

3 Material und Methode

3.1 Tiermaterial und erfaßte Merkmale

3.1.1 Tiermaterial

Grundlage der Untersuchung bildet die Berliner Ressourcepopulation. Dabei handelt es sich um die reziproke Verpaarung der Rassen Duroc und Berliner Miniaturschwein.

Die Rasse Duroc hat ihren Ursprung in den USA. Diese Tiere zeichnen sich durch Robustheit, Frohwüchsigkeit und gute Futtermittelverwertung aus. Sie zeigen eine rotbraune Fellfarbe auf der gelegentlich kleine schwarze Flecke zu sehen sind. Die männlichen Tiere erreichen eine Schulterhöhe von 90 cm und ein Gewicht von 350 kg (SAMBRAUS, 1994).

Das Berliner Miniaturschwein wurde 1966 aus den Rassen Vietnamesisches Hängebauchschwein, Deutsches Veredeltes Landschwein und Sattelschwein erzeugt. Das Ziel dieser Züchtung war die Entwicklung einer Schweinerasse zu medizinischen und biologischen Forschungszwecken. Dabei wurden vor allem die Eigenschaften geringe Größe, gute Fruchtbarkeit und Frühreife angestrebt. Die Tiere sollten weiterhin von ruhigem Temperament sein und eine weiße Haut- und Fellfarbe mitbringen. Der starke Fettansatz und die Ausprägung des Hängebauches waren dagegen unerwünscht. Das Berliner Miniaturschwein, das zu Anfang als Mini-LEWE bezeichnet wurde, erreicht eine Schulterhöhe von 50 cm und ein Gewicht von 39 kg, Haut- und Fellfarbe sind weiß (LEUCHT et al., 1982). Damit ergibt sich eine große Differenz in den Merkmalen Wachstum und Farbausprägung zwischen den Ausgangsrassen.

Die Versuchspopulation wurde zur Untersuchung der genetischen Ursache quantitativer Merkmale (QTL) erstellt. Es wurde jeweils ein Eber der Rassen Duroc und Berliner Miniaturschwein an 5 Duroc und 6 Miniaturschwein Sauen angepaart. Dabei stammten die Tiere der Rasse Miniaturschwein und das männliche P₁-Tier der Rasse Duroc aus der Versuchsstation des Instituts für Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin. Die weiblichen P₁-Tiere der Rasse Duroc stammen von der „GbR Henze“ in Lebusa. Die Anpaarung erfolgte mittels künstlicher Besamung mit Unterstützung des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere in Schönow. Die Sauen wurden in einem Alter von 460 Tagen (Miniaturschwein), bzw. 412 Tagen (Duroc) besamt.

Aus dieser Verpaarung ergaben sich 179 F₁-Tiere, von denen 58 weibliche Tiere zur Erzeugung der F₂-Generation genutzt wurden. Diese wurden an 4 F₁-Eber angepaart. Es wurden vorwiegend zwei der Eber eingesetzt, nur ein geringer Anteil der Nachkommen wurde durch die beiden anderen Eber erzeugt.

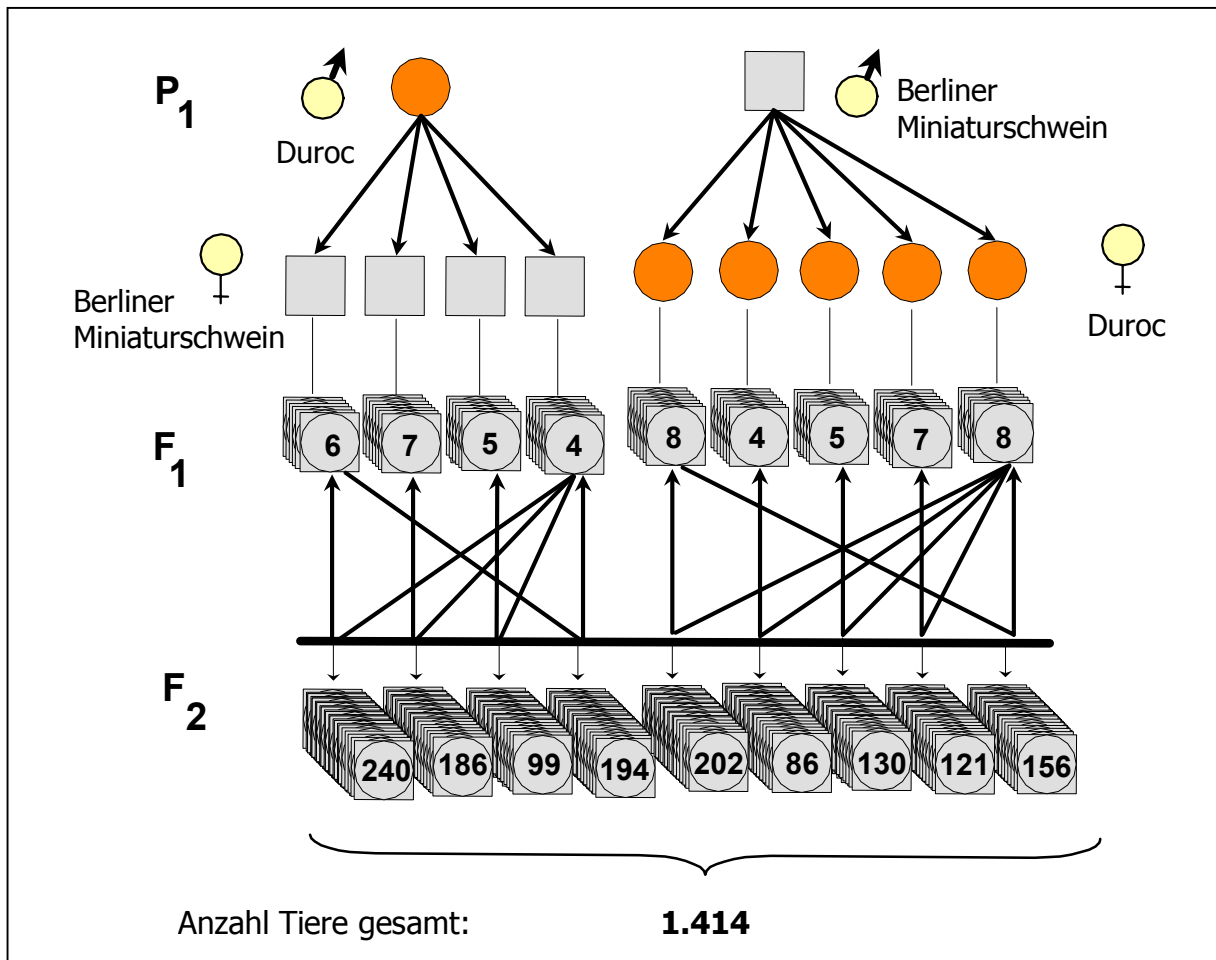


Abbildung 3.1: Struktur der Berliner Ressourcepopulation. Die F₂-Generation umfaßt 1.414 Tiere.

3.1.2 Erfasste Merkmale

Die Population zeigte eine unübliche Vererbung der weißen Farbe, die sich bereits in der F₁-Generation manifestierte. Auffallend war die breite Variation der Fellfarben in der F₂-Generation. Alle Tiere der F₁-Generation, sowie 863 Tiere der F₂-Generation wurden beidseitig fotografiert und der Farbphänotyp bestimmt. Die Photographien wurden mit Hilfe einer Videokamera in den Computer eingelesen. Anschließend wurden die prozentualen Farbanteile sowie die Anzahl pigmentierter Flecken unter Verwendung eines Bildanalyseprogramms (h&k, Image P2, Version 8.3) berechnet. Weiterhin wurde die Pigmentierung der einzelnen Klauen erfaßt.

Von allen Tieren der F₂-Generation wurden Merkmale der Mastleistung, des Schlachtkörperwerts und der Fleischqualität erfaßt. Dies erfolgte von der Geburt bis zur 14. Lebenswoche in der Versuchsstation der Humboldt-Universität zu Berlin. Die Tiere wurden in Gruppen gehalten und ad libitum gefüttert. Von der 15. Lebenswoche bis zur Schlachtung in der 29. Lebenswoche fand die Leistungsprüfung in der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und

Tierhaltung Ruhlsdorf / Groß-Kreutz statt. Die Tiere befanden sich in Einzelhaltung und wurden auf ein Prüfungsfutter umgestellt. Bei der Schlachtung wurden Blutproben, sowie Gewebeprobe aus Milz und Muskulatur entnommen.

Insgesamt wurden 36 Einzelmerkmale erfaßt, die in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 dargestellt sind.

Tabelle 3.1: Merkmale der Mastleistung bei Schweinen der F₂-Generation der Ressourcepopulation

Merkmal	Definition
Körpermassen¹	
Geburtsmasse (kg)	Körpermasse zum Zeitpunkt der Geburt
Körpermasse 50. d (kg)	Körpermasse am 50. Lebenstag
Körpermasse 100. d (kg)	Körpermasse am 100. Lebenstag
Körpermasse 200. d (kg)	Körpermasse am 200. Lebenstag
Körpermassezunahmen	
Geburt bis 50. d (kg/d)	Tägliche Lebendmassezunahme von der Geburt bis zum 50. Lebenstag
50. d bis 100. d (kg/d)	Tägliche Lebendmassezunahme vom 51. bis zum 100. Lebenstag
100. d bis 200. d (kg/d)	Tägliche Lebendmassezunahme vom 101. bis zum 200. Lebenstag
Futterverwertung²	
100. d bis 150. d (kg/kg)	Futteraufnahme je kg Lebendmassezunahme vom 101. bis 150. Lebenstag
150. d bis 200. d (kg/kg)	Futteraufnahme je kg Lebendmassezunahme vom 151. bis 200. Lebenstag
Nettofutterverwertung (kg/kg)	$\frac{\text{Futterverbrauch (kg) vom 101. bis 200. Lebenstag}}{\text{Schlachtkörpermasse (kg) – Körpermasse 100.d * 0,8}}$

¹ Alle Tiere der F₂-Generation wurden wöchentlich gewogen. Die Berechnung der Körpermasse zu den Zeitpunkten 35., 50., 100., 150. und 200. Lebenstag erfolgte unter Berücksichtigung der Körpermassezunahme des jeweiligen Wägeintervalls.

² Die Futteraufnahme konnte nur im 2. Prüfabschnitt gemessen werden. Sie wurde auf der Basis des in die Einzelfutterautomaten ein- bzw. rückgewogenen Prüfungsfutters ermittelt.

Die Erfassung der Merkmale der Schlachtleistung und Fleischqualität erfolgte nach der vom Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion e.V. herausgegebenen "Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein" vom 1.1.1994.

Tabelle 3.2: Merkmale der Schlachtleistung bei Schweinen der F₂-Generation der Ressourcepopulation

Merkmal		Definition
Schlachtkörpermasse	(kg)	Masse des Schlachtkörpers mit Beckenhöhlenfett, Nieren und Flomen unmittelbar nach der Schlachtung
Magerfleischanteil	(%)	Auf der Basis der Speck- und Muskeldicke 7 cm seitlich der Rückenmitte in Höhe der zweit/ drittletzten Rippe mittels Fat-O-Meater
Rückenspeck (Ultraschall)	(mm)	Mittels Ultraschallgerät ermittelte durchschnittliche Rückenspeckdicke an den Meßpunkten A2, B2, C2, B4 und B6 bei der ersten Wägung ¹ > 40 kg Körpermasse
FOM Speckmaß	(mm)	Messung der Speckdicke mittels Fat-O-Meater 7 cm seitlich der Rückenmitte in Höhe der zweit-/ drittletzten Rippe.
FOM Fleischmaß	(mm)	Messung der Muskeldicke mittels Fat-O-Meater 7 cm seitlich der Rückenmitte in Höhe der zweit-/ drittletzten Rippe.
Speckmaß B	(mm)	Speckdicke über den M. longissimus dorsi am Kotelettanschnitt 13./14. Rippe
Speckmaß D	(mm)	Fettauflage senkrecht zur Schwarte am ventralen Ende des M. latissimus am Kotelettanschnitt 13./14. Rippe
Rückenspeckdicke	(mm)	Durchschnittliche Speckdicke zwischen Muskel und Außenkante der Schwarte am Widerrist, in der Rückenmitte und an der Lende
Kotelettfläche	(cm ²)	Fleischfläche am Kotelettanschnitt 13./14. Rippe mittels Videobildanalyse
Fettfläche	(cm ²)	Fettfläche am Kotelettanschnitt 13./14. Rippe mittels Videobildanalyse
Fleisch:Fett-Verhältnis	(1 :)	Reziprokes Relativmaß des Quotienten aus Fettfläche und Kotelettfläche
Schlachtkörperlänge	(cm)	Länge der hängenden Schlachthälfte (1. Halswirbel bis zur cranialen Kante des Schloßknochens)

¹ Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug 133 ± 15 Tage.

Tabelle 3.3: Merkmale der Fleischqualität bei Schweinen der F₂-Generation der Ressourcepopulation

Merkmal	Definition
pH1k	pH-Wert 45 min p.m. im M. longissimus dorsi 13./14. Rippe
pH2k	pH-Wert 24 h p.m. im M. longissimus dorsi 13./14. Rippe
Leitfähigkeit 1k	Leitfähigkeit 45 min p.m. im M. longissimus dorsi 13./14. Rippe
Leitfähigkeit 2k	Leitfähigkeit 24 h p.m. im M. longissimus dorsi 13./14. Rippe
Fleischfarbe	Farbwert 24 h p.m. des M. longissimus dorsi am Kotelettanschnitt 13./14. Rippe mittels Optostar (0 = hell; 100 = dunkel)
Reflektion	Reflektionswert des M. longissimus dorsi 45 min p.m. 13./14. Rippe mittels Fat-O-Meater (0 = dunkel; 99 = hell)
Marmorierung	Subjektive Benotung der Marmorierung des M. longissimus dorsi 24 h p.m. am Kotelettanschnitt 13./14. Rippe (1 = wenig und 5 = stark marmoriert)

Neben den Merkmalen der Mastleistung, Schlachtleistung und Fleischqualität wurden auftretende Erkrankungen, der Krankheitsverlauf, die veterinärmedizinischen Behandlungen und die Schlachtverwürfe der Organe Leber, Lunge und Herz erfaßt.

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) stellt eine Methode dar, mit der spezifische DNA Abschnitte vervielfältigt werden können. Sie wurde 1983 von Kary Mullins entwickelt (SAMBROOK et al., 1989).

Bei der Polymerase handelt es sich um ein Enzym, das anhand eines Einzelstranges der DNA einen komplementären Strang synthetisieren kann, die einzelsträngige DNA wird dabei als Matrize verwendet. Für die Synthese benötigt die Polymerase ein kurzes Segment doppelsträngiger DNA als Startpunkt. Durch die Auswahl bekannter Oligonucleotidsequenzen, die als Primer bezeichnet werden und die zu synthetisierende Sequenz am 5'- und am 3'-Ende flankieren, kann der Abschnitt des Genoms, der amplifiziert werden soll, bestimmt werden. Dabei hybridisieren die Primer mit den komplementären Sequenzen des DNA-Einzelstranges und bilden so den Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges, die in 3'-5'-Richtung verläuft. Die neu synthetisierten Stränge tragen wieder die Bindungsstelle für den gegenüberliegenden Primer und können so als Matrize für eine weitere Synthese dienen, so daß sich das Reaktionsprodukt bei jedem Schritt verdoppelt. Dem Reaktionsgemisch müssen die einzelnen Nucleotidbausteine als Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP) zugesetzt werden (STRYER, 1991).

Um die Synthese zu ermöglichen, muß die DNA als Einzelstrang vorliegen. Das Reaktionsgemisch wird deshalb auf 94 °C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge zu trennen. Anschließend wird die optimale Temperatur benötigt, die es den Primern erlaubt, an die komplementäre Sequenz zu binden. Diese Temperatur ist abhängig von der Länge und den Basen der Oligonucleotide und bewegt sich meist zwischen 55 – 65 °C. Sie wird als Annealing-Temperatur bezeichnet. Das Temperaturoptimum der Polymerase liegt bei 72 °C. Um mehrere Zyklen durchlaufen zu können, wird die Taq-Polymerase verwendet, sie stammt von dem Bakterium *Thermus aquaticus* und ist auch bei 94 °C noch stabil. So werden zum Beispiel bei einem Molekül als Ausgangsmaterial nach 32 Zyklen 1.073.741.824 Zielmoleküle erwartet (WATSON et al., 1993).

3.2.2 Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Mit dem Ausdruck Restriktion wird die Fähigkeit prokaryotischer Enzyme beschrieben, bestimmte DNA-Sequenzen zu erkennen und beide Stellen des DNA-Doppelstranges zu schneiden (STRYER, 1991). Diese Enzyme werden als Restriktionsendonucleasen bezeichnet. Bakterien nutzen dieses Enzym, um die Fremd-DNA eingedrungener Viren zu zerstören, ihre eigene DNA ist dagegen geschützt. Wenn sich zwei Allele eines Genlocus durch eine Sequenz unterscheiden, die durch ein Restriktionsenzym erkannt und geschnitten wird, entstehen zwei Bruchstücke unterschiedlicher Basenpaarlänge für das eine Allel, das andere Allel bleibt ungeschnitten. Die verschiedenen Längen der DNA-Fragmente können in der Gelelektrophorese durch Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht werden. Die jeweilige Sequenz, die ein bestimmtes Enzym zu schneiden vermag, ist heute schon für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen bekannt.

3.2.3 Mikrosatelliten-Marker

Als Mikrosatelliten-Marker werden Genombereiche bezeichnet, die repetitive DNA-Sequenzen enthalten. Diese repetitiven Sequenzen kommen bei allen Eukaryoten vor und liegen meist als Tandemwiederholungen vor (WATSON et al., 1993). Sie werden nicht in RNA transkribiert, so daß hier auftretende Mutationen wenig Einfluß auf den Organismus ausüben. Ob und welche Funktion sie im Genom ausüben ist nicht genau bekannt. Sie sind häufig und gleichmäßig über das Genom verteilt und enthalten die 20 bis 50 fache Wiederholung von meist nicht mehr als 4 bp (BROWN, 1993). Die Tandemwiederholungen liegen in mehreren Versionen vor, ihre Verteilung ist von Individuum zu Individuum verschieden (SINGER et al., 1992). Eine Nutzung dieser Mikrosatelliten-DNA als Marker wird durch die Einmaligkeit der sie flankierenden Sequenzen ermöglicht. Werden diese flankierenden Sequenzen als Primer genutzt, um die Mikrosatelliten-DNA mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen, können die unterschiedlichen Längen der Fragmente zur Beschreibung der jeweiligen Genomregion genutzt werden.

3.2.4 DNA-Isolation aus Milzgewebe

Zur Isolation der DNA aus dem bei der Schlachtung gewonnenen Milzgewebe wurden ca. 0,3 g des Gewebes in 3 ml Spleen-Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) zerkleinert und in 0,1 ml einer 20 %igen SDS-Lösung gelöst. Nach Zugabe von 1 ml einer Proteinase-Solution (Proteinase K 1mg/ml H₂O, 1 % SDS, 2 mM EDTA) wurde das Gesamtvolumen bei 56 °C über Nacht inkubiert. Unter Zugabe von TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) und eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (50 % Phenol, 48 % Chloroform, 2 % Isoamylalkohol) wurde das Eiweiß ausgefällt, anschließend erfolgte eine Zentrifugation (8000 rpm, 10 min, 4°C) und ein weiterer Reinigungsschritt mit einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (96 % Chloroform, 4 % Isoamylalkohol). Nach einer weiteren Zentrifugation (8000 rpm, 10 min, 4 °C) erfolgte eine Zugabe von Natriumacetat (2,25 M, pH 5,2) zur Denaturierung des Proteinanteils und von 99,7 % Isopropanol zur Ausfällung der DNA. Diese wurde dann mittels einer Pasteurpipette in 70 % Ethanol überführt, zentrifugiert (13000 rpm, 15 sec) und luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) gelöst und ihre Konzentration spektrometrisch erfaßt.

Die gelöste DNA wurde dazu 1 : 100 mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) verdünnt, und bei einer Extinktion von 260 nm wurde die optische Dichte dieser Verdünnung gemessen. Unter Voraussetzung der optischen Dichte der DNA von 1 od = 50 µg/ml konnte die tatsächliche Konzentration unter Verwendung der Formel $50 \mu\text{g/ml} / 1 \text{ od} = X / \text{Meßwert}$ berechnet werden. Für die PCR wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 25 ng/µl verdünnt.

3.2.5 PCR-RFLPs des E-Locus

KIJAS et al. (1998b) identifizierten das MC1R-Gen als Kandidatengen für den E-Locus beim Schwein und sequenzierten ein 965 bp langes Exon des Gens, wobei die flankierenden Primer nicht einbezogen sind. Anhand dieser Sequenz des MC1R-Gens wurden mehrere Polymorphismen zwischen den Rassen verschiedener Farbausprägung ermittelt und zur Genotypisierung des E-Locus mehrere RFLPs entwickelt:

3.2.5.1 PCR-RFLP zur Detektion des Allels e

Eine Abgrenzung des Allels e von allen anderen Allelen des E-Locus wird durch eine Substitution der Base G durch A an Position 751 des MC1R-Gens bei Tieren der Rasse Duroc ermöglicht (KIJAS et al., 1998b). Durch diese Basensubstitution geht ein zusätzlicher Erkennungs- und Schnittpunkt für das Restriktionsenzym HhaI verloren. Zur Amplifizierung des DNA-Fragments, das die Basensubstitution enthält, wurden die Primer EPIG 1 (5´-CGG CCA TCT GGG CGG GCA GCG TGC-3´ forward) und EPIG 3 (5´-GGA AGG CGT AGA TGA GGG GGT

CCA-3' reverse) verwendet, das Amplifikationsprodukt ist ein 405 bp Fragment. Die PCR wurde auf einem DNA-Thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600) unter Verwendung folgender Zyklen durchgeführt:

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 65 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 63 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 61 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 59 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 57 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 55 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 32 Zyklen

Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 50 ng genomische DNA, 1,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 U Taq-Polymerase (AmpliAq Gold, Perkin Elmer / InViTAQ Polymerase, InViTek), 20 pmol eines jeden Primers, 5 % DMSO, 1 x NH₄ Reaction Buffer.

Der Zusatz von DMSO erfolgte, um eine verbesserte Auftrennung der DNA-Doppelstränge durch eine chemische Denaturierung zu gewährleisten, da die amplifizierte Sequenz ein gehäuftes Auftreten von C-G Basenpaaren zeigt.

Die Kontrolle des PCR-Velaufs erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel (SeaKem GTG agarose, bioproducts Rockland Maine, USA) in 1 x TBE (89 mM Tris pH 8,0, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA) unter Zusatz von 0,05 %igem Bromphenolblau-Puffer.

Zur Restriktion der Amplifizierungsprodukte wurde ein Reaktionsgemisch von 2 U HhaI (Erkennungssequenz: '5'-GCG↓C-3'; Amersham Life Science / Takara), 1 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,7 mM MgCl₂, 0,7 mM 2-mercaptoethanol, 0,001 % BSA sowie 8 µl des PCR-Produkts in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 37 °C für 150 min inkubiert.

Das gesamte Reaktionsvolumen wurde unter Zusatz von 0,05 %igem Bromphenolblau-Puffer in einem 8 %igen Polyacrylamidgel (30 % Acrylamide / Bis Solution, 37,5 : 1 (2,6 % C) Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid, Bio-Rad Laboratories) in 0,6 x TBE (53,4 mM Tris pH 8,0, 53,4 mM Borsäure, 0,6 mM EDTA) für 2 h einer vertikalen Elektrophorese (SE600, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) bei 270 V unterzogen. Die Restriktionsbanden wurden mittels Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Für das Allel e entstehen 2 Banden der Länge 107 bp und 298 bp, für alle anderen Allele 3 Banden der Basenpaarlängen 107, 115 und 183 (Abbildung 3.2).

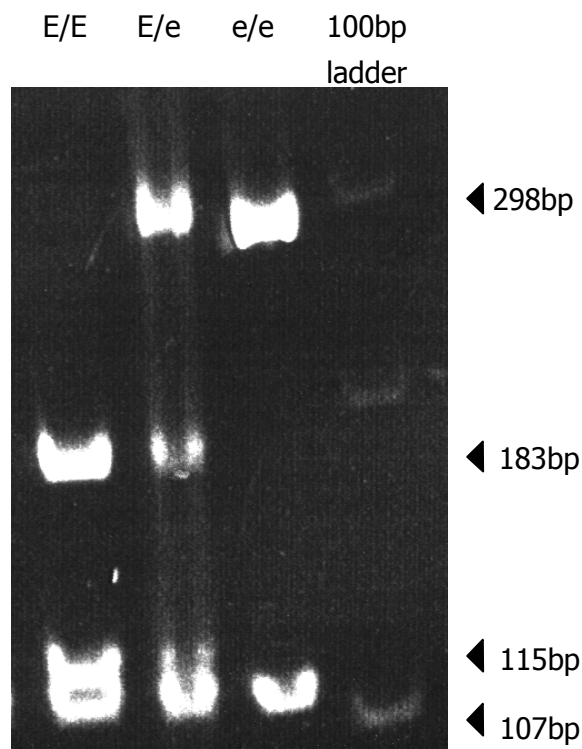


Abbildung 3.2: PCR-RFLP des MC1R zur Detektion des Allels e

3.2.5.2 PCR-RFLP zur Detektion des Allels E^{D2}

Die Entwicklung eines PCR-RFLP Tests für das Allel E^{D2} wurde durch eine G→A Substitution an Position 394 des MC1R Gens ermöglicht. Durch die Substitution entsteht ein Restriktionspunkt für das Enzym BspHI (5'-T↓CATGA-3') (KIJAS et al., 1998b). Da diese Substitution ebenfalls bei dem Allel E^P auftritt, kann dieser RFLP auch zur Detektion dieses Allels verwendet werden. Unter Verwendung des Primerpaares EPIG 16 (5'-GGG AAG CTT GAC CCC CGA GAG CGA CGC GCC-3' forward) und EPIG 2 (5'-CGC CCA GAT GGC CGC GAT GGA CCG-3' reverse) wurde das gewünschte Fragment mit einer Länge von 588 bp in der PCR amplifiziert (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600). Verwendete Zyklen:

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 68 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 66 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 64 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 62 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 60 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 58 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 32 Zyklen

Die Restriktion erfolgte unter den bei Punkt 3.2.5.1 beschriebenen Bedingungen unter Verwendung des Enzyms BspHI (Erkennungssequenz 5'-T↓CATGA-3', Amersham Life Science). Anschließend erfolgte eine Auftrennung der Restriktionsprodukte in einem 2 %igen Agarosegel (SeaKem GTG agarose, bioproducts Rockland Maine, USA) in 1 x TBE (89 mM Tris pH 8,0, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA) unter Zusatz von 0,05 %igem Bromphenolblau-Puffer (Abbildung 3.3).

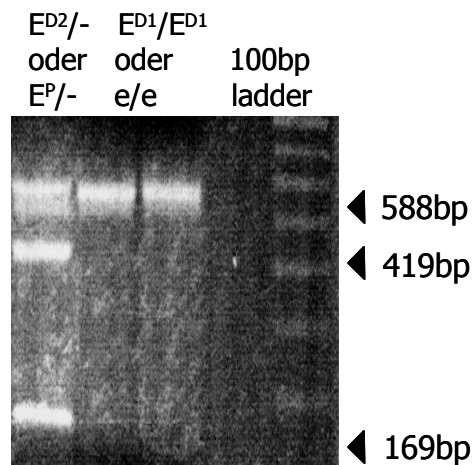


Abbildung 3.3: PCR-RFLP zur Detektion des Alleles E^{D2} oder E^P

3.2.5.3 PCR-RFLP zur Detektion des Allels E^{D1}

Durch eine Basensubstitution von T→C an der Position 329 des MC1R Gens für das Allel E^{D1} entsteht ein zusätzlicher Restriktionsort für das Enzym MspA1I (5'-C(A/C)G↓C(G/T)G-3', Promega Corporation) (KIJAS et al., 1999 unveröffentlicht). Die PCR- und Restriktionsbedingungen entsprechen denen unter Punkt 3.2.5.2 (Abbildung 3.4).

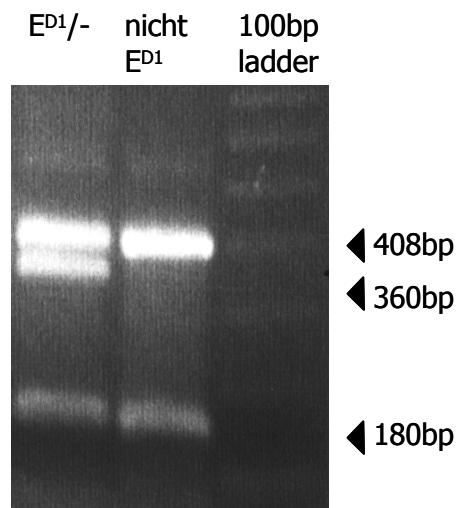


Abbildung 3.4: PCR-RFLP zur Detektion des Allels E^{D1}

3.2.6 Fragmentlängen-Polymorphismus des Allels E^P

Bei der Sequenzierung des MC1R-Locus des Allels E^P zeigte sich eine 2bp-Insertion an der Position 90 (KIJAS et al., 1999 unveröffentlicht). Zur Amplifizierung dieser Region wurden die Primer EPIG 16 (5´-GGG AAG CTT GAC CCC CGA GAG CGA CGC GCC-3´ forward) und EPIG 24 (5´-CAC GTT CTC CAC GAG GCT CAC CAG C-3´ reverse) genutzt, der Primer EPIG 24 ist fluoreszenzmarkiert. Die verwendeten PCR-Zyklen entsprechen denen von Punkt 3.2.5.1.

Die Fragmentlängen der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 8 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel (Accugel 19 : 1, 40 %, Kimberly Research, Atlanta Georgia; 6 M Harnstoff, 1 x TBE) auf dem DNA-Sequencer (ABI 377 Prism Sequencer, Version 3.2, Perkin Elmer; Software: ABI Prism gene scan analysis) ermittelt.

Für das Allel E^P entsteht ein Fragment der Länge 234 bp, alle anderen Allele zeigen ein Fragment der Länge 232 bp (Abbildung 3.5).

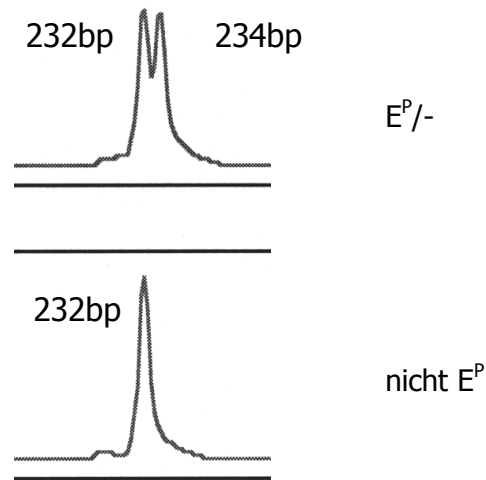


Abbildung 3.5: Fragmentlängen-Polymorphismus zur Detektion des Allels E^P

3.2.7 PCR-RFLP des I-Locus

Es wurde ein 175 bp Fragment amplifiziert, das die Grenze zwischen Exon 17 und Intron 17 des KIT-Gens beinhaltet. Für die PCR wurden die Primer KIT 21 (5'-GTA TTC ACA GAG ACT TGG CGG C-3') und KIT 35 (5'-AAA CCT GCA AGG AAA ATC CTT CAC GG-3') verwendet. Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 50 ng genomische DNA, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 U Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold, Perkin Elmer / InViTAQ Polymerase, InViTek), 20 pmol eines jeden Primers, 1 x NH₄ Reaction Buffer. Verwendete PCR-Zyklen:

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 65 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 63 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 61 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 59 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 57 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 55 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 32 Zyklen

Durch die Basensubstitution G→A (splice-mutation) entsteht im Intron 17 der Duplikation des KIT-Locus ein zusätzlicher Restriktionspunkt für das Enzym NlaIII (5'-CATG↓-3' Amersham Pharmacia Biotech) (MARKLUND et al., 1997a). Dadurch kann das Allel I von den Allelen I^P und i abgegrenzt werden. Zur Restriktion der Amplifizierungsprodukte wurde ein Reak-

tionsgemisch von 1 U NlaIII, 1 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20 mM KCl, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,01 mM EDTA, 50 µg/ml BSA, 5 % Glycerol sowie 8 µl des PCR-Produkts in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 37 °C für 150 min inkubiert.

Das gesamte Reaktionsvolumen wurde unter Zusatz von Bromphenolblau-Puffer (250 mM EDTA, 10 % Ficoll 400, 1 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, pH 8,0) in einem 8 %igen Polyacrylamidgel (30 % Acrylamide / Bis Solution, 37,5 : 1 (2,6 % C) Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid, Bio-Rad Laboratories) in 0,5 x TBE (44,5 mM Tris pH 8,0, 44,5 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) für 2 h einer vertikalen Elektrophorese (SE600, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) bei 270 V unterzogen. Die Restriktionsbanden wurden mittels Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Trägt das Tier das Allel I, so entstehen 4 Banden mit den Basenpaarlängen 41 bp, 54 bp, 80 bp und 134 bp. Alle anderen Allele zeigen zwei Banden einer Länge von 41 bp und 134 bp (Abbildung 3.6).

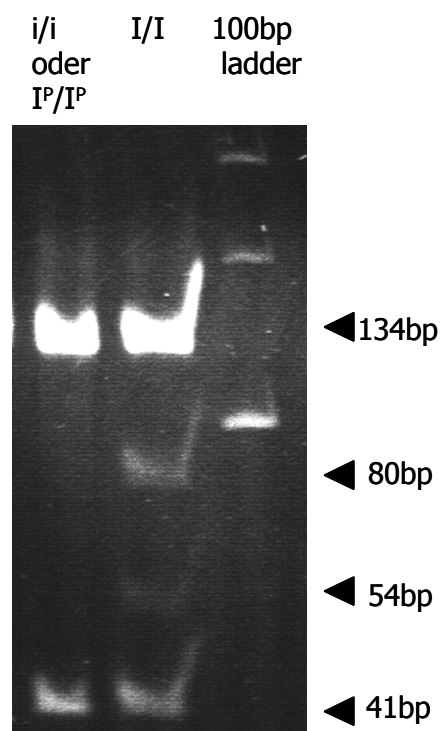


Abbildung 3.6: PCR-RFLP des I-Locus zur Detektion des Allels I

3.2.8 Mikrosatelliten-Analyse zur Genotypisierung des I-Locus

Zur Beschreibung der Genomregion des KIT-Locus wurde der Mikrosatellitenmarker S0086 (Primer 1: 5'-GCA CAG TCT ATT GAT ACT GGC GTC-3', fluoreszenzmarkiert/ Primer 2: 5'-CTG AGA ACT TCC ATA TGC TCC TGG-3') ausgewählt, der 2,7 cM vom KIT-Locus entfernt liegt (Nordic.2 sex averaged). Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl

enthielt 50 ng genomische DNA, 1,25 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,75 U Taq-Polymerase (InViTAQ Polymerase, InViTek), 15 pmol eines jeden Primers, 1 x NH₄ Reaction Buffer. Verwendete PCR-Zyklen:

Denaturierung 94 °C, 3 min 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 1 min/ Annealing 58 °C, 1 min / Synthese 72 °C, 1 min: 30 Zyklen

Denaturierung 94 °C, 1 min/ Annealing 58 °C, 2 min / Synthese 72 °C, 2 min: 1 Zyklus

Im Rahmen einer Kooperation mit der Schwedischen Universität für Landwirtschaft in Uppsala wurde ein weiterer Marker (131F2STS2), der dort aus einem BAC-Klon gewonnen wurde, genutzt. Er befindet sich ca. 200-300 kB von der codierenden Region des KIT-Locus entfernt (Primer 1: 5´-TGG GAG TGG CCC AAG AAA TGG C-3´ / Primer 2: 5´-TTC ACC TTT TAT TCA TGG GTC AGC-3´, fluoreszenzmarkiert). Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 50 ng genomische DNA, 1,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 U Taq-Polymerase (InViTAQ Polymerase, InViTek), 20 pmol eines jeden Primers, 1 x NH₄ Reaction Buffer. Verwendete PCR-Zyklen:

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 65 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 63 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 61 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 59 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 57 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 55 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 32 Zyklen

Die Ermittlung der Fragmentlängen beider Marker erfolgte auf dem DNA-Sequencer A.L.F. der Firma Pharmacia unter Verwendung eines 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgels (rotiphorese Gel 40, 38 %ige Acrylamidstammlösung mit 2 % Bisacrylamid (19 : 1), Roth / Harnstoff 7 M, Urea plus one, Pharmacia Biotech / 0,03 % APS plus one, Pharmacia Biotech / 0,06 % TEMED plus one, Pharmacia Biotech). Dazu werden 2 µl des PCR-Produktes mit 3 µl eines Formamid-Dextranblau-Puffers (Formamide 98+%, Heraeus / Dextran Blue pure, Serva, ca. 30 %), sowie 2 µl eines standardisierten Markers versetzt. Die Laserstrahl-Photozellen-Einheit des Sequencers erkennt die Fluoreszenzmarkierung des Primers und liest die Fragmentlänge. Die Analyse erfolgte unter Benutzung der Software OS/2 2.1, IBM und Fragment-Manager™ Version 1.1, Pharmacia Biotech.

3.2.9 Mikrosatelliten-Analyse zur Genotypisierung des Agouti-Locus

In der Schwedischen Universität für Landwirtschaft in Uppsala wurde aus einem BAC-Klon ein Mikrosatelliten-Marker (AgCA1 'F: 5'-CCC TTA GGT GGA AAT TAG CTA GAG-3' / AgCA1R: 5'-CTC ATA TCA CCC CTG AGA GGT AG-3') gewonnen, der ca. 100 kB vom Agouti-Locus entfernt liegt. Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 50 ng genomische DNA, 1,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 U Taq-Polymerase (InViTAQ Polymerase, InViTek), 20 pmol eines jeden Primers, 1 x NH₄ Reaction Buffer. Verwendete PCR-Zyklen:

Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 65 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus
Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 63 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus
Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 61 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus
Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 59 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus
Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 57 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 1 Zyklus
Denaturierung 94 °C, 45 s / Annealing 55 °C, 45 s / Synthese 72 °C, 45 s: 32 Zyklen

Die Analyse der Fragmentlängen erfolgte wie unter 3.2.8 beschrieben.

3.2.10 PCR-RFLP zur Genotypisierung des Tyrosinase-Locus

Unter Verwendung des Tyrosinase-Primers der Hausmaus (D00440) und des Menschen (M27160) konnte mittels heterologer PCR ein 820 bp langes Fragment des Exons 1 des Tyrosinase-Gens der Ressourcepopulation amplifiziert und sequenziert werden. In Anlehnung an die Sequenz wurden die Primer (PMC2 forward: 5'-AAT GCT CCT GGC TGT TTT GTA-3' / PMC1 reverse: 5'-CTG CCA GGA GGA GAA GAA GGA TGC T-3') synthetisiert. Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 50 ng genomische DNA, 1,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 U Taq-Polymerase (InViTAQ Polymerase, InViTek), 20 pmol eines jeden Primers, 1 x NH₄ Reaction Buffer. Verwendete PCR-Zyklen:

Denaturierung 92 °C, 2 min / Annealing 56 °C, 30 s / Synthese 72 °C, 3 min: 1 Zyklus
Denaturierung 92 °C, 30 s / Annealing 56 °C, 30 s / Synthese 72 °C, 3 min: 35 Zyklen
Denaturierung 92 °C, 30 s / Annealing 56 °C, 30 s / Synthese 72 °C, 10 min: 1 Zyklus

Durch eine Substitution der Base C durch T an Position 468 der Sequenz ergibt sich ein zusätzlicher Schnittpunkt für das Restriktionsenzym MluNI. Zur Restriktion der Amplifizierungsprodukte wurde ein Reaktionsgemisch von 2 U MluNI (Erkennungssequenz: '5'-

TGG↓CCAC-3'; Boehringer Mannheim Biochemica), 3,3 mM Tris-Acetat (ph 7,9), 1 mM Mg-Acetat, 6,6 mM K-Acetat, 0,05 mM Dithiothreitol, sowie 8 µl des PCR-Produkts in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 37 °C für 160 min inkubiert.

Für das Allel mit der Base C entstehen 2 Banden der Länge 683 bp und 137 bp, für das Allel mit der Base T 3 Banden der Längen 353 bp, 330 bp und 137 bp. Die Darstellung der Banden erfolgte wie unter 3.2.5.1 beschrieben (Abbildung 3.7).

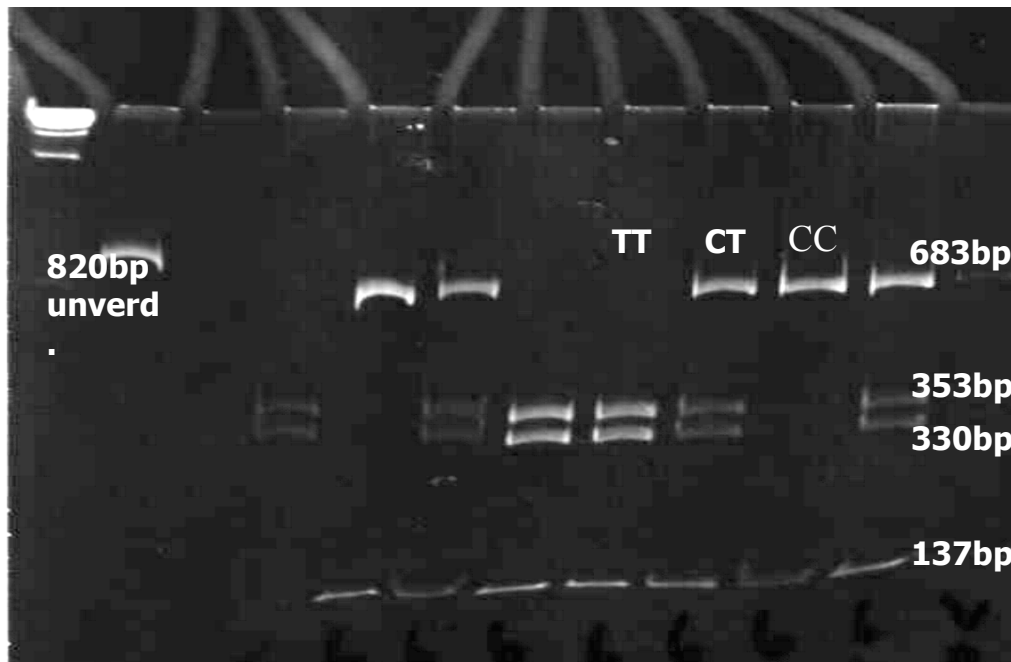


Abbildung 3.7: PCR-RFLP zur Detektion des Polymorphismus des Tyrosinase Locus

3.3 Statistische Methoden

Die erfaßten phänotypischen Daten wurden unter Beachtung der Plausibilitätsgrenzen auf Fehler untersucht. Die phänotypischen Daten erkrankter Tiere schieden aus dem gesamten Datenmaterial ab dem Zeitpunkt der Erkrankung aus.

Die Typisierung der Genotypen der Farbloci wurde unter Berücksichtigung der Mendelschen Regeln für die Vererbung in Familien überprüft. Basierend auf den Genotypen der Elterntiere wurden Abweichungen von der erwarteten Verteilung der Genotypen in den Familien durch den Chi-Quadrat-Test ermittelt.

Zur Untersuchung der Effekte von Polymorphismen der Farbloci auf die Merkmale der Mastleistung, des Schlachtkörperwerts und der Fleischqualität erfolgte eine Varianzanalyse unter Verwendung des General-Linear-Models (Procedure GLM) des SAS Programms, Version 6.11 für Windows.

Den Berechnungen liegt folgendes allgemeines Modell zugrunde:

$$Y_{ijklm} = \mu + FAM_i + SAI_j + SEX_k + GEN_l + X_{ijklm} + e_{ijklm}$$

Y_{ijklm} : Merkmalswert des Tieres

μ : Gesamtmittel

FAM_i : fixer Effekt der Familie i I = 1...53

SAI_j : fixer Effekt der Saison j j = 1...6

SEX_k : fixer Effekt des Geschlechts k k = 1...2

GEN_l : fixer Effekt des Genotyps des Farblocus l l = 1...5 für den Locus MC1R
1...3 für die Marker 131F2STS2

S0086

AgCA1

für den Locus Tyrosinase

X_{ijklm} : Kovariable

e_{ijklm} : Restfehler

In das GLM-Modell wurden neben dem Effekt des Genotypen des Farblocus die fixen Effekte der Familie, der Saison und des Geschlechts mit einbezogen. Als Familie wurden alle Vollgeschwister aus der wiederholten Verpaarung derselben Elterntiere definiert. Ihr Effekt beruht auf dem gemeinsamen genetischen Hintergrund aller Tiere einer Familie. Die Saison beschreibt sechs Zeitintervalle von einem Vierteljahr. Die Kovariablen umschreiben den fixen Effekt korrelierter Merkmale. Es bestand ein signifikanter Effekt der Wurfgröße auf die Körpermasse und Körpermassenzunahme bis zum 50. Lebenstag. Für die Merkmale der Futterverwertung und des Schlachtkörperwerts mit Ausnahme der Schlachtmasse warm wurde das Mastendgewicht als signifikante Einflußgröße in die Analyse einbezogen.