen exprimierte Sequenzen (ESTs) der Skelettmuskulatur beim Schwein beschrieben werden. In zwei der Untersuchungen wurden insgesamt 41 ESTs identifiziert, die im *M. longissimus* von adulten Schweinen exprimiert werden (Tuggle & Schmitz 1994, Ponsuksili et al. 2000). Demgegenüber erstellten Davoli et al. (1999, 2000) eine Bibliothek aus dem auch in den eigenen Untersuchungen verwendeten *M. biceps femoris* von adulten Schweine und beschrieben insgesamt 83 exprimierte Sequenzen. Hier bietet sich die Möglichkeit eines direkten Vergleiches zur Expression von Genen innerhalb eines Gewebes in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, auch wenn die Aussage in Anbetracht der geringen Anzahl von Fragmenten nur begrenzten Wert hat. Davoli et al. (1999) fanden unter 72 willkürlich ausgewählten Fragmenten 65% mit Homologie zu Genen verschiedener Spezies, 28% mit Entsprechungen zu nicht näher charakterisierten EST und nur 2 Sequenzen (3%), die keinerlei Homologien zu gespeicherten Daten aufwiesen. Demgegenüber liegt das Verhältnis der angegebenen Kategorien in den eigenen Untersuchungen bei 42% : 31% : 27%. Im Datenbanksystem GenBank sind von der Arbeitsgruppe um Davoli mittlerweile weitere 422 ESTs aus dem *M. biceps femoris* dokumentiert. Ein Vergleich der eigenen mit

diesen Sequenzen erbrachte keinerlei Homologien, so dass weiterhin nur 1 Fragment von über 500 beschriebenen ESTs aus diesem Muskel sowohl in den eigenen Untersuchungen (Maak et al. 2001c) als auch in denen von Davoli et al. (1999, 2000, unpubliziert) identifiziert wurde. Hierbei handelt es sich um das Gen für die Pyruvatdehydrogenase (Isoenzym 4; PDK14). Von einer Gruppe des Meat Animal Research Center (Clay Center, USA) wurden zwei normalisierte porcine ESTs – Bibliotheken erstellt, die aus gepoolten embryonalen Geweben (MARC PIG1) sowie aus gepoolten Gewebe von reproduktiven und sekretorischen Organen (MARC PIG2) gewonnen wurden. In beiden Bibliotheken sind jeweils über 20.000 ESTs charakterisiert worden. Auch im Vergleich mit diesen 40.000 Genfragmenten ist lediglich eine Übereinstimmung mit 4 der 26 hier isolierten Fragmente gegeben. Dabei finden die Gene für CDKN3, ATP5I sowie BCL7B ihre Entsprechungen in ESTs der MARC PIG2 – Bibliothek und unterstreichen damit die Expression dieser Gene in zahlreichen Geweben. Ein weiteres anonymes Fragment (AJ133891) korrespondiert mit einem EST aus der embryonalen Bibliothek (MARC PIG1). Diese Daten zeigen, dass offensichtlich große Unterschiede zwischen den Expressionsmustern des M. biceps femoris bei neugeborenen Ferkeln sowie den anderen untersuchten embryonalen und adulten Geweben beim Schwein bestehen. Insofern stellen die eigenen Ergebnisse einen ersten Schritt zur Charakterisierung der Genexpression in diesem Muskel im früh – postnatalen Zeitraum beim Schwein dar. Der Vergleich mit Ergebnissen aus dem gleichen Muskel zu ontogenetisch verschiedenen Zeitpunkten verdeutlicht zudem die Richtigkeit der eingangs zitierten Aussage, dass ein Vergleich nur zwischen verschiedenen Geweben nicht ausreicht, um für die Tierzucht nutzbare Erkenntnisse zu gewinnen. Vielmehr müssen verschiedene Entwicklungsstufen und physiologische Zustände innerhalb eines Gewebes herangezogen werden, um zu einem umfassenden Bild der Genexpression zu gelangen (Gellin et al. 2000). Mit der chromosomalen Zuordnung von 13 Genfragmenten wurde ein Beitrag zur Vervollständigung der Genkarte des Schweines geleistet. Die zytogenetische Karte des Schweines enthält nach Gellin et al. (2000) etwa 400 Gene sowie 4.000 Marker aller Kategorien, davon 1.800 Mikrosatelliten. Damit wird eine Abdeckung von mehr als 95 % der geschätzten Genomlänge erreicht. Jedoch existieren starke Differenzen in der Dichte der Abdeckung sowohl zwischen einzelnen Chromosomen als auch zwischen zytogenetischen Banden innerhalb der Chromosomen. So sind Regionen, die stärker im Interesse vergangener Arbeiten standen (MHC – Region auf Chromosom 7) relativ dicht mit kartierten Genen und Markern belegt. Die Einordnung der eigenen Ergebnisse in die bisherige Charakterisierung des verwendeten Somatischen Zellhybridpanels (Yerle et al. 1996) ist in Tabelle 5.3 dargestellt. Für die Banden auf den Chromosomen 8 und X stellen die beschriebenen Fragmente erst das dritte Gen (ATP5I) bzw. den zweiten EST (AJ133887) dar, die kartiert wurden. Neben dem allgemeinen Beitrag zur Erhöhung der Dichte der zugeordneten Gene, ist im Zusammenhang

5 Diskussion

mit der Zielstellung der Untersuchungen der Aspekt der Identifizierung von Chromosomenregionen mit „Kandidatencharakter“ für die untersuchte Erkrankung von besonderem Interesse.

Tabelle 5.3: Anzahl an Genen, anonymen ESTs sowie Markern, die in den mit den eigenen Daten korrespondierenden Chromosomenabschnitten lokalisiert wurden (URL 8).

Fragment (GenBank/EMBL Accession No.)	Chromosomale Region	bislang beim Schwein kartiert		
		Gene	anonyme ESTs	Marker
CDKN3 (AJ404882)	1q23-q27	5	4	7
AJ133889	1q18 oder 1q28-q213	17	1	10
BCL7B (AJ404881)	3p16-p17	5	-	3
TAF1B (AJ277993)	3q21-q27	8	2	14
AJ133890	4q15-q16	5	1	7
EPLIN (AJ279591)	5p11-p15	12	1	3
RPS10 (AJ279590) NDRG2 (AJ279582)	7q12-q23 oder q26	23	2	15
ATP5I (AJ278444)	8q11-q12	2	-	2
SPARCL1 (AJ279589)	8q23-27	6	2	4
AJ133891	91/3p21-p24	6	-	3
PDK4 (AJ279587)	9q12-1/3q21	3	-	-
AJ133887	Xq13	1	1	-

Nach den in Tabelle 4.23 dargestellten Ergebnissen sind somit Regionen der Chromosomen 1, 3, 4, 8, 9 sowie X Träger von Genen, die als potentielle Kandidaten für das Ausgrätschen betrachtet werden können. Diese Information ist an sich von geringem Nutzen für die Aufklärung der Ursachen des Syndroms. Jedoch ist sie potentiell bedeutsam in Verbindung mit weiteren Untersuchungen. In einem Verbundprojekt (Förderverein Biotechnologieforschung der Deutschen Schweineproduktion e. V.; FBF) wird versucht, mittels Mikrosatelliten – Kopplungsanalyse Genomregionen zu identifizieren, die in Verbindung mit dem hier untersuchten Syndrom stehen. Somit können die eigenen Daten zur Verifizierung von potentiellen „QTL“ für das Ausgrätschen genutzt werden. Andererseits können Daten aus diesem Projekt wiederum Hinweise liefern, ob die hier vorgestellten Gene als Kandidatengene gelten können.

5.4. Der Kandidatengenansatz in der Genomanalyse bei Nutztieren – Grenzen und Chancen

Der Inhalt dieser Arbeit bestand in Untersuchungen an einem bereits charakterisierten funktionellen Kandidatengen für Leistungseigenschaften sowie der Isolierung von potentiellen Kandidatengenen für einen Erbfehler beim Schwein. Im ersten Teil der Untersuchungen wurden dazu Methoden der strukturellen Genomanalyse verwendet, wogegen im zweiten Teil Gene über Verfahren der funktionellen Genomanalyse identifiziert wurden um anschließend strukturell charakterisiert zu werden. Beiden Teilen der Arbeit ist gemeinsam, dass sie dem Kandidatengenansatz zuzurechnen sind und als Zielsetzung die Identifizierung der genetischen Ursachen von phänotypischen Eigenschaften haben.

Im Vergleich zum Markeransatz (siehe Abschnitt 2.1.2.4) hat der Kandidatengenansatz nach Rothschild et al. (2000) folgende Vorteile:

- Es werden Informationen zur biologischen Wirkung von Genprodukten als Grundlage für die Auswahl von Genen verwendet. Damit entspricht diese Methode eher dem Ziel, eine Ursache – Wirkung – Beziehung aufzudecken. Weiterhin ist eine Übertragung von Erkenntnissen über Speziesgrenzen oft möglich.
- Die Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen genetischer Variation im Kandidatengen und phänotypischer Eigenschaft lassen sich im Gegensatz zum Markeransatz in kommerziellen Populationen durchführen und sind im Erfolgsfalle direkt in der Population züchterisch verwendbar.
- Durch die Nutzung von kommerziellen Populationen können große Stichproben untersucht werden. Das ermöglicht das Auffinden auch kleinerer Effekte.
- Selbst wenn kein kausaler Zusammenhang zwischen Genvariation und Merkmal vorliegt, können nachgewiesene Assoziationen zumindest in der untersuchten Population sofort in der Selektion genutzt werden.

Limitierend wirkt dagegen die begrenzte Anzahl von potentiellen Kandidatengenen, die für landwirtschaftliche Nutztiere beschrieben sind. Darüber hinaus ist die Mehrzahl aller wirtschaftlich relevanten Merkmale polygen bedingt, d.h. die Chance, Gene mit deutlichen phänotypischen Effekten zu untersuchen, ist von vornherein gering. Der Stand der Technik erlaubte bis vor kurzem nur die Analyse von einzelnen oder wenigen Polymorphismen im Routinebetrieb. Als Maßnahmen zur Überwindung dieser Nachteile gibt Hardge (1999) im Wesentlichen zwei Wege an. Einerseits muss die Anzahl der zur Verfügung stehenden Kandidatengene erhöht werden und andererseits die genetischen Varianten möglichst vieler relevanter Gene in verschiedenen Populationen ermittelt werden. Die Bereitstellung von potentiellen Kandidatengensequenzen erfolgt gegenwärtig in einem rasanten Tempo. Dabei stehen vor allem die *expressed sequence tags* (EST) als nachgewiesenermaßen exprimierte Fragmente von Genen im Mittelpunkt des Interesses. Einerseits können diese, wie in der

5 Diskussion

Arbeit beschrieben, zielgerichtet durch Vergleich der Expressionsmuster direkt von merkmalsdifferenzierten Tieren gewonnen werden. Andererseits lässt sich der große Vorlauf der Humangenomforschung nutzen, indem humane ESTs beim Nutztier kartiert werden. Dabei ist mit einer Erfolgsrate von 5 – 10% zu rechnen, was angesichts der hohen Anzahl zur Verfügung stehender humaner ESTs zu einem signifikanten Erkenntniszuwachs führen kann (Lahbib-Mansais et al. 1999). Einen Eindruck dieser dynamischen Entwicklung vermitteln die Zahlen in Tabelle 5.4. In nur vier Monaten wurden z.B. für den Menschen etwa 10 – mal mehr ESTs isoliert, als für das Schwein momentan insgesamt beschrieben sind. Jedoch ist auch für Rind und Schwein ein beträchtlicher Zuwachs zu verzeichnen, der auf kürzlich beendete oder laufende EST – Isolierungsprojekte (z.B. Smith et al. 2001) zurückzuführen ist. Eine weitere Beschleunigung dieser Entwicklung ist bei fast allen Nutztierarten zu erwarten (Gellin et al. 2000).

Tabelle 5.4: Anzahl publizierter ESTs für verschiedene Spezies (URL 9).

Spezies Parameter	Mensch	Maus	Rind	Schwein
dbEST-Einträge				
05.01.2001	2.857.827	1.872.712	154.940	57.060
11.05.2001	3.510.107	1.961.530	168.667	60.022
Zuwachs	652.280	88.818	13.727	2.962

Die Ursachen für den immer größer werdenden Widerspruch zwischen der erwarteten Anzahl von nur 30.000 – 40.000 verschiedenen Genen bei Säugern (Bork & Copley 2001) und der beim Menschen bereits 100 – fach höheren Anzahl an scheinbar verschiedenen Genfragmenten werden von Cirera et al. (2000) diskutiert. Die Autoren stellten fest, dass von 1.328 selbst isolierten porcinen ESTs nach wie vor 38% keine Homologie zu Sequenzen im Datenbanksystem GenBank/EMBL aufwiesen. In den eigenen Untersuchungen lag dieser Anteil bei 27%. Als mögliche Ursachen geben die Autoren an:

- Verschiedene kurze Fragmente ein und desselben Gens wurden isoliert. Für das hier isolierte PDK4 - Gen trifft dieses zu (eigenes Ergebnis vs. Davoli et al.1999).
- Die Fragmente repräsentieren verschieden gespleißte Transkripte eines Gens.
- Orthologe Gene haben sich zwischen den Spezies stark verändert.
- Es handelt sich um Gene, die aufgrund zeitlich oder mengenmäßig limitierter Expression tatsächlich noch nie isoliert wurden.
- Es liegen Sequenzierungsfehler vor.

Zusätzlich zur Nutzung von ESTs werden zunehmend große genomische Fragmente bei Nutztieren sequenziert und führen zur direkten Detektion von Genen (Andersson et al. 2000, Robic et al. 2001, Fahrenkrug et al. 2001). Vergleichende Sequenzierungsprojekte (z.B. NISC Comparative Sequencing Initiative) werden in der Zukunft zu einer weitgehend vollständigen Sequenz des Genoms von ökonomisch bedeutsamen Spezies führen und damit einen großen Teil der insgesamt vorhandenen Gene einer Spezies für Kandidatengenuntersuchungen zugänglich machen. Auch für das zweite von Hardge (1999) genannte Ziel der parallelen Typisierung von zahlreichen Polymorphismen in verschiedenen Genen sind technische Lösungen bereits vorhanden. Durch Kodierung verschiedener Allele mit automatisch detektierbaren „Etiketten“ (Masscode) lassen sich bereits gegenwärtig 30 Polymorphismen parallel detektieren und damit einen Durchsatz von 40.000 Genotypen je Tag zu (Kokoris et al. 2000). Es wird weiterhin erwartet, dass mit DNA – Chips in wenigen Jahren bis zu 16.000 Genen zeitgleich analysiert werden können (Nelson 2001).

Die Typisierung von genetischen Varianten und die Untersuchung von deren Assoziation mit phänotypischen Eigenschaften stellt das Hauptmerkmal des klassischen Kandidatengenansatzes dar.

Im günstigsten, allerdings auch seltensten Fall wird dabei die kausale Mutation typisiert. Das MHS – Gen stellt ein solches Kandidatengen dar. Begleitet von jahrelangen biochemischen Untersuchungen, konnte hier für das Schwein eine Kausalkette „Mutation => Aminosäureaustausch => veränderte Proteineigenschaft => deutliche Auswirkung auf den Phänotyp“ etabliert werden. Damit ist eine äußerst effektive Anwendung in der praktischen Tierzucht möglich.

In den meisten Fällen jedoch werden Polymorphismen verwendet, deren Auswirkungen auf das entstehende Genprodukt entweder unbekannt sind oder nachgewiesenermaßen nicht existieren. Ein Beispiel für letzteren Fall ist das RPB4 – Gen. Der untersuchte Polymorphismus liegt im Intronbereich und ist demnach mit Sicherheit nicht die kausale Mutation (Rothschild et al. 2000). Trotzdem existieren in einigen Populationen enge Beziehungen zwischen genetischen Varianten an diesem Locus und Fruchtbarkeitsleistungen beim Schwein – und werden folgerichtig auch tierzüchterisch genutzt.

Demgegenüber konnten Schwerin et al. (1999) für die Mutationen im Promotor des pHSP70.2 – Gens Wirkungen auf die Genexpression nachweisen. Mutationen ohne Auswirkungen auf die Struktur des Genproduktes erhielten somit eine funktionelle Bedeutung zugewiesen.

Nach wie vor überwiegt jedoch die Situation, dass keine Erkenntnisse zur Auswirkung der genetischen Varianten auf die Funktion des Genproduktes vorliegen. Entsprechend fließen hier die Grenzen zwischen dem Kandidatengen – und Markeransatz, da Polymorphismen im

5 Diskussion

Kandidatengen als Marker für eine noch unbekannte kausale Mutation verwendet werden. Mit den beschriebenen neuen Technologien ist dieser Ansatz auch bei komplexeren phänotypischen Merkmalen, die durch mehrere Gene beeinflusst werden, anwendbar. Nach Cargill & Daley (2000) kann man durch umfangreiche Studien letztendlich einige wenige Polymorphismen auffinden, die allen Individuen mit einer bestimmten Eigenschaft zueigen sind (common variant – common disease – Hypothese).

Für die meisten tierzüchterisch relevanten Merkmale wird sich die Situation jedoch komplexer darstellen. So sind vergleichsweise in einer Übersicht von Perusse et al. (2001) mehr als 250 Gene aufgeführt, die mit unterschiedlichsten Methoden als Kandidatengene für das Merkmal „Verfettung“ beim Menschen identifiziert wurden, einige davon auch durch Studien an Nutztieren. Viele Nutzleistungen der Haustiere, wie die Schlachtkörperqualität beinhalten Merkmale (hier z.B. den Muskelfleischanteil), die Resultanten von äußerst komplexen biochemischen Abläufen darstellen. Dementsprechend ist für die Ausprägung solcher Merkmale die Beteiligung von zahlreichen Genprodukten mit oft nur geringen Einzeleffekten wahrscheinlich. Die von Schwerin et al. (2001a, b) beschriebenen kompensatorischen Effekte von Polymorphismen bereits innerhalb eines Gens lassen erahnen, dass selbst mit der parallelen Darstellung von einer großen Anzahl genetischer Varianten – der Haplotypenbildung – nicht alle Fragen zur genetischen Ursache für eine phänotypische Variante zu klären sind. Hier liegen die Grenzen des bisherigen Kandidatengenansatzes.

Für den Komplex der Regulation des Zellzyklus (siehe Abschnitt 5.2.1.4) ziehen Murray & Marks (2001) die enttäuschende Bilanz, dass sich aus einer ersten Analyse des sequenzierten humanen Genoms keinerlei bedeutsame Erweiterung des Wissensstandes ergeben hat. Somit werden auch Grenzen der strukturellen Genomanalyse ersichtlich. Die Autoren folgern, dass noch ein weiter Weg im Prozess der Umwandlung von DNA – Sequenzdaten zu biologischem Wissen zu gehen ist.

Eine potentielle Lösung dieses Problems können Verfahren der funktionellen Genomanalyse darstellen. Die Identifizierung von Zusammenhängen zwischen Genexpression und Phänotyp ist deswegen zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Der auch in den eigenen Untersuchungen verwendete Ansatz des Differential Display wird weiterhin erfolgreich zur Identifizierung von Genen mit differenter Expression eingesetzt (Kostic & Shaw 2000) und neue Verfahren mit analoger Zielsetzung werden entwickelt (Shmelkov et al. 2001). Die so identifizierten Gene erschließen sich nachfolgenden Kandidatengenuntersuchungen. Die parallele Darstellung der Expression einer Vielzahl von Genen ist mittels der Chip – basierenden Technologien inzwischen auch für die Tierzuchtforschung verfügbar. Erste DNA – Arrays für wissenschaftliche Fragestellungen bei Nutztieren befinden sich in der Anwendung (Schwerin, persönl. Mitteilung).

Unter diesem Blickwinkel kann von einer Neudefinition des Kandidatengenansatzes gesprochen werden, indem zunehmend Methoden der funktionellen Genomanalyse die bislang vorwiegend strukturellen Analysen von Kandidatengen ergänzen. Auch im Bereich der Forschung zu komplexen Erkrankungen beim Menschen wird dem Kandidatengenansatz für die Zukunft eine zunehmende Bedeutung prognostiziert (Kwon & Goate 2000, Baron 2001).

Begleitet werden wird dieser Prozess der weiteren Genomanalyse von Entwicklungen auf dem Gebiet der sogenannten *proteomics*, der Analyse der letztendlich aus der Genexpression resultierenden Proteine. Deren Anzahl in menschlichen Zellen wird auf 1 bis 10 Millionen geschätzt und verdeutlicht die noch anstehenden Herausforderungen bis zum umfassenden Verständnis komplexer biologischer Prozesse (Nelson 2001). Van Bogelen (zitiert von Nelson 2001) fordert dementsprechend: „What you need to do is to pull several fields together – physiology, biochemistry, RNA profiling and protein structure. That way we can get much further in understanding what biology is all about“. Die ohnehin nicht starr abgrenzbaren Gebiete von Genom –, Transkriptom – und Proteomanalyse werden folglich noch stärker in Wechselwirkung treten. Auch der Kandidatengenansatz wird in seiner neuen Form als Methode in diesen Prozess integriert sein.

Die Verwendung molekulargenetischer Methoden wird zunehmend Bestandteil der Tierzucht. Die Erwartungen an diese Entwicklung sollten jedoch von Realismus geprägt sein. Eine dramatische Beschleunigung des Zuchtfortschrittes in ökonomisch bedeutsamen Merkmalen ist nicht zu erwarten, da einerseits das biologische Potential unserer Nutztiere bereits durch die klassischen Zuchtmethoden weitgehend ausgeschöpft worden ist (z.B. Muskelfleischanteil beim Schwein) und andere Merkmalskomplexe (z.B. Fruchtbarkeit) durch hohe Umweltbeeinflussbarkeit geprägt sind (Simianer 2000). Jedoch werden molekulargenetische Daten (z.B. Markerinformationen zu qualitativen und quantitativen Leistungsmerkmalen) eine wichtige zusätzliche Informationsquelle für die sich ebenfalls ständig weiterentwickelnde klassische Tierzucht darstellen.

Aus dem besseren Verständnis der biologischen Vorgänge, das durch die Genomanalyse in Verbindung mit anderen Wissenschaftszweigen erreicht werden wird, lassen sich wiederum art- und tierspezifische Anforderungen an Haltung und Fütterung ableiten und bei der Gestaltung einer zukunftsfähigen Produktion tierischer Nahrungsmittel berücksichtigen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit beinhaltet die Untersuchung von Beziehungen zwischen Kandidatengenvarianten und Leistungsmerkmalen sowie die Identifizierung von Kandidatengenen für einen Erbfehler beim Schwein. Mit der physischen Kartierung isolierter Gene wird ein Beitrag zur Vervollständigung der Genkarte des Schweines geleistet.

Dazu wurden genetische Varianten im Hitzeschockprotein 70.2 – Gen (HSP70.2) als Vertreter der Stressproteine auf ihre Beziehung zu Leistungsparametern, die durch Stress beeinflussbar sind, untersucht. Mit der Methode des Differential Display/Reverse Transkriptase PCR (DD/RT-PCR) wurden in einem zweiten Komplex Genfragmente isoliert, die mit dem Auftreten des Erbfehlers „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel assoziiert sind. Einige der so identifizierten Fragmente wurden im Hinblick auf ihren Charakter als potentielle Kandidatengene für die Erkrankung charakterisiert. Mit der physische Kartierung solcher Gene durch Analyse somatischer Zellhybridlinien wurde die zytogenetische Karte des Schweines erweitert.

Zu den Assoziationsanalysen zwischen pHSP70.2 – Genvarianten und Leistungseigenschaften wurden insgesamt 754 Schweine in 6 separaten Untersuchungen herangezogen. Die Identifizierung von potentiellen Kandidatengenen für das Ausgrätschen beim Saugferkel wurde an Skelettmuskelproben von jeweils zwei gesunden und vom Erbdefekt betroffenen Ferkeln vorgenommen.

Das pHSP70.2 – Gen als funktionelles Kandidatengen für stressbeeinflussbare Leistungsmerkmale beim Schwein.

In diesem Komplex wurden genetische Varianten in zwei transkriptionbeeinflussenden Sequenzmotiven des Promotors des pHSP70.2 – Gens (GC – Box, TATA – Box) in Bezug auf ihre Beziehung zu Merkmalen der Fleischbeschaffenheit, zu in-vitro Parametern zu deren Vorhersage sowie zu Merkmalen der männlichen und weiblichen Fruchtbarkeit untersucht. In einigen Populationen wurden signifikante Mittelwertdifferenzen für Fleischbeschaffenheitsmerkmale zwischen Schweinen mit unterschiedlichen pHSP70.2 – Genotypen gefunden. Diese Unterschiede traten jedoch nicht durchgängig und einheitlich auf. Es wurde ein Trend beobachtet, wonach der Wildtyp im TATA – Box – Polymorphismus sowie das mutierte Allel in der GC – Box mit vorteilhaften Leistungsparametern verbunden sind. In einer Ressourcepopulation, in der der TATA – Box – Polymorphismus segregierte, konnten diese tendenziellen Zusammenhänge nicht bestätigt werden. Vor dem Hintergrund mittlerweile beschriebener Auswirkungen der Polymorphismen auf die Gentranskription und weiterer identifizierter funktioneller Polymorphismen in diesem Gen werden die Ergebnisse

einer kritischen Bewertung unterzogen. Die beim pHSP70.2 – Gen beobachteten Polymorphismen mit teilweise gegenläufigen funktionellen Auswirkungen zeigen die Grenzen des klassischen Kandidatengenansatzes – Analyse einzelner Polymorphismen in ihrer Auswirkung auf den Phänotyp – auf. Weitere Untersuchungen unter Berücksichtigung aller funktionellen Varianten können Aufklärung bringen, ob das pHSP70.2 – Gen ein Kandidatengen für stressbeeinflussbare Leistungen beim Schwein darstellt.

Potentielle Kandidatengene für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“.

Mittels DD/RT-PCR wurden insgesamt 16 Genfragmente isoliert, die merkmalsassoziiert exprimiert wurden. Diese Gene können somit als potentielle Kandidatengene für den Erbfehler betrachtet werden. Durch vergleichende Analysen konnten vier der Fragmente als orthologe Gene des Schweines für CDKN3 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 3), TAF1B (TATA box binding protein associated factor), BCL7B (B cell CLL, lymphoma 7B) sowie ATP5I (ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F0 complex, subunit e) identifiziert werden. Für die drei erstgenannten Gene sind Funktionen im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus beschrieben, was ihre Einbeziehung in den Pathogenesemechanismus des Syndroms als möglich erscheinen lässt. Für das porcine CDKN3 – Gen wurde die genomische Organisation analysiert und damit Voraussetzungen für weiterführende Kandidatengen – Untersuchungen geschaffen. Es wurden sechs verschiedene Transkriptvarianten gefunden, die zu veränderten Proteinen führen können. Aufgrund dieser Beobachtungen erscheint eine Betrachtung des CDKN3 – Gens als Kandidatengen für den untersuchten Erbfehler gerechtfertigt. Auch hierzu müssen weitere, bereits begonnene Untersuchungen Aufklärung bringen. Im Zuge der Analysen wurden weitere 10 Gene isoliert, die im Skelettmuskel neugeborener Ferkel exprimiert werden. Diese insgesamt 26 *expressed sequence tags* (ESTs) stellen die erste Angabe zur Genexpression in einem Skelettmuskel des Schweines unmittelbar nach der Geburt dar. Dreizehn ESTs konnten physisch kartiert werden und tragen zur Erweiterung der zytogenetischen Karte des Schweines bei.

Die eigenen Ergebnisse zur Kandidatengen – Analyse beim Schwein werden im Kontext der dynamischen Entwicklung der Genomanalyse diskutiert und eine Bewertung des Kandidatengen – Ansatzes vorgenommen.

6 Zusammenfassung

Summary

The association between candidate gene variants and performance traits was investigated and, potential candidate genes for a hereditary disorder were identified. The physical mapping of isolated genes contributed to the compilation of the porcine gene map. To this end, genetic variants of the heat shock protein 70.2 – gene (HSP70.2) as a member of the family of stress proteins were investigated on their association with quantitative traits.

In the second part of this work, the Differential Display/Reverse Transcriptase PCR (DD/RT PCR) was employed to isolate gene fragments associated with the hereditary disorder „Congenital splay leg in piglets“. Some of the identified genes were characterized as potential candidates for the syndrome. Physical mapping was performed by analysis of somatic cell hybrids. These results extend the cytogenetic map of the pig.

The association between pHSP70.2 variants and performance traits was analyzed in 6 separate experiments with a total number of 754 pigs. Muscle samples of each two healthy and affected piglets were used for the identification of potential candidate genes for splay leg syndrome.

The pHSP70.2 – gene as functional candidate for performance traits susceptible to stress.

Variants in two promoter elements (GC – box; TATA – box) influencing gene transcription were investigated on their association with meat quality, in-vitro parameters for the prediction of meat quality and, traits of male and female fertility, respectively. Significant differences in meat quality traits were found between pigs with different HSP70.2 genotypes in some populations. These relationships however, were inconsistent in different investigations. The TATA – box wild type allele and the mutant allele of the GC – box tended to be associated with favorable traits. Investigations in an experimental resource population could not confirm the association of TATA – box alleles with any performance trait. Meanwhile, the functional effects of these polymorphisms were described and further functional mutations in the HSP70.2 gene were identified. Taking this into consideration, the own results are critically discussed. The existence of several polymorphisms with partly opposite effects on transcription within a single gene elucidates the limits of the classical candidate approach – to find relationships between a single mutation and quantitative traits. Further experiments including all functional mutations of the gene are necessary to prove the pHSP70.2 gene as functional candidate for performance traits susceptible to stress.

Potential candidate genes for the syndrome „Congenital splay leg in piglets“.

A total of 16 gene fragments with obvious trait association was isolated by DD/RT PCR. Their differential display makes them potential candidate genes for the investigated hereditary disorder. Four genes could be identified as porcine orthologs of the human genes for CDKN3 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 3), TAF1B (TATA box binding protein associated factor), BCL7B (B cell CLL, lymphoma 7B) and ATP5I (ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F₀ complex, subunit e), respectively. Three of these genes have functions in the regulation of the cell cycle. This indicates a participation of this complex in the pathogenesis of the syndrome. The genomic organization of the porcine CDKN3 gene was analyzed thus providing a basis for subsequent candidate gene investigations. There were at least six different transcripts of the gene potentially resulting in altered proteins. For these reasons the porcine CDKN3 gene can be considered as candidate for splay leg in piglets. Further investigations will aim at the identification of relationships between CDKN3 gene expression and congenital splay leg syndrome in piglets. Furthermore, 10 fragments were isolated that are expressed in skeletal muscle of neonatal piglets. The total of 26 expressed sequence tags (ESTs) establishes a first list of genes expressed in a porcine muscle at this developmental stage. Thirteen ESTs were physically mapped and thus, contribute to the extension of the cytogenetic map of the pig.

The own results are evaluated on the background of the dynamic developments in genome analysis. The perspectives of the candidate gene approach in future are discussed.

7 Literaturverzeichnis

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*. 1999 402:715-720.
- Agashe VR, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol*. 2000 11:15-25.
- Al-Bayati HK, Duscher S, Kollers S, Rettenberger G, Fries R, Brenig B. Construction and characterization of a porcine P1-derived artificial chromosome (PAC) library covering 3.2 genome equivalents and cytogenetical assignment of six type I and type II loci. *Mamm Genome*. 1999 10:569-572.
- Alexander LJ, Troyer DL, Rohrer GA, Smith TP, Schook LB, Beattie CW. Physical assignments of 68 porcine cosmid and lambda clones containing polymorphic microsatellites. *Mamm Genome*. 1996a 7:368-372.
- Alexander LJ, Rohrer GA, Beattie CW. Cloning and characterization of 414 polymorphic porcine microsatellites. *Anim Genet*. 1996b 27:137-148.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 25:3389-3402.
- Andersson-Eklund L, Marklund L, Lundstrom K, Haley CS, Andersson K, Hansson I, Moller M, Andersson L. Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a wild boar x Large White intercross. *J Anim Sci*. 1998 76:694-700.
- Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja I, Fredholm M, Hansson I, Hakansson J, Lundstrom K. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*. 1994 263:1771-1774.
- Anderson SI, Lopez-Corrales NL, Gorick B, Archibald AL. A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mamm Genome*. 2000 11:811-814.
- Antalikova L, Horak V, Matolin S. Ultrastructural demonstration of glucose-6-phosphatase activity and glycogen in skeletal muscles of newborn piglets with the splayleg syndrome. *Reprod Nutr Dev*. 1996 36:205-212.
- Aron Y, Busson M, Polla BS, Dusser D, Lockhart A, Swierczewski E, Favatier F. Analysis of hsp70 gene polymorphism in allergic asthma. *Allergy*. 1999 54:165-170.
- Archibald AL, Haley CS, Brown JF, Couperwhite S, McQueen HA, Nicholson D, Coppieters W, Van de Weghe A, Stratil A, Wintero AK, et al. The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm Genome*. 1995 6:157-175.
- 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.
- Baltimore D. Our genome unveiled. *Nature*. 2001 409:814-815.
- Baron M. The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? *Mol Psychiatry*. 2001 6:143-149.
- Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe 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 protein (PLP) gene. *Mamm Genome*. 1999 10:895-899.
- Beckers M, Gabriels J, van der Maarel S, De Vriese A, Frants RR, Collen D, Belayew A. Active genes in junk DNA? Characterization of DUX genes embedded within 3.3 kb repeated elements. *Gene*. 2001 264:51-57.
- Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2001 11:6-10.
- Bergmann V. Elektronenmikroskopische Befunde an der Skelettmuskulatur von neugeborenen Ferkeln mit Grätschstellung. *Arch Exp Vet Med*. 1976 30:239-260.
- Beuzen ND, Stear MJ, Chang KC. Molecular markers and their use in animal breeding. *Vet J*. 2000 160:42-52.
- Bichsel VE, Liotta LA, Petricoin EF. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling. *Cancer J*. 2001 7:69-78.
- Bickhardt K. Pathogenese und Behandlungsmöglichkeiten der Myopathien beim Schwein. *Der Praktische Tierarzt*. 1984 10:841-844.
- Bienz M, Pelham HR. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv Genet*. 1987 24:31-72.

- Bit-Avragim N, Perrot A, Schols L, Hardt C, Kreuz FR, Zuhlke C, Bubel S, Laccone F, Vogel HP, Dietz R, Osterziel KJ. The GAA repeat expansion in intron 1 of the frataxin gene is related to the severity of cardiac manifestation in patients with Friedreich's ataxia. *J Mol Med.* 2001 78:626-632.
- Björklund NE, Svendsen J, Svendsen LS. Histomorphological studies of the perinatal pig: Comparison of five mortality groups with unaffected pigs. *Acta Vet Scand.* 1987 28:105-116.
- Bolla MK, Miller GJ, Yellon DM, Evans A, Luc G, Cambou JP, Arveiler D, Cambien F, Latchman DS, Humphries SE, Day IN. Analysis of the association of a heat shock protein70-1 gene promoter polymorphism with myocardial infarction and coronary risk traits. *Dis Markers.* 1998 13:227-235.
- Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg GD. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* 1994 23:85-93.
- Bork P, Copley R. The draft sequences: Filling in the gaps. *Nature.* 2001 409:818-819.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980 32:314-331.
- Bovenhuis H, van Arendonk JAM, Davis G, Elsen JM, Haley CS, Hill WG, Baret PV, Hetzel DJS, Nicholas FW. Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. *Livestock Production Sci.* 1997 52:135-144.
- Breen GA, Jordan EM. Regulation of the nuclear gene that encodes the alpha-subunit of the mitochondrial F0F1-ATP synthase complex. Activation by upstream stimulatory factor 2. *J Biol Chem.* 1997 272:10538-10542.
- Breen GA, Jordan EM. Upstream stimulatory factor 2 activates the mammalian F1F0 ATP synthase alpha-subunit gene through an initiator element. *Gene Expr.* 1998 7:163-170.
- Breen GA, Jordan EM. Transcriptional activation of the F(1)F(0) ATP synthase alpha-subunit initiator element by USF2 is mediated by p300. *Biochim Biophys Acta.* 1999 1428:169-176.
- Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol.* 2000 19:569-580.
- Brenig B, Brem G. Direct cloning of sequence tagged microsatellite sites by DNA affinity chromatography. *Nucleic Acids Res.* 1991 19:5441.
- Brenig B. Analyse und Kartierung von Nutztiergenomen. 18. Hülsenberger Gespräche. Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung. 2000 18:22-27.
- Brookes AJ, Lehvaslaiho H, Siegfried M, Boehm JG, Yuan YP, Sarkar CM, Bork P, Ortigao F. HGBASE: a database of SNPs and other variations in and around human genes. *Nucleic Acids Res.* 2000 28:356-360.
- Buitkamp J, Ammer H, Geldermann H. DNA fingerprinting in domestic animals. *Electrophoresis.* 1991 12:169-174.
- Buitkamp J, Schwaiger W, Epplen C, Gomolka M, Weyers E, Epplen JT. Towards covering immunological genes with highly informative markers: a trans-species approach. *EXS.* 1993 67:87-102.
- Buitkamp J, Kollers S, Durstewitz G, Fries R, Welzel K, Schafer K, Kellermann A, Lehrach H. Construction and characterization of a gridded cattle BAC library. *Anim Genet.* 2000 31:347-351.
- Bull LN, Pabon-Pena CR, Freimer NB. Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. *Genome Res.* 1999 9:830-838.
- Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000 28:4364-4375.
- Cargill M, Daley GQ. Mining for SNPs: putting the common variants--common disease hypothesis to the test. *Pharmacogenomics.* 2000 1:27-37.
- Cascino I, Sorrentino R, Tosi R. Strong genetic association between HLA-DR3 and a polymorphic variation in the regulatory region of the HSP70-1 gene. *Immunogenetics.* 1993a 37:177-182.
- Cascino I, D'Alfonso S, Cappello N, Giordano M, Pugliese A, Awdeh Z, Alper CA, Richiardi PM. Gametic association of HSP70-1 promoter region alleles and their inclusion in extended HLA haplotypes. *Tissue Antigens.* 1993b 42:62-66.
- Castellanos C, Barragan C, Rodriguez MC. Detection of four porcine Y-specific markers by RAPD. *Anim Genet.* 1996 27:433.
- Chaudhary R, Wintero AK, Fredholm M, Chowdhary BP. FISH mapping of seven cDNA sequences in the pig. *Chromosome Res.* 1997 5:545-549.
- Cheah KS, Cheah AM, Lahucky R, Mojto J, Poltarsky J. An in-vivo predictive test for meat quality in pigs. *Proc 37th ICoMST.* 1991 Vol 1:64-67.

7 Literaturverzeichnis

- Chen S, Maul RS, Kim HR, Chang DD. Characterization of the human EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) gene reveals distinct promoters for the two EPLIN isoforms. *Gene*. 2000a 248:69-76.
- Chen MY, Huang SY, Tsou HL, Lin EC, Yang PC, Kuo YH, Huang TY, Lee WC. Polymorphism in the 5'-flanking region of porcine heat shock protein 70.2 gene. *Anim Genet*. 2000b 31:410-411.
- Chen KF, Huang LS, Li N, Zhang Q, Luo M, Wu CX. The genetic effect of estrogen receptor (ESR) on litter size traits in pig. *Yi Chuan Xue Bao*. 2000c 27:8573-8577.
- Cheng WT, Lee CH, Hung CM, Chang TJ, Chen CM. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs. *Theriogenology*. 2000 54:1225-1237.
- Chevalet C, Gouzy J, SanCristobal-Gaudy M. Regional assignment of genetic markers using a somatic cell hybrid panel: a WWW interactive program available for the pig genome. *Comput Appl Biosci*. 1997 13:69-73.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 162:156-159.
- Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer*. 1997 80:1489-1496.
- Chouchane L, Danguir J, Beji C, Bouassida K, Camoin L, Sfar H, Gabbouj S, Strosberg A. Genetic variation in the stress protein hsp70-2 gene is highly associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 25:462-466.
- Christison GI, Lewis NJ, Bayne GR. Effects of farrowing crate floors on health and performance of piglets and sows. *Vet Rec*. 1987 121:37-41.
- Cirera S, Wintero AK, Fredholm M. Why do we still find anonymous ESTs? *Mamm Genome*. 2000 11:689-693.
- Clarke AR. Molecular chaperones in protein folding and translocation. *Curr Opin Struct Biol*. 1996 6:43-50.
- Clouscard-Martinato C, Mulsant P, Robic A, Bonnet A, Gasser F, Hatey F. Characterization of FSH-regulated genes isolated by mRNA differential display from pig ovarian granulosa cells. *Anim Genet*. 1998 29:98-106.
- Cogne N, Claverys J, Denis F, Martin C. A novel mutation in the alpha-helix 1 of the C subunit of the F(1)/F(0) ATPase responsible for optochin resistance of a *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 38:119-121.
- Colgan J, Manley JL. Cooperation between core promoter elements influences transcriptional activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 92:1955-1959.
- Colige A, Sieron AL, Li SW, Schwarze U, Petty E, Wertelecki W, Wilcox W, Krakow D, Cohn DH, Reardon W, Byers PH, Lapiere CM, Prockop DJ, Nusgens BV. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet*. 1999 65:308-317.
- Comai L, Tanese N, Tjian R. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*. 1992 68:965-976.
- Comai L, Zomerdijk JC, Beckmann H, Zhou S, Admon A, Tjian R. Reconstitution of transcription factor SL1: exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science*. 1994 266:1966-1972.
- 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.
- Combes S, Louveau I, Bonneau M. Moderate food restriction affects skeletal muscle and liver growth hormone receptors differently in pigs. *J Nutr*. 1997 127:1944-1949.
- Connelly C, McCormick MK, Shero J, Hieter P. Polyamines eliminate an extreme size bias against transformation of large yeast artificial chromosome DNA. *Genomics*. 1991 10:10-16.
- Cox CS, Ward PS, Baskerville A. Quantitative image analysis of skeletal muscle from newborn pigs with myofibrillar hypoplasia and splayleg. *Br Vet J*. 1979 135:370-374.
- Craig EA. The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem*. 1985 18:239-280.
- Crooijmans RP, Vrebalov J, Dijkhof RJ, van der Poel JJ, Groenen MA. Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library. *Mamm Genome*. 2000 11:360-363.
- 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, Calus A, Hoorens J. Morphometric evaluation of myofibrillar hypoplasia in splayleg piglets. *Dt Tierärztl Wschr*. 1989 96:189-191.
- Czernek-Schäfer D, Schwerin M. Genexpression des Eutergewebes von Kühen mit und ohne Mastitis – Darstellung different exprimierter mRNA's. *Proc. Vortragstagung DGfZ/GfT Kiel 2000*. B17.
- David JC, Landry J, Grongnet JF. Perinatal expression of heat-shock protein 27 in brain regions and nonneural tissues of the piglet. *J Mol Neurosci*. 2000 15:109-120.

- Davoli R, Zambonelli P, Bigi D, Fontanesi L, Russo V. Analysis of expressed sequence tags of porcine skeletal muscle. *Gene*. 1999 233:181-188.
- Davoli R, Bigi D, Fontanesi L, Zambonelli P, Yerle M, Zijlstra C, Bosma AA, Robic A, Russo V. Mapping of 14 expressed sequence tags (ESTs) from porcine skeletal muscle by somatic cell hybrid analysis. *Anim Genet*. 2000 31:400-403.
- Demand J, Luders J, Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol Cell Biol*. 1998 18:2023-2028.
- 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 cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet*. 1995 69:190-192.
- DeNagel DC, Pierce SK. Heat shock proteins in immune responses. *Crit Rev Immunol*. 1993 13:71-81.
- Dennis JA, Moran C, Healy PJ. The bovine alpha-glucosidase gene: coding region, genomic structure, and mutations that cause bovine generalized glycogenosis. *Mamm Genome*. 2000 11:206-212.
- Deutsch K, Done JT. Congenital myofibrillar hypoplasia of piglets: ultrastructure of affected fibres. *Res Vet Sci*. 1971 12:176-184.
- Derrigo M, Cestelli A, Savettieri G, Di Liegro I. RNA-protein interactions in the control of stability and localization of messenger RNA (review). *Int J Mol Med*. 2000 5:111-123.
- Dezeure F, Vaiman M, Chardon P. Characterization of a polymorphic heat shock protein 70 gene in swine outside the SLA major histocompatibility complex. *Biochim Biophys Acta*. 1993 1174:17-26.
- Dibb NJ, Newman AJ. Evidence that introns arose at proto-splice sites. *EMBO J*. 1989 8:2015-2021.
- Ding ST, Schinckel AP, Weber TE, Mersmann HJ. Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. *J Anim Sci*. 2000 78:2127-2134.
- Di Pietro C, Rapisarda A, Amico V, Bonaiuto C, Viola A, Scalia M, Motta S, Amato A, Engel H, Messina A, Sichel G, Grzeschik K, Purrello M. Genomic localization of the human genes TAF1A, TAF1B and TAF1C, encoding TAF(I)48, TAF(I)63 and TAF(I)110 subunits of class I general transcription initiation factor SL1. *Cytogenet Cell Genet*. 2000 89:133-136.
- Dressel R, Gunther E. A pentanucleotide tandem duplication polymorphism in the 3' untranslated region of the HLA-linked heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) gene. *Hum Genet*. 1994 94:585-586.
- Dobson KJ. Failure of choline and methionine to prevent splayleg in piglets. *Aust Vet J*. 1971 44:26-28.
- Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Green JM, Pierce SK. Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol Cell Biol*. 1993 13:3598-3610.
- 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.
- Dudley JW. Theory for identification of marker locus – QTL associations in population by line crosses. *Theor Appl Genet*. 1992 85:101-104.
- Duhamel-Maestracci N, Simard R, Harbers K, Spencer JH. Localization of satellite DNAs in the chromosomes of the guinea pig. *Chromosoma*. 1979 75:63-74.
- Duret L. Why do genes have introns? Recombination might add a new piece to the puzzle. *Trends Genet*. 2001 17:172-175.
- Dworniczak B, Mirault ME. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res*. 1987 15:5181-5197.
- Eberhard D, Tora L, Egly JM, Grummt I. A TBP-containing multiprotein complex (TIF-IB) mediates transcription specificity of murine RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res*. 1993 21:4180-4186.
- Eddy SR. Noncoding RNA genes. *Curr. Op. Genet. Dev* 1999 9:695-699.
- Editorial. The nature of the number. *Nature Genetics*. 2000 25:127-128.
- Edwards CJ, Dolf G, Looft C, Loftus RT, Bradley DG. Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzen and three related European cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. *Anim Genet*. 2000 31:329-332.
- Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, Ealy AD. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*. 2001 55:209-223.
- Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 12:676-684.
- Ellegren H, Johansson M, Chowdhary BP, Marklund S, Ruyter D, Marklund L, Brauner-Nielsen P, Edfors-Lilja I, Gustavsson I, Juneja RK, et al. Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. *Genomics*. 1993 16:431-439.

7 Literaturverzeichnis

- Ellegren H, Basu T. Filling the gaps in the porcine linkage map: isolation of microsatellites from chromosome 18 using flow sorting and SINE-PCR. *Cytogenet Cell Genet.* 1995 71:370-373.
- Ellis RJ. The molecular chaperone concept. *Semin Cell Biol.* 1990 1:1-9.
- 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.
- Estrade M, Vignon X, Rock E, Monin G. Glycogen hyperaccumulation in white muscle fibres of RN-carrier pigs. A biochemical and ultrastructural study. *Comp Biochem Physiol B.* 1993 104:321-326.
- Everts RE, Versteeg SA, Renier C, Vignaux F, Groot PC, Rothuizen J, van Oost BA. Isolation of DNA markers informative in purebred dog families by genomic representational difference analysis (gRDA). *Mamm Genome.* 2000 11:741-747.
- Fahrenkrug SC, Rohrer GA, Freking BA, Smith TP, Osoegawa K, Shu CL, Catanese JJ, de Jong PJ. A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration. *Mamm Genome.* 2001 12:472-474.
- Fathallah DM, Cherif D, Dellagi K, Arnaout MA. Molecular cloning of a novel human hsp70 from a B cell line and its assignment to chromosome 5. *J Immunol.* 1993 151:810-813.
- Favatier F, Jacquier-Sarlin MR, Swierczewski E, Polla BS. Polymorphism in the regulatory sequence of the human hsp70-1 gene does not affect heat shock factor binding or heat shock protein synthesis. *Cell Mol Life Sci.* 1999 56:701-708.
- Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol.* 1999 61:243-282.
- Fields S. Proteomics: Proteomics in genomeland. *Science.* 2001 291:1221-1224.
- Flanagan MP, Jung YC, Rothschild MF, Warner CM. RFLP analysis of SLA class I genotypes in Duroc swine. *Immunogenetics.* 1988 27:465-469.
- Flores AI, Cuezva JM. Identification of sequence similarity between 60 kDa and 70 kDa molecular chaperones: evidence for a common evolutionary background? *Biochem J.* 1997 322:641-647.
- Foerster M. Gene diagnostic analysis of hereditary diseases for an increased animal health. *Zuechtungskunde.* 1992 64:405-410.
- Fredholm M, Wintero AK, Christensen K, Kristensen B, Nielsen PB, Davies W, Archibald A. Characterization of 24 porcine (dA-dC)n-(dT-dG)n microsatellites: genotyping of unrelated animals from four breeds and linkage studies. *Mamm Genome.* 1993 4:187-192.
- French C, Menegazzi P, Nicholson L, Macaulay H, DiLuca D, Gompels UA. Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for human herpesvirus 6. *Virology.* 1999 262:139-151.
- Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL. Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim Biophys Acta.* 1995 1262:64-68.
- 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.
- Geldermann H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor Appl Genet.* 1975 46:319-330
- Geldermann H, Müller E, Beeckmann P, Knorr C, Yue G, Moser G. Mapping of quantitative trait loci by means of marker genes in F2 generations of wild boar Piétrain and Meishan pigs. *J Anim Breed Genet.* 1996 113:381-387.
- Gellin J, Brown S, Marshall Graves JA, Rothschild M, Schook L, Womack J, Yerle M. Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals. *Mamm Genome.* 2000 11:140-144.
- Gentles AJ and Karlin S. Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless? [Letter] *Trends in Genetics.* 1999 15:47-49.
- Georges M. Towards marker assisted selection in livestock. *Reprod Nutr Dev.* 1999 39:555-561.
- Gerbens F, de Koning DJ, Harders FL, Meuwissen TH, Janss 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.
- Gerbens F, Verburg FJ, Van Moerkerk HT, Engel B, Buist W, Veerkamp JH, te Pas MF. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *J Anim Sci.* 2001 79:347-354.

- Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992 355:33-45.
- Giesel, M: Bestimmung von Struktur- und Funktionsmerkmalen am *Musculus longissimus* und deren Beziehungen zu Leistungskriterien des wachsenden Schweines. Dissertationsschrift. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 1998.
- Girard JP, Springer TA. Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *Immunity*. 1995 2:113-123.
- Glodek P. Sicherheit in der Produktion und Ausgeglichenheit am Markt. Hauptziele der deutschen Schweinezucht 2000. *Arch Tierzucht*. 1997 Sonderheft 40:41-47.
- Goodman R, Blank M. Magnetic field stress induces expression of hsp70. *Cell Stress Chaperones*. 1998 3:79-88.
- Gossen M, Wullrich A, Kilimann MW. Dinucleotide repeat polymorphism within the PHKA1 gene at Xq12-q13. *Hum Genet*. 1995 95:469-470.
- Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinton P, Frelat G, Gellin J. Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics*. 1996 36: 252-262.
- 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.
- Gray IC, Campbell DA, Spurr NK. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet*. 2000 9:2403-2408.
- Gray NK, Hentze MW. Regulation of protein synthesis by mRNA structure. *Mol Biol Rep*. 1994 19:195-200.
- Griffin TJ, Smith LM. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol*. 2000 18:77-84.
- Grimm DR, Goldman T, Holley-Shanks R, Buoen L, Mendiola J, Schook LB, Louis C, Rohrer GA, Lunney JK. Mapping of microsatellite markers developed from a flow-sorted swine chromosome 6 library. *Mamm Genome*. 1997 8:193-199.
- Grindflek E, Szyda J, Liu Z, Lien S. Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mamm Genome*. 2001 12:299-304.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat Genet*. 1997 17:71-74.
- Grosz MD. Molecular genetics of bovine 70 kilodalton heat shock protein (HSP70) genes. 1992 Thesis.
- Grosz MD, Womack JE, Skow LC. Syntenic conservation of HSP70 genes in cattle and humans. *Genomics*. 1992 14:863-868.
- Grosz MD, Skow LC, Stone RT. An Alu polymorphism at the bovine 70 kD heat-shock protein-1 (HSP70-1) locus. *Anim Genet*. 1994 25:196.
- Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*. 2001 265:11-23.
- Günther E, Walter L. Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia*. 1994 50:987-1001.
- Gupta RS. Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 62:1435-1491.
- Gutierrez JA, Guerriero V. Chemical modifications of a recombinant bovine stress-inducible 70 kDa heat-shock protein (Hsp70) mimics Hsp70 isoforms from tissues. *Biochem J*. 1995 305:197-203.
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*. 1993 75:791-803.
- Haberfeld A, Cahaner A, Yoffe O, Plotsky Y, Hillel J. DNA fingerprints of farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. *Anim Genet*. 1991 22:299-305.
- Hagendorf A. Auswirkungen von Promotorvarianten des pHSP70.2 – Gens auf seine Expression und die phänotypische Leistungsausprägung beim Schwein. Dissertationsschrift. Christian – Albrechts – Universität zu Kiel. 1999.
- Haley CS. Use of DNA fingerprints for the detection of major genes for quantitative traits in domestic species. *Anim Genet*. 1991 22:259-277.
- Hamet P. Abnormal hsp70 gene expression: its potential key role in metabolic defects in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1992 20:53-59.
- Hancock JM. Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays*. 1996 18:421-425.
- Hancock JM, Santibanez-Koref MF. Trinucleotide expansion diseases in the context of micro- and minisatellite evolution. *EMBO J*. 1998 17:55.

7 Literaturverzeichnis

- Hannon GJ, Casso D, Beach D. KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 91:1731-1735.
- Hardge T. Untersuchungen zu den genetischen Ursachen von quantitativen Leistungsmerkmalen mittels Kandidatengenanalyse beim Schwein. Habilitationsschrift. Humboldt-Universität zu Berlin. 1999.
- Harrison GS, Drabkin HA, Kao FT, Hartz J, Hart IM, Chu EH, Wu BJ, Morimoto RI. Chromosomal location of human genes encoding major heat-shock protein HSP70. *Somat Cell Mol Genet*. 1987 13:119-130.
- Hawken RJ, Murtaugh J, Flickinger GH, Yerle M, Robic A, Milan D, Gellin J, Beattie CW, Schook LB, Alexander LJ. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mamm Genome*. 1999 10:824-830.
- Heaton MP, Chitko-McKown CG, Grosse WM, Keele JW, Keen JE, Laegreid WW. Interleukin-8 haplotype structure from nucleotide sequence variation in commercial populations of U.S. beef cattle. *Mamm Genome*. 2001a 12:219-226.
- Heaton MP, Grosse WM, Kappes SM, Keele JW, Chitko-McKown CG, Cundiff LV, Braun A, Little DP, Laegreid WW. Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes. *Mamm Genome*. 2001b 12:32-37.
- Hecker KH, Asea A, Kobayashi K, Green S, Tang D, Calderwood SK. Mutation detection in the human HSP70B' gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *Cell Stress Chaperones*. 2000 5:415-424.
- Heix J, Vente A, Voit R, Budde A, Michaelidis TM, Grummt I. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J*. 1998 17:7373-7381.
- Hekman C, Hatefi Y. The F0 subunits of bovine mitochondrial ATP synthase complex: purification, antibody production, and interspecies cross-immunoreactivity. *Arch Biochem Biophys*. 1991 284:90-97.
- Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif*. 2000 33:341-365.
- 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.
- Herbergs J, Siwek M, Crooijmans RP, Van der Poel JJ, Groenen MA. Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*). *Anim Genet*. 1999 30:274-285.
- Herfort MR, Garber AT. Simple and efficient subtractive hybridization screening. *Biotechniques*. 1991 11:598, 600, 602-604.
- Higuti T, Kuroiwa K, Kawamura Y, Yoshihara Y. Complete amino acid sequence of subunit e of rat liver mitochondrial H(+)-ATP synthase. *Biochemistry*. 1992 31:12451-12454.
- Hillert S, Kolb E, Büchner A. Untersuchungen über den Gehalt an DNA, RNA, Protein und Nicht-Protein-N in Geweben von normal entwickelten Ferkeln sowie von Grätschferkeln sehr unterschiedlicher Geburtsmasse (1. bis 3. Mitteilung). *Arch Exp Vet Med*. 1987a, b, c 41:65-77, 78-89, 90-103.
- 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 Ferkeln sowie von Grätschferkeln. *Mh Vet Med*. 1992 47:383-387.
- Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasuga A, Nakamaru T, Hirotsune S, Sugimoto Y. Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res*. 2000 10:659-663.
- Hofmann GE, Buckley BA, Airaksinen S, Keen JE, Somero GN. Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae). *J Exp Biol*. 2000 203:2331-2339.
- Holmquist GP. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am J Hum Genet*. 1992 51:17-37.
- Hörügel K, Lorenz A. Untersuchungen zum angeborenen Beinspreizen bei Ferkeln in einer industriemäßig produzierenden Zuchtanlage. *Mh Vet Med*. 1979 34:183-184.
- Huang SY, Kuo YH, Lee YP, Tsou HL, Lin EC, Ju CC, Lee WC. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim Reprod Sci*. 2000 63:231-240.
- Huett AS, Innes DA, Moore MJ, Schnieke AE, Shiels PG. Identification of a novel *HaeIII* PCR-RFLP in the SLA DQB gene. *Anim Genet*. 1999 30:397.
- Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 82:6455-6459.

- IHGSC (International Human Genome Sequencing Consortium). Initial sequencing and analysis of the human genome *Nature*. 2001 409:860-927.
- Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*. 1994 6:84-89.
- Jadayel DM, Osborne LR, Coignet LJ, Zani VJ, Tsui LC, Scherer SW, Dyer MJ. The BCL7 gene family: deletion of BCL7B in Williams syndrome. *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.
- Jarjour W, Reed AM, Gauthier J, Hunt S 3rd, Winfield JB. The 8.5-kb PstI allele of the stress protein gene, Hsp70-2: an independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans? *Hum Immunol*. 1996 45:59-63.
- Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B, Smale ST. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1994 14:116-127.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 1985 314:67-73.
- Jenkins SC, March RE, Campbell RD, Milner CM. A novel variant of the MHC-linked hsp70, hsp70-hom, is associated with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2000 56:38-44.
- Jeon JT, Carlborg O, Tornsten A, Giuffra E, Amarger V, Chardon P, Andersson-Eklund L, Andersson K, Hansson I, Lundstrom K, Andersson L. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nat Genet*. 1999 21:157-158.
- 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 minipiglets. *Zbl Vet Med. A* 1985 32:445-458.
- Johansson M, Ellegren H, Andersson L. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *J Hered*. 1992 83:196-198.
- Johansson Moller M, Chaudhary R, Hellmen E, Hoyheim B, Chowdhary B, Andersson L. Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the KIT gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mamm Genome*. 1996 7:822-830.
- 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.
- Jung YC, Rothschild MF, Flanagan MP, Christian LL, Warner CM. Association of restriction fragment length polymorphisms of swine leucocyte antigen class I genes with production traits of Duroc and Hampshire boars. *Anim Genet*. 1989 20:79-91.
- Kajstura J, Pertoldi B, Leri A, Beltrami CA, DePalma A, Darzynkiewicz Z, Anversa P. Telomere shortening is an in vivo marker of myocyte replication and aging. *Am J Pathol*. 2000 156:813-819.
- Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, de Jonge R, Blechschmidt K, Angelicheva D, Chandler D, Worsley P, Rosenthal A, King RH, Thomas PK. N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet*. 2000 67:47-58.
- Karlin S, Brocchieri L. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J Mol Evol*. 1998 47:565-577.
- Karrasch S, Walker JE. Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J Mol Biol*. 1999 290:379-384.
- Kas K, Voz ML, Hensen K, Meyen E, Van de Ven WJ. Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem*. 1998 273:23026-23032.
- Kasof GM, Goyal L, White E. Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. *Mol Cell Biol*. 1999 19:4390-4404.
- 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 receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics*. 1998 150:1177-1185.
- Kim KS, Larsen N, Short T, Plastow G, Rothschild MF. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mamm Genome*. 2000 11:131-135.
- Klein J, Grummt I. Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 96:6096-6101.

7 Literaturverzeichnis

- Klosterhalfen B, Hauptmann S, Tietze L, Tons C, Winkeltau G, Kupper W, Kirkpatrick CJ. The influence of heat shock protein 70 induction on hemodynamic variables in a porcine model of recurrent endotoxemia. *Shock*. 1997 7:358-363.
- Knoll A, Stratil A, Moser G, Geldermann H. Characterization of three PCR-RFLPs in an intron of the porcine liver- and red cell-type pyruvate kinase (PKLR) gene. *Anim Genet*. 2000 31:234.
- Knoll R, Arras M, Zimmermann R, Schaper J, Schaper W. Changes in gene expression following short coronary occlusions studied in porcine hearts with run-on assays. *Cardiovasc Res*. 1994 28:1062-1069.
- Knorr C, Cheng HH, Dodgson JB. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim Genet*. 1999 30:28-35.
- Koh MC, Lim CH, Chua SB, Chew ST, Phang STW. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat-Science*. 1998 48:275-285.
- Köhler R, Seffner W. Angeborenes Beinspreizen bei Saugferkeln. *Mh Vet Med*. 1974 29:259-262.
- Kojima T, Udagawa K, Onishi A, Iwahashi H, Komatsu Y. Effect of heat stress on development in vitro and in vivo and on synthesis of heat shock proteins in porcine embryos. *Mol Reprod Dev*. 1996 43:452-457.
- Kokoris M, Dix K, Moynihan K, Mathis J, Erwin B, Grass P, Hines B, Duesterhoeft A. High-throughput SNP genotyping with the Masscode system. *Mol Diagn*. 2000 5:329-340.
- 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 bei Ferkeln mit Grätschstellung. *Mh Vet Med*. 1981 36:904-908.
- Kolb E, Grodrian 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.
- Kolb E, Wahren M, Dobeleit G, Gründel G. Untersuchungen über den Gehalt an Ascorbinsäure in verschiedenen Geweben von Rindern, normal entwickelten Ferkeln, Grätschferkeln, adulten Schweinen sowie von Hunden. *Arch Exp Vet Med*. 1989 43:327-334.
- Konietzko U, Kuhl D. A subtractive hybridisation method for the enrichment of moderately induced sequences. *Nucleic Acids Res*. 1998 26:1359-1361.
- 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.
- Koskinen MT, Bredbacka P. Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Anim Genet*. 2000 31:310-317.
- Kostia S, Ruohonen-Lehto M, Vainola R, Varvio SL. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the artiodactyla and evolution of the bov-tA SINE. *Heredity*. 2000 84:37-45.
- Kostic C, Shaw PH. Isolation and characterization of sixteen novel p53 response genes. *Oncogene*. 2000 19:3978-3987.
- Kowalski J, Gilbert SA, van Druenen S, van den Hurk S, van den Hurk J, Babiuk LA, ZambTJ. Heat-shock promoter-driven synthesis of secreted herpesvirus glycoproteins in transfected Cells. *Vaccine*. 1993 11:1100-1107.
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 95:10774-10778.
- Kuhl NM, Rensing L. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci*. 2000 57:450-463.
- Kühne S, Kolb E, Hillert S, Gründel G. Untersuchungen über die Aktivität der Katalase in der Leber, in der Niere, im Herzmuskel, in der Lunge, in einigen Skelettmuskeln sowie im Hämolytat normal entwickelten Ferkeln und Grätschferkeln sowie in einigen Geweben von adulten Schweinen. *Arch Exp Vet Med*. 1986 40:417-424.
- Kwon JM, Goate AM. The candidate gene approach. *Alcohol Res Health*. 2000 24:164-168.
- Lagziel A, Lipkin E, Soller M. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. *Genetics*. 1996 142:945-951.
- Lahbib-Mansais Y, Leroux S, Milan D, Yerle M, Robic A, Jiang Z, Andre C, Gellin J. Comparative mapping between humans and pigs: localization of 58 anchorage markers (TOASTs) by use of porcine somatic cell and radiation hybrid panels. *Mamm Genome*. 1999 11:1098-1106.
- Langer T, Neupert W. Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991;167:3-30.
- Lax T. Hereditary splayleg in pigs. *J Heredity*. 1971 62:250-252.
- Lee SW, Reimer CL, Fang L, Iruela-Arispe ML, Aaronson SA. Overexpression of kinase-associated phosphatase (KAP) in breast and prostate cancer and inhibition of the transformed phenotype by antisense KAP expression. *Mol Cell Biol*. 2000 20:1723-1732.

- Leeb T, Kriegesmann B, Baumgartner BG, Klett C, Yerle M, Hameister H, Brenig B. Molecular cloning of the porcine beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II gene and assignment to chromosome 1q23-q27. *Biochim Biophys Acta*. 1997 1336:361-366.
- Legault C, Gruand J, Lebost J, Garreau H, Ollivier L, Messier LA, Rothschild MF. Frequency and effect on the prolificacy of the ESR gene in two French Large White lines. *J Rech Porcine*. 1996 28:9-14.
- Le Hong T, Kolb E, Müller I, Vallentin G. Untersuchungen über die Aktivität der Acetylcholinesterase im zentralen Nervensystem von gesunden Ferkeln 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.
- Lengerken G von, Maak S, Wicke M., Fiedler I, Ender K. Suitability of structural and functional traits of skeletal muscle for the genetic improvement of meat quality in pigs. *Arch Tierzucht*. 1994. 37:133-143.
- Le Roy P, Naveau J, Elsen JM, Sellier P. Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs. *Genet Res*. 1990 55:33-40.
- 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.
- Leung TK, Rajendran MY, Monfries C, Hall C, Lim L. The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem J*. 1990 267:125-132.
- Lewin B. *Gene. Lehrbuch der molekularen Genetik*. VCH Verlag, Weinheim, New York, Basel, Cambridge 1991 (ISBN 3-527-28052-9).
- Lewis M, Helmsing PJ, Ashburner M. Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975 72:3604-3608.
- Li MD, Matteri RL, Macdonald GJ, Wise TH, Ford JJ. Overexpression of beta-subunit of thyroid-stimulating hormone in Meishan swine identified by differential display. *J Anim Sci*. 1996 74:2104-2111.
- 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, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1992 52:6966-6968.
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*. 1986 55:1151-1191.
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet*. 1988 22:631-637.
- Linville RC, Pomp D, Johnson RK, Rothschild MF. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *J Anim Sci*. 2001 79:60-67.
- Liu WS, Harbitz I, Gustavsson I, Chowdhary BP. Mapping of the porcine erythropoietin gene to chromosome 3p16-p15 and ordering of four related subclones by fiber-FISH and DNA-combing. *Hereditas*. 1998 128:77-81.
- Lobb DK, Porter DG. Rapid increase in relaxin gene expression in early pregnancy in the pig. *Mol Cell Endocrinol*. 1992 89:R5-8.
- Luft JC, Dix DJ. Hsp70 expression and function during embryogenesis. *Cell Stress Chaperones*. 1999 4:162-170.
- Lundstrom K, Andersson A, Hansson I. Effect of the RN gene on technological and sensory meat quality in crossbred pigs with Hampshire as terminal sire. *Meat Science*. 1996 42:145-153.
- Maak S, Wicke M, Beitz DC, Lengerken G von. Suitability of a shot biopsy test for prediction of meat quality in live pigs at different ages. *J Anim Sci*. 1995 73 Suppl1:156.
- Maak S, Petersen K, Lengerken G von. Associations of polymorphisms in the porcine HSP 70.2 gene promoter with performance traits. *Anim Genetics*. 1998 29 Suppl1:71
- Maak S, Hardge T, Wimmers K, Lengerken G von, Leuthold G. No association between mutations in the porcine HSP 70.2 gene promoter and performance traits in an experimental F2 population. *Archiv Tierzucht*. 1999 42 spec issue:141-144.
- Maak S, Jaesert S, Neumann K, Yerle M, Lengerken G von. Isolation of potential candidate genes for congenital splay leg in piglets by Differential Display/Reverse Transcriptase PCR (DD/RT PCR). *Proc ISAG Mtg Minneapolis 2000*. 30.
- 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.

7 Literaturverzeichnis

- Maak S, Jaesert S, Neumann K, Lengerken G von. Rapid Communication: Nucleotide sequence and physical mapping of the porcine cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (*CDKN3*) gene. *J Anim Sci.* (accepted) 2001b.
- Maak S, Jaesert S, Neumann K, Yerle M, Lengerken G von. Isolation of expressed sequence tags of skeletal muscle of neonatal piglets and mapping by somatic cell hybrid analysis. *Anim Genetics.* 2001c 32:303-307.
- Maaß P, Schulze J. Zur genetischen Disposition des angeborenen Beinspreizens bei Saugferkeln. *Mh Vet Med.* 1979 34:20-21.
- McArdle A, Jackson MJ. Exercise, oxidative stress and ageing. *J Anat.* 2000 197:539-541.
- Mariani P, Johansson M, Ellegren H, Andersson L. TaqI and PvuII restriction fragment length polymorphisms at the porcine plasminogen activator, urokinase, locus (PLAU). *Anim Genet.* 1991 22:447.
- Marsich E, Xodo LE, Manzini G. Widespread presence in mammals and high binding specificity of a nuclear protein that recognises the single-stranded telomeric motif (CCCTAA)_n. *Eur J Biochem.* 1998 258:93-99.
- Marth G, Yeh R, Minton M, Donaldson R, Li Q, Duan S, Davenport R, Miller RD, Kwok PY. Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they? *Nat Genet.* 2001 27:371-372.
- Martinez AM, Delgado JV, Rodero A, Vega-Pla JL. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Anim Genet.* 2000 31:295-301.
- Mason PB, Lis JT. Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter. *J Biol Chem.* 1997 272:33227-33233.
- Matouschek A, Pfanner N, Voos W. Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.* 2000 1:404-410.
- Mattapallil MJ, Ali S. Analysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationship between water buffalo *Bubalus bubalis* and sheep *Ovis aries*. *DNA Cell Biol.* 1999 18:513-519.
- Matteri RL, Dyer CJ, Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL. Effects of weaning on somatotrophic gene expression and circulating levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-2 in pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 2000 19:247-259.
- Maueler W, Bassili G, Epplen C, Keyl HG, Epplen JT. Protein binding to simple repetitive sequences depends on DNA secondary structure(s). *Chromosome Res.* 1999 7:163-166.
- Maul RS, Chang DD. EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm. *Oncogene.* 1999 18:7838-7841.
- Maxwell CV, Johnson RK, Luce WG. Effect of level of protein and supplemental choline on reproductive performance of gilts fed sorghum diets. *J Anim Sci.* 1987 64:1044-1050.
- Mazurier S, van de Giessen A, Heuvelman K, Wernars K. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett Appl Microbiol.* 1992 14:260-262.
- McComb MA, Spurlock ME. Expression of stress proteins in porcine tissues: developmental changes and effect of immunological challenge. *J Anim Sci.* 1997 75:195-201.
- 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, Neuenschwander S, Bertschinger 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 (ECF18R) loci. *Mamm Genome.* 1997 8:736-741.
- 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.
- Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L. Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer.* 2001 91:672-678.
- Milan D, Le-Roy P, Woloszyn N, Caritez JC, Elsen JM, Sellier P, Gellin J. The RN locus for meat quality maps to pig chromosome 15. *Genet Sel Evol.* 1995 27:195-199.
- Milan D, Woloszyn N, Yerle M, Le Roy P, Bonnet M, Riquet J, Lahbib-Mansais Y, Caritez JC, Robic A, Sellier P, Elsen JM, Gellin J. Accurate mapping of the "acid meat" RN gene on genetic and physical maps of pig chromosome 15. *Mamm Genome.* 1996 7:47-51.
- Milan D, Bidanel JP, Le Roy P, Chevalet C, Woloszyn N, Caritez JC, Gruand J, Bonneau M, Lafaucheur L, Renard C, Vaiman M, Mormède P, Désautés C, Gellin J, Ollivier L. Current status of QTL detection in Large White x Meishan crosses in France. *Proc 6th World Congress Quantitative Genetics of Livestock.* 1998 26:414-417.

- Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Iannuccelli 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.
- Milburn S. Purify mRNA rapidly with high yield. *Ambion Tech Notes*. 1996 3:1-8.
- Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*. 1990 32:242-251.
- Milner CM, Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*. 1992 36:357-362.
- Monin G, Sellier P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Science*. 1985 13:49-63.
- Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*. 1998 12:3788-3796.
- Moseley P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*. 2000 48:299-302.
- Mount SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res*. 1982 22:459-472.
- Mues GI, Munn TZ, Raese JD. A human gene family with sequence homology to *Drosophila melanogaster* hsp70 heat shock genes. *J Biol Chem*. 1986 261:874-877.
- Murray AW, Marks D. Can sequencing shed light on cell cycling? *Nature*. 2001 409:844-846.
- Muth V, Nadaud S, Grummt I, Voit R. Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *EMBO J*. 2001 20:1353-1362.
- Natter S, Seiberler S, Hufnagl P, Binder BR, Hirschl AM, Ring J, AbeckD, Schmidt T, Valent P, Valenta R. Isolation of cDNA clones coding for IgE autoantigens with serum IgE from atopic dermatitis patients. *FASEB J*. 1998 12:1559-1569.
- Nelson NJ. Microarrays have arrived: gene expression tool matures. *J Natl Cancer Inst*. 2001 93:492-494.
- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2000 6:149-159.
- Newell W, Beck S, Lehrach H, Lyall A. Estimation of distances and map construction using radiation hybrids. *Genome Res*. 1998 8:493-508.
- Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*. 2000 53:21-34.
- Nunes M, Yerle M, Dezeure F, Gellin J, Chardon P, Vaiman M. Isolation of four HSP70 genes in the pig and localization on chromosomes 7 and 14. *Mamm Genome*. 1993 4:247-251.
- Oh HJ. The studies on the genetic marker of Korean wild pig (*Sus coreanus*) using RAPD method. *Kor J Anim Sci*. 1999 41:629-636.
- Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, Kunieda T. A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics*. 2000 68:229-236.
- Ohnishi M, Kojima N, Kokue EI, Hayama T. Experimental induction of splayleg in piglets by pyrimethamine. *Jpn J Vet Sci*. 1989 51:146-150.
- Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40 - a review. *Int J Hyperthermia*. 2000 16:231-245.
- Olsen LD, Prange JF. Spraddle-legged baby pigs. *Vet Med Small Anim Clin*. 1968 63:714-718.
- Otterson GA, Flynn GC, Kratzke RA, Coxon A, Johnston PG, Kaye FJ. Stch encodes the 'ATPase core' of a microsomal stress 70 protein. *EMBO J*. 1994 13:1216-1225.
- Ovilo C, Cervera MT, Castellanos C, Martinez-Zapater JM. Characterization of Iberian pig genotypes using AFLP markers. *Anim Genet*. 2000 31:117-122.
- Parma P, Pailhoux E, Cotinot C. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biol Reprod*. 1999 61:741-748.
- Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*. 1993 27:437-496.
- Partanen J, Milner C, Campbell RD, Maki M, Lipsanen V, Koskimies S. HLA-linked heat-shock protein 70 (HSP70-2) gene polymorphism and celiac disease. *Tissue Antigens*. 1993 41:15-19.
- Partlow GD, Fisher KR, Page PD, MacMillan K, Walker AF. Prevalence and types of birth defects in Ontario swine determined by mail survey. *Can J Vet Res*. 1993 57:67-73.
- Paszek AA, Flickinger GH, Fontanesi L, Beattie CW, Rohrer GA, Alexander L, Schook LB. Evaluating evolutionary divergence with microsatellites. *J Mol Evol*. 1998 46:121-126.
- Paszek AA, Wilkie PJ, Flickinger GH, Rohrer GA, Alexander LJ, Beattie CW, Schook LB. Interval mapping of growth in divergent swine cross. *Mamm Genome*. 1999 10:117-122.

7 Literaturverzeichnis

- Peelman LJ, Van de Weghe AR, Coppieters WR, Van Zeveren AJ, Bouquet YH. Complete nucleotide sequence of a porcine HSP70 gene. *Immunogenetics*. 1992 35:286-289.
- Peelman LJ, Chardon P, Vaiman M, Mattheeuws M, Van Zeveren A, Van de Weghe A, Bouquet Y, Campbell RD. A detailed physical map of the porcine major histocompatibility complex (MHC) class III region: comparison with human and mouse MHC class III regions. *Mamm Genome*. 1996 7:363-367.
- Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Snyder E, Sands J, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2000 update. *Obes Res*. 2001 9:135-169.
- Pinton P, Schibler L, Cribru E, Gellin J, Yerle M. Localization of 113 anchor loci in pigs: improvement of the comparative map for humans, pigs, and goats. *Mamm Genome*. 2000 11:306-315.
- Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol*. 1993 38:491-495.
- 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.
- Poon RY, Hunter T. Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science*. 1995 270:90-93.
- Prange H, Maak S, Geipel U. Incidence of congenital splay leg syndrome and biochemical parameters in affected and healthy newborn piglets. *Proc IVPS Melbourne 2000*. 213.
- Prange H, Maak S, Geipel U. Investigations on congenital splayleg syndrome in newborn piglets. *DVG Publikation*. Proc 34. Jahrestagung "Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung" Gießen. 34.
- Prince JA, Feuk L, Howell WM, Jobs M, Emahazion T, Blennow K, Brookes AJ. Robust and accurate single nucleotide polymorphism genotyping by dynamic allele-specific hybridization (DASH): design criteria and assay validation. *Genome Res*. 2001 11:152-162.
- Pugliese A, Awdeh ZL, Galluzzo A, Yunis EJ, Alper CA, Eisenbarth GS. No independent association between HSP70 gene polymorphism and IDDM. *Diabetes*. 1992 41:788-791.
- Puntschart A, Vogt M, Widmer HR, Hoppeler H, Billeter R. Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiol Scand*. 1996 157:411-417.
- Rathje, T.A., Rohrer, G.A., and Johnson, R.K. Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. *J Anim Sci*. 1998 75:1486-1494.
- Rettenberger G, Fredholm M, Fries R. Chromosomal assignment of porcine microsatellites by use of a somatic cell hybrid mapping panel. *Anim Genet*. 1994 25:343-345.
- Ritossa FM. A new puffing induced by temperature shock and DMP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962 18:571-573.
- Riquet J, Milan D, Woloszyn N, Schmitz A, Pitel F, Frelat G, Gellin J. A linkage map with microsatellites isolated from swine flow-sorted chromosome 11. *Mamm Genome*. 1995 6:623-628.
- Robic A, Riquet J, Yerle M, Milan D, Lahbib-Mansais Y, Dubut-Fontana C, Gellin J. Porcine linkage and cytogenetic maps integrated by regional mapping of 100 microsatellites on somatic cell hybrid panel. *Mamm Genome*. 1996 7:438-445.
- Robic A, Seroude V, Jeon JT, Yerle M, Wasungu L, Andersson L, Gellin J, Milan D. A radiation hybrid map of the RN region in pigs demonstrates conserved gene order compared with the human and mouse genomes. *Mamm Genome*. 1999 10:565-568.
- Robic A, Jeon JT, Rey V, Amarger V, Chardon P, Looft C, Andersson L, Gellin J, Milan D. Construction of a high-resolution RH map of the human 2q35 region on TNG panel and comparison with a physical map of the porcine homologous region 15q25. *Mamm Genome*. 2001 12:380-386.
- Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, Chardon P. Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet*. 1999 85:205-211.
- Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*. 1994 136:231-245.
- Rohrer GA, Alexander LJ, Hu Z, Smith TP, Keele JW, Beattie CW. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res*. 1996 6:371-391.
- Rohrer GA, Keele JW. Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *J Anim Sci*. 1998a 76:2247-2254
- Rohrer GA, Keele JW. Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *J Anim Sci*. 1998b 76:2255-2262.

- Rohrer GA. Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of backfat and weight in a Meishan-White Composite resource population. *J Anim Sci.* 2000 78:2547-2553.
- Rothschild MF, Liu HC, Tuggle CK, Yu TP, Wang L. Analysis of pig chromosome 7 genetic markers for growth and carcass performance traits. *J Anim Breed Genet.* 1995 112:341-348.
- Rothschild M, Jacobson C, Vaske D, Tuggle C, Wang L, Short T, Eckardt G, Sasaki S, Vincent A, McLaren D, Southwood O, van der Steen 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.
- Rothschild MF. Genetics and reproduction in the pig. *Reprod Livest Sci.* 1996 42:143-151.
- Rothschild MF, Messer L, Day A, Wales R, Short T, Southwood O, Plastow G. Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mamm Genome.* 2000 11:75-77.
- Rouslin W. Regulation of the mitochondrial ATPase in situ in cardiac muscle: role of the inhibitor subunit. *J Bioenerg Biomembr.* 1991 23:873-888.
- Rowles J, Scherer SW, Xi T, Majer M, Nickle DC, Rommens JM, Popov KM, Harris RA, Riebow NL, Xia J, Tsui LC, Bogardus C, Prochazka M. Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem.* 1996 271:22376-22382.
- Ruohonen-Lehto MK, Rothschild MF, Larson RG. Restriction fragment length polymorphisms at the heat shock protein HSP70 gene(s) in pigs. *Anim Genet.* 1993 24:67-68.
- Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 86:1968-1972.
- SAS Institute Inc. SAS/Stat guide for personal computers. Version 6.11 for Windows, Cary, USA 1993.
- Schmitz A, Chaput B, Fouchet P, Guilly MN, Frelat G, Vaiman M. Swine chromosomal DNA quantification by bivariate flow karyotyping and karyotype interpretation. *Cytometry.* 1992 13:703-710.
- Schnapperelle H, Koch J. Untersuchungen zum Auftreten und zur Therapie des angeborenen Beinspreizens bei Saugferkeln. *Mh Vet Med.* 1980 35:865-869.
- Schöberlein L. Die Schussbiopsie – eine neue Methode zur Entnahme von Muskelproben. *Mh Vet Med.* 1976 31:457–460.
- Schroeder S, Reck M, Lehmann LE, Book M, Hoefl A, Stuber F. The PstI polymorphism of the endotoxin-inducible heat-shock protein 70-2 gene does not affect messenger RNA level in human whole-blood cultures. *Intensive Care Med.* 2000 26:1139-1143.
- Schwaiger FW, Gomolka M, Geldermann H, Zischler H, Buitkamp J, Epplen JT, Ammer H. Oligonucleotide fingerprinting to individualize ungulates. *Appl Theoret Electrophoresis.* 1992 2:193-200.
- Schwerin M. Marker-gestützte Selektion: Die Anfänge sind gemacht. *Tierzüchter.* 1993 9:35-37.
- Schwerin M, von Lengerken G, Fredholm M, Christensen K, Krause S. DNA polymorphisms in two transcription control elements (SP1- and TATA-box) of porcine HSP70.2 gene detected by allele-specific PCR. *Anim Genet.* 1995 26:203-204.
- Schwerin M, Langhammer M, Matthes W, Dietl G. Additive genetic effects of the RYR1 and HSP70.2 loci upon stress susceptibility in swine. *Anim Genetics.* 1996 27 Suppl2:116.
- Schwerin M, Gruppe S, Hagendorf A, Brockmann G. Genetic predisposition for productive life is associated with functional inactivation of a AP2 – binding site in the promoter of the stress protein encoding 70.1 – encoding gene in cattle. *Anim Genetics.* 1998 29 Suppl1:77.
- Schwerin M, Hagendorf A, Fürbass R, Teuscher F. The inducible stress protein 70.2 gene – A candidate gene for stress susceptibility in swine. *Arch. Tierzucht.* 1999 42 spec issue:61-66
- Schwerin M, Maak S, Dorroch U, Brockmann G. Die strukturelle und funktionelle Genomanalyse im Dienste einer tiergerechten Haltung und der Verbesserung der Qualität tierischer Produkte. "Qualität von Futtermitteln und tierischen Primärprodukten". Wissenschaftliche Vortragsstagung der Institute für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik sowie Ernährungswissenschaften. Halle, Nov 2000, Tagungsband.
- Schwerin M. Struktur und Funktion von Genen beim Nutztier. 18. Hülsenberger Gespräche. Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung. 2000 18:28-34.
- Schwerin M, Maak S, Fürbass R, Hagendorf A, Teuscher F. Functional promoter variants of highly conserved inducible *hsp 70* genes significantly affect stress response. *BBA Gene Structure Expr.* 2001a 1522:108-111.
- Schwerin M, Maak S, Hagendorf A, Lengerken G von, Seyfert HM. A 3'-UTR variant of the inducible porcine *hsp70.2* gene affects mRNA stability. *BBA Gene Structure Expr.* (submitted) 2001b.
- 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.

7 Literaturverzeichnis

- Seyfert HM, Pitra C, Meyer L, Brunner RM, Wheeler TT, Molenaar A, McCracken JY, Herrmann J, Thiesen HJ, Schwerin M. Molecular characterization of STAT5A- and STAT5B-encoding genes reveals extended intragenic sequence homogeneity in cattle and mouse and different degrees of divergent evolution of various domains. *J Mol Evol.* 2000 50:550-561.
- Sharp FR, Massa SM, Swanson RA. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci.* 1999 22:97-99.
- Shay JW, Wright WE. Ageing and cancer: the telomere and telomerase connection. *Novartis Found Symp.* 2001 235:116-125, discussion 125-129, 146-149.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999 13:1501-1512.
- Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin Chem.* 2001 47:164-172.
- Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 1998 12:654-666.
- Shmelkov SV, Visser JW, Belyavsky AV. Two-dimensional gene expression fingerprinting. *Anal Biochem.* 2001 290:26-35.
- Short TH, Rothschild MF, Southwood OI, McLaren DG, de Vries A, van der Steen H, Eckardt GR, Tuggle CK, Helm J, Vaske DA, Mileham AJ, Plastow GS. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J Anim Sci.* 1997 75:3138-3142.
- Simianer H. Neue Zuchtstrategien dank moderner Gentechnik. *Schweinezucht und Schweinemast.* 2000 6:56-59.
- Simon MC, Fisch TM, Benecke BJ, Nevins JR, Heintz N. Definition of multiple, functionally distinct TATA elements, one of which is a target in the hsp70 promoter for E1A regulation. *Cell.* 1988 52:723-729.
- Smith TP, Grosse WM, Freking BA, Roberts AJ, Stone RT, Casas E, Wray JE, White J, Cho J, Fahrenkrug SC, Bennett GL, Heaton MP, Laegreid WW, Rohrer GA, Chitko-McKown CG, Perteau G, Holt I, Karamycheva S, Liang F, Quackenbush J, Keele JW. Sequence Evaluation of Four Pooled-Tissue Normalized Bovine cDNA Libraries and Construction of a Gene Index for Cattle. *Genome Res.* 2001 11:626-630.
- Soller M, Genizi A. Candidate genes as QTL. *Proc XXVI Int Conf Anim Genet.* 1998:9.
- Southwood OI, van der Steen HAM, Mileham AJ, Cuthbert-Heaven D. Evaluation of the oestrogen receptor (ESR) gene in Meishan synthetic and Large White pigs. *Proc EAAP, Prag* 1995. 4-7.
- Spelman RJ, Bovenhuis H. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. *Anim Genet.* 1998 29:77-84.
- Splan RK, Pilcik BR, Tomsen UJ, Arango JA, Ruiz-Flores A, Hallock JW, Allan MF, Karnati SK, Vega V, Lindsey BR, Moody DE, Pomp D. Rapid communication: mapping of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) gene to porcine chromosome 15 by linkage analysis using a novel PCR-RFLP. *J Anim Sci.* 1998 76:658-659.
- Stalder KJ, Maya J, Christian LL, Moeller SJ, Prusa KJ. Effects of preslaughter management on the quality of carcasses from porcine stress syndrome heterozygous market hogs. *J Anim Sci.* 1998 76:2435-2443.
- StatSoft Inc. *Statistica for Windows (Computer program manual).* Tulsa, USA 2000.
- Stephanou A, Latchman DS. Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors. *Gene Expr.* 1999 7:311-319.
- Stigler J, Distl O, Kruff B, Kräusslich H. Segregationsanalyse von Erbfehlern beim Schwein. *Züchtungskunde.* 1991 63:294-305.
- Stranzinger G, Went DF. Molecular genetics as a diagnostic tool in farm animals. *Biotechnol Annu Rev.* 1996 2:447-464.
- Sugden MC, Lall HS, Harris RA, Holness MJ. Selective modification of the pyruvate dehydrogenase kinase isoform profile in skeletal muscle in hyperthyroidism: implications for the regulatory impact of glucose on fatty acid oxidation. *J Endocrinol.* 2000 167:339-345.
- Sunyaev S, Hanke J, Brett D, Aydin A, Zastrow I, Lathe W, Bork P, Reich J. Individual variation in protein-coding sequences of human genome. *Adv Protein Chem.* 2000 54:409-37.
- Suzuki K, Asakawa S, Iida M, Shimanuki S, Fujishima N, Hiraiwa H, Murakami Y, Shimizu N, Yasue H. Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library. *Anim Genet.* 2000 31:8-12.
- Svendsen LS, Weström BR, Svendsen J, Olsson AC, Karlsson 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.
- Swartz DA, Park EI, Visek WJ, Kaput J. The e subunit gene of murine F1F0-ATP synthase. Genomic sequence, chromosomal mapping, and diet regulation. *J Biol Chem.* 1996 271:20942-20948.

- Tanguay RM. Transcriptional activation of heat-shock genes in eukaryotes. *Biochem Cell Biol.* 1988 66:584-593.
- Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones.* 1996 1:23-28.
- Taylor JF, Coutinho LL, Herring KL, Gallagher DS Jr, Brennenman RA, Burney 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.
- te Pas MF, Harders FL, Soumilion A, Born L, Buist W, Meuwissen TH. Genetic variation at the porcine MYF-5 gene locus. Lack Of association with meat production traits. *Mamm Genome.* 1999 10:123-127.
- Thaller G, Dempfle L, Hoeschele I. Maximum likelihood analysis of rare binary traits under different modes of inheritance. *Genetics.* 1996 143:1819-1829.
- Thurley DC, Gilbert FR, Done JT. Congenital splayleg of piglets-myofibrillar hypoplasia. *Vet Rec.* 1967 80:302-304.
- Timblin C, Battey J, Kuehl WM. Application for PCR technology to subtractive cDNA cloning: identification of genes expressed specifically in murine plasmacytoma cells. *Nucleic Acids Res.* 1990 18:1587-1593.
- Timchenko LT, Caskey CT. Triplet repeat disorders: discussion of molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 1999 55:1432-1447.
- Ting J, Lee AS. Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *DNA.* 1988 7:275-286.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974 85:389-398.
- Tosser-Klopp G, Bonnet A, Yerle M, Hatey F. Functional study and regional mapping of 44 hormone-regulated genes isolated from a porcine granulosa cell library. *Genet Sel Evol.* 2001 33:69-87.
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 2000 10:967-981.
- Trebichavsky I, Splichal I, Ivanyi J, Tlaskalova H. Prenatal expression of the 65-kDa heat-shock protein homologue in pig tissues. *Folia Microbiol.* 1993 38:242-244.
- TSC (The SNP Consortium). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001 409:928-933.
- Tucek S, Svoboda T, Riczny J, Bass A, Soukup T, Vittek V. The concentration of choline and the activities of cholinesterases, creatine kinase and lactate dehydrogenase in the blood plasma of piglets with the syndrome of splayleg (Congenital Myofibrillar Hypoplasia). *Zbl Vet Med A.* 1985 32:1-10.
- Tuggle CK, Schmitz CB. Cloning and characterization of pig muscle cDNAs by an expressed sequence tag approach. *Anim Biotechnol.* 1994 5:1-13.
- URL1: <http://www.ri.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/arkdb>
- URL2: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/LocusLink>
- URL3: <http://spinal.tag.csiro.au>
- URL4: <http://www.toulouse.inra.fr/lqc/pig/pcr/pcr.htm>
- URL5: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/AceView>
- URL6: <http://www.toulouse.inra.fr/lqc/pig/compare/table.htm>
- URL7: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>
- URL8: <http://www.toulouse.inra.fr/lqc/pig/cyto/cyto.htm>
- URL9: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>
- URL10: <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards>
- URL11: <http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature>
- URL 12: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>
- Van den Hemel-Grooten HN, te Pas MF, van den Bosch TJ, Garssen GJ, Schreurs VV, Verstegen MW. mRNA levels of the calpain system in longissimus muscle of young pigs during prolonged feeding of a protein-free diet. *J Anim Sci.* 1997 75:968-974.
- 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.
- Van Laack RL, Faustman C, Sebranek JG. Pork quality and the expression of stress protein Hsp 70 in swine. *J Anim Sci.* 1993 71:2958-2964.
- Vargas-Alarcon G, Granados J, Martinez-Laso J, Gomez-Casado E, Zuniga J, Salgado N, Hernandez-Pacheco G, Hesiquio R, Rodriguez-Reyna TS, Gamboa R, Alcocer-Varela J, Arnaiz-Villena A. Lack of association between the polymorphism at the heat-shock protein (HSP70-2) gene and systemic lupus erythematosus (SLE) in the Mexican mestizo population. *Genes Immun.* 2000 1:367-370.

7 Literaturverzeichnis

- Vila C, Leonard JA, Gotherstrom A, Marklund S, Sandberg K, Liden K, Wayne RK, Ellegren H. Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*. 2001 291:474-477.
- Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Pareja E, Mataran L, Martin J. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 1997 50:71-73.
- Vincent AL, Wang L, Tuggle CK, Robic A, Rothschild MF. Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. *Mamm Genome*. 1997 8:793-794.
- Vivinus S, Baulande S, Van Zanten M, Campbell F, Topley P, Ellis JH, Dessen P, Coste H. An element within the 5' untranslated region of human Hsp70 mRNA which acts as a general enhancer of mRNA translation. *Eur J Biochem*. 2001 268:1908-1917.
- Voellmy R, Ahmed A, Schiller P, Bromley P, Rungger D. Isolation and functional analysis of a human 70,000-dalton heat shock protein gene segment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 82:4949-4953.
- 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.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1995 23:4407-4414.
- Wada Y, Akita T, Awata T, Furukawa T, Sugai N, Inage Y, Ishii K, Ito Y, Kobayashi E, Kusumoto H, Matsumoto T, Mikawa S, Miyake M, Murase A, Shimanuki S, Sugiyama T, Uchida Y, Yanai S, Yasue H. Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan x Gottingen cross population. *Anim Genet*. 2000 31:376-384.
- Walker JE, Lutter R, Dupuis A, Runswick MJ. Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry*. 1991 30:5369-5378.
- Walter L, Rauh F, Gunther E. Comparative analysis of the three major histocompatibility complex-linked heat shock protein 70 (Hsp70) genes of the rat. *Immunogenetics*. 1994 40:325-330.
- Wang L, Yu TP, Tuggle CK, Liu HG, Rothschild MF. A directed search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in the pig. *J Anim Sci*. 1998 76:2560-2567.
- 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.
- Weber JA, Taxman DJ, Lu Q, Gilmour DS. Molecular architecture of the hsp70 promoter after deletion of the TATA box or the upstream regulation region. *Mol Cell Biol*. 1997 17:3799-3808.
- Weitzel JN, Hows JM, Jeffreys AJ, Min GL, Goldman JM. Use of a hypervariable minisatellite DNA probe (33.15) for evaluating engraftment two or more years after bone marrow transplantation for aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1988 70:91-97.
- Welch, WJ. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*. 1992 72:1063-1083.
- Welcher AA, Torres AR, Ward DC. Selective enrichment of specific DNA, cDNA and RNA sequences using biotinylated probes, avidin and copper-chelate agarose. *Nucleic Acids Res*. 1986 14:10027-10044.
- Westman P, Partanen J, Leirisalo-Repo M, Koskimies S. HSP70-Hom NcoI polymorphism and HLA-associations in the Finnish population and in patients with ankylosing spondylitis or reactive arthritis. *Eur J Immunogenet*. 1994 21:81-90.
- White ME, Diao R, Hathaway MR, Mickelson J, Dayton WR. Molecular cloning and sequence analysis of the porcine insulin-like growth factor binding protein-5 complementary deoxyribonucleic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 218:248-253.
- White P, Dauncey MJ. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J Mol Endocrinol*. 1999 23:241-254.
- Wicke M, Maak S, Lengerken G von, Fiedler I. Vergleichende Untersuchungen zur Streßempfindlichkeit sowie Schlachtkörper- und Fleischqualität unter besonderer Beachtung der Anpaarung von Pietrainebern. *Schweinezucht und Schweinemast*. 1992 40:144-146.
- Wicke M, Lengerken G von, Maak S, Fiedler I. Vorhersage von PSE- Fleisch mittels biochemischer und morphologischer Merkmale der Skelettmuskulatur am lebenden Schwein. *Arch Tierzucht*. 1993 36:631-638.
- Wicke M, Maak S, Lengerken G von. Structural and functional traits of the skeletal muscle for the improvement of pork quality. *Polish J Food Nutr Sci*. 1998 48:21-31.
- Wickens M, Anderson P, Jackson RJ. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 7:220-232.
- Wieland I, Bolger G, Asouline G, Wigler M. A method for difference cloning: gene amplification following subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 87:2720-2724.

- Wilkie PJ, Paszek AA, Flinkenger GH, Rohrer GA, Alexander LJ, Beattie CW, Schook L. Scan of eight porcine chromosomes for growth, carcass and reproductive traits reveals two likely quantitative trait loci. *Anim. Genetics* 1996 27 Suppl2:117.
- 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 Ferkel mit normaler bzw. geringer Körpermasse sowie bei Ferkeln mit Stehungsvermögen (Ausgrätschen). *Arch Exp Vet Med.* 1982 36:221-235.
- Wolfsberg TG, McEntyre J, Schuler GD. Guide to the draft human genome. *Nature.* 2001 409:824-827.
- Womack JE. Molecular cytogenetics of cattle: a genomic approach to disease resistance and productivity. *J Dairy Sci.* 1988 71:1116-1123.
- Wrathall AE. The boar and congenital problems. *Pig Vet Soc Proc.* 1988 21:116-134.
- Wu CH, Madabusi L, Nishioka H, Emanuel P, Sypes M, Arkhipova I, Gilmour DS. Analysis of core promoter sequences located downstream from the TATA element in the hsp70 promoter from *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* 2001 21:1593-1602.
- Wu P, Blair PV, Sato J, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA. Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys.* 2000 381:1-7.
- Yasue H, Harumi T, Awata T. Assignment of GRP78 gene to swine chromosome 1q2.12-->q2.13 by fluorescent in situ hybridization. *Hereditas.* 1994 121:203-205.
- 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.
- Yeh CT, Lu SC, Chen TC, Peng CY, Liaw YF. Aberrant transcripts of the cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2000 60:4697-4700.
- Yerle M, Echard G, Robic A, Mairal A, Dubut-Fontana C, Riquet J, Pinton P, Milan D, Lahbib-Mansais Y, Gellin J. A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet.* 1996 73:194-202.
- Yerle M, Pinton P, Robic A, Alfonso A, Palvadeau Y, Delcros C, Hawken R, Alexander L, Beattie C, Schook L, Milan D, Gellin J. Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet Cell Genet.* 1998 82:182-188.
- Yost HJ, Lindquist S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell.* 1986 45:185-193.
- Zani VJ, Asou N, Jadayel D, Heward JM, Shipley J, Nacheva E, Takasaki 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 87:3124-3134.
- ZDS. „Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein“. 1994.
- Zhang JM, Zhao X, Wei Q, Paterson BM. Direct inhibition of G(1) cdk kinase activity by MyoD promotes myoblast cell cycle withdrawal and terminal differentiation. *EMBO J.* 1999 18:6983-6993.
- Zhao F, Ambady S, Ponce de Leon FA, Miller LM, Lunney JK, Grimm DR, Schook LB, Louis CF. Microsatellite markers from a microdissected swine chromosome 6 genomic library. *Anim Genet.* 1999 30:251-255.
- Zhu B, Smith JA, Tracey SM, Konfortov BA, Welzel K, Schalkwyk LC, Lehrach H, Kollers S, Masabanda J, Buitkamp J, Fries R, Williams JL, Miller JR. A 5x genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. *Mamm Genome.* 1999 10:706-709.
- Zhu F, Yan W, Zhao ZL, Chai YB, Lu F, Wang Q, Peng WD, Yang AG, Wang CJ. Improved PCR-based subtractive hybridization strategy for cloning differentially expressed genes. *Biotechniques.* 2000 29:310-313.
- Zijlstra C, Bosma AA, de Haan NA, Mellink C. Construction of a cytogenetically characterized porcine somatic cell hybrid panel and its use as a mapping tool. *Mamm Genome.* 1996 7:280-284.
- Zuckerkindl E. Gene control in eukaryotes and the c-value paradox "excess" DNA as an impediment to transcription of coding sequences. *J Mol Evol.* 1976 9:73-104.
- Zuniga J, Vargas-Alarcon G, Osnaya N, Martinez-Tripp S, Rodriguez-Reyna TS, Hernandez-Martinez B, Hesiquio R, Hernandez-Pacheco G, Gamboa R, Juarez F, Salgado N, Granados J. Heat-shock protein (HSP70-2) allelic frequencies in three distinct Mexican populations. *Genes Immun.* 1999 1:66-68.

8 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

8. VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

8.1 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 2.1:	Für die Initiation der Gentranskription erforderliche Promotorelemente bei Säugern (Auswahl nach Levin 1991).
Tabelle 2.2:	Typen von repetitiver DNA im Genom von Säugern (IHGSC 2001).
Tabelle 2.3:	Häufigkeit von Mikrosatelliten im humanen Genom (modifiziert nach IHGSC 2001).
Tabelle 2.4:	Identifizierte QTL für allgemeine und spezielle Leistungsmerkmale beim Schwein.
Tabelle 2.5:	Kartierte Gene und Mikrosatelliten bei landwirtschaftlichen Nutztieren im Vergleich zu Daten aus dem humanen Genom.
Tabelle 2.6:	Ausgewählte Kandidatengene für allgemeine und spezielle Leistungsmerkmale beim Schwein.
Tabelle 2.7:	Übersicht über die HSP70 – Multigenfamilie beim Menschen und orthologe Gene bei Rind und Schwein (ergänzt und verändert nach Günther & Walther 1994).
Tabelle 2.8:	Phänogramm für das Merkmal „Ausgrätschen“ im Zwei-Locus-Modell (Stigler et al. 1991).
Tabelle 3.1:	Struktur des Tiermaterials in den Untersuchungen zum HSP70.2-Gen
Tabelle 3.2:	Primersequenzen für den diagnostischen Nachweis von Promotorvarianten (GC – Box, TATA – Box) mittels zweistufigem PCR – RFLP – Test (Hagendorf 1999).
Tabelle 3.3:	Biochemische Parameter von Biopsieproben des <i>M. longissimus</i> .
Tabelle 3.4:	Merkmale der Struktur des <i>M. longissimus</i> .
Tabelle 3.5:	Merkmale der Lebendmasseentwicklung und Mastleistung.
Tabelle 3.6:	Merkmale der männlichen und weiblichen Fruchtbarkeit.
Tabelle 3.7:	Merkmale der Schlachtkörperqualität.
Tabelle 3.8:	Merkmale der Fleischqualität.
Tabelle 3.9:	Primersequenzen zur Amplifizierung der cDNA des porcinen CDKN3-Gens.
Tabelle 3.10:	Primersequenzen zur Ermittlung der genomischen Sequenz des porcinen CDKN3-Gens.
Tabelle 3.11:	Primersequenzen und Annealing-Temperaturen für die chromosomale Zuordnung von porcinen cDNAs mittels Analyse von somatischen Zellhybriden.
Tabelle 4.1:	Beobachtete Genotypenhäufigkeiten (%) in den untersuchten Promotorelementen des pHSP70.2 – Gens in unterschiedlichen Populationen.
Tabelle 4.2:	Frequenzen für die Allele in den Polymorphismen in der GC – und TATA – Box.
Tabelle 4.3:	Verteilung der Genotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens und am MHS – Locus (Versuch 2).
Tabelle 4.4:	Biochemische Kennwerte von Biopsieproben des <i>M. longissimus</i> (LSQ – Mittelwerte \pm SE) bei Schweinen in Abhängigkeit von Alter und Genotyp.
Tabelle 4.5:	Merkmale der Struktur des <i>M. longissimus</i> (LSQ –Mittelwerte \pm SE) bei Schweinen in Abhängigkeit von Alter und Genotyp.
Tabelle 4.6:	Verteilung der Genotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens (TATA – Box) und am MHS – Locus (Versuch 1).
Tabelle 4.7:	Merkmale der Fleischqualität (LSQ –Mittelwerte \pm SE) in Abhängigkeit von den Genotypen im MHS – Locus sowie in der TATA - Box des pHSP70.2 – Gens.
Tabelle 4.8:	Merkmale der Fleischbeschaffenheit (LSQ –Mittelwerte \pm SE) in Abhängigkeit vom Genotyp (Versuch 2).
Tabelle 4.9:	Gesamtmittelwerte (\pm SE) der untersuchten Population in ausgewählten Merkmalen der Mast- und Schlachtleistung sowie Fleischbeschaffenheit, Mittelwerte (\pm SE) in den selektierten Gruppen sowie Frequenzen der Allele der Promotor – Polymorphismen (Versuch 3).

8 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 4.10:	Parameter der Spermaqualität (LSQ –Mittelwerte \pm SE) bei Besamungsebern mit unterschiedlichen Genotypen im MHS – Locus sowie dem Promotor des pHSP70.2 – Gens (Versuch 4).
Tabelle 4.11:	Merkmale der Fruchtbarkeit sowie Geburtsgewichte der Nachkommen bei Sauen mit unterschiedlichen Haplotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens (LSQ –Mittelwerte \pm SE; Versuch 5).
Tabelle 4.12:	Geburtsgewichte von Ferkeln (LSQ –Mittelwerte \pm SE) mit unterschiedlichen Haplotypen im Promotor des pHSP70.2 – Gens (Versuch 5).
Tabelle 4.13:	Effekte auf Merkmale der Lebendmasseentwicklung und Mastleistung in der Berlin – Bonner Ressourcepopulation sowie LSQ - Mittelwerte (\pm SE) für die Genotypen im Polymorphismus der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens (Versuch 6).
Tabelle 4.14:	Effekte auf Merkmale der Schlachtkörperqualität in der Berlin – Bonner Ressourcepopulation sowie LSQ - Mittelwerte (\pm SE) für die Genotypen im Polymorphismus der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens (Versuch 6).
Tabelle 4.15:	Effekte auf Merkmale der Fleischqualität in der Berlin – Bonner Ressourcepopulation sowie LSQ - Mittelwerte (\pm SE) für die Genotypen im Polymorphismus der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens (Versuch 6).
Tabelle 4.16:	Getestete Primerkombinationen für die cDNA-Synthese aus mRNA des <i>Musculus biceps femoris</i> von gesunden und Spreizferkeln.
Tabelle 4.17:	Ergebnisse der Homologiesuche in den Abteilungen „nr“, „dbest“ und „htgs“ des EMBL/GenBank - Systems für different exprimierte Fragmente im M. biceps femoris von gesunden und Spreizferkeln.
Tabelle 4.18:	Genomische Struktur des humanen BCL7B – Gens und Einordnung des porcinen Fragmentes.
Tabelle 4.19:	Genomische Struktur des humanen (obere Zeile) und porcinen (untere Zeile) CDKN3- Gens. Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf die GenBank Einträge L27711(hCDKN3) und AJ404882 (pCDKN3).
Tabelle 4.20:	Homologe Abschnitte im porcinen (AJ404883 und 404884) und humanen (NT_010084) CDKN3 – Gen.
Tabelle 4.21:	SINEs im porcinen CDKN3 – Gen.
Tabelle 4.22:	Identifizierung von Genen, die im M. biceps femoris neugeborener Ferkel exprimiert werden.
Tabelle 4.23:	Chromosomale Lokalisation potentieller Kandidatengensequenzen für das Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel.
Tabelle 4.24:	Chromosomale Lokalisation von Genen die im M. biceps femoris neugeborener Ferkel exprimiert werden.
Tabelle 5.1:	Beobachtete Genotypenfrequenzen (%; von – bis) in zwei Polymorphismen des pHSP70.2 – Gen – Promotors.
Tabelle 5.2:	Assoziationen zwischen Polymorphismen im Promotor des pHSP70.2 – Gens und physiologischen Parameter sowie Leistungsmerkmalen beim Schwein.
Tabelle 5.3:	Anzahl an Genen, anonymen ESTs sowie Markern, die in den mit den eigenen Daten korrespondierenden Chromosomenabschnitten lokalisiert wurden (URL 8).
Tabelle 5.4:	Anzahl publizierter ESTs in verschiedenen Spezies (URL 9)

8 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

8.2 Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 2.1:** Schematische Struktur des Säuger-genoms (Baltimore 2001).
- Abbildung 2.2:** Einordnung von struktureller und funktioneller Genomanalyse im Weg vom Gen zur Merkmalsausprägung (Schwerin et al. 2000).
- Abbildung 3.1:** Darstellung der Genotypen in der GC – Box (oberer Teil) und TATA – Box (unterer Teil) des pHSP70.2 - Gens mit dem GATC 1500 Sequenzierungssystem.
- Abbildung 3.2:** Darstellung der Genotypen in der GC – Box (linkes Bild) und der TATA – Box (rechtes Bild) mittels PCR – RFLP – Test (Schwerin unveröffentlicht).
- Abbildung 3.3:** Gesamt – RNA aus Skelettmuskulatur (Präparation durch CsCl – Gradientenzentrifugation).
- Abbildung 4.1:** Vergleich der von Peelman et al. (1992) ermittelten Sequenz von Promotor und 5'-UTR des pHSP70.2 – Gens (M69100, obere Zeile) mit eigenen Ergebnissen (Konsenssequenz aus n = 51; untere Zeile, Maak et al. 1998).
- Abbildung 4.2:** Vergleich der von Peelman et al. (1992) ermittelten Sequenz des 3'-UTR des pHSP70.2 – Gens (M69100, obere Zeile) mit eigenen Ergebnissen (Konsenssequenz aus n = 4, untere Zeile).
- Abbildung 4.3:** Effekt der Genotypen am MHS – Locus und in der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens auf den pH – Wert – Abfall im M. longissimus (45 min p.m. bis 24 h p.m.).
- Abbildung 4.4:** Fleischqualitätsparameter bei Schweinen mit unterschiedlichen Genotypen im MHS – Locus und in der TATA – Box des pHSP70.2 – Gens.
- Abbildung 4.5:** Mittlere Abweichung der Geburtsgewichte von Ferkeln mit unterschiedlichen maternalen und paternalen Allelen im Polymorphismus in der GC – Box des pHSP70.2 – Gens.
- Abbildung 4.6:** Beispiel für ein Polyacrylamid – Gel mit merkmalsassoziiert exprimierten Fragmenten (Differential Display).
- Abbildung 4.7:** Vergleich der partiellen Proteinsequenzen des humanen und porcinen TAF1B – Gens.
- Abbildung 4.8:** Vergleich der porcinen *ATP5I* cDNA mit den entsprechenden humanen und bovinen Sequenzen (Maak et al. 2001a).
- Abbildung 4.9:** Differentielles Display von Banden mit der Primerkombination D8U17.
- Abbildung 4.10:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen und porcinen CDKN3 – Gene.
- Abbildung 4.11:** Nachweis der Expression des CDKN3 – Gens in verschiedenen Geweben mittels RT – PCR.
- Abbildung 4.12a:** Beobachtete Transkriptvarianten des CDKN3 – Gens bei einem Spreizerferkel
b: Beobachtete Transkriptvarianten des CDKN3 – Gens bei zwei Spreizerferkeln
c: Beobachtete Transkriptvarianten des CDKN3 – Gens bei einem gesunden Ferkel
- Abbildung 4.13:** Resultierende Polypeptide aus veränderten Transkripten des porcinen CDKN3 – Gens bei Spreizerferkeln (S1, S4 und S9) sowie einem Kontrollferkel (K5).
- Abbildung 5.1:** Vergleich der Promotor – Region zwischen dem pHSP70.2 – (eigene Daten), dem bHSP70-2 – (U02896) sowie dem hHSP70-2 – Gen (M59830).
- Abbildung 5.2:** Vergleich der partiellen Aminosäuresequenzen des HSP70.2 von Schwein (1: Maak et al. 1999; 2: Peelman et al. 1992) und Rind (Grosz et al. 1992) mit dem HSP70-1 der Ratte (Walther et al. 1994).

1. Verwendete Geräte

Zentrifugen

μ-Centrifuge Model 10 (Nuclepore, Tübingen)
Tischzentrifuge 2K15 (Sigma, Osterrode)
Microfuge E (Beckman, München)

Gelelektrophorese

Macrophor Sequencing System (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg)
Horizontalelektrophorese B1A (AGS, Heidelberg)
Stromversorgung Consort E 700 (AGS, Heidelberg)
Stromversorgung Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)

PCR – Geräte

Biometra UNO II (Biometra, Göttingen)
TC1 (Perkin Elmer, Überlingen)

Sequenzierung

Automatische Sequenziereinheit ALFexpress (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg)
GATC 1500 (GATC, Konstanz)

Thermostate, Wasserbäder, Heizblöcke, Inkubatoren

Thermoblock Liebisch III (Liebisch, Bielefeld)
Heizplatte (Schott, Mainz)
Wasserbad Haake K15 (Rettberg, Göttingen)
Blockthermostat BT100 (Rettberg, Göttingen)
Test Tube Heater 7SHT 1007 (MLT, Rostock)
Schüttelinkubator GFL 3032 (GFL, Leipzig)
Mini Oven MK II (MWG Biotech, Ebersbach)

weitere Geräte

Spektralphotometer GeneQuantII (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg)
Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Berlin)
pH-Meter Modell 537 (WTW, Weilheim)
CAMAG Reprokabinett (Polaroid, Offenbach)
Vakuumtrockner Univapo 100H (GETEC, Halle)

9 Anhang

2. Verwendete biologische Substanzen und Chemikalien (soweit nicht im Text erläutert)

DNA - Isolierung

<i>Triton – Lysepuffer (pH 7,5; 1000 ml)</i>	
Tris – Aminomethan (Roth, Karlsruhe)	1,21 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (Roth, Karlsruhe)	1,02 g
Sucrose (Sigma, Deisenhofen)	109,54 g
Triton X100 (Merck, Darmstadt)	10,00 ml
Aqua bidestillata ad 1000 ml	

<i>Kern – Lysepuffer (pH 8,2; 1000 ml)</i>	
Tris – Aminomethan (Roth, Karlsruhe)	1,21 g
NaCl (Sigma, Berlin)	23,38 g
0,5 M Na-EDTA (pH 8,0)	4,00 ml
Aqua bidestillata ad 1000 ml	

<i>Pronase – Arbeitslösung</i>	
Pronase E (Roche, Mannheim)	10,00 mg
20% SDS (Merck, Darmstadt)	500 µl
0,5 M Na-EDTA (pH 8,0)	40 µl
Aqua bidestillata	8.960 µl

<i>TE – Puffer (pH 7,5)</i>	
10 mM Tris – HCl (Roth, Karlsruhe)	
1 mM EDTA (Roth, Karlsruhe)	

RNA - Isolierung

<i>Homogenisationspuffer</i>	
4 M Guanidiniumthiocyanat (Merck, Darmstadt)	
0,1 M Tris – HCl (pH 7,5; Roth, Karlsruhe)	
1% Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)	

Agarose – Gelelektrophorese

<i>10 x TAE – Puffer (pH 8,0; 1000 ml)</i>	
Tris – Acetat (Roth, Karlsruhe)	48,46 g
EDTA (Roth, Karlsruhe)	3,72 g
Aqua bidestillata ad 1000 ml	

Agarose NuSieve 3:1 (Biozym, Hessisch Oldendorf)

<i>Lade – Puffer</i>	
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 Ammoniumpersulfat (APS)

PlusOne TEMED (N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamid)

PlusOne Bindsilan

PlusOne Harnstoff

PlusOne Repel - Silan

10 x TBE – Puffer (pH 7,5; 1000 ml)

Tris – HCl (Roth, Karlsruhe)

108,00 g

0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe)

40,00 ml

PlusOne Borsäure (AmershamPharmacia Biotech, Freiburg)

55,00 g

Aqua bidestillata ad 1000 ml

Ladepuffer (Differential Display)

25% Glycerin (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, Karlsruhe)

20,00 g.

Lebenslauf

LEBENS LAUF

Name: Steffen Maak
Geburtstag: 25.01.1962
Geburtsort: Halle/Saale
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet; 2 Kinder

Schulbildung:

1968 - 1976 Polytechnische Oberschule Bad Dürrenberg
1976 - 1980 Erweiterte Oberschule Merseburg; Abschluss mit Abitur (Note „sehr gut“)

Wehrdienst: 1980 - 1983

Studium:

1983-1988 Studium der Ökonomie und Technologie der Tierproduktion; Universität Leipzig, Abschluss als Diplom-Agraringenieur, Prädikat „sehr gut“

berufliche Tätigkeit:

1988 - 1991 Forschungsstudent am WB Schweinezucht; Sektion Tierproduktion und Veterinärmedizin; Universität Leipzig,
1991 Verteidigung der Dissertation; Universität Leipzig; Promotion zum Dr. agr., Thema der Dissertation: „Beziehungen zwischen Parametern der Calciumhomöostase in Blutplättchen und Kriterien der Belastbarkeit beim Schwein“; Prädikat „magna cum laude“
seit 1991 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktika und Auslandsaufenthalte:

03/1988 - 12/1988 Forschungsaufenthalt am Institut für Pathobiochemie der Medizinischen Akademie Erfurt
10/1994 - 03/1995 Forschungsaufenthalt am Department of Animal Science; Iowa State University; Ames (USA)
11/2000 - 12/2000 Gastdozentur an der Universidad Central de las Villas, Santa Clara (Kuba)

Halle (Saale), 2001

Steffen Maak

Danksagung

DANKSAGUNG

Die Arbeiten, die in die vorliegende Schrift eingeflossen sind, waren nur durch die Unterstützung zahlreicher Personen möglich. Ihnen möchte ich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. habil. Dr. h.c. G. von Lengerken, der als langjähriger Direktor des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik den eigentlichen Anstoß für die durchgeführten Untersuchungen gab. Beim Wiederaufbau eines tierzüchterischen Institutes an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg legte er großen Wert auf die Etablierung moderner molekulargenetischer Methoden, mit der er mich betraute. Für die immer vorhandene Unterstützung beim Auf- und Ausbau des Labors sowie die gewährte wissenschaftliche Freiheit bei der Bearbeitung von Forschungsvorhaben bin ich ihm dankbar.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. habil. M. Schwerin, der jederzeit für fachliche Diskussionen zur Verfügung stand und uns wesentlich bei der Überwindung von Problemen geholfen hat. Zahlreiche der in der Arbeit angewandten Methoden konnten von mir und weiteren Mitarbeitern des Instituts in den Labors des von ihm geleiteten Forschungsbereiches Molekulargenetik des FBN in Dummerstorf studiert und geübt werden. Diese stets unbürokratische Hilfe trug maßgeblich zum Gelingen der hier beschriebenen Untersuchungen bei.

Herrn Prof. Dr. M. Wicke danke ich für die langjährige gute Zusammenarbeit. Gerade weil unsere ursprünglich ähnlichen Arbeitsgebiete im Laufe der Jahre mehr und mehr divergierten, waren die Diskussionen mit ihm sehr fruchtbar und sorgten dafür, dass die eigenen Arbeiten immer wieder kritisch hinterfragt wurden. Nicht zuletzt unterstützte er mich bei der Organisation tierexperimenteller Arbeiten für die hier beschriebenen Untersuchungen, die teilweise auch an Tieren aus von ihm betreuten Forschungsvorhaben durchgeführt werden konnten. In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen Mitarbeitern des Nutztierwissenschaftlichen Zentrums in Merbitz mit seinen früheren und jetzigen Leitern Herrn Dr. M. Buchte und Herrn Dr. S. Götze danken.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Schweinezucht- und Produktionsverbandes Sachsen – Anhalt (i.L.) für die Bereitstellung von Daten und Proben von Zuchtschweinen. Ebenso bedanke ich mich beim Geschäftsführer Herrn Schönfeldt sowie Herrn Römer aus den Quellendorfer und Zehbitzer Agrar AGs für die große Unterstützung bei den Untersuchungen zum Ausgrätschen der Saugferkel. Herrn Dr. habil. T. Hardge bin ich dankbar für die Bereitstellung von DNA – Proben und Leistungsdaten der Berlin – Bonner – Ressourcepopulation sowie für die fachlichen Diskussionen.

Danksagung

Der Schwerpunkt der Arbeiten lag jedoch im Labor. Hier möchte ich mich ganz besonders bei Frau G. Becke bedanken, die mit mir gemeinsam ein völlig neues Arbeitsgebiet erschloss. Mit großem Engagement und viel Geduld sorgte sie dafür, dass zahlreiche molekulargenetische Analyseverfahren trotz aller auftretenden Probleme mittlerweile zum etablierten Methodenspektrum des Labors unseres Institutes gehören. Dem Laborleiter Herrn Dr. R. Schmidt danke ich für die jederzeit gewährte Hilfe beim Auf- und Ausbau des Labors. Sein großes Fachwissen unterstützte uns während der gesamten Zeit der Untersuchungen. Frau S. Jäsert führte einen großen Teil der molekulargenetischen Analysen zum Ausgrätschsyndrom beim Saugferkel durch. Für ihr Engagement bei der Einarbeitung in neue Methoden und der Organisation der Versuche für zwei von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderte Projekte danke ich ihr herzlich. Mein Dank gilt weiterhin Frau K. Petersen, die Teile der Untersuchungen zum Hitzeschockprotein – Gen durchführte. Seit 1998 betreiben die Institute für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik sowie Zoologie das molekulargenetische Labor gemeinsam. Herrn Dr. K. Neumann sei an dieser Stelle für die gute Zusammenarbeit gedankt. Sowohl in methodischer Hinsicht als auch durch stete Bereitschaft zu kritischen Diskussionen war er mir eine große Hilfe bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht danke ich für das kollegiale Arbeitsklima und die immer gewährte Unterstützung der Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau, die mir besonders in kritischen Phasen während der Projektbearbeitung eine große Hilfe war.

Erklärung

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Halle (Saale), 15.06.2001

Steffen Maak

**Untersuchungen zu Kandidatengeneten für Leistungseigenschaften
und Erbfehler beim Schwein**

Thesen
zur
Habilitationsschrift

Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

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

vorgelegt von
Dr. agr. Steffen Maak

geb. am 25.01.1962
in Halle (Saale).

Halle (Saale), Juni 2001

Einführung und Zielsetzung

Die moderne Tierzucht wird neben weiteren Fortschritten in den klassischen Zucht – und Selektionsverfahren von der zunehmenden Anwendung molekulargenetischer Methoden bestimmt. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Identifizierung von Genen mit Effekten auf Nutzleistungen und Tiergesundheit. Diese, Kandidatengene genannten Loci, werden auf ihren Zusammenhang mit phänotypischen Eigenschaften untersucht und können bei enger Beziehung zur Nutzleistung in Selektionsprogramme einbezogen werden.

Die vorliegende Arbeit ordnet sich in diesen methodischen Ansatz ein. Gegenstand der Untersuchungen ist einerseits die Analyse des Zusammenhanges zwischen genetischen Varianten in einem Kandidatengen und Leistungsmerkmalen sowie andererseits die Identifizierung von potentiellen Kandidatengenen für einen Erbdefekt beim Schwein.

Dazu wurden Sequenzvariationen im porcinen Hitzeschock - Protein 70.2 – Gen als funktionellem Kandidatengen für die zelluläre Stressantwort auf ihre Assoziation zu Leistungsmerkmalen mit nachgewiesener Beeinflussbarkeit durch Stress untersucht. Weiterhin wurden Gene isoliert, deren Expression mit dem Erbdefekt „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ assoziiert ist. Diese Gene wurden teilweise strukturell charakterisiert. Im Ergebnis dieser Untersuchung isolierte Gene wurden mit Methoden der physischen Kartierung den entsprechenden Chromosomenbanden beim Schwein zugewiesen.

Ziel der Untersuchungen war somit

- die Evaluierung eines bereits bekannten Genes in Hinblick auf seinen Kandidatengencharakter,
- die Identifizierung und Charakterisierung neuer Kandidatengene sowie
- die Ergänzung der Genkarte des Schweines.

Methodik

Die eigenen Untersuchungen sind in zwei Komplexe gegliedert.

Im ersten Schwerpunkt standen die Beziehungen von zwei beschriebenen Polymorphismen im Promotor des porcinen HSP70.2 – Gens zu Leistungsmerkmalen beim Schwein im Mittelpunkt. Hierzu wurde nach dem klassischen Kandidatengenansatz vorgegangen. Die Genotypen in zwei transkriptionsbeeinflussenden Sequenzmotiven (GC – Box; TATA –Box) wurden durch vergleichende Sequenzierung bzw. RFLP – Tests (Restriktionsfragment – Längen – Polymorphismus) dargestellt und mittels Varianzanalyse auf ihre Assoziation mit Merkmalen der Fleischbeschaffenheit, in - vitro Parametern zur deren Vorhersage, Merkmalen der Mast – und Schlachtleistung sowie der männlichen und weiblichen

Fruchtbarkeit untersucht. Diese Analysen wurden an insgesamt 754 Schweinen verschiedener genetischer Konstruktionen in 6 separaten Experimenten vorgenommen.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit hatte die Identifizierung von potentiellen Kandidatengensequenzen für den Erbfehler „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ zum Inhalt. Als Methode wurde hierzu die Differential Display/Reverse Transkriptase – PCR (DD/RT – PCR) verwendet. Die mRNA aus dem Musculus biceps femoris von gesunden und erkrankten Ferkeln wurde revers transkribiert und die resultierenden cDNAs im Differential Display verglichen. Merkmalsassoziiert erscheinende Banden wurden isoliert und charakterisiert.

Einige der isolierten Banden wurden durch Analyse eines somatischen Zellhybrid – Panels physisch kartiert.

Aus den vorliegenden Ergebnissen werden folgende Thesen abgeleitet:

Das porcine HSP70.2 – Gen als potentielles Kandidatengen für Leistungsmerkmale beim Schwein

1. Die Allele in den beiden untersuchten Polymorphismen treten in unterschiedlichen Häufigkeiten in verschiedenen kommerziell genutzten Schweinepopulationen auf. Die mit 0,09 sehr geringe Frequenz der homozygot mutierten Variante in der TATA – Box lässt auf eine indirekte Selektion gegen diesen Genotyp in der Schweinezucht schließen.
2. Eine Verpaarung heterozygot mutierter Varianten im TATA – Box – Polymorphismus in einer experimentellen Population erbrachte eine dem theoretischen Erwartungswert nahekommende Genotypenverteilung. Diese Nachkommen unterschieden sich, unabhängig vom TATA – Box – Genotyp, nicht in ihren Leistungen. Daraus wird gefolgert, dass keine direkten Effekte dieses Locus auf die untersuchten Merkmale vorhanden sind.
3. Es existieren signifikante Assoziationen zwischen den untersuchten Polymorphismen im Promotor des porcinen HSP70.2 – Gens und Merkmalen der Fleischqualität sowie dem Geburtsgewicht der Ferkel in einigen kommerziell genutzten Populationen. Dabei sind das mutierte Allel in der GC – Box sowie das Wildtyp – Allel in der TATA – Box mit vorteilhaften Werten in den untersuchten Merkmalen verbunden.
4. Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse der Assoziationsstudien in unterschiedlichen Populationen zeigen die Notwendigkeit von Untersuchungen zu

funktionellen Auswirkungen der Mutationen auf. Im Zuge solcher Analysen wurde demonstriert, dass teilweise gegenläufige Effekte der untersuchten sowie weiterer funktioneller Mutationen im Promotor des HSP70.2 – Gens auf die Gentranskription zu beobachten sind.

5. Weitere Polymorphismen in der 3' - nicht translatierten Region (3'- UTR) des Gens sind mit Differenzen in der mRNA – Stabilität assoziiert. Demnach wird die Expression des pHSP70.2 – Gens sowohl transkriptionell als auch auf der Ebene der Translation reguliert.
6. Bei Berücksichtigung der Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung der Polymorphismen im pHSP70.2 – Gen werden die Grenzen des klassischen Kandidatengenansatzes deutlich. Die isolierte Betrachtung einzelner Polymorphismen in ihrer Beziehung zu komplexen quantitativen Merkmalen wird nur in seltenen Fällen (Majorgene) zu populationsübergreifend reproduzierbaren Ergebnissen führen.
7. Das porcine HSP70.2 – Gen ist weiterhin als funktionelles Kandidatengen für Leistungseigenschaften anzusehen, deren Ausprägung durch Stresseinwirkung beeinflussbar ist. Dazu sind Folgeuntersuchungen unter Einbeziehung aller vorhandenen Informationen zur Expression des Gens erforderlich.
8. Die Entwicklung neuer Technologien (z.B. DNA – Chips) ermöglicht die gleichzeitige Analyse zahlreicher Polymorphismen in ihrer Auswirkung auf Gesundheit und tierische Leistung. Darüber hinaus wird die Integration von Methoden der strukturellen und funktionellen Genomanalyse zu einer Neudefinition des traditionellen Kandidatengenansatzes führen.

Potentielle Kandidatengene für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“

1. Die Methode der Differential Display/Reverse Transkriptase – PCR ist zur Identifizierung von Genen geeignet, deren Expression mit dem untersuchten Erbfehler assoziiert ist. Insgesamt 16 entsprechende Fragmente wurden in den eigenen Untersuchungen isoliert.
2. Die Charakterisierung der isolierten Sequenzen zeigte auf, dass keines dieser Gene bislang für das Schwein beschrieben wurde. Homologievergleiche mit Sequenzen anderer Spezies führten zur Identifizierung von 4 Genen (TAF1B, ATP5I, BCL7B und CDKN3), die für weiterführende Kandidatengenuntersuchungen zur Verfügung stehen.
3. Die bereits in dieser begrenzten Studie identifizierten 16 merkmalsassoziiert erscheinenden Genfragmente deuten auf einen polygenen Erbgang für das Syndrom „Congenitales Ausgrätschen beim Saugferkel“ hin.
4. Für drei der Gene (TAF1B, BCL7B sowie CDKN3) wird eine Einbeziehung ihrer Produkte in zelluläre Entwicklungs – und Differenzierungsprozesse beschrieben. Vor dem Hintergrund der beobachteten, merkmalsassoziierten Expression dieser Gene stärken die eigenen Ergebnisse die postulierte Hypothese des Vorliegens einer kompensatorischen Hypoplasie bei Spreizerferkeln. Allerdings sind weitere Untersuchungen dazu erforderlich.
5. Die umfassende strukturelle Charakterisierung des porcinen CDKN3 – Gens zeigt eine hohe Homologie zum entsprechenden menschlichen Gen sowohl in der genomischen Organisation als auch in der kodierenden Sequenz. Diese evolutionäre Konservierung sowie die für den Menschen beschriebene Funktion des Genproduktes deuten auf eine zentrale Rolle des Gens bei der Regulation der Zelldifferenzierung hin.
6. Vornehmlich bei Spreizerferkeln treten abberante Transkripte des CDKN3 – Gens auf. Dieses, auch beim Menschen im Zusammenhang mit Tumoren beschriebene Phänomen ist Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen. Dabei stehen die Ermittlung der Häufigkeit solcher abweichender Transkripte bei Erkrankten und Gesunden sowie das Auffinden eventueller Intronvarianten als deren Ursache im

Mittelpunkt. CDKN3 ist ein potientes funktionelles Kandidatengen für den untersuchten Erbfehler.

7. Die isolierten 16 merkmalsassoziierten und die weiterhin beschriebenen 10 Genfragmente aus dem Musculus biceps femoris neugeborener Ferkel stellen die erste Beschreibung der Genexpression in einem Skelettmuskel in diesem Entwicklungsstadium beim Schwein dar.
8. Mit einer Ausnahme (PDK4) wurden Fragmente isoliert, die noch nicht für das Schwein beschrieben wurden. Vor dem Hintergrund von bereits über 40.000 dokumentierten exprimierten Sequenzen in verschiedenen Geweben des Schweines zeigen die eigenen Ergebnisse die Spezifität der Genexpression im Skelettmuskel neugeborener Ferkel auf.
9. Die chromosomale Zuordnung von insgesamt 13 Genen trägt zur Erweiterung der physischen Genkarte des Schweines bei. Potentielle Kandidatengene für die untersuchte Erkrankung sind demnach auf den porcinen Chromosomen 1, 3, 4, 8, 9 und X lokalisiert.
10. Die für das porcine CDKN3 – Gen ermittelte Lokalisation auf Chromosom 1q23-27 korrigiert Literaturangaben, die eine Homologie dieser Region mit dem humanen Chromosomen 9 angeben. Das eigene Ergebnis trägt zu einer Verfeinerung der vergleichenden Genkarte zwischen Mensch und Schwein bei.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung des Kandidatengenansatzes für die zukünftige Genomanalyse beim Schwein auf. Dabei wird der klassische Kandidatengenansatz durch zunehmende Einbeziehung von Verfahren der funktionellen Genomanalyse erweitert werden. Die im ersten Teil der eigenen Untersuchungen aufgezeigten Grenzen dieses Ansatzes lassen sich somit überwinden.