

Aus dem Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Institut für Tierwissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**Phänotypisierung von Schweinen einer F2-Ressourcenpopulation für
molekulargenetische Untersuchungen zum Beinschwächesyndrom:
histologische Klassifizierung von Knorpelstrukturen,
Vergleich mit Exterieur- und Leistungsmerkmalen sowie
mRNA-Expressionsanalysen einzelner funktionaler Kandidatengene**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin

(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von

Christiane Theune (geb. Rudolph)

aus Bergisch-Gladbach

Hannover 2008

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Gerhard Breves

Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Breves

2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Waldmann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2008

Carsten

und

meinen Eltern

Tu erst das Notwendige, dann das Mögliche,
und plötzlich schaffst du das Unmögliche.

(Franz von Assisi)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung und Literaturübersicht	11
1.1 Bedeutung der Gliedmaßenerkrankungen in der Schweinehaltung	11
1.1.1 Diagnose und Krankheitsverlauf der degenerativen Gelenkerkrankungen OC und OA.....	14
1.2 Einflussfaktoren auf die Entstehung von degenerativen Gelenkerkrankungen beim Hausschwein.....	18
1.3 Exterieurbeurteilung und Auswirkungen der OC.....	22
1.4 Phänotypische und genetische Korrelationen bezogen auf Fundament- und Fleischleistungsmerkmale beim Hausschwein.....	23
1.5 Prävalenz der Gelenkveränderungen ausgewählter Spezies und Heritabilität von BS und OC beim Hausschwein	24
1.6 Zielgene und Bedeutung des <i>Transforming Growth Factor</i> (TGF) für den Knorpelstoffwechsel.....	26
1.7 Ziele der Studie	32
2 Tiere, Material und Methoden.....	34
2.1 Ablauf der Untersuchungen	34
2.2 Tiere.....	35
2.2.1 Datenerhebung zur Mast- und Schlachtleistung.....	37
2.2.2 Exterieurbeurteilung	37
2.2.3 Entnahme von Knorpel- und Gelenkknochenproben	39
2.3 Histologie.....	39
2.3.1 Herstellung und Färbung von histologischen Schnitten	39
2.3.2 Pathohistologische Beurteilung der Schnitte.....	40
2.4 Expressionsanalysen und Probenauswahl.....	43
2.4.1 Allgemeines.....	43

Inhaltsverzeichnis

2.4.2	Homogenisierung und Isolierung der Gesamt-RNA	44
2.4.3	Konventionelle PCR zur Herstellung einer PCR-Produkt-Standardreihe	47
2.4.3.1	cDNA-Synthese	47
2.4.3.2	Herstellung einer PCR-Produkt-Standardreihe für die Echtzeit-RT-PCR.....	48
2.4.4	Echtzeit-RT-PCR.....	51
2.5	Statistik	53
2.5.1	Statistische Analyse der Tierdaten.....	53
2.5.2	Statistische Analyse der mRNA-Expressionsanalysen.....	54
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Ergebnisse der Exterieurbeurteilung und der Histologiebefunde	56
3.1.1	Exterieurbeurteilung der Versuchstiere	56
3.1.2	Histologische Beurteilung der Gelenkknorpelschnitte	58
3.1.2.1	Mikroskopische Untersuchung der histologischen Gelenkknorpelschnitte.....	58
3.1.2.2	Histologische Beurteilung der Gelenkoberflächen.....	65
3.1.2.3	Histologische Beurteilung der Gelenkoberflächen pro Tier	66
3.1.3	Zusammenhang zwischen Exterieurbeurteilungen und histologischen Befunden.....	67
3.1.4	Zusammenhang zwischen Fundament-, Mast- und Fleischleistungsmerkmalen	69
3.2	Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen.....	72
3.2.1	Qualität der isolierten Gesamt-RNA.....	72
3.2.2	PCR-Produkt-Standardreihe.....	73
3.2.3	mRNA-Quantifizierung	73
3.2.4	Vergleich der Expressionsniveaus.....	77
4	Diskussion.....	80
5	Zusammenfassung.....	104
6	Summary	106
7	Literaturverzeichnis.....	108

Inhaltsverzeichnis

8	Anhang	122
8.1	SYBRGreen II [®] -Versuchsprotokolle nach Sigma & Aldrich.....	122
8.2	Material.....	124
8.2.1	Puffer.....	124
8.2.2	Materialliste.....	126
8.2.3	Software	128
8.2.4	Geräteliste	128

Abkürzungsverzeichnis

A.U.	<i>arbitrary units</i>
ALTABS	Alter beim Absetzen
BAUCH	Bauchspeckdichte
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BS	Beinschwäche
C	Kontingenzkoeffizient
CDMP	<i>Cartilage-Derived Morphogenetic Protein</i>
cDNA	komplementäre DNA
Ct	<i>cycle threshold</i>
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosidintriphosphat
dist.	distal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dR	Ct-Wert
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Tymidintriphosphat
Du	Duroc
EU	Europäische Union
ENDKG	Gewicht bei Mastende
EZM	extrazelluläre Matrix
FAKTOR	Faktoranalyse
FEFL	Fettfläche
FLFL	Fleischfläche
GAG	Glycosaminoglycane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

GH	Wachstumshormon
λ	Wellenlänge
HE	Hämotoxylin/Eosin
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
LEBTGZ	Tageszunahme
LFKO1	Leitfähigkeit im Kotelett eine Stunde p. m.
LFKO24	Leitfähigkeit im Kotelett 24 Stunden p. m.
LFSI1	Leitfähigkeit im Schinken eine Stunde p. m.
LPA	Leistungs-Prüfanstalt
M.	<i>Musculus</i>
Mad	<i>Mother against decapentaplegic</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger-Riboxynucleinsäure
MSA	<i>Multiplication Stimulating Activity</i>
NNR	Nebennierenrinde
NTC	Negativkontrolle
OA	Osteoarthrose
OC	Osteochondrose
OCD	OC dissecans
OPTO	optisch gemessener Emissionswert zur Bestimmung der Fleischfarbe
p. m.	<i>post mortem</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Protoglycane
PHKO1	pH-Wert im Kotelett eine Stunde p. m.
PHKO24	pH-Wert im Kotelett 24 Stunden p. m.
PHSI1	pH-Wert im Schinken eine Stunde p. m.
Pi	Pietrain
prox.	proximal
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
rel.	relativ

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Riboxynucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Riboxynuclease
RT	reverse Transkription
S	Svedberg
SD	Standardabweichung
SEITSPE	Seitenspeckdichte
SLAKG	Gewicht des Schlachtkörpers in kg
Sma	<i>small body size</i>
SPECKMI	Dicke des Specks über dem <i>M. longissimus dorsi</i> mittig
SPECKWR	Dicke des Specks über dem <i>M. longissimus dorsi</i> auf dem Widerrist
ssp.	Subspezies
SUER	Dicke des Specks über dem <i>M. longissimus dorsi</i> an neun Punkten gemessen
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGZ	Tageszunahmen
TIMP	<i>Tissue-Inhibitor-Metalloproteinase</i>
Tm	Schmelzpunkt
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TROPFSAF	Tropfsaftverlust
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung und Literaturübersicht

In der heutigen Schweinehaltung entstehen die größten wirtschaftlichen Einbußen durch Tierverluste. Dabei machen Gliedmaßenerkrankungen, darunter auch das Beinschwäche-Syndrom (BS-Syndrom), einen großen Teil der Abgangsursachen aus.

Das Ziel dieser Studie bestand darin, einen definierten Phänotyp zu erstellen und Basisdaten der Gliedmaßenerkrankung BS zu analysieren. Um einen möglichst großen, vielfältigen Genpool mit verschiedenen Phänotypen zu erhalten, wurde eine Experimentalpopulation aus einer Duroc x Pietrain-Kreuzung verwendet. Des Weiteren wurde der Einfluss von Mast-, Schlacht- und Fleischleistungsmerkmalen auf Fundamentbefunde untersucht. Diese Erkenntnisse sollten als Grundlage für weitere molekularbiologische Untersuchungen dienen und könnten letztlich dazu beitragen, Kandidatengene zu identifizieren und über markergestützte Selektion genetisch disponierte Gliedmaßenerkrankungen zurückzudrängen.

1.1 Bedeutung der Gliedmaßenerkrankungen in der Schweinehaltung

Gesunde Gliedmaßen sind die Voraussetzung für eine wirtschaftliche Schweinemast und das Wohlbefinden der Tiere. BS und Gelenkveränderungen können zu beträchtlichen wirtschaftlichen Verlusten führen und gehören neben den infektiös bedingten Arthritiden zu den häufigsten Gelenkerkrankungen (JORGENSEN 2000a). Bei Untersuchungen in verschiedenen Ländern sind Verluste von Zuchttieren, verursacht durch BS, zwischen 10 % und 40 % beschrieben (REILAND 1978b, NAKANO 1987, JORGENSEN 2000a). Damit stellt BS nach den Reproduktionsproblemen die zweithäufigste Abgangsursache dar (JORGENSEN 2000a). Gerade Schlachtungen von Ebern aufgrund von *Impotenia coeundi* fallen dabei ins Gewicht (REILAND 1978b). In der Mast macht das BS-Syndrom 23 % bis 28 % der Abgangsursachen aus (SCHULZE et al. 1998).

REILAND (1978b) sowie WARDALE und DUANCE (1994) beschreiben, dass BS bei allen Spezies der *Mammalia* vorkommt. Die höchste Prävalenz zeigt sich aber bei kommerziell gehaltenen Schweinen. Vor allem weitere schnellwüchsige Spezies, wie z. B. Pferde oder Hunde, aber auch der Mensch, haben Probleme in diesem Bereich (REILAND 1978b). BS ist ein allgemeiner Begriff, unter dem verschiedene klinische Erscheinungen zusammengefasst

werden. Dazu gehören Gliedmaßenstellungsanomalien, Bewegungsprobleme, Lahmheiten in verschiedenen Ausmaßen und Strukturveränderungen des Knorpels (GRONDALEN 1974c, REILAND et al. 1978, NAKANO 1987, DRAPPER 1992, JORGENSEN et al. 1995).

Einige nicht infektiöse Erkrankungen, die in Gelenken und verschiedenen Teilen des Skeletts vorkommen können, werden als Ursache für die klinischen Zeichen der BS betrachtet (REILAND 1978b). Zu diesen nicht entzündlichen Erkrankungen gehören u. a. Osteoarthrose (OA) und Osteochondrose (OC).

Bei OA handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung, welche von GARDNER et al. (1997) als Syndrom beschrieben wird. Dieses Syndrom beinhaltet verschiedene Veränderungen, wie Osteosklerose, Gelenkknorpeldegeneration und entzündliche Veränderungen der *Membrana synovialis*. Des Weiteren handelt es sich bei der primären oder sekundären OA um eine degenerative Gelenkerkrankung, die vor allem beim Menschen mit dem Alter stark an Frequenz zunimmt (BUCKWALTER und MARTIN 2006). Als Ursache einer sekundären OA beim Schwein kommen vor allem Arthritiden in Form von Infektionen, z. B. mit *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococce n ssp.* oder am häufigsten mit *Arcanobacterium pyogenes*, in Betracht (REILAND 1978b, JORGENSEN 2000b). Bei der OA handelt es sich um eine weltweit verbreitete Erkrankung, die beim Menschen nach Schätzung durch die WHO eine Prävalenz von 10 % in der Weltbevölkerung zeigt (BUCKWALTER und MARTIN 2006).

Die OC ist eine enchondrale Ossifikationsstörung im Knochenwachstum, die bei allen *Mammalia* vorkommen kann und in deren Folge schwerwiegende Lahmheiten auftreten können. Der Begriff OC wird von LJUNGGREN und REILAND (1970) für Veränderungen des Gelenkknorpels sowie der Epiphysenplatten beim Schwein eingeführt. 1978 definiert REILAND (1978b) OC als eine Störung der enchondralen Ossifikation und Osteogenese, die häufig zur OC dissecans (OCD) oder, weniger häufig, zur Epi- bzw. Apophyseolyse führen kann. Er schlussfolgert, dass OC die häufigste Ursache für BS bei allen Individuen sein muss. Diese Theorie hat bis heute Bestand. Synonyme sind Osteochondritis, Osteochondrosis und Dyschondroplasie.

GRONDALEN (1974c) sowie REILAND (1978b) beweisen, dass OC eine primäre Erkrankung des jungen, wachsenden Knorpels ist, die mit Störungen in der

Zelldifferenzierung einhergeht. OA ist eine gewöhnliche Folge der OC. Die Inzidenz der OC ist bei Schweinen extrem hoch und liegt bei mehr als 90 % (REILAND et al. 1978; NAKANO 1987), in einigen Studien sogar bei nahezu 100 % (GRONDALEN 1974b, REILAND 1978b, LUNDEHEIM 1987).

Obwohl mehrere Untersuchungen einen engen Zusammenhang zwischen BS und OC bestätigen (GRONDALEN 1974b, REILAND et al. 1978, NAKANO 1987, HILL 1990a), werden die Zusammenhänge dennoch kontrovers diskutiert. LUNDEHEIM (1987) belegt bei mehreren starken OC-Läsionen einen signifikanten Zusammenhang zwischen BS und OC. Andere Studien ergeben hingegen, dass kein Zusammenhang zwischen BS und OC existiert (GOEDEGEBUURE et al. 1988, JORGENSEN et al. 1995; JORGENSEN und ANDERSON 2000).

GRONDALEN (1974a) zeigt, dass OC eine degenerative Gelenkerkrankung ist, die symmetrisch auftritt. Daher wurden in der vorliegenden Dissertationsstudie Gelenkproben von nur einer Schlachtkörperhälfte entnommen. Die Erkrankung verläuft meistens ohne klinische Anzeichen, es sei denn, es kommt zu OCD, Knochenformationsveränderungen oder Epiphyseolyse (REILAND et al. 1978). Die OC wird heute zum Komplex der entwicklungsbedingten Skeletterkrankungen gezählt, wobei beim Pferd die Erscheinungsformen der OCD und subchondrale Knochenzysten (Geröllzysten) zu den Hauptformen der OC zählen (GLADE et al. 1986).

Histologische und histochemische Untersuchungen zum BS bzw. zur OC wurden an verschiedenen *Mammalia*-Spezies durchgeführt. Dabei wird die Ätiologie der OC auf viele Faktoren, z. B. Heritabilität, Wachstum und Ernährung, zurückgeführt. Gerade im Bereich der Humanmedizin, in Bezug auf Osteoarthritis, sowie in der Pferde- und Hundezucht gibt es große Bestrebungen, die Ätiologie aufzuklären. Dennoch bleibt die Ursache der OC bisher unklar (FUKAWA und KUSUHARA 2001, AURICH et al. 2006).

1.1.1 Diagnose und Krankheitsverlauf der degenerativen Gelenkerkrankungen OC und OA

OC und OA sind das Resultat einer Dysbalance der physiochemischen Verhältnisse im Gelenkknorpel und verursachen mechanischen Stress. Gelenkknorpel ist hoch spezialisiert und ein einzigartig strukturiertes Biomaterial, welches die weiche, glatte Oberfläche der diarthrodialen Gelenke bildet (AIGNER und MCKENNA 2002, BUCKWALTER et al. 2005). Die Versorgung mit Nährstoffen und der Abtransport von Stoffwechselprodukten erfolgt nur über Diffusion aus der in der Gelenkkapsel befindlichen Synovialflüssigkeit. Das Be- und Entlasten des Knorpels, ähnlich dem Ausdrücken und Wässern eines Schwamms, unterstützt die Versorgung des Knorpels durch Flüssigkeitsaustausch mit der Synovialflüssigkeit (MCGAVIN et al. 2000). Der Hauptbestandteil im Knorpel ist Wasser, welches etwa drei Viertel des Feuchtgewichts ausmacht. Beim Trockengewicht hat Kollagen, vor allem vom Typ II, den größten Anteil, gefolgt von Proteoglycanen (PG), bei denen das aggregierte Aggrecan am häufigsten vorkommt (MCGAVIN et al. 2000, AIGNER und MCKENNA 2002).

Aufgrund seiner biomechanischen Eigenschaften ist artikulärer Knorpel in der Lage, die normalen Belastungen in den Gelenken durch Bewegung, Druck, Stoß und die damit verbundene Kraftübertragung ohne Schädigung zu überstehen (AIGNER und MCKENNA 2002). Diese Eigenschaften werden durch eine komplexe Architektur der Knorpelmatrix ermöglicht, bestehend aus kollagenen Fasern und einer gelartigen, hoch molekularen Grundsubstanz aus aggregierten PG mit starkem Hydrationsvermögen. Die Fasern bilden ein kompliziertes Netzwerk, in das die PG eingebettet sind. Durch die starke Wasseraufnahme der PG wird ein hoher Quelldruck (Turgor) ermöglicht, der dem Knorpel in Verbindung mit den zug- und reißfesten Kollagenfasern seine bemerkenswerte Elastizität, Härte und mechanische Stabilität verleiht (MCGAVIN et al. 2000). Knorpel besitzt aufgrund seiner einzigartigen Struktur nur eine geringe regenerative Kapazität und füllt Defekte mit Narbengewebe oder fibrösem Knorpel wieder auf (YATES et al. 2004).

Die Knorpelmatrix wird durch Chondroblasten (Knorpelzellen) synthetisiert. Chondroblasten synthetisieren eine avaskuläre, aneurale und alymphatische Matrix, die sich aus zwei grundlegenden Bestandteilen zusammensetzt: der fibrillären und der extrafibrillären Matrix.

Chondrozyten sind die ausdifferenzierten, inaktiven Formen der Chondroblasten. Im weiteren Verlauf wird in der vorliegenden Studie nur von Chondrozyten gesprochen.

Die fibrilläre Komponente formt ein extrem stabiles Netzwerk, welches aus verschiedenen Kollagentypen besteht: hauptsächlich Kollagene vom Typ II sowie vom Typ IX, XI und VI. Die nicht fibrilläre Komponente besteht hauptsächlich aus PG (AIGNER und MCKENNA 2002). PG bestehen aus Glycosaminoglycan-Ketten, die kovalent an einen Proteinkern gekoppelt sind. Glycosaminoglycane (GAG) sind unverzweigte Polysaccharid-Ketten, die aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten aufgebaut sind. An den Saccharid-Einheiten befinden sich Sulfat- und Carboxyl-Gruppen. Dadurch herrscht dort eine stark negative Ladungsdichte, die für das hohe Wasserbindungsvermögen verantwortlich ist (HUNZIKER und SCHENK 1984).

Die Knorpelzellen befinden sich in einer Knorpelhöhle (Lakune oder Zellhof). Je nach Entwicklungsstand der Zellen können sie in einem Zellhof paarweise auftreten (z. B. in der Proliferationszone) oder zu mehreren vorkommen (z. B. in der hypertrophen Zone). Lakune und Zellen bilden eine funktionelle Einheit, die als Chondron bezeichnet wird. Form und Größe der Chondrone variieren innerhalb der Knorpelschichten (LIEBICH 1993). Chondrozyten sind Zellen mit labiler Differenzierung. Sie können leicht durch äußere Einflüsse wie entzündliche Reize oder degenerative Prozesse ein anderes Syntheseprofil entwickeln, d. h. andere Matrixproteine synthetisieren und die Fähigkeit verlieren, knorpel-spezifische Kollagene (Typ II, IX) zu produzieren (BRAY 1995).

Kollagene sind eine Familie sehr charakteristischer Faserproteine. Sie bilden die Hauptproteine der extrazellulären Matrix. Im Knorpel kommt der Kollagentyp II mit einem Anteil von etwa 90 % am Gesamtkollagen am häufigsten vor (BUCKWALTER et al. 2005). Die Kollagentypen IX und XI sind ebenfalls knorpelspezifisch. Das Kollagen II bildet das Fasernetzwerk des Knorpels. Das Kollagen IX, ein fibrillenassoziiertes Kollagen, bindet kovalent an Kollagenfasern vom Typ II und bildet die Verbindung der Kollagen II-Fibrillen untereinander sowie mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Das Kollagen Typ XI bindet kovalent an andere Typ IX-Kollagenfasern und steuert so zur Stabilisierung des Kollagen Typ II-Netzwerkes bei (HESSE et al. 1990, AIGNER und MCKENNA 2002, BUCKWALTER et al. 2005). Dabei ergibt sich durch den engen Kontakt der

Plasmamembranen der Zellen über den Kollagenfaser Typ VI ein gegenseitiger Einfluss auf die Anordnung und Ausrichtung der Kollagenfasern sowie der Zellen (LIEBICH 1993, BUCKWALTER et al. 2005).

BUCKWALTER und MARTIN (2006) teilen die Entstehung der OA beim Menschen in drei Phasen ein, die auch den OC-Veränderungen entsprechen. Die frühe Phase beginnt mit dem Verlust von PG und somit einer adäquaten Lubrication der Knorpeloberfläche. Je mehr PG verloren gehen, um so mehr Kollagenfasern kondensieren (Fibrillation, Asbestfaserung), und eine Ausfransung der Oberfläche durch Kollagenfasern ermöglicht in diesen Regionen vertikale Spalten (MCGAVIN et al. 2000). Die zweite Phase ist gekennzeichnet von der extensiven Neubildung der Knorpelmatrix. Es findet eine Penetration von Fibrozyten und Kapillaren in die degenerative Knorpelmatrix statt, während Chondrozyten bis zur Hyperplasie proliferieren. Typische histologische Veränderungen der osteochondrotischen Knorpelmatrix sind leere Lacunen und Zellcluster (HILL et al. 1984, VON DER MARK et al. 1995).

Auf der einen Seite resultiert der Verlust der Knorpeloberfläche in bestimmten Regionen in einer ansteigenden Knorpeldicke durch Chondrozytenhypertrophie (KLOPP et al. 2002). Der degenerative Prozess des Knorpels ist vor allem an der Oberfläche und um die Chondrozyten des osteochondrotischen Knorpels erkennbar (HILL et al. 1984).

Auf der anderen Seite ist Asbestfaserung mit dem Verlust der Knorpeloberfläche (Erosion) und Ausdünnen der Gelenkknorpeloberfläche verbunden. Dies kann bis auf den subchondralen Knochen (Ulceration) erfolgen. Bei weiterer Reibung auf dem subchondralen Knochen kommt es zur dichten, glatten, wie gebügelten Oberfläche (Eburnation) (MCGAVIN et al. 2000). Die Eburnation beschreibt eine elfenbeinartige Umwandlung des Knochens mit Zunahme der Kompakta auf Kosten der Spongiosa (ZETKIN und SCHALDACH 1999).

In dieser dritten Phase der degenerativen Knorpelveränderung sind die Chondrozyten nicht mehr von einer kompakten, stabilen Matrix geschützt und erleiden irreparable Schäden. Katabole Cytokine, wie z. B. IL-1, gewinnen die Oberhand, da anabole Cytokine (z. B. IGF-1) durch eine Anzahl von weiteren Molekülen gebunden werden, und fördern den weiteren Abbau der Knorpelmatrix (BUCKWALTER et al. 2005).

Um die Gelenkveränderungen der OC bzw. OA evaluieren zu können, werden verschiedene Untersuchungen der einzelnen Gelenke und deren Oberfläche durchgeführt. Einige Studien beschäftigen sich mit der Erfassung von Gelenkknorpelveränderungen *post mortem* (p. m.) durch makroskopische Pathologie und/oder histologische Untersuchungen. Die Kriterien dieser Untersuchungen sind objektiver als die Kriterien der BS- bzw. Exterieur-Klassifizierung und deutlich präziser (FUKAWA und KUSUHARA 2001). Dabei ist die Tötung der Tiere nötig, um die Knochen zu entbeinen und die Gelenke öffnen und beurteilen zu können. HILL et al. (1984) halten die histologische und histochemische Untersuchung für die beste Evaluierung der OC, mit der schon kleinste Läsionen darstellbar sind (HILL 1990a). Doch auch andere Evaluierungsmethoden kommen zur Darstellung von OC-Läsionen zum Einsatz: Um kleine Läsionen des Knorpels zu beurteilen, werden auch radiologische Untersuchungen an Gelenken vorgenommen (HILL et al. 1984). Im Falle von größeren Läsionen des Knorpels kann die Diagnose OC durch röntgenologische Untersuchungen bei Tieren mit einem Alter von über 40 Tagen getroffen werden (BITTEGEKO und ARNBJERG 1994). Weitere Untersuchungen von Gelenkveränderungen an lebenden Tieren führt HILL (1990b) durch.

Einige weitere Methoden (z. B. Computertomografie oder Arthrozentese) werden zur Evaluierung der BS und OC genutzt. Die erfolgreichsten und am häufigsten durchgeführten Methoden am Schwein sind allerdings die subjektive Exterieurbeurteilung für BS und die p. m. Evaluierung der OC (FUKAWA und KUSUHARA 2001). Auf die Exterieurbeurteilung wird in der Einleitung (Kapitel 1.3) noch ausführlich eingegangen.

1.2 Einflussfaktoren auf die Entstehung von degenerativen Gelenkerkrankungen beim Hausschwein

Die OC wird als Erkrankung des jungen, wachsenden Individuums angesehen. Der Knorpel ist zu diesem Zeitpunkt in einer sehr wachstums- und stoffwechselintensiven Phase und somit empfindlich gegenüber endogenen Einflüssen. Die folgende Abbildung 1 soll einige der möglichen Einflüsse dieser Faktoren auf den wachsenden Knorpel verdeutlichen.

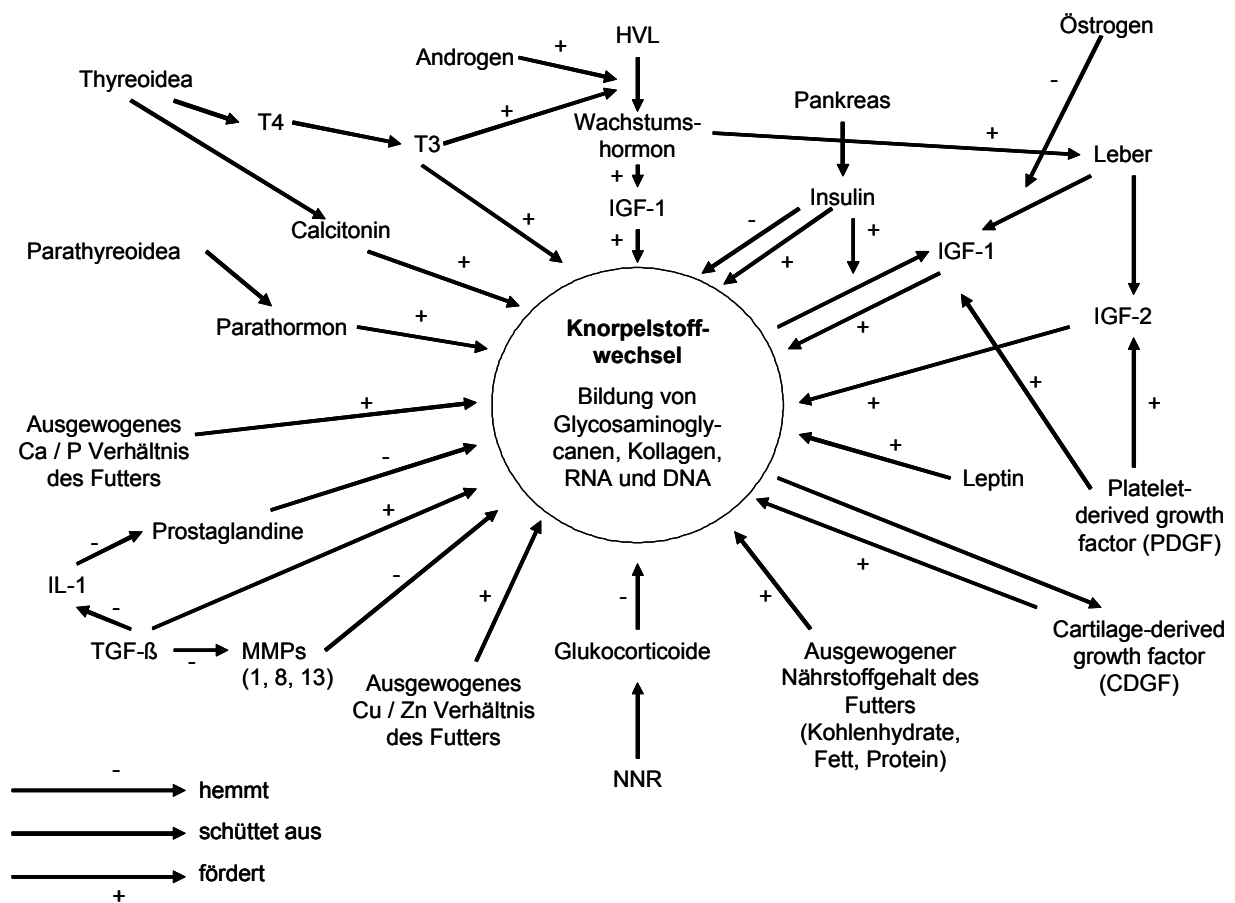


Abbildung 1: Wechselwirkungen der Einflussfaktoren auf den Knorpelstoffwechsel (modifiziert nach GLADE et al. (1986), POOLE et al. (2002))

IGF-1 = *Insulin-like Growth Factor-1*;

IL-1 = Interleukin 1;

TGF-β = *Transforming Growth Factor-β*;

MMP = Matrix-Metalloproteinase;

HVL = Hypophysenvorderlappen;

NNR = Nebennierenrinde

Rasse, Geschlecht und Alter

Die Ausprägung und Inzidenz der OC ist bei verschiedenen Rassen und Linien unterschiedlich (GRONDALEN 1974a, REILAND et al. 1978, ROTHSCHILD et al. 1988), und der Vergleich zwischen Ebern, Börgen und Sauen wird kontrovers diskutiert (REILAND et al. 1978, ROTHSCHILD et al. 1988, STERN et al. 1995, YTREHUS et al. 2004c). Von mikroskopischen Läsionen im Knorpel von Schweinen mit einem Alter von einem Tag berichten HILL et al. (1985b). Dies lässt eine mit dem Alter steigende Inzidenz vermuten.

Fütterung

Das hohe Wachstumspotenzial bei entsprechender Energie- und Eiweißversorgung soll zu steigenden Tageszunahmen (TGZ), besserer Futtermittelverwertung und höherem Fleischanteil führen.

Verschiedene Studien belegen, dass die Höhe der Energieversorgung keinen Einfluss auf BS hat (CALABOTTA et al. 1982, NAKANO 1987). GRONDALEN (1974d) zeigt, dass die Fütterungsart (*ad libitum* oder restriktiv) die Ausprägung von OC nicht beeinflusst, ebenso wenig wie der Energiegehalt des Futters (JORGENSEN et al. 1995). Im Gegensatz dazu findet GRONDALEN (1974b) weniger Fundamentveränderungen bei Tieren mit *ad libitum* Fütterung als bei Tieren, die nur begrenzt Zugang zu Futter erhalten. Genau das Gegenteil ergibt eine Studie von GOEDEGEBUURE et al. (1980), in der Tiere mit restriktiver Fütterung weniger Veränderungen des Fundaments aufweisen.

Mineralien

Die Mischung aus organischer Grundsubstanz und Mineral bestimmt die Eigenschaften von Knochen und Knorpel. Knochen setzt sich zu einem Drittel aus organischem Gewebe, bestehend aus Knorpelmatrix und Ossein, sowie zu zwei Dritteln aus anorganischem Material zusammen. Der anorganische Teil besteht zu 85 % aus Calcium-Phosphat, zu 10 % aus Calcium-Carbonat und zu einem Rest aus Magnesium-Phosphat und Calcium-Fluorid (NICKEL et al. 1992). Diverse Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss der Calcium- und Phosphorversorgung auf BS bzw. OC. Dabei wird gezeigt, dass die Supplementierung von Calcium und Phosphor keinen Einfluss auf BS oder OC besitzt (CALABOTTA et al. 1982,

KORNEGAY et al. 1990). REILAND et al. (1991) suchen einen Zusammenhang zwischen Hypophosphatämie und OC und stellen fest, dass Hypophosphatämie kein ätiologischer Faktor für OC sein kann.

Bicarbonat in Verbindung mit Kohlendioxid und Wasser dient dem Organismus als Puffersystem, um den pH-Wert des Blutes konstant zu halten (VON ENGELHARDT und BREVES 2000). ERNST et al. (1990) können keinen Einfluss der Versorgung mit Natriumcarbonat auf BS bei Schweinen nachweisen.

Vitamine

Vitamine sind niedermolekulare, organische Verbindungen, die von Mensch und Tier nicht oder nur unzureichend synthetisiert werden. Sie sind für physiologische Abläufe essenziell. Fehlen Vitamine in der Nahrung oder werden sie nur unzureichend im Magen-Darm-Trakt resorbiert, können charakteristische Mangelercheinungen auftreten. Da der menschliche Organismus bei ausreichender UV-Strahlung alle Reaktionen der Vitamin D-Synthese selbst durchführen kann, ist das Vitamin D dort eher ein Hormon als ein Vitamin (ZETKIN und SCHALDACH 1999). REILAND (1978a) berichtet, dass die Vitamine A und D keine Effekte auf die OC-Ausprägung haben. Auch JEFFERIES et al. (2002) können keinen Einfluss von Vitamin D auf die Inzidenz von OC feststellen. Einflüsse der Vitamine A und C auf OC werden in mehreren Studien untersucht, können aber nicht detektiert werden (GRONDALEN 1974b, NAKANO 1987). Durch Biotin-Supplementierung kann die Klauenhärte von Schweinen positiv beeinflusst werden, aber nicht die OC (WEBB et al. 1983).

Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren und -hormon spielen eine weitere Rolle im Knorpel- und Knochenstoffwechsel, wozu neben dem Wachstumshormon (*Growth Hormon* = GH) auch die *Insulin-like Growth Factors* (IGF-1 und -2) sowie der *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) zählen. Das GH ist vor allem für das Längenwachstum durch Stimulierung zur Proliferation und Maturation zuständig. Dabei wird der GH-Effekt vor allem durch IGF-1 vermittelt (CRUICKSHANK et al. 2005). Menschen mit einem GH-Defizit oder verminderter Ansprechbarkeit der Zellen auf GH können Minder- oder Kleinwuchs erleiden und haben einen vergleichsweise geringen Mineralgehalt im Knochen (ZETKIN und SCHALDACH

1999, HITZ et al. 2006). Dem IGF-1 wird ein Einfluss auf die Zellproliferation und Apoptoseverhinderung zugeschrieben, wobei der IGF-2 vermehrt in der fetalen Zellphase Einfluss nimmt. Beide IGFs werden primär von der Leber gebildet. Als potenter Stimulator für die Osteoblastenaktivität zur Produktion von neuer Knochenmatrix und -mineralisierung gilt IGF-1 (CLEMENS 2004). Ein weiteres Hormon mit Einfluss auf den Knorpelstoffwechsel ist das Adipocytokin Leptin. Es wird vor allem von Adipozyten gebildet und ist primär für die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch, aber auch für die Reproduktion, Hämatogenese, Angiogenese sowie für den Knochen- und Knorpelstoffwechsel zuständig (CORNISH et al. 2002, MORRONI et al. 2004). Leptin wird als Regulator des Knochenwachstums beschrieben, indirekt agierend durch das Nervensystem zur Aktivierung eines undifferenzierten, antiosteogenetischen Faktors oder direkt durch Induzierung der Osteoblastenproliferation, Kollagensynthese und Knochenmineralisierung. Dadurch ist Leptin ein Wachstumsfaktor, der auf das Skelett Einfluss nimmt und die enchondrale Ossifikation stimuliert (DUMOND et al. 2003). MORRONI et al. (2004) weisen Leptin immun-histochemisch im wachsenden Knochen von Ratten, in Chondrozyten und Stromazellen, aber nicht in Osteoblasten nach. In derselben Studie werden diese Ergebnisse in humanem Knochen bestätigt. Leptin reduziert signifikant die Frakturanfälligkeit der Knochen *in vivo* durch eine direkte Stimulation der Osteoblasten (CORNISH et al. 2002). DUMOND et al. (2003) zeigen einen Anstieg der Protein- sowie mRNA-Expression von Leptin, IGF-1 sowie TGF- β in humanem OA-Knorpel. Dies wird mit dem anabolen Effekt von Leptin auf Chondrozyten begründet, die daraufhin IGF-1 und TGF- β synthetisieren.

Die Tatsache, dass zwischen den Geschlechtern eine unterschiedliche Prävalenz der degenerativen Knorpelerkrankungen besteht, lässt auf einen Einfluss der Geschlechtshormone schließen. Östrogene beschleunigen die Knorpeldegradierung. Studien beim Menschen ergaben, dass Frauen eine höhere Inzidenz von OA aufweisen als Männer (BUCKWALTER und MARTIN 2006). Zudem haben Frauen mit einem GH-Defizit bei Östrogen-Substitution eine signifikant niedrigere Konzentration an Calcium und Vitamin D als Frauen mit normalem GH- und physiologischem Östrogen-Spiegel (HITZ et al. 2006). Geschlechtsunterschiede aufgrund von Östrogenen werden ebenfalls bei norwegischen Neufundländern in der Metaphyse von Radius und Ulna detektiert (TRANGERUD et al. 2007). Der Einfluss des TGF- β auf den Knorpelstoffwechsel wird in Kapitel 1.6 beschrieben.

1.3 Exterieurbeurteilung und Auswirkungen der OC

Zur Erfassung der BS wurde vor allem die Exterieurbeurteilung verwendet. Um die OC zu erfassen, ist, wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben, die histologische Befunderhebung am effektivsten und detailliertesten.

Die Exterieurbeurteilung war in der Tierzucht lange Zeit das wichtigste Verfahren zur Stützung von züchterischen Entscheidungen und Selektionsmaßnahmen. Auch in der modernen Tierzucht wird bei allen Tierarten zur Auswahl der Zuchttiere die Klassifizierung des Exterieurs herangezogen und in einzelnen Verbänden gesichert. Dabei wird vor allem auf die Beurteilung der Gesundheit und die Freiheit von Erbfehlern und nutzungsbeschränkenden Mängeln geachtet. Für Spezies, bei denen die Fleischleistung ein entscheidendes objektives Merkmal ist, wird die Schlachtkörperbeurteilung wegen ihrer Bedeutung in der praktischen Tierzucht mit aufgenommen und hat in Form von Leistungsprüfungen einen hohen Stellenwert (BREM 1998). In Deutschland wird die Zuchtorganisation, Zuchtwertschätzung sowie die Zuchtwertbeurteilung durch das TIERZUCHTGESETZ (2006) geregelt. Anerkannte Zuchtverbände haben demnach das Recht, Zuchtwertbeurteilungen durchzuführen. Die Stationsprüfung bei der vorliegenden Versuchspopulation wurde nach anerkannten ALZ-Richtlinien durchgeführt (ALZ 2003). Andere Länder verfügen über ähnliche Bestimmungen.

Um die Implementierung der Selektion gegen OC in Zuchtprogrammen im Hinblick auf die Nutzungsdauer von Schweinen und in diesem Zusammenhang auf die ökonomischen Auswirkungen richtig bewerten zu können, sollten die Einflüsse der OC auf diese Bereiche berücksichtigt werden. Besonders wichtig für die Selektionsarbeit und die damit einhergehenden züchterischen Überlegungen in einem modernen Schweinezuchtprogramm sind Beziehungen zwischen funktionalen Leistungs- sowie Exterieurmerkmalen. In der Schweinezucht ist die Beurteilung des BS-Syndroms und der Gelenkveränderungen ein wichtiges Element bei der Erfassung des Zuchtwertes (SCHWOERER 1991). ROTHSCILD und CHRISTIAN (1988) sowie ROTHSCILD et al. (1988) können in Studien belegen, dass die Stellung der Vordergliedmaße mit dem BS-Syndrom zusammenhängt.

Als Zeichen von BS mit einem negativen Effekt auf die Nutzungsdauer werden von JORGENSEN (2000a) Vorbiegigkeit der Vordergliedmaße sowie Unterstellen der Beine identifiziert. Dagegen können weiche Fesselungen der Hinterbeine und gespreizte Vorderklauen mit guter Beweglichkeit und Gesundheit der Gliedmaßen in Verbindung gebracht werden. Als klinische Zeichen für OC und OA werden Vorbiegigkeit der Vorderbeine, Abduktion der Gliedmaßen sowie steile Fesselungen hinten dargestellt (JORGENSEN 2000b). Weiter wird X-Beinigkeit oder Abduktion der Vordergliedmaßen mit Veränderungen im Vorderfußwurzelgelenk als prädisponierend für BS festgestellt. Bei Tieren mit schwachen Fesseln und Gangfehlern ist meistens das Kniegelenk von Knorpelveränderungen betroffen (SCHWOERER 1991). Die Heritabilität der Fundamentnote variiert bei verschiedenen Rassen und liegt zwischen 0,23 und 0,49 (BERESKIN 1979, SCHWOERER 1991, SCHULZE et al. 1998).

1.4 Phänotypische und genetische Korrelationen bezogen auf Fundament- und Fleischleistungsmerkmale beim Hausschwein

Bei den züchterischen Arbeiten sind nicht nur die Beziehungen zwischen den Fundamentmerkmalen bezogen auf BS oder OC, sondern auch die Beziehungen zwischen dem BS-Syndrom, den Gelenkveränderungen und den Mast- und Schlachtleistungsmerkmalen zu berücksichtigen.

Der wirtschaftliche Verlust durch BS besteht nicht nur aus den Abgängen der Schweine, sondern auch aus Einbußen in der Reproduktion und Mastleistung. Gerade um den Zusammenhang von BS und Gelenkveränderungen bzw. allgemeinen Fundamentmerkmalen und Fleischleistungsmerkmalen aufzudecken, werden viele Studien mit unterschiedlichen Parametern durchgeführt. Schon REILAND et al. (1978) untersuchen den Zusammenhang zwischen Seitenspeck, Rückenspeck, Schlachtkörperlänge und prozentualen Anteilen von Magerfleisch und Speck mit OC. Sie beschreiben positive, genetische Korrelationen zwischen der Gelenkoberfläche des *Condylus medialis femoris* und BS mit der Wachstumsrate sowie zwischen BS und der Schlachtkörperlänge. Negative Zusammenhänge isolieren sie zwischen der Wachstumsrate und dem Fleischanteil sowie zwischen der Rückenspeckdicke und OC-Läsionen an der Gelenkoberfläche der distalen Ulna. Weitere Untersuchungen zu

Zusammenhängen folgen und sollen in der Diskussion aufgegriffen werden (BERESKIN 1979, LUNDEHEIM 1987, STERN et al. 1995, SCHULZE et al. 1998). Einen phänotypischen Zusammenhang zwischen BS und der Schlachtkörperlänge sowie dem Magerfleischanteil entdeckt auch DRAPPER (1992). Unvorteilhafte phänotypische Korrelationen zwischen relativem Speckgewicht und morphologischen Läsionen des Femurs zeigen VAN DER WAL et al. (1980), die 1983 von WEBB et al. bestätigt werden.

1.5 Prävalenz der Gelenkveränderungen ausgewählter Spezies und Heritabilität von BS und OC beim Hausschwein

Die OC ist eine Erkrankung des Jungtieres und in allen Spezies der *Mammalia* mehr oder weniger stark vertreten. Beim Warmblutpferd wird in verschiedenen Populationen eine Prävalenz von 10 % bis 30 % angenommen. Eine Stichprobe des niederländischen Warmblutzuchtverbandes an 30 Hengsten ergibt eine OC-Frequenz im Sprunggelenk von 18 % (MABINTI BUSCHE 2005). Bei schnellwüchsigen Hunderassen sind die Prävalenzen ähnlich. Sie betragen bis zu 20 %, wobei am häufigsten das Ellenbogengelenk betroffen ist (CLEMENTS et al. 2006, BRUNNBERG 2007). Studien der WHO ergeben eine weltweite OA-Frequenz beim Menschen von 10 % (BUCKWALTER und MARTIN 2006, CLEMENTS et al. 2006). Bei Untersuchungen zur OC bzw. OCD beim Schwein wird in Skandinavien eine Prävalenz von 40 % bei Ebern im Leistungstest beobachtet und 47 % der Zuchtsauen werden aufgrund von Lahmheiten, verursacht durch OC oder OA, geschlachtet (HILL 1990b). Prävalenzstudien in Finnland zeigen einen Anstieg der Arthritiden (darunter auch OC und OA) von 2,3 % im Jahr 1999 auf 3,4 % in 2003. Ähnliche Entwicklungen werden in Dänemark verzeichnet (HEINONEN et al. 2007). Aufgrund der hohen Prävalenz der OC bzw. OA und des wirtschaftlichen Verlustes durch Einbußen in der Reproduktion oder Mast kommt der Aufklärung der Ätiologie eine große Bedeutung zu.

Da die Ätiologie der BS bzw. OC und OA bisher noch unklar ist, wurden verschiedene Studien durchgeführt, um die Heritabilitäten der verschiedenen Merkmale beim Schwein zu schätzen. Genetische Ursachen können demnach nicht ausgeschlossen werden (Tabelle 1). BERESKIN (1979) berichtet von Heritabilitäten für Fundamentmerkmale bei Duroc- und Yorkshire-Populationen zwischen 0,15 und 0,38 und WEBB et al. (1983) von ähnlichen

Heritabilitäten (h^2 zwischen 0,17 und 0,19) bei Large White und Schwedischer Landrasse. STEENBERGEN et al. (1990) schätzen die Heritabilität von 14 Fundamentmerkmalen auf Werte von 0,01 bis zu 0,31.

Tabelle 1: Geschätzte Heritabilitäten verschiedener Studien an verschiedenen Lokalisationen bzw. Merkmalen für BS bzw. OC beim Hausschwein

Autor	BS/OC	Lokalisation bzw. betrachtetes Merkmal	Heritabilität (h^2)
REILAND et al. (1978)	OC	<i>Condylus medialis humerus</i>	0,20
		<i>Condylus medialis femoris</i>	0,30
		distale Ulna	0,14
BERESKIN (1979)	BS	Vordergliedmaßengesundheit	0,27-0,28
		Hintergliedmaßengesundheit	0,15-0,38
WEBB et al. (1983)	BS	Beinbewegung	0,18-0,14
		Summe Beinbewegung	0,19-0,13
		Körpergestalt	0,22-0,17
LUNDEHEIM (1987)	OC	Ellenbogengelenk	0,21-0,25
		Kniegelenk	0,33-0,35
	BS	BS-Merkmale	0,11-0,14
ROTHSCHILD und CHRISTIAN (1988)	BS	Vordergliedmaßengesundheit	0,23-0,35
		Vordergliedmaße BS	0,38-0,45
SCHWOERER (1991)	OC	Gelenkveränderungen	0,07
		<i>Condylus medialis humerus</i>	0,54
		<i>Condylus lateralis humerus</i>	0,50
		<i>Caput humerus</i>	0,50
	<i>Condylus medialis femoris</i>	0,70	
BS	<i>Caput femoris</i>	0,23	
STERN et al. (1995)	OC	OC-Merkmale	0,10-0,20
	BS	BS-Merkmale	0,20-0,50
SCHULZE et al. (1998)	BS	Vordergliedmaßenfesselstellung	0,30-0,47

Andere Studien schätzen die Heritabilität der Vordergliedmaßengesundheit über fünf Generationen, selektiert in drei Gruppen, auf Werte in Höhe von 0,29 bis 0,42 (ROTH-SCHILD et al. 1988). Generell liegen die Heritabilitäten für OC- höher als für BS-Merkmale, sind aber immer noch niedrig bis moderat. Dennoch werden genetische Komponenten als wichtiger Teil des BS-Komplexes betrachtet und die Heritabilitäten sind hoch genug, um weitere molekulargenetische Untersuchungen durchzuführen (GRONDALEN 1974a).

Vor allem *Quantitative Trait Loci* (QTL)-Analysen werden im Bereich der BS bzw. der degenerativen Knorpelerkrankungen durchgeführt, um Aufschluss über mögliche Prädispositionen zu geben. Die QTL-Analyse ist eine Kopplungsanalyse und dient zum Nachweis von Chromosomenregionen, die Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals des betreffenden Organismus haben (JONAS 2006). LEE et al. (2003) detektieren QTL bei einer Large White x Meishan Schweinepopulation auf verschiedenen Chromosomen in Bezug auf die Gesundheit der Vorder- und Hintergliedmaßen sowie der Klauen. Es wird allerdings kein QTL für OC nachgewiesen. Eine andere Studie zeigt QTL für OC bei einer Hybridpopulation aus Wildschwein und Large White auf fünf Chromosomen sowie weitere QTL für Femur-Ausmaße, wobei hier die Besonderheit des Wildschweineinflusses beachtet werden muss (ANDERSSON-EKLUND et al. 2000). Andere QTL-Analysen beschäftigen sich mit Fleischleistungsmerkmalen. So werden QTL an einer Duroc x Pietrain-Ressourcenpopulation für die Fleischfarbe und -beschaffenheit sowie für Schlachtkörperbeschaffenheit und Tageszunahme und weiter zwei QTL für die Rückenspeckdicke erfasst (LIU et al. 2007). Bisher sind allerdings noch keine geeigneten QTL für BS bzw. OC definiert. Dadurch bleibt die Bedeutung der Suche nach geeigneten Kandidatengen groß und soll in dieser Studie vorangetrieben werden.

1.6 Zielgene und Bedeutung des *Transforming Growth Factor* (TGF) für den Knorpelstoffwechsel

Berichte über Veränderungen von Gelenken mit OC beinhalten Abweichungen in der Kollagenexpression und -vernetzung (HENSON et al. 1997, SEMEVOLOS et al. 2001, AURICH et al. 2006) sowie inadäquate Expression von Wachstumsfaktoren wie z. B. von TGF (THORP et al. 1995, SEMEVOLOS et al. 2001, AURICH et al. 2006). Diese Veränder-

ungen können Hinweise auf mögliche Kandidatengene für BS oder degenerative Gelenkerkrankungen sein. Deshalb wurden in der vorliegenden Studie einige Kollagene sowie der TGF- β ausgewählt, um mögliche Veränderungen der mRNA-Expression bei OC zu erfassen.

Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der Kollagene im Knochen (NICKEL et al. 1992). Außerdem wird Kollagen I mit fibroelastischem Gewebe in Verbindung gebracht. Die Expression ist im Knorpel mit fibröser Degeneration erhöht (FRENKEL et al. 2000, AURICH et al. 2006). In einigen Studien wird Kollagen I in artikulärem Knorpel gefunden. AURICH et al. (2006) weisen immun-histochemisch in Humanstudien Kollagen I an fibrös degenerierter Gelenkknorpeloberfläche nach und bestätigen durch Echtzeit-RT-PCR in OCD-Fragmenten einen Anstieg. Weiter entdecken CLEMENTS et al. (2006) einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen I in OC-Knorpel beim Hund. Beim Pferd wurde die Proteinexpression des Kollagen I durch Westernblot bzw. die mRNA-Expression mittels Echtzeit-RT-PCR analysiert. Dabei wird in beiden Methoden kein Unterschied zwischen Knorpel mit und ohne OC entdeckt (SEMEVOLOS et al. 2001). WARDALE und DUANCE (1994) unternehmen am Gelenkknorpel vom Schwein Vergleiche zwischen osteochondrotisch verändertem und unverändertem Knorpel. Demnach ist im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Pferd die Kollagen I-Proteinexpression bei Schweinen mit OC erhöht.

Bei Kollagen II handelt es sich um das Kollagenmolekül mit dem größten Anteil an den Kollagenfasern im hyalinen Knorpel. Ein hohes Expressionsniveau von Kollagen II-Molekülen ist ein phänotypischer Marker für Chondrogenese und ein Kennzeichen für die Belastbarkeit von hyalinem Knorpel (QIAO et al. 2005). Daraus kann geschlossen werden, dass die Belastbarkeit des Knorpelgewebes abnimmt, wenn die Kollagen II-Expression sinkt. Eine Punktmutation im Exon 50 des Kollagen II-Gens des Menschen führt zur avaskulären Nekrose des Femurkopfes (LIU et al. 2005); andere Abnormalitäten und Dysbalancen des Kollagen Typ II werden beim Menschen mit Stickler-Syndrom, Spondyloepiphysealdysplasie oder Osteoarthritis in Verbindung gebracht (MIER et al. 2001). Bei OA kann Kollagen II vor allem in der mittleren und tiefen Knorpelschicht immun-histochemisch nachgewiesen werden (AURICH et al. 2006). Als Zeichen der Zerstörung von Kollagenfasern werden Kollagen II-Fragmente nach mechanischem Stress durch intensive Druckbelastung an Gelenkknorpelscheiben vom Kalb *in vitro* vermehrt nachgewiesen (WILSON et al. 2006). GANGL et al. (2007) untersuchen Unterschiede in der Konzentration der nitrierten Form des Kollagen II

zwischen degradiertem OC- und nicht degradiertem Knorpel beim Pferd. Die nitrierte Kollagen II-Form gilt als Abbauprodukt von Kollagenmolekülen und entsteht durch Knorpeldegradierung. Sie wird als Marker für Entzündungen und Degradierungen verwendet und zeigt einen signifikanten Anstieg bei OC. SEMEVOLOS et al. (2001) können beim Pferd keinen Unterschied in der Expression von Matrixmolekülen des Kollagen II zwischen OC und unverändertem Knorpel nachweisen. In einer Ernährungsstudie beim Schwein, bezogen auf Supplementierung mit 25-Hydroxyvitamin D3 und OC, werden geringere Kollagen II-mRNA-Expressionsniveaus bei OC-Knorpel als bei unverändertem Knorpel gefunden (JEFFERIES et al. 2002). Der Abfall des Proteinniveaus an Kollagen II bei OC wird auch am Schweineknorpel gefunden (WARDALE und DUANCE 1994). Allgemein ist zu erkennen, dass der Anteil an Kollagen II-Fasern abnimmt, wenn OC oder andere degenerative Gelenkerkrankungen vorliegen.

Zellen vom fibrösen Phänotyp synthetisieren Kollagen Typ V-Moleküle (CLEMENTS et al. 2006), die normalerweise nicht im hyalinen Knorpel zu finden sind. WARDALE und DUANCE (1993) können dieses Matrixmolekül im Westernblot weder in der Wachstumsfuge noch im artikulären Knorpel vom Schwein nachweisen. CLEMENTS et al. (2006) finden dagegen einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen V in OC-Knorpel beim Hund. Weitere Untersuchungen zu Kollagen V an Gelenkknorpeln liegen bisher nicht vor.

Bei Kollagen X handelt es sich um ein atypisches Knorpelmatrix-Molekül, welches mit Chondrozyten-Hypertrophie sowie mit Kollagen II in Verbindung gebracht wird (KIELTY et al. 1985, AURICH et al. 2006, BUCKWALTER und MARTIN 2006). In gesundem Gelenkknorpel wird es nicht exprimiert, wohl aber bei noch nicht geschlossenen Wachstumsfugen (NERLICH et al. 1992). Die mRNA des Kollagenfasertyps X wird als Marker für die Hypertrophie in neoplastischen Chondrozyten durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen (AIGNER et al. 1997) und wird von VON DER MARK (1995) in Regionen mit fibröser Degradierung rund um Chondrozytencluster sowie in tieferen Regionen im Rahmen der OA beim Menschen mithilfe von Antikörpern nachgewiesen. Der Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen X bestätigt sich beim Menschen mit OCD (AURICH et al. 2006). Beim Pferd ergeben sich keine Unterschiede in der mRNA sowie in der Proteinexpression zwischen OC- und Kontrollknorpel (SEMEVOLOS et al. 2001).

WARDALE und DUANCE (1993) detektieren Kollagen X-Protein in der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge sowie in calcifizierten Regionen des artikulären Knorpels beim Schwein. Im Vergleich von OC mit unverändertem Knorpel ergibt sich allerdings kein Unterschied in der Proteinexpression (WARDALE und DUANCE 1994). Ebenfalls beim Schwein weisen JEFFERIES et al. (2002) in der mRNA-Expression von Kollagen X einen Anstieg in der Knorpelmatrix bei OC nach.

Neben der Interaktion mit ihrer extrazellulären Matrix wird die Stoffwechsellistung von artikulären Chondrozyten auch von unterschiedlichen mito- und morphogenen Wachstumsfaktoren beeinflusst, die sie z. T. selbst produzieren. Von besonderer Relevanz hierbei sind einige Mitglieder der TGF- β -Superfamilie.

Zu diesen werden TGF- β 1, -2, -3, die knochenspezifischen morphogenetischen Proteine (*Bone-Morphogenetic Protein* = BMP) und – als Untergruppe der BMPs – der Wachstums- und Differenzierungsfaktor-5 (auch bekannt als *Cartilage-Derived Morphogenetic Protein-1* = CDMP-1) gezählt (ZEHENTNER et al. 1999, QIAO et al. 2005). Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie nehmen eine zentrale Rolle bei der Signalmodulation von Differenzierungsprozessen bei Chondrozyten ein. TGF- β und BMPs bestimmen im Zusammenspiel mit lokalen gewebespezifischen, mechanischen und systemischen Einflüssen den Differenzierungsprozess von der Vorläuferzelle zum differenzierten, matrixbildenden Chondrozyten (QIAO et al. 2005). Der heilende Effekt der BMPs auf Knorpelläsionen wird in einigen Studien an verschiedenen Spezies der *Mammalia* untersucht (FRENKEL et al. 2000, CHUBINSKAYA und KUETTNER 2003, ROELEN und DIJKE 2003). Im Knorpelgewebe besitzt der Wachstumsfaktor TGF- β bereits bei der embryonalen Entwicklung eine wichtige Funktion. Das Vorkommen der mRNA dieses Faktors in den Wachstumsplatten von humanen fötalen Röhrenknochen deutet auf seine frühzeitige Einflussnahme auf das Wachstum des Skelettsystems und des Knorpelgewebes hin (BRENNER et al. 1993, QIAO et al. 2005).

TGF- β transduziert Signale über Membranrezeptoren (Typ I und II) an sogenannte Smad-Proteine. Der Name der Smad-Proteine leitet sich von den sie kodierenden Genen ab, die in genetischen Studien an *Drosophila* und *C. elegans* erstmals identifiziert wurden. Das *Drosophila*-Gen wird als *Mad* (*Mother against decapentaplegic*), das Gen in *C. elegans* als *Sma* (*Small body size*) bezeichnet. Die Kombination dieser beiden Bezeichnungen kreiert den

Namen „Smad“ (ITOHO et al. 2000). Smad-Proteine sind intrazelluläre Modulatoren, die rezeptorvermittelte Signale der Wachstumsfaktoren an den Zellkern übermitteln. Sie können Signale übermitteln (Smad 2, 3 und 4) oder hemmen (Smad 6 und 7) (SAKOU et al. 1999, CANALIS et al. 2003).

Der TGF- β wird in verschiedenen Geweben u. a. von Thrombozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteozyten produziert und kann in hohen Konzentrationen in der Knochenmatrix gespeichert werden (CENTRELLA et al. 1991, 1994).

Die drei verschiedenen Isoformen von TGF- β (1-3) sind nicht nur in der Entwicklung des embryonalen Knorpels von Bedeutung, sondern vor allem auch maßgeblich an der Regulation des Metabolismus von differenzierten Chondrozyten im adulten Organismus beteiligt (BRENNER et al. 1993, CHUBINSKAYA und KUETTNER 2003). Sie unterscheiden sich bezüglich ihres Einflusses auf die Genexpression. TGF- β 1 und -2 induzieren sich gegenseitig. TGF- β 3 hingegen erhöht die Expression von TGF- β 1-mRNA, hat aber keinen Effekt auf die mRNA von TGF- β 2. TGF- β 3 bindet mit dreifach höherer Affinität an fetalen Knochenzellen als die beiden anderen Isoformen und wird am häufigsten von Chondrozyten gebildet (CHUBINSKAYA und KUETTNER 2003). TGF- β hemmt die Replikation von Fibroblasten und induziert in den meisten Geweben die Synthese der Matrixmoleküle der PG und Kollagene (CENTRELLA et al. 1994, FRENKEL et al. 2000, CHUBINSKAYA und KUETTNER 2003) sowie die mRNA-Expression von Aggrecan, Kollagen II und *Tissue-Inhibitor-Metalloproteinasen* (TIMPs) (FRENKEL et al. 2000, CHUBINSKAYA und KUETTNER 2003). Fibroblasten zählen zu den beweglichen Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft, die eine wichtige Rolle in der extrazellulären Matrixproduktion – vor allem der Kollagen II- und GAG-Produktion – spielen (ZETKIN und SCHALDACH 1999).

Außerdem reduziert TGF- β die PG-Zerstörung, die mRNA-Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie den Interleukin(IL)-1-Effekt, in dem er als IL-1-Antagonist fungiert (VAN BEUNINGEN et al. 1998). Einige MMPs werden von Chondrozyten produziert, darunter auch die Kollagenasen MMP-1, -8 und -13. Sie sind u. a. für die Degradierung der PG und Zerstörung des kollagenen Netzwerkes verantwortlich (SABATINI et al. 2005). TIMPs hemmen MMPs.

IL-1 wird von aktivierten Monozyten freigesetzt und löst eine komplexe Entzündungsreaktion aus. Diese Entzündungsreaktion stimuliert außerdem die Kollagenaseausschüttung und ist somit an der Knorpeldestruktion beteiligt (ZETKIN und SCHALDACH 1999). CHUBINSKAYA und KUETTNER (2003) skizzieren folgende Wege des hemmenden Einflusses von TGF- β auf IL-1:

1. Reduktion von Proteasen durch
 - a) Blockade von IL-1 induzierter Proteasenproduktion
 - b) Stimulation der Proteaseninhibitor-Produktion
2. Interaktion mit den IL-1 stimulierenden Metaboliten (Stickstoffoxide sowie Stickstoffoxid-Synthase)

Untersuchungen über den TGF- β -Einfluss in degenerativ verändertem Knorpel ergeben bei OA eine gesteigerte PG-Produktion im Vergleich zu unverändertem Knorpel. Dies wird primär auf einen veränderten Phänotyp der Chondrozyten zurückgeführt (VAN BEUNINGEN et al. 1998, CHUBINSKAYA und KUETTNER 2003). CENTRELLA et al. (1994) beschreiben eine hemmende Funktion des TGF- β auf die Kollagen I-Synthese, bringen TGF- β mit anderen degenerativen Gelenkerkrankungen (Dyschondroplasie) bei Hühnern und Pferden in Verbindung und assoziieren diese mit Hypertrophie. Beim Pferd ist kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von TGF- β in OC zu gesundem Gelenkknorpel zu beobachten (SEMEVOLOS et al. 2001). Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch AURICH et al. (2006) bei mRNA-Expressions-Studien beim Menschen sowie JEFFERIES et al. (2002) beim Schwein.

Obwohl bereits eine Studie zur mRNA-Expressionsanalyse von Kollagen II, X und TGF- β vorliegt (JEFFERIES et al. 2002), wurden diese als Kandidatengene in die Studie aufgenommen. Dies geschah, da in der vorliegenden Dissertationsstudie ein anderes histologisches Einteilungsschema vorgenommen wurde und dadurch unterschiedliche Ergebnisse möglich sind (FUKAWA und KUSUHARA 2001). JEFFERIES et al. (2002) wählen eine Histologieskala von null bis fünf (sechs Klassen). In der vorliegenden Dissertationsstudie wurde eine Skala von null bis drei (vier Klassen) verwendet.

1.7 Ziele der Studie

Im Rahmen dieser Studie wurden Basisdaten der Gliedmaßenerkrankung BS bzw. OC erfasst. Sie sollten eine definierte Grundlage für weitere molekularbiologische Untersuchungen in Form einer Kandidatengenanalyse liefern. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse können im Rahmen von Zuchtprogrammen helfen, positiven Einfluss auf die Gliedmaßenerkrankungen zu nehmen.

Das erste Ziel der Studie bestand in der Charakterisierung eines definierten, objektiven und nachvollziehbaren Phänotyps, mit dessen Hilfe pathologische Knorpelveränderungen mit negativen Konsequenzen auf Produktionsleistungen möglichst zweifelsfrei nachgewiesen werden können. Die im Vergleich zur Exterieurbeurteilung objektivere Histologie sollte dabei die Exterieurbefunde ergänzen. Damit wurden die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen, um den Zusammenhang zwischen Fundamentproblemen und genetischen Einflüssen durch Kandidatengene zu prüfen. In Bezug auf die funktionalen Kandidatengene wurde in diesem Versuch ein Schwerpunkt auf verschiedene Kollagenfasern sowie auf den TGF- β gelegt. TGF- β ist einer der Wachstumsfaktoren im Knorpel, verfügt über großen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und -proliferation, induziert die Matrixproteinsynthese und reguliert den Metabolismus der PG. Die Kollagene sind Syntheseprodukte der Chondrozyten. Durch eine Veränderung in der synthetisierten Matrix kann einerseits auf Expressionsänderungen in den Chondrozyten geschlossen, andererseits aber auch ein mechanischer oder enzymatischer Einfluss detektiert werden. Bei einigen der Kollagenen sind bereits bei anderen Spezies Änderungen der Protein- und/oder mRNA-Expression nachgewiesen.

Zusammenfassend ergaben sich aus der Sammlung von Basisdaten vier Ziele, die auch einzeln diskutiert werden sollen:

1. Erfassung eines definierten Phänotyps mit objektiven, histologischen Merkmalen in einer Experimentalpopulation einer F2-Generation aus Duroc x Pietrain
2. Vergleich und Analyse der Fundamentmerkmale bestehend aus Exterieurbeurteilung und Histologiebefunden

3. Prüfung der Zusammenhänge zwischen einzelnen Fundamentmerkmalen und Parametern der Mast- und Schlachtleistung sowie der Fleischbeschaffenheit
4. Quantifizierung der mRNA-Expression einiger funktionaler Kandidatengene zur Aufdeckung möglicher Unterschiede zwischen OC bzw. OA und gesundem Gelenkknorpel

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Ablauf der Untersuchungen

Der experimentelle Teil der Studie ließ sich in einen ersten Bereich der Datensammlung am Tier und in einen zweiten, molekularbiologischen Bereich unterteilen (Abbildung 2). Zu Beginn wurden Daten aus der Aufzucht und Mast in der Leistungs-Prüfanstalt (LPA) Frankenforst erfasst und die Tiere im Exterieur beurteilt. Schlachtbefunde und Fleischbeschaffenheitsmerkmale wurden am Schlachthof der LPA Schwarzenau in Nordbayern protokolliert. Des Weiteren wurden histologische Schnitte von Gelenkoberflächen angefertigt und anhand eines erstellten Analyseschemas in vier Klassen eingeordnet. Dabei sollte ein definierter, nachvollziehbarer Phänotyp charakterisiert werden, mit dessen Hilfe pathologische Knorpelveränderungen mit Konsequenzen auf Produktionsleistungen möglichst zweifelsfrei nachgewiesen werden können. Des Weiteren sollten Zusammenhänge zwischen den Beurteilungssystemen des Exterieurs, den histologischen Klassifizierungen und den erhobenen Aufzucht-, Mast-, Schlacht- und Fleischbeurteilungsdaten geschätzt werden.

Anschließend wurde im zweiten molekularbiologischen Bereich das mRNA-Expressionsmuster verschiedener Kandidatengene, die nach der Literatur mit Änderungen in der Knorpelmatrix assoziiert sind, ermittelt. Hierfür wurden – für jedes Gelenk von zwei definierten Extremgruppen der histologischen Einteilung – jeweils fünf Gelenkknorpelproben verwendet.

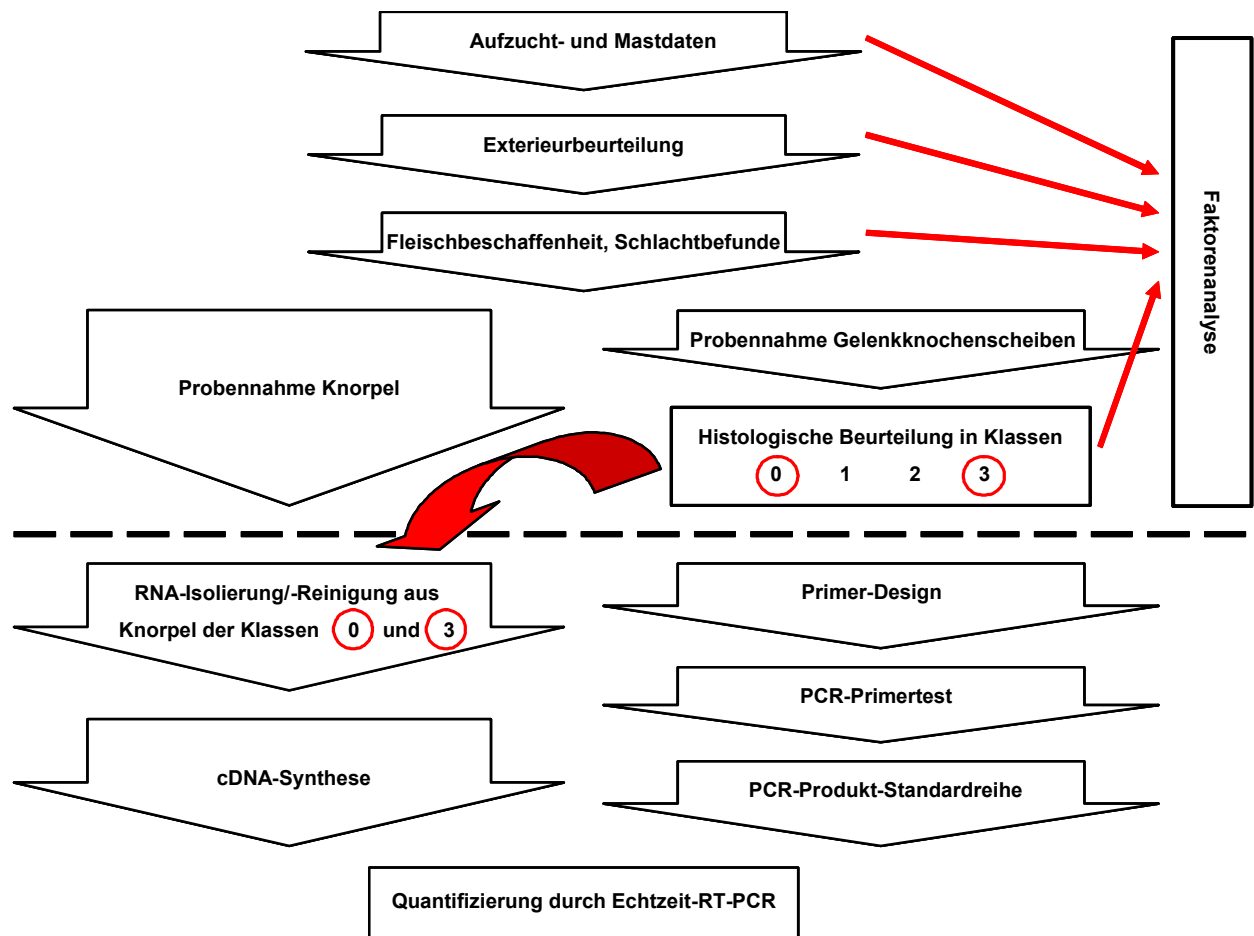


Abbildung 2: Ablauf der Untersuchungen

Oberer Teil mit Mast- und Aufzucht-daten, Exterieurbeurteilung und histologischer Befunderhebung;
 unterer, molekularbiologischer Teil mit Echtzeit-RT-PCR-Quantifizierung

2.2 Tiere

Es wurden 139 (74 weibliche und 65 kastrierte, männliche) Schweine einer F2-Generation aus Duroc x Pietrain mit Pietrain x Duroc verwendet (Abbildung 3). In der F0-Generation kamen reinrassige Pietrain- und Duroc-Tiere zum Einsatz. Dabei zeichnen sich beide durch gegensätzliche Fleischbeschaffenheitsmerkmale aus: Das Pietrain-Schwein ist gekennzeichnet durch beste Bemuskulierung mit geringem Fettansatz, mäßige Futtermittelverwertung und hohe Stressanfälligkeit. In Deutschland stellt das Pietrain-Schwein eine bedeutende Vatterrasse dar (SAMBRAUS 1994). Das Duroc-Schwein hat dagegen einen fetteren Schlachtkörper mit hervorragender Fleischqualität, Frohwüchsigkeit und eine höhere Fruchtbarkeit als die

Pietrain-Rasse. Duroc-Schweine zeigen eine gute Belastbarkeit und Stressresistenz (SAMBRAUS 1994).

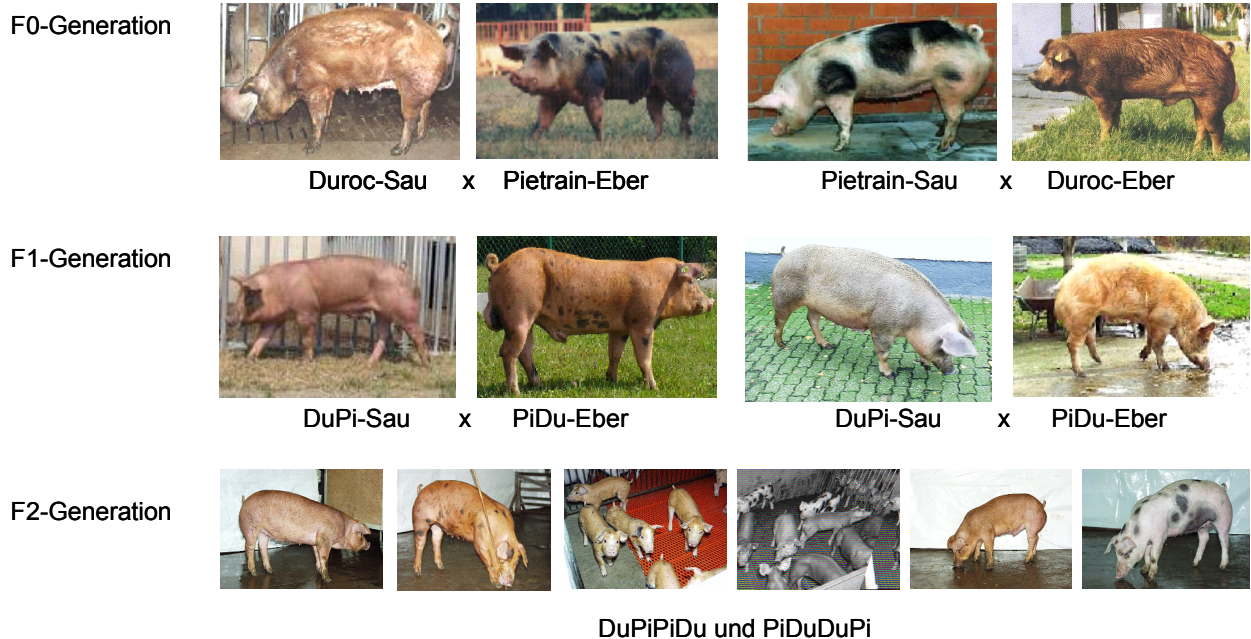


Abbildung 3: Duroc(Du)- und Pietrain(Pi)-Versuchspopulation von F0- bis F2-Generation
(Lehr- und Forschungsstation Frankenforst, Universität Bonn)

In der Versuchspopulation wurden die männlichen Tiere während der ersten beiden Lebenswochen kastriert. Nach dem Absetzen wurden die Tiere gemäß den Richtlinien der stationären Fleischleistungsprüfung (ALZ 2003) in Zweiergruppen unter *ad libitum* Fütterungsbedingungen bis zu einem Lebendendgewicht von 110 kg (\pm 8 kg) gemästet. Die Fütterung erfolgte mit Prüfungsfutter der LPA (13,5 MJ/kg, 16,5 % Rohprotein (Cystein: 0,3 %, Lysin: 1,0 %, Methionin: 0,28 %, Threonin: 0,59 %), 2,9 % Rohfett, 3,6 % Rohfaser, 4,55 % Asche (Phosphor: 0,55 %, Natrium: 0,13 %)). Alle Tiere wurden auf der Lehr- und Forschungsstation Frankenforst der Universität Bonn – mit integrierter LPA (Frankenforst, Königswinter) – geboren, gemästet und der Fleischleistungsprüfung sowie der Exterieurbeurteilung unterzogen.

2.2.1 Datenerhebung zur Mast- und Schlachtleistung

Mast- und Aufzuchtdaten

Während der Mastperiode wurden verschiedene Parameter erhoben: Tageszunahme (LEBTGZ), Alter beim Absetzen (ALTABS), Futtermittelverwertung ab dem 105. Tag (FVW105) und Gewicht bei Mastende (ENDKG). Am Mastende vor der Schlachtung wurden alle Tiere im Exterieur beurteilt.

Schlachtbefunde und Fleischbeschaffenheitsparameter

Nach der Schlachtung wurden folgende Schlachtbefunde protokolliert:

Gewicht des Schlachtkörpers (SLAKG), Länge des Schlachtkörpers (LAENGE), Dicke des Specks über dem *M. longissimus dorsi* auf dem Widerrist (SPECKWR), Speckdicke über dem *M. longissimus dorsi* im Lendenbereich (SPECKLE), Speckdicke über dem *M. longissimus dorsi* mittig (SPECKMI), Seitenspeckdicke (SEITSPE), Speckdicke über dem *M. longissimus dorsi* an neun Punkten gemessen (SUER) sowie die Bauchspeckdicke (BAUCH).

Des Weiteren wurden folgende Fleischbeschaffenheitsparameter aufgenommen: pH-Werte im Kotelett eine Stunde (PHKO1) und 24 Stunden (PHKO24) p. m., pH-Wert im Schinken eine Stunde p. m. (PHSI1), Leitfähigkeit im Kotelett eine Stunde (LFKO1) und 24 Stunden (LFKO24) p. m., Leitfähigkeit im Schinken eine Stunde p. m. (LFSI1), Fettfläche (FEFL), Fleischfläche (FLFL), optisch gemessener Emissionswert zur Bestimmung der Fleischfarbe (OPTO) und Tropfsaftverlust (TROPFSAF).

2.2.2 Exterieurbeurteilung

Die Exterieurbeurteilung in der Leistungsprüfungsanstalt diente zur Beschreibung eines Phänotyps und bestand aus unterschiedlichen Bewertungsmerkmalen, die alle linear von 1 bis 5 beurteilt wurden (STEENBERGEN 1989, BREM 1998). Bewertet wurden die 139 Schweine in Bezug auf Winkelung des Fundaments vorne (*Articulatio cari*), Winkelung des Fundaments hinten (*Articulatio tarsi*), jeweils mit seitlichem Blickwinkel, sowie Stellung des Fundaments hinten (*Articulatio genus*, Blickwinkel von hinten). Die Zuordnung der Werte ist in Tabelle 2 dargestellt. Dabei kann der Tabelle entnommen werden, dass die Einteilung in

die Kategorie 3 im originalen System dem Optimum entsprach. Die Kategorien 1 und 5 stellten dagegen starke Abweichungen dar.

Um abnormale Fundamentstellungen bewerten und vergleichen zu können, wurden die originalen linear skalierten Exterieurdaten in ordinale Daten transformiert. Aus dieser Zuordnung folgte, dass das Optimum, in der linearen Skalierung als 3 beziffert, nach der Transformation der 0 entsprach. Die 1 beschrieb leichte, von der Norm abweichende Merkmale (linear die 2 und 4), die 2 starke Abweichungen (linear die 1 und 5). In welcher Richtung die Abweichung vorlag, ging bei dieser Einteilung verloren.

Tabelle 2: Zuordnung der Bewertungen der Exterieurmerkmale

Merkmal	Note/Bewertung				
	original	1	2	3	4
transformiert	2	1	0	1	2
Fundament vorne (Winkelung)	sehr steil		optimal		sehr stark durchtrittig
Fundament hinten (Winkelung)	sehr steil		optimal		sehr stark durchtrittig
Fundament hinten (Stellung)	stark fassbeinig		optimal		stark x-beinig

„Exterieurgruppe/Tier“

Um eine bessere Gesamtbeurteilung des Fundaments pro Tier zu ermöglichen, wurden die transformierten Beträge (0 bis 2) der drei Fundamentmerkmale von Winkelung vorne, hinten sowie Stellung der Hinterhand addiert und als „Exterieurgruppe/Tier“ bezeichnet. Hieraus resultierte ein Notenbereich von 0 bis 3. Die Tiere aus der „Exterieurgruppe/Tier“ 0 zeigten dabei keine Abweichungen vom Optimum in der Fundamentbeurteilung. In der „Exterieurgruppe/Tier“ 3 waren dagegen Tiere mit drei Punkten Abweichungen von der optimalen Fundamentbeurteilung zu finden.

2.2.3 Entnahme von Knorpel- und Gelenkknochenproben

Direkt nach der Schlachtung der Schweine auf dem Schlachthof der LPA Schwarzenau in Nordbayern wurden an der rechten Hälfte des Schlachtkörpers Femur, Humerus sowie die Ossa antebrachii vom umgebenden Gewebe herausgelöst.

Craniodorsal des *Caput femoris*, dorsal des *Condylus medialis femoris*, craniomedial des *Caput humeri* sowie dorsal des *Condylus medialis humerus* wurde eine Doppelprobe des Gelenkknorpels von jeweils ca. 1 x 3,5 cm Fläche mithilfe von Einmal-Skalpellen und desinfizierten Pinzetten in einer Tiefe von max. 1 mm entnommen. Die entnommenen Knorpelproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Knochen wurden nach der Knorpelentnahme sofort mit auf -80°C vorgekühlten Kühlakkus gefroren und bei -20°C gelagert.

Aus den Gelenkflächen von Femur und Humerus wurden in gefrorenem Zustand sagittale ca. 0,5 cm x 2 cm x 1 cm dicke Scheiben gesägt. Die Gelenkknochenscheiben wurden zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3 Histologie

Alle verwendeten Reagenzien und Geräte sind im Anhang (Kapitel 8.2) detailliert aufgeführt.

2.3.1 Herstellung und Färbung von histologischen Schnitten

Die zuvor gesägten Gelenkknochenscheiben von Femur und Humerus wurden in Bouin'scher Lösung zwei Tage fixiert, in einem Schnellentkalker (RDO) 6 h entmineralisiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Iso-2-Propanol) von 70 %, 80 %, 90 % bis 100 % für jeweils 12 h entwässert. Anschließend wurden die Gelenkknochenscheiben 24 h im Intermedium Rotihistol gelagert. Alle Alkohollösungen sowie das Rotihistol wurden zweimal erneuert. Am Ende wurden die Gelenkknochenscheiben in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte mit einer Schnittdicke von 7 µm mittels eines Schlittenmikrotoms hergestellt.

Färbung nach Masson-Goldner

Die Färbetheorie der biologischen Färbungen begründet sich meist in der Affinität bestimmter Gewebestrukturen zu bestimmten Farbstoffen. Die Hauptbindungskraft ist die Ionenbindung, die bewirkt, dass z. B. saure Farbstoffe durch basische Proteine gebunden werden. Das Prinzip der Dispersität (Farbstoffmolekülgröße) bestimmt, in welche Gewebestrukturen der Farbstoff eindringen kann.

Für die Trichromfärbung nach Masson-Goldner (ROMEIS 1998) wurden nach der Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (ROMEIS 1998) weitere disperse Farbstoffe simultan und sukzessiv angewendet. Als Ersatz für Eisenhämatoxylinfarbstoff wurde im vorliegenden Versuch Hämalaun nach Mayer verwendet. Dieses besteht aus Hämatoxylin mit Natriumjodat als Oxidationsmittel und hat den Vorteil, dass es lange stabil bleibt. Eine Überfärbung mit Hämalaun nach Mayer ist kaum möglich.

Hämatoxylin ist ein basophiler Farbstoff, welcher die sauren Aminosäuren der DNA, RNA sowie GAG des hyalinen Knorpels blau färbt.

Nach der selektiven Färbung des Kerns mit Hämalaun schloss sich die Färbung mit Ponceau-Säurefuchsin zur Färbung der Kollagenfasern des Bindegewebes an. Anschließend erfolgte eine Differenzierung mit Phosphormolybdänsäure sowie eine Gegenfärbung der Kollagenfasern mit Lichtgrün. Im Ergebnis stellen sich kollagenes Bindegewebe grün, Zellkerne blauschwarz, Cytoplasma rot, Erythrozyten orangerot und Muskelfasern rot dar. Die gefärbten Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträgern angefertigt, mit Histokit und Abdeckgläsern fixiert und eingedeckelt.

2.3.2 Pathohistologische Beurteilung der Schnitte

Die pathohistologischen Untersuchungen erfolgten nach dem Schema der Abbildung 4.

Untersucht wurden jeweils zwei Querschnitte pro Gelenkoberfläche, auf denen mindestens ca. 3 cm Gelenkoberfläche makroskopisch zu erkennen waren. Die Auswertung geschah auf der gesamten zu erkennenden Oberfläche mit einem Lichtmikroskop in einer 132-fachen und 264-fachen Vergrößerung. Allgemein erfolgte die Klassifizierung der histologischen Veränderungen in vier Gelenkklassen in Anlehnung an GOEDEGEBUURE et al. (1988).

Die proximalen und distalen Gelenkflächen des Humerus sowie Femurs wurden pathohistologisch auf folgende Merkmale analysiert:

Oberflächenstruktur (glatt, rau, dick, Erosionen), Asbestfaserung, Hyperplasie, Vaskularisierung des hyalinen Gelenkknorpels sowie Nekrose- bzw. Verknöcherungszonen innerhalb des hyalinen Gelenkknorpels.

Die einzelnen Merkmale wurden jeweils zusammenfassend quantitativ und qualitativ (Tabelle 3) mit + (geringgradig verändert), ++ (mittelgradig verändert), +++ (hochgradig verändert) beurteilt und anschließend zu einer Gesamtbewertung für die jeweilige Gelenkfläche auf einer Skala von 0 (normal) bis 3 (hochgradige Veränderungen) in Klassen zusammengefasst.

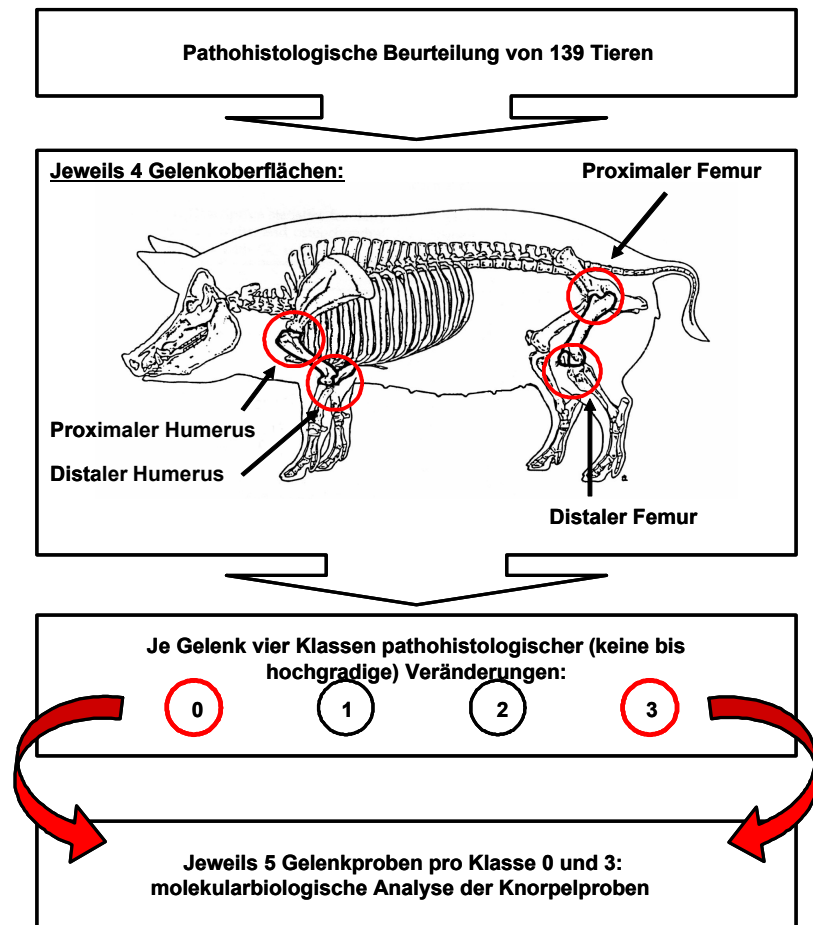


Abbildung 4: Ablauf der pathohistologischen Beurteilung

Von 139 Tieren wurden die pathohistologischen Veränderungen der proximalen und distalen Gelenkoberflächen von Humerus und Femur beurteilt und in vier Gelenkklassen von 0 (keine Veränderungen) bis 4 (hochgradige Veränderungen) eingeteilt. Aus den Gelenkklassen 0 und 3 wurden jeweils 5 Proben pro Gelenkoberfläche molekularbiologisch analysiert.

Die Bewertung der Klasse 0 erhielten die Gelenkflächen, deren Schnitte keine pathohistologischen Veränderungen erkennen ließen. Geringgradige pathohistologische Veränderungen durch Asbestfaserung und Hyperplasie und ggf. geringgradige Vaskularisierungen des Gelenkknorpels wurden der Klasse 1 zugeordnet. Verschiedene mittelgradige und hochgradige Veränderungen der Oberflächenstruktur sowie Veränderungen der tieferen Struktur im Gelenkknorpel, wie hochgradige Asbestfaserung, Hyperplasie und starke Vaskularisierung, kennzeichneten die Klasse 2 der pathohistologischen Veränderungen. Gelenkknorpel, welcher aufgrund von massiven Veränderungen kaum noch typische Merkmale des hyalinen Knorpelgewebes aufwies oder bereits Nekrosen und/oder Verknöcherungen zeigte, wurde in die Klasse 3 eingeordnet.

Tabelle 3: Pathohistologisches Bewertungsschema für die histologischen Schnitte aus den proximalen und distalen Gelenkflächen von Humerus und Femur sowie Zuordnung zu definierten Bewertungsklassen 0 bis 3 mit den einzelnen Merkmalsausprägungen

Klasse/ Merkmal	Oberfläche	Asbest- faserung	Vaskulari- sierung	Hyperplasie	Nekrose/Ver- knöcherung
0				+	
0		+			
0	+				
1	+, ++, +++	+, ++	+	+, ++	
2	++, +++	++, +++	++, +++	++, +++	+
3	++, +++	++, +++	++, +++	++, +++	+, ++, +++

+ = geringgradige Veränderung;
 ++ = mittelgradige Veränderung;
 +++ = hochgradige Veränderung

„Histologie/Tier“-Gruppierung

Um eine Beurteilung der einzelnen Tiere zu ermöglichen, wurden die vier einzelnen Beurteilungen der Gelenkoberflächen (Gelenkklassen von 0 bis 3) jedes Tieres addiert und ergaben die „Histologie/Tier“-Gruppierung von 0 bis ≥ 9 . Zur Veranschaulichung wurden die „Histologie/Tier“-Gruppen in vier Histologiegruppen I bis IV zusammengefasst (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zuordnung der „Histologie/Tier“-Gruppierung von 0 bis ≥ 9 zu den Histologiegruppen I bis IV der histologischen Schnitte vom proximalen und distalen Humerus bzw. Femur

„Histologie/Tier“-Gruppierung	0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9
Histologiegruppe	I			II		III		IV		

2.4 Expressionsanalysen und Probenauswahl

2.4.1 Allgemeines

Um möglichst RNase-frei im molekularbiologischen Labor zu arbeiten, wurden grundsätzlich Einmal-Handschuhe getragen. Im Umgang mit Ethidiumbromid sowie mit phenolhaltigen Stoffen (mutagene, cancerogene und sehr giftige Stoffe) wurden zum Schutz der Gesundheit Nitril-Handschuhe verwendet und entsprechend zur jeweiligen Anwendung wurde unter dem Abzug gearbeitet.

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien, daraus hergestellte Puffer und Lösungen, kommerziell erwerbliche Reaktionskits und sämtliche Gebrauchsgegenstände sind im Anhang aufgeführt.

Für den Umgang mit RNA-, cDNA-, PCR-Mastermix oder PCR-Produkten wurden getrennte Arbeitsplatzbereiche benutzt. Das Material, welches in Kontakt mit RNA- oder PCR-Material kam, wurde bei 121°C 1,5 h autoklaviert. Dazu gehörten u. a. Pipettenspitzen (in speziell getrennten Boxen für die Arbeit mit RNA-, cDNA-, Mastermix- bzw. PCR-Produkten), Lösungen wie z. B. 10 x TBE-Puffer oder Reinstwasser. Gerade beim Umgang mit RNA

wurde darauf geachtet, dass die Materialien RNase-frei waren. Dies wurde durch Autoklavieren der Materialien, UV-Bestrahlung oder aber durch die Behandlung mit Hitze (180°C, 6 h) erreicht.

2.4.2 Homogenisierung und Isolierung der Gesamt-RNA

Die in -80°C gelagerten Knorpelproben wurden unter flüssigem Stickstoff mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühltem Mörser mit Pistill zu feinem Pulver homogenisiert. Das Abfüllen des Homogenats in einzelne Eppendorfgefäße wurde mit einem gereinigten, in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Spatel durchgeführt.

Die RNA-Isolierung erfolgte in zwei Schritten nach der TRIspin-Methode nach RENO et al. (1997) für hartes, hypocelluläres Bindegewebe wie z. B. Knorpel. Zu Beginn wurde die Gesamt-RNA mit TRIreagent[®] nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Aufgrund von Verunreinigungen sowie DNA-Resten wurde eine Reinigung der RNA mit dem RNeasy Mini Kit[®] sowie ein DNA-Verdau auf der Silicatsäule des Kits angeschlossen.

Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIreagent[®]

Das Homogenat jeder Gelenkoberfläche wurde in drei Ansätzen mit je ca. 50 mg/ml TRIreagent[®] abgewogen. Durch die Zugabe von TRIreagent[®] war davon auszugehen, dass alle mit der Lösung in Kontakt kommenden Zellen lysiert und so die vorhandenen Proteine, DNA sowie RNA und andere Zellstrukturen freigesetzt wurden. Um eine bessere Dissoziation des TRIreagents[®] ins Gewebe zu gewährleisten, wurde ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform und einer erneuten Inkubation von 2 bis 5 min bei Raumtemperatur und anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C bildete sich ein Drei-Phasen-Gemisch. Die denaturierten Proteine befanden sich in der unteren Phenolphase, DNA vornehmlich in der Interphase, während sich die RNA-Moleküle in der oberen, wässrigen Phase konzentrierten. Die Denaturierung von zellulären Proteinen – und damit auch der Ribonukleasen – durch das TRIreagent[®] war entscheidend, um den Abbau von zytoplasmatischer und nukleärer RNA zu verhindern. Die Zugabe des Chloroforms erfolgte, um einen höheren Dichtegradienten zwischen den einzelnen Komponenten der Lösung zu erreichen.

Die obere, wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Bei der Überführung war darauf zu achten, dass die Interphase nicht mit aufgenommen wurde, da sie große Mengen an DNA enthielt.

Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen, das entstandene RNA-Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen – um Salze und Propanolrückstände zu entfernen – und erneut 5 min bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet ca. 10 min im offenen Eppendorfgefäß bei Raumtemperatur getrocknet. Dabei war darauf zu achten, dass das Pellet nicht vollständig austrocknete, um eine Herabsetzung der Löslichkeit zu verhindern. Anschließend wurde das Pellet in 30 µl DEPC-Wasser gelöst.

RNA-Reinigung mithilfe einer Silicatsäule des RNeasy Mini Kits[®] und DNA-Verdau

Die in DEPC-Wasser gelöste Gesamt-RNA wurde mit DEPC-Wasser aus dem RNeasy Mini Kit[®] auf 100 µl Volumen aufgefüllt. Nach Zugabe von 350 µl RLT-Puffer sowie 250 µl 99 %igem Ethanol wurde die Lösung durch Pipettieren gemischt und auf die Silicatsäule des Kits gegeben. Bei der Reinigung des RNA-Eluats handelt es sich um ein Affinitätsprinzip, bei dem die Silicatsäule des Kits pH-spezifisch die Gesamt-RNA bindet. Die Reinigung sowie der DNA-Verdau erfolgten nach Angaben des Herstellers mit einem integrierten DNA-Verdau, der auf der Silicatsäule durchgeführt wurde. Nach der letzten Waschung der Silicatsäule wurde diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl DEPC-Wasser überschichtet. Es erfolgte eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur zur besseren Elution der Gesamt-RNA bevor 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert wurde. Durch die Reinigung wurde die Gesamt-RNA von Mineralresten, DNA sowie Proteinen befreit.

Prüfung der RNA-Qualität und -Quantität

Die Bestimmung der Gesamt-RNA-Qualität erfolgte mithilfe von SYBRGreen II[®] durch eine Agarose-Gelelektrophoreseauftrennung anhand des Mengenverhältnisses der 28S- zur 18S-Bande der rRNA (IVELL 1998). SYBRGreen II[®] hat in Verbindung mit RNA eine höhere Affinität sowie eine 7-fach höhere Fluoreszenz als Ethidiumbromid (MOLPROBES 2001). Dadurch ist SYBRGreen II[®] deutlich sensitiver und besser geeignet, geringe Mengen RNA qualitativ in der Gelelektrophorese darzustellen als Ethidiumbromid. SYBRGreen II[®] ist

lichtempfindlich, sodass die Gefäße der Lösungen mit Alufolie eingewickelt und die Arbeitsschritte mit möglichst wenig Licht durchgeführt wurden.

Die Handhabung und Sensitivität der unterschiedlichen Versuchsprotokolle wurden in Vorversuchen nach den Angaben des Herstellers getestet. Der Hersteller gab drei verschiedene Versuchsprotokolle an, die im Anhang (Kapitel 8.1) genau beschrieben und verglichen werden. Aufgrund der einfachsten Handhabung und hohen Sensitivität wurde die Variante „Vorgefärbtes Gel“ gewählt, in der die SYBRGreen II[®]-Lösung zum noch flüssigen Gel hinzugegeben wird.

Zur Beurteilung der Qualität der aus den Proben gewonnenen Gesamt-RNA wurde diese elektrophoretisch in einer hydratisierten Agarose-Gelmatrix aufgetrennt. Hierzu wurde eine Flachbettelektrophoreseapparatur mit einem 1 %igen Agarosegel mit TBE-Puffer und einer Höhe von 4 mm verwendet. Für das 1 %ige Gel wurde die Agarose in TBE-Puffer in einem Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 60°C wurde SYBRGreen II[®]-Lösung in einer 1:100-Verdünnung hinzugefügt, die Lösung gemischt, in die mit Probenkämme versehene Kammer gegossen und mit Alufolie bedeckt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und die Kämme entfernt. Von der zu analysierenden Gesamt-RNA wurden jeweils 2 µl abgenommen, mit 2 µl 5 x RNA-Ladepuffer und 6 µl Reinstwasser gemischt, 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend in die durch die Kämme geformten Taschen des Gels überführt. Die Proben wurden bei 4 V/cm für 40 min elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Detektion der rRNA-Banden erfolgte aufgrund der Fluoreszenz des SYBRGreen II[®] bei 520-550 nm durch UV-Licht im Fluorimager SI mit dem Filter 530DF30. Die Dokumentation und Auswertung der digitalisierten Gele erfolgte mithilfe des Softwarepakets ImagequaNT[™].

Zur Bestimmung der Quantität wurde die RNA 1:100 mit Reinstwasser verdünnt und die Absorption im Photometer bei 260 nm (Wellenlänge, bei der Nucleinsäuren eine hohe Absorption aufweisen) bestimmt. Eine Einheit der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Dies führt zu folgender Gleichung zur Bestimmung der RNA-Quantität:

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} * 40 \mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um Verunreinigungen durch Proteine zu ermitteln, wurde ebenfalls die Wellenlänge bei 280 nm (Wellenlänge, bei der Proteine eine hohe Absorption aufweisen) gemessen, sodass die Reinheit anhand des Verhältnisses OD_{260}/OD_{280} geprüft werden konnte. Es wurden nur Proben mit einem Verhältnis größer als 1,8 verwendet.

2.4.3 Konventionelle PCR zur Herstellung einer PCR-Produkt-Standardreihe

2.4.3.1 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA wurde nach der Methode von GERARD und GRANDGENETT (1975) im programmierbaren Gradient-Cycler PTC-200 durchgeführt. Ausgehend von einem Primerpaar wurde hierbei die cDNA-Synthese von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase katalysiert. Verwendet wurde dazu die RT Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transkriptase®. Dieses Enzym gewährleistet das durchgehende Umschreiben des mRNA-Stranges in cDNA. Als Negativkontrolle wurde statt des RNA-Eluats nur Reinstwasser eingesetzt, um Kontaminationen während der cDNA-Synthese auszuschließen.

9 µl DEPC-Wasser mit 0,8 µg Gesamt-RNA, 1 µl (50 pmol) Random Hexamer-Primer sowie 3,5 µl Reinstwasser wurden 5 min bei 65°C denaturiert, auf 4°C abgekühlt und zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Anschließend wurden für die cDNA-Synthese weitere Komponenten als Mastermix hinzugefügt:

4 µl 5 x Revert Aid-Puffer (4 mM MgCl₂, 10 mM DTT)

2,5 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,5 µl RNase Inhibitor (40 U)

1 µl Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transkriptase® (200 U)

Um die Reaktionsgefäße einzusetzen, wurde eine Annealingtemperatur von 27°C für 10 min gewählt. Anschließend fand die Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA für 1 h bei 42°C statt. Nach einer Denaturierung von 1 min bei 99°C wurde die Reaktion abgestoppt.

2.4.3.2 Herstellung einer PCR-Produkt-Standardreihe für die Echtzeit-RT-PCR

Die spezifischen Gensequenzen zum Primerdesign wurden anhand der vorliegenden Gendaten der Gendatenbank ermittelt (Tabelle 5). Anschließend wurden die Primer mithilfe der Software OLIGO Explorer kreiert und mit der Software BLAST (ALTSCHUL et al. 1990) auf Übereinstimmung getestet.

Zur Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte wurde eine PCR in einem programmierbaren Gradient-Cycler PTC-200 ausgeführt. Durch die PCR sollte die Funktionalität der Primer sichergestellt und PCR-Produkt für die Standardreihe hergestellt werden. Die einzelnen PCR-Produkte der Gene wurden gereinigt (s. u.) und für die spezifischen Standardreihen verwendet. Die Sequenzen der verschiedenen gereinigten PCR-Produkte wurden jeweils durch eine Sequenzierung abgesichert.

Die Reaktionen der PCR wurden jeweils in Volumina von 50 µl durchgeführt und pro Primerpaar wurde je eine Negativkontrolle (Reinstwasser) mitgeführt. Auf Eis wurden die folgenden Komponenten sukzessiv als Mastermix zusammen pipettiert:

39 µl Reinstwasser

5 µl 10 x PCR-Puffer mit 15mM MgCl₂

0,5 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

1 µl *Forward*-Primer (20 pmol)

1 µl *Reverse*-Primer (20 pmol)

0,5 µl Supratherm DNA Polymerase[®] (5 U/µl)

3 µl cDNA-Synthese Produkt (für die Negativkontrolle Reinstwasser)

Der Ansatz wurde gemischt und bei 72°C ins Gerät verbracht. Der vereinfachte *hot start* wurde bei 72°C für 2 min und anschließend bei 94°C für 5 min durchgeführt. Danach folgten 38 Zyklen mit jeweils drei verschiedenen Temperaturphasen:

1. einer Denaturierungsphase von 20 sec bei 94°C, in der die helikalen Strukturen aufgeschmolzen wurden;

2. einer Annealingphase (20 sec; primerspezifische Annealingtemperatur vgl. Tabelle 5), in der sich die Oligonukleotide als Primer an die komplementären DNA-Abschnitte anlagerten;
3. einer Polymerisationsphase bei 72°C (20 sec), in der die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase den Primer in 3' Richtung komplementär zum DNA-Strang verlängerte.

Die Temperatur der Annealingphase wurde vom Hersteller je Primer angegeben und verwendet. Die Schmelzpunkte (T_m) wurden durch die Software der Produktionsfirma errechnet. Nach Abschluss der Zyklen wurden die Proben für weitere 5 min bei 72°C inkubiert und auf 10°C abgekühlt. Für die Sequenzen der einzelnen Ziel-mRNAs sowie GAPDH, welches als Haushaltsgen mitgeführt wurde, kamen die in Tabelle 5 genannten Primer zur Anwendung:

Tabelle 5: Primer, die für die PCR verwendet wurden

Primer	Primer länge (bp)	Sequenz	Gendatenbank- nummer	Annealing (°C)
GAPDH, <i>forward</i>	19	CGGGAAACACAAAAGCAAC	X14150	60,4
GAPDH, <i>reverse</i>	20	TCAGAGCCAGCAAGAAAGAG		
Kollagen X, <i>forward</i>	20	CCCTTTTGCTGCTGCTATTG	NM_0010005153	65,2
Kollagen X, <i>reverse</i>	19	TGTGCCTTGGTGTGGATG		
Kollagen V, <i>forward</i>	20	CATCATCCCTGCTTCTACTG	AF017079	63,0
Kollagen V, <i>reverse</i>	19	CTGCTTCACCACCTTCTTG		
Kollagen II, <i>forward</i>	19	CCCAGAAACAACACAATCC	AF201724	60,4
Kollagen II, <i>reverse</i>	20	GCCCAGTTCAGGTCTCTTAG		
Kollagen I, <i>forward</i>	20	CCAAGAAGAAGACATCCCAC	AF201723	61,2
Kollagen I, <i>reverse</i>	19	GTCATCGCACAACACATTG		
TGF-β3, <i>forward</i>	20	ACACAGCCCTCATCTAATCC	X14150	59,8
TGF-β3, <i>reverse</i>	20	GCAGAAGTTGGCATAGTAGC		

Von den PCR-Produkten wurden jeweils 5 µl abgenommen und nicht denaturiert auf einem 2 %igen Agarose-TBE-Gel elektrophoretisch bei 5 V/cm aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt, mithilfe des Fluorimager SI und einem 610RG Filter digitalisiert und mit der Software ImagequaNT™ ausgewertet. Die Analyse der Banden erfolgte im Fluoreszenzvergleich zum Molekulargewichtsmarker ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII).

PCR-Produktreinigung und Standardreihe

Die Quantifizierung der Gene erfolgte im Vergleich zu einer genspezifischen Standardreihe aus gereinigtem PCR-Produkt. Für jedes Gen wurde eine Standardreihe hergestellt, die eine Effizienz von 100 % ± 15 % und ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 98 % ($r^2 = 0,980$) aufweisen musste. Sie reichte von 10^1 bis 10^7 Moleküle/µl, sodass immer sieben Standardkonzentrationen zur Verfügung standen.

Für die Standardreihe wurde das hergestellte PCR-Produkt (vgl. Kapitel 2.4.3), welches mit dem jeweiligen Primerpaar erhalten wurde, gereinigt und verwendet. Die Quantifizierung der mRNA in der Echtzeit-RT-PCR erfolgte gegen die spezifische PCR-Produkt-Standardreihe. Die Reinigung war nötig, um mögliche Störsignale durch Primerreste, Salze und andere Verunreinigungen in der Echtzeit-RT-PCR zu vermeiden. Für die Reinigung wurde der QIAquick PCR Purification Mini Kit® verwendet:

Zu Beginn wurde die fünffache Menge des PCR-Produktvolumens an PB-Puffer zum PCR-Produkt-Eluat hinzugegeben. Die Silicat-Matrix der Kitsäule bindet das PCR-Produkt pH-spezifisch bei einem pH-Wert von 5 bis 6. Bei der Messung des pH-Werts der Eluat-Puffer-Lösung ergab sich, dass deren pH-Wert immer größer als 7,2 war, sodass die Lösung mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 bis 6 eingestellt wurde. Die weitere Reinigung erfolgte nach Angabe des Herstellers. Die Elution des gereinigten PCR-Produkts geschah mit 30 µl DEPC-Wasser. Die Quantifizierung des gereinigten PCR-Produkts wurde anhand einer Gelelektrophorese durchgeführt. Die PCR-Produkt-Konzentration konnte aus dem Verhältnis der gemessenen Fluoreszenz des Molekulargewichtsmarkers ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) zu dem aufgetragenen PCR-Produkt bestimmt werden. Die Konzentration des aufgetragenen Markers betrug 50 ng/µl, wovon 11,2 % (5,6 ng/µl) in der vierten Bande mit der Fragmentgröße 603 bp zu finden waren. Es wurden 3 µl Marker gegen jeweils 5 µl PCR-Produkt-Eluat aufgetragen und die Fluoreszenz des Marker-Standards (Bande 603 bp) gegen

die Fluoreszenz der Proben gemessen und berechnet. Dadurch ließ sich die Konzentration (ng/μl) im Eluat bestimmen.

Die Konzentration der PCR-Produkte betrug nach der Reinigung etwa 10^{11} Moleküle/μl und wurde in einem ersten Schritt 1:100 verdünnt und auf eine Konzentration von etwa 10^9 Molekülen/μl durch Zugabe von Tris-Puffer (10 mM, pH 8,5) eingestellt. Anschließend erfolgte die genaue Verdünnung der PCR-Produkte auf exakt 10^9 Moleküle/μl mit einem Endvolumen von 500 μl. In einem weiteren Schritt wurde die Lösung mit 10^9 Molekülen/μl 1:100 mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8,5) auf 10^7 Moleküle/μl verdünnt. Es schlossen sich weitere 1:10 Verdünnungsstufen von 10^7 bis 10^1 Moleküle/μl mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8,5) an, wobei jeweils 10 μl PCR-Produkt zu 90 μl Tris-Puffer (10 mM, pH 8,5) pipettiert wurden. Die hergestellte Verdünnungsreihe diente im Folgenden als Standard für die Interpolation der Ausgangskonzentration an mRNA in unbekanntem Knorpelproben in der Echtzeit-RT-PCR.

2.4.4 Echtzeit-RT-PCR

Die Quantifizierung der mRNA von Kollagen I, Kollagen II, Kollagen V, Kollagen X, TGF-β3 und GAPDH erfolgte in einem Echtzeit-PCR-Cycler MX 3000P mit SYBRGreen I[®] als Doppelstrang-DNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff. Die quantitative Analyse der cDNA aus den Histologieklassen 0 und 3 des Gelenkknorpels wurde im Vergleich zur PCR-Produkt-Standardreihe für jedes Primerpaar auf zwei separaten 96-Well-Platten durchgeführt. Die Standardreihen wurden jeweils mit PCR-Produkt-Konzentrationen von 10^1 bis 10^7 Molekülen/μl erstellt. Die Verdünnung der cDNA wurde für jedes Primerpaar angepasst: Die cDNA-Verdünnung betrug für Kollagen V, X und TGF-β3 1:4, für Kollagen I 1:40, für Kollagen II 1:100 und für GAPDH 1:200. Jede PCR wurde mit jeweils 10 μl entsprechend vorverdünnter cDNA, 5 μl SYBRGreen[®] JumpStart Taq ReadyMix[™] und je 0,5 μl *forward* und *reverse* Primer durchgeführt und mit Reinstwasser auf 10 μl aufgefüllt. Negativkontrollen wurden in Form von Reinstwasser statt cDNA mitgeführt. Dabei wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch Dreifachbestimmungen jedes Standards und jeder cDNA-Probe durch Ermittlung des Variationskoeffizienten ermittelt. Der Variationskoeffizient der Dreifachbestimmung musste unter 30 % liegen (Intraassayvarianz). Zusätzlich wurde auf jeder Platte bei verschiedenen Messungen eines Markers eine dreifache

Poolprobe mitgeführt. Diese diente als Vergleich zwischen den verschiedenen Messungen eines Markers, durfte den Variationskoeffizienten der Poolprobe von 40 % zwischen den Platten nicht überschreiten (OVSTEBE et al. 2003) und gab die Interassayvarianz an.

Der Echtzeit-PCR-Cycler wurde auf 95°C für 10 min eingestellt, gefolgt von mehreren Zyklen der Denaturierung bei 95°C für 15 sec und Annealing bei 60°C für 30 sec. Die Anzahl der Zyklen für jedes Primerpaar ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus bei einer Annealingtemperatur von 60°C. Nach dem Ende des letzten Zyklus wurde eine Dissoziationskurve erstellt. Durch die Dissoziationskurve wurde die Schmelztemperatur der PCR-Produkte erfasst. Die Schmelztemperatur richtet sich nach der Länge und Basenzusammensetzung jedes Produkts (Tabelle 6) und ist somit spezifisch. Zur quantitativen Analyse wurde die Standardkurve nach der Methode von TESFAYE et al. (2004) verwendet. Dabei wurden die Konzentrationen der Ziel-mRNAs anhand der kalibrierten PCR-Produkt-Standardreihe ermittelt und über die parallel erhaltenen Werte für die internen Kontrollen korrigiert.

Tabelle 6: Primerspezifische Gegebenheiten von Zyklenanzahl, Schmelztemperatur und PCR-Produktlänge in der Echtzeit-RT-PCR

Primer	Zyklenanzahl	Schmelztemperatur (°C)	PCR-Produktlänge (bp)
Kollagen I	40	86,9	127
Kollagen II	34	84,0	168
Kollagen V	40	86,4	139
Kollagen X	40	81,9	109
TGF-β3	32	87,3	214
GAPDH	40	88,9	178

2.5 Statistik

2.5.1 Statistische Analyse der Tierdaten

Der Zusammenhang zwischen der Exterieur- und histologischen Beurteilung wurde mithilfe eines Chi-Quadrattestes in der SAS-Prozedur FREQ getestet. Da mit nominalskalierten Variablen (Exterieurdaten) keine Ordnungsrelation verbunden ist, kann mit solchen Variablen kein Korrelationskoeffizient berechnet werden. Als beschreibendes Maß des Zusammenhangs dient der Kontingenzkoeffizient (C). Im Vergleich zum Korrelationskoeffizient kann der Kontingenzkoeffizient nicht den Wert ± 1 annehmen und liegt maximal bei $\pm 0,8$. Um den Zusammenhang zwischen der großen Anzahl verschiedener, z. T. hoch korrelierter Mast-, Schlachtkörper- und Fleischbeschaffenheitsmerkmale und den Befunden der histologischen Untersuchung bzw. Exterieurbeurteilung zu quantifizieren, wurden in einem ersten Schritt die Fleischleistungsmerkmale sowie Daten der Aufzucht und Mast mithilfe einer Faktoranalyse (SAS-Prozedur FAKTOR) auf zwei unkorrelierende Hauptkomponenten (Faktoren) komprimiert. Die Begrenzung auf zwei Faktoren erfolgte anhand der berechneten Eigenwerte, ermittelt durch einen integrierten t-Test. Der Eigenwert eines Faktors ist der Anteil der Varianz, den ein Faktor an allen anderen Variablen erklärt. In die weitere Analyse gingen nur die beiden Faktoren ein, die einen Eigenwert größer 1 aufwiesen. Nach Auswertung der Korrelationsmatrix – der Bedeutung einzelner Fleischleistungsmerkmale innerhalb der Faktoren (Faktorladungen) – ließen sich beide Faktoren beschreiben und benennen.

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss dieser Faktoren auf die Merkmale der Exterieurbeurteilung sowie der histologischen Untersuchung überprüft. Mithilfe einer kategorischen Varianzanalyse (SAS-Prozedur GENMOD) wurde dabei auf Signifikanz, Korrelation sowie auf Regression getestet. Außer den extrahierten Faktoren gingen die Einflussfaktoren Geschlecht und Einfluss der Elterntiere der Schweine in die Signifikanzanalyse mit ein.

2.5.2 Statistische Analyse der mRNA-Expressionsanalysen

Um die Ergebnisse als Expressionsniveau im Vergleich zur kalibrierten PCR-Produkt-Standardreihe als relative Konzentration nach Bezug zur internen Kontrolle zu erhalten, wurden die Anzahl der gemessenen Kopien der mRNA in Relation zur Expression der mRNA des Haushaltsgens als *arbitrary units* (A.U.) nach folgender Formel bestimmt:

$$rel.KonzentrationGen = \frac{QuantitätGen}{QuantitätGAPDH}$$

Im Vergleich zum gemessenen Wert der Kopienanzahl steht der Ct-Wert (*cycle threshold*). Dieser wird immer am Anfang der exponentiellen Phase des Echtzeit-RT-PCR-Zyklus gemessen, bei dem die Fluoreszenz der Probe einen definierten Schwellenwert (*threshold*) überschreitet. In dieser Studie wird er nur in der Darstellung der Standardkurve verwendet (vgl. Kapitel 3.2.3).

Zur statistischen Auswertung der Daten aus den Echtzeit-RT-PCR-Messungen wurde die Statistik-Software SPSS für Windows benutzt.

Nach dem Logarithmieren zur Basis 10 wurden die Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung überprüft. Alle Daten waren normalverteilt.

Potentielle Unterschiede zwischen den Proben aus den Klassen 0 und 3 der histologischen Beurteilung sowie zwischen jedem Gelenk mit den Einzelwerten (welche für jedes Gen erhalten wurden) wurden mithilfe einer einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA) mit integriertem Post-Hoc-Test (nach Tukey) in SPSS auf Signifikanz getestet.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Boxplot. Der Boxplot veranschaulicht, wie in Abbildung 5 gezeigt, den Median, das 25 %- und 75 %- Perzentil, den größten und kleinsten nicht extremen Wert sowie auch Ausreißer und Extremwerte.

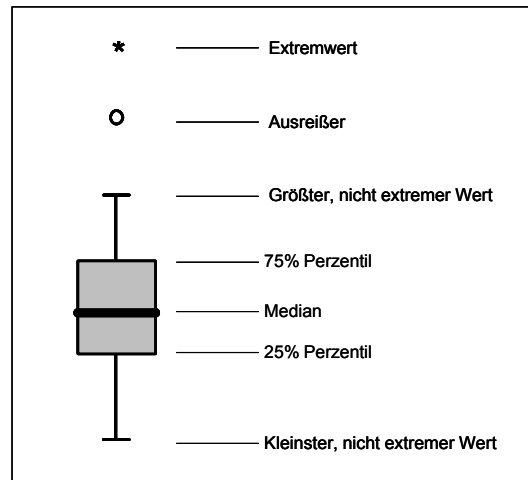


Abbildung 5: Bedeutung der Symbole im Boxplot

Darstellung von Extremwerten, Ausreißern, größtem und kleinstem, nicht extremen Wert sowie 75 % und 25 % Perzentil und Median im Boxplot

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Exterieurbeurteilung und der Histologiebefunde

3.1.1 Exterieurbeurteilung der Versuchstiere

Um abnormale Fundamentstellungen bewerten und vergleichen zu können, wurden die linearen Exterieurbewertungen (von 0 bis 3) pro Tier addiert und zur „Exterieurgruppe/Tier“ zusammengefasst. Die Skala von 0 bis 3 beschreibt Tiere, die ein optimales Fundament zeigten („Exterieurgruppe/Tier“ = 0), sowie Tiere mit auffälligen starken Abweichungen vom optimalen Fundament („Exterieurgruppe/Tier“ ≥ 3). Bei der Exterieurbewertung von 139 Tieren wiesen insgesamt 122 Tiere (87,8 %) Abweichungen vom optimalen Wert auf, wobei sogar 39 Tiere (28,1 %) in die „Exterieurgruppe/Tier“ ≥ 3 (auffällige, starke Abweichungen vom optimalen Wert) eingestuft wurden (Abbildung 6).

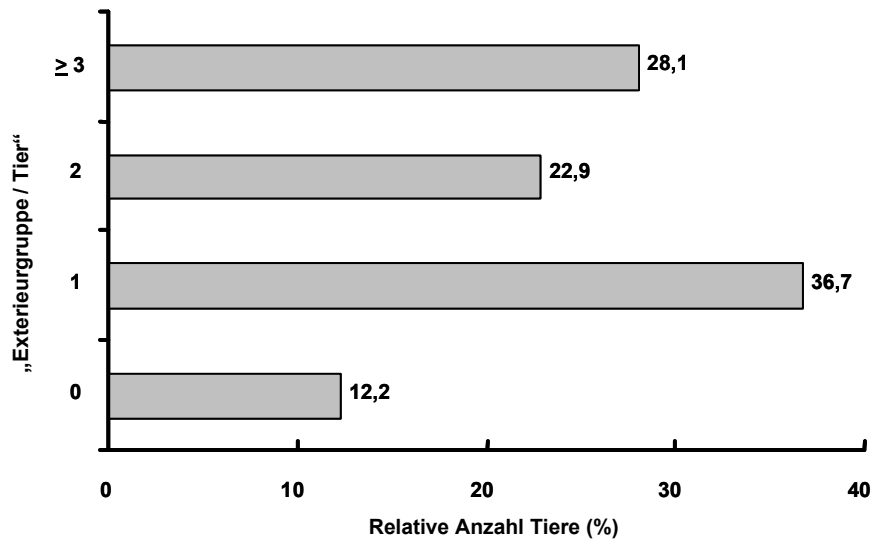


Abbildung 6: Zusammenfassende Darstellung der Exterieurbeurteilung bei 139 Mastschweinen

Relative Anzahl der Tiere [%] pro „Exterieurgruppe/Tier“ von 0 bis ≥ 3

0 = optimales Fundament, keine Abweichungen vom optimalen Wert

1 = leichte Abweichungen vom optimalen Fundament

2 = mehrere, vom optimalen Fundament abweichende Exterieurmerkmale

≥ 3 = auffällig starke Abweichungen vom optimalen Fundament

Die „Exterieurgruppe/Tier“ bezeichnet die Summe aus drei einzelnen Fundamentmerkmalen in der Exterieurbeurteilung. Die einzelnen Merkmale sind: 1.) Fundament vorne, Winkelung, 2.) Fundament hinten, Winkelung und 3.) Fundament hinten, Stellung, jeweils beurteilt auf einer Skala von 0 (keine Abweichungen vom Optimum) bis 2 (starke Abweichungen vom Optimum).

3.1.2 Histologische Beurteilung der Gelenkknorpelschnitte

Bei der Probenahme konnten vereinzelt makroskopische Läsionen der Gelenkknorpeloberfläche beobachtet werden. Diese Erkenntnisse gingen allerdings nicht in die Auswertung mit ein, da keine durchgängige geschulte pathologische Beurteilung möglich war.

Ein Beispiel der Veränderungen ist in Abbildung 7 dargestellt.

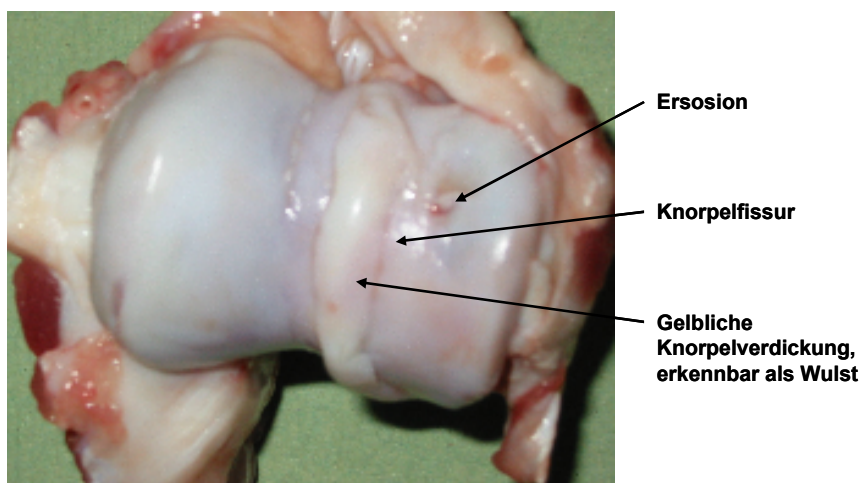


Abbildung 7: Beispiel von pathologischen Veränderungen der distalen Femuroberfläche
Erkennbare Erosion und Fissurbildung mit knorpeliger Verdickung

3.1.2.1 Mikroskopische Untersuchung der histologischen Gelenkknorpelschnitte

Die proximalen und distalen Gelenkflächen des Humerus sowie Femurs wurden auf histologische Merkmale, wie z. B. Oberflächenstruktur, Asbestfaserung, Hyperplasie und Nekrose- bzw. Verknöcherungszonen, untersucht und dementsprechend in vier Gelenkclassen von 0 (physiologischer, hyaliner Gelenkknorpel ohne Veränderungen) bis 3 (hochgradige, massive Veränderungen der hyalinen Knorpelstruktur) eingeordnet.

Bei der Auswertung der histologischen Schnitte von 139 Tieren der F2-Generation konnte die zuvor anhand der Literatur durchgeführte Klassifizierung des Gelenkknorpels (vgl. Kapitel 2.3.2) belegt werden. In Abbildung 8 bis Abbildung 13 sind die histologischen Beurteilungen und Veränderungen beispielhaft dargestellt. Abbildung 8 zeigt den physiologischen hyalinen Gelenkknorpel, Abbildung 9 geringgradig veränderten und Abbildung 10

mittelgradig veränderten Gelenkknorpel. Vor allem Spaltenbildung, Vaskularisierung, Ossifikationszentren sowie Vorkommen von Geröllzysten machen die gravierenden Veränderungen der Klasse 3 deutlich und sind in Abbildung 11 bis Abbildung 13 zu erkennen.

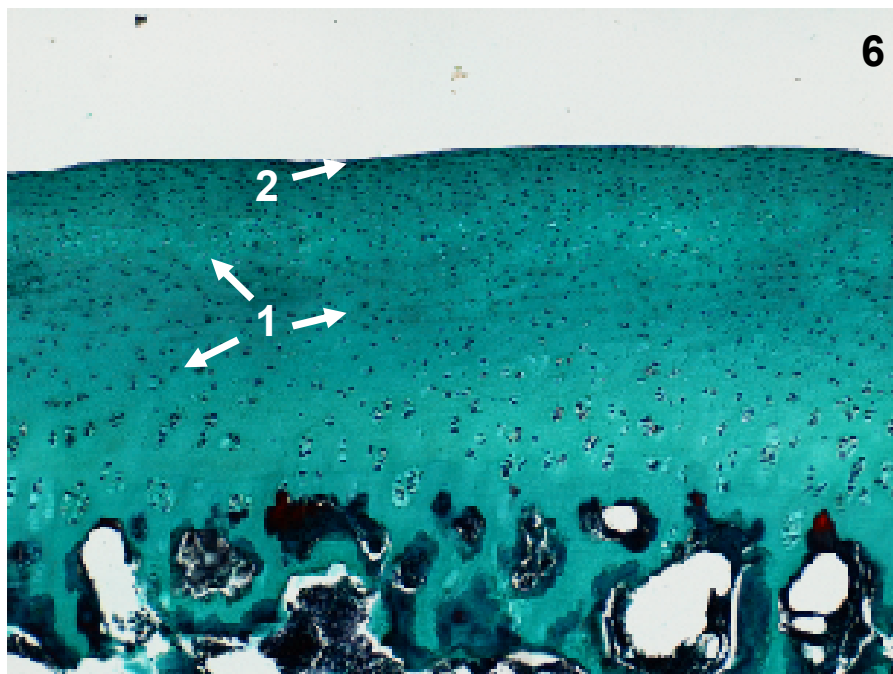


Abbildung 8: Histologischer Schnitt in Masson-Goldner Färbung am proximalen Humerus als Beispiel für die Histologie-Gelenkklasse 0

Physiologische, hyaline Knorpelstruktur mit homogener Knorpelmatrix (1) und glatter Oberfläche (2)

(132-fache Vergrößerung)

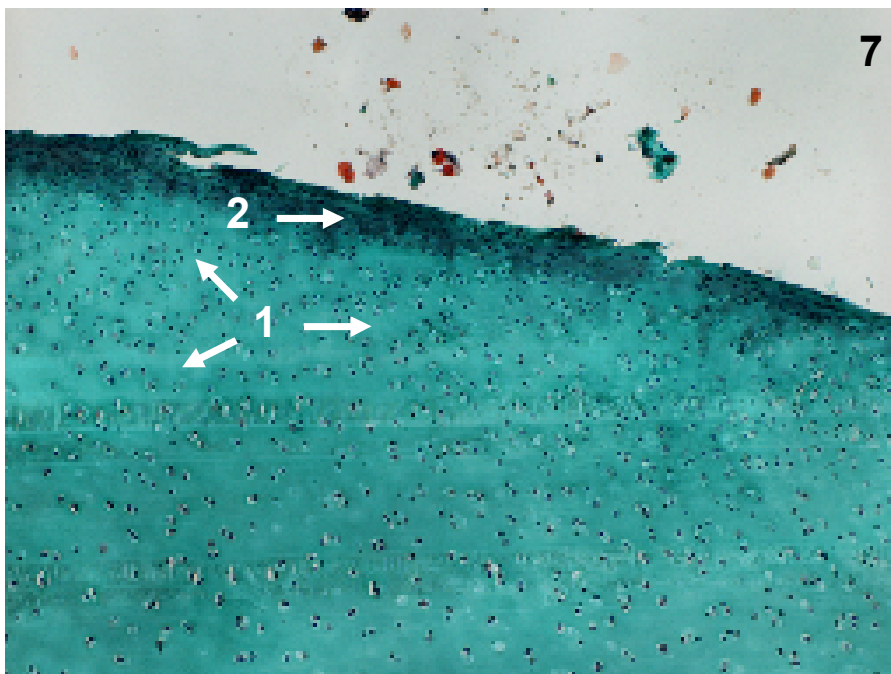


Abbildung 9: Histologischer Schnitt in Masson-Goldner Färbung am proximalen Humerus als Beispiel für die Histologie-Gelenkkategorie 1

Geringgradige, pathohistologisch veränderte Knorpelstruktur mit homogener Knorpelmatrix (1) und einer leicht angerauten Oberfläche, die beginnende Asbestfaserung sowie eosinophile Matrix zeigt (2)

(132-fache Vergrößerung)

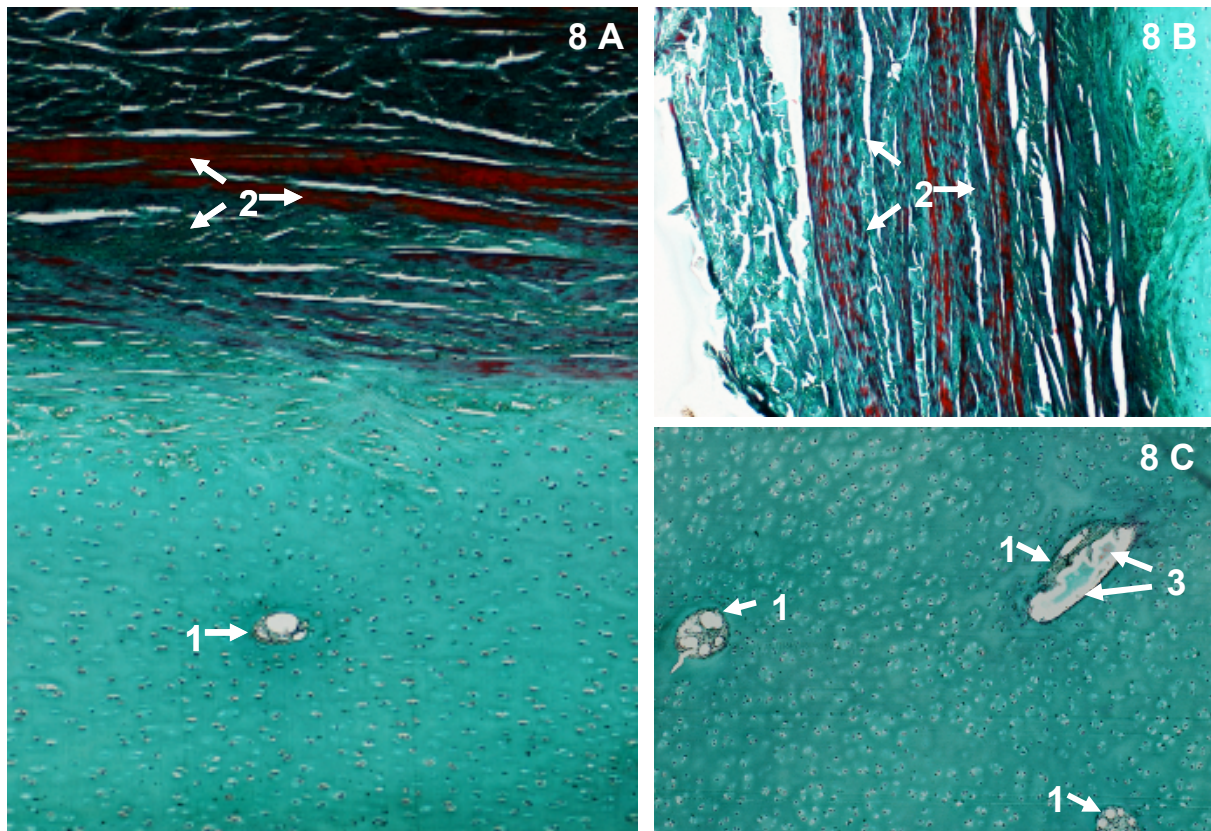


Abbildung 10: Histologischer Schnitt in Masson-Goldner Färbung am proximalen Humerus als Beispiel für die Histologie-Gelenkkategorie 2

A: Mittelgradige pathohistologisch veränderte Knorpelstruktur mit homogener Knorpelmatrix; Kapillareinsprossung (1) sowie starke oberflächliche Asbestfaserung mit eosinophiler Matrix (2)

(132-fache Vergrößerung)

B: Starke oberflächliche Asbestfaserung mit eosinophiler Matrix (2)

(264-fache Vergrößerung)

C: Kapillaransammlung (1) mit einzelnen Erythrozyten (3)

(264-fache Vergrößerung)

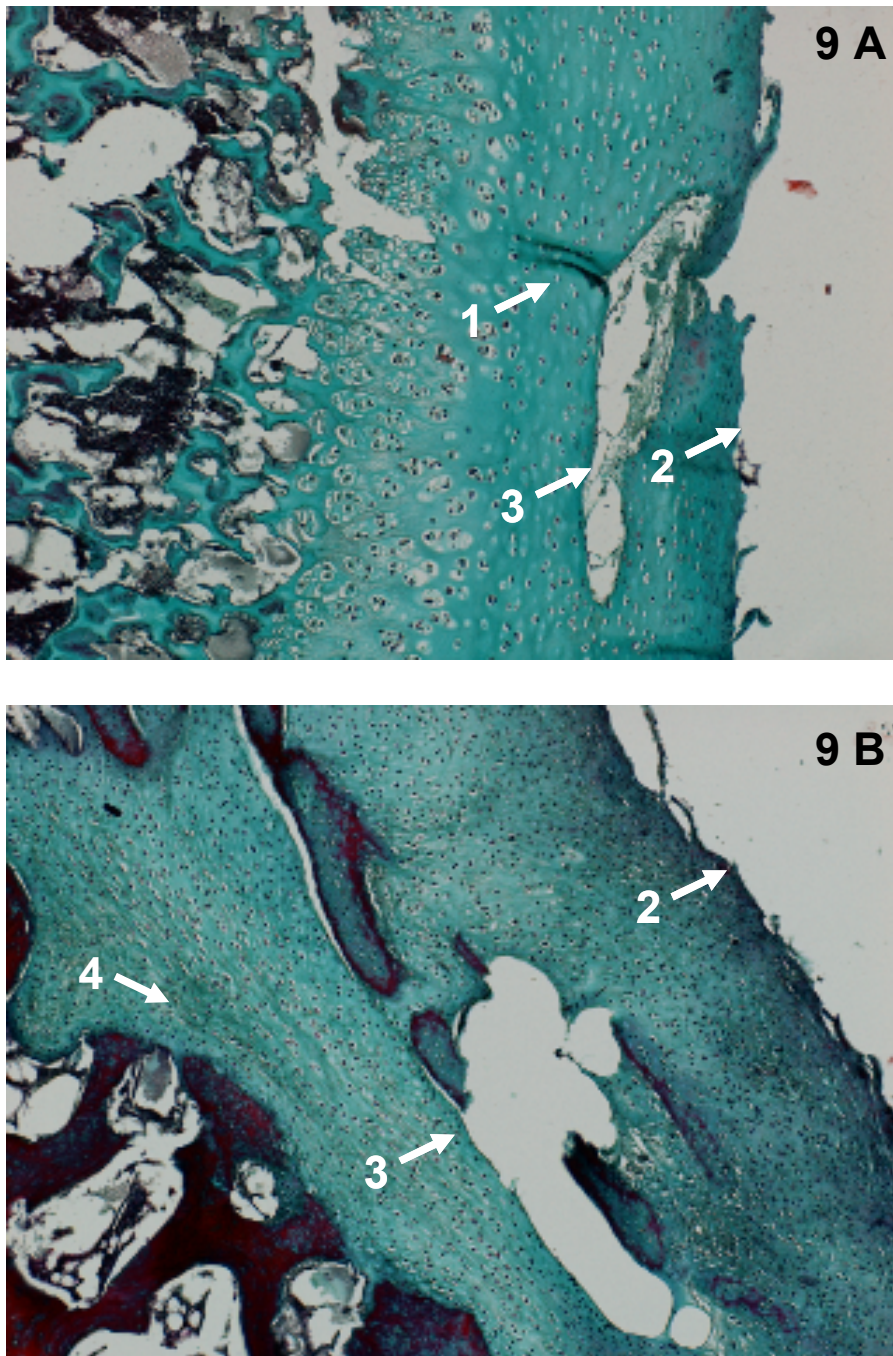


Abbildung 11: Histologischer Schnitt in Masson-Goldner Färbung am distalen Femur als Beispiel für die Histologie-Gelenkklasse 3

A: Hochgradige histopathologische Veränderungen mit Kapillareinsprossung (längs angeschnitten, 1) sowie oberflächliche Asbestfaserung (2) und vertikale Spaltenbildung (3) (264-fache Vergrößerung)

B: Hochgradige histopathologische Veränderungen mit oberflächlicher Asbestfaserung (2), vertikaler Spaltenbildung (3) und beginnender Demaskierung der Kollagenfasern im tieferen Knorpelgewebe (4) (132-fache Vergrößerung)

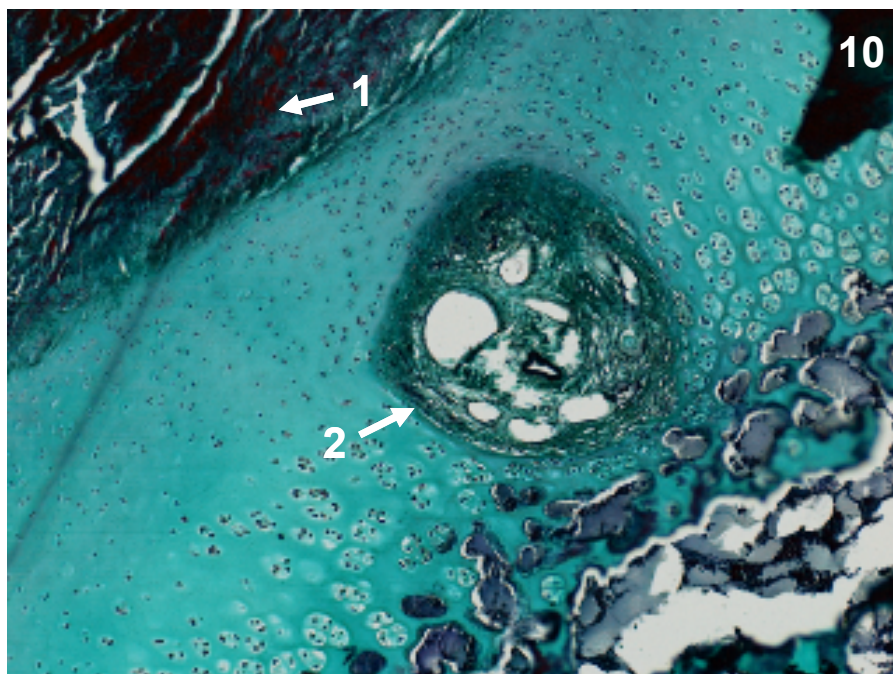


Abbildung 12: Histologischer Schnitt in Masson-Goldner Färbung am distalen Femur als Beispiel für die Histologie-Gelenkklasse 3

Hochgradige histopathologische Veränderungen mit starker oberflächlicher Asbestfaserung und eosinophiler Matrix (1) sowie einer Geröllzyste (2) (264-fache Vergrößerung)

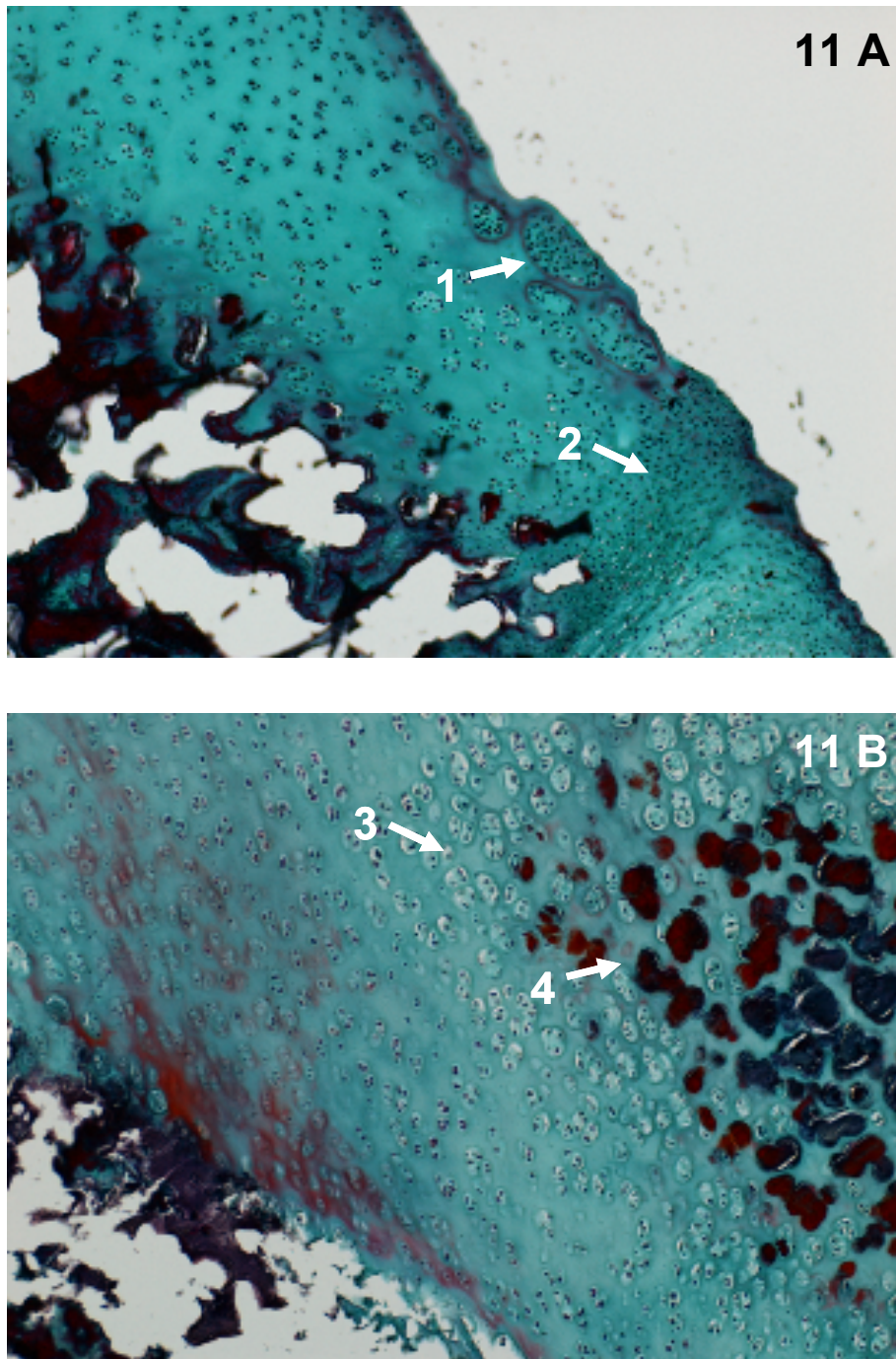


Abbildung 13: Histologischer Schnitt in Masson-Goldner Färbung am distalen Humerus als Beispiel für die Histologie-Gelenkklasse 3

A: Hochgradige histopathologische Veränderungen mit Chondrozytencluster (1) sowie fibroelastische Faserzüge (132-fache Vergrößerung)
B: Hochgradige histopathologische Veränderungen mit Chondrozytenhyperplasie (3) und Ossifikationszentren (4) in hyaliner Knorpelmatrix (264-fache Vergrößerung)

3.1.2.2 Histologische Beurteilung der Gelenkoberflächen

Die proximalen und distalen Gelenkflächen des Humerus sowie Femurs wurden pathohistologisch analysiert und in vier Gelenkklassen von 0 (keine Veränderungen) bis 3 (massive Veränderungen) eingeordnet. Es ergab sich folgende Verteilung auf die Klassen:

Mehr als die Hälfte der Gelenkoberflächen (58,0 %) wiesen geringe Gelenkveränderungen auf. Keine Gelenkveränderungen waren bei 15,2 % sichtbar. Bei 17,2 % waren mittlere und bei 9,3 % starke Gelenkveränderungen zu beobachten (Abbildung 14).

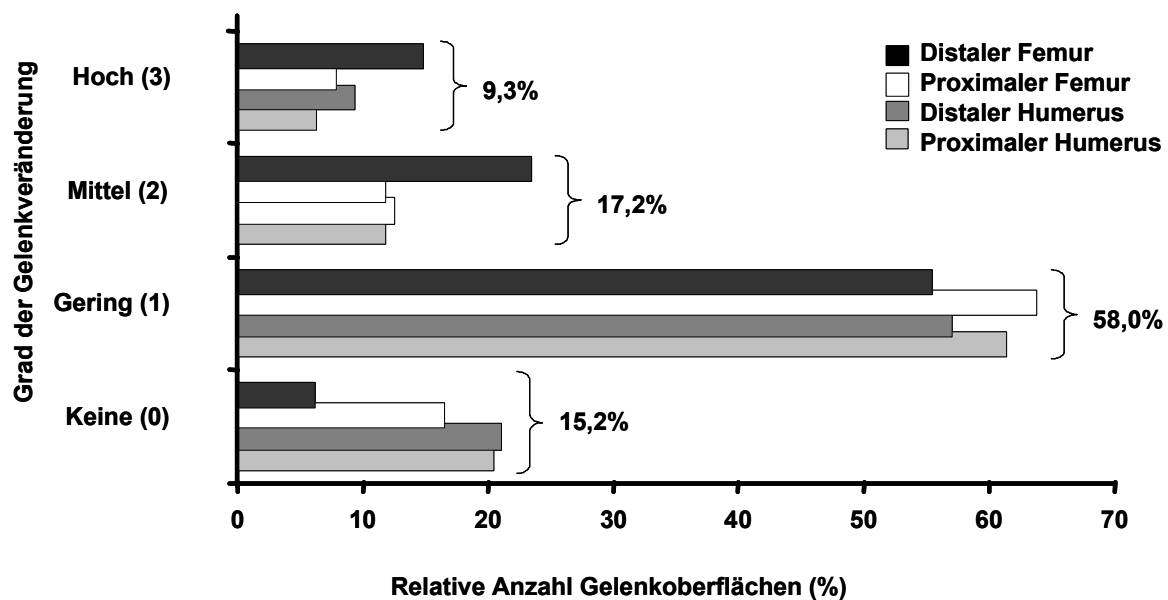


Abbildung 14: Verteilung der Gelenkoberflächen auf die Gelenkklassen 0 bis 3 sowie deren prozentuale Anteile an den gesamten Gelenkveränderungen

An der Gelenkfläche des distalen Femurs konnten bei der Beurteilung die häufigsten Veränderungen isoliert werden. Die wenigsten Veränderungen wies die Knorpelmatrix des proximalen Humerus auf (Abbildung 15), wobei die Unterschiede nicht signifikant waren.

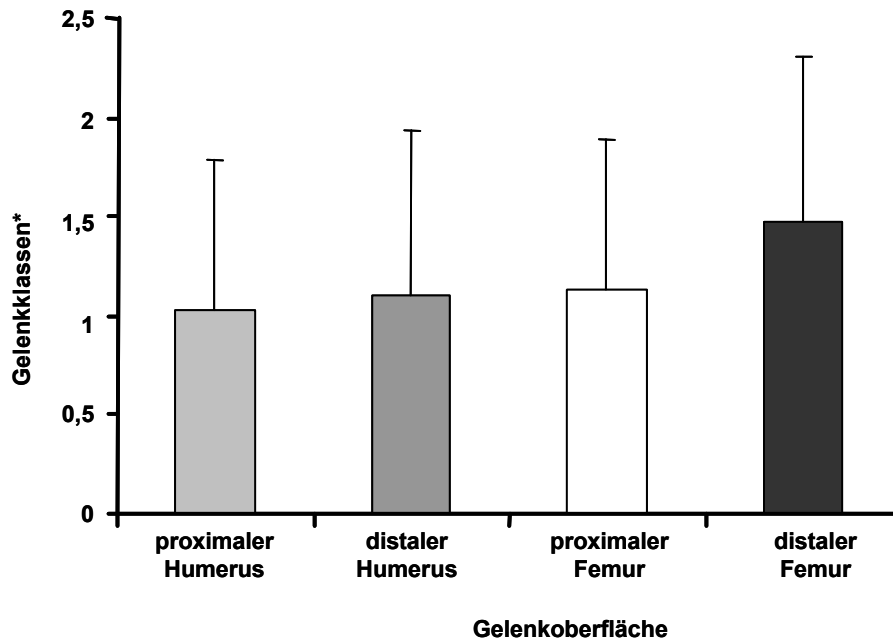


Abbildung 15: Vergleich der Mittelwerte (\pm SD) aus den Gelenkclassen* für jede Gelenkfläche

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte von den verschiedenen Gelenkoberflächen beobachtet werden.

* Gelenkclassen: 0 = physiologisch,
 1 = geringgradige histologische Veränderungen,
 2 = mittelgradige histologische Veränderungen,
 3 = hochgradige histologische Veränderungen

3.1.2.3 Histologische Beurteilung der Gelenkoberflächen pro Tier

Um eine Beurteilung der einzelnen Tiere zu ermöglichen, wurden die vier einzelnen Beurteilungen der Gelenkoberflächen (Gelenkclassen von 0 bis 3) jedes Tieres addiert („Histologie/Tier“ 0 bis \geq 9) und zur Veranschaulichung in vier Histologiegruppen (I bis IV) zusammengefasst. Dabei wurden der Histologiegruppe I die „Histologie/Tier“-Klassen 0 bis 2, der Histologiegruppe II die „Histologie/Tier“-Klassen 3 und 4, der Histologiegruppe III die Klassen 5 und 6 und der Histologiegruppe IV die „Histologie/Tier“-Klassen 7 bis \geq 9 zugeordnet.

Kein Tier wies die Klasse 0 auf allen vier Gelenkoberflächen auf. Insgesamt waren es 14,2 % der beurteilten 139 Tiere, die auf einem Gelenk mittelgradige oder auf zwei Gelenken geringgradige pathohistologische Veränderungen (Histologiegruppe I) zeigten. 15,5 % der Tiere waren von starken Veränderungen auf mehreren Gelenken (Histologiegruppe IV) betroffen, wobei kein Tier hochgradige starke histologische Veränderungen („Histologie/Tier“-Gruppe 10 bis 12) auf allen vier Gelenkoberflächen aufwies (Abbildung 16).

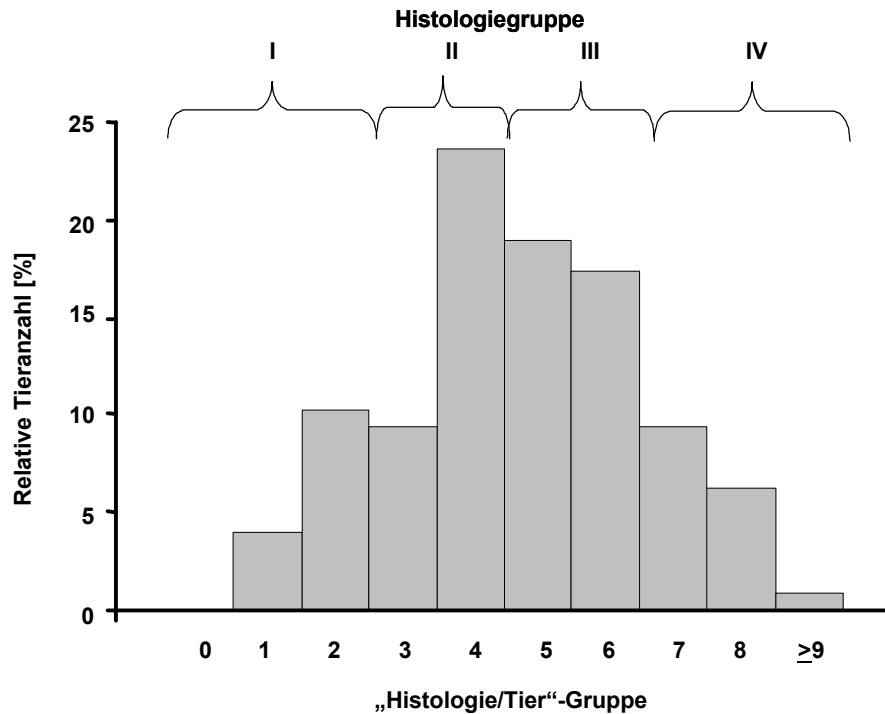


Abbildung 16: Darstellung der relativen Tieranzahl [%] innerhalb der „Histologie/Tier“-Gruppen von 0 bis ≥ 9 und Zusammenfassung zu Histologiegruppen I bis IV

0 = Tiere mit vier physiologischen Gelenkknorpeloberflächen

≥ 9 = Tiere mit mehreren stark veränderten Gelenkknorpeloberflächen

Die „Histologie/Tier“-Gruppe ist die Summe der einzelnen histologischen Gelenkbeurteilungen pro Tier, die sich aus den Noten 0 (keine Veränderungen) bis 3 (hochgradige pathohistologische Veränderungen) der proximalen/ distalen Gelenkoberflächen des Humerus bzw. Femurs zusammensetzt. Diese wurden zur besseren Veranschaulichung in vier Histologiegruppen von I (keine bis geringgradige pathohistologische Veränderungen) bis IV (massive pathohistologische Veränderungen) zusammengefasst.

3.1.3 Zusammenhang zwischen Exterieurbeurteilungen und histologischen Befunden

Tabelle 7 beinhaltet die Ergebnisse des Chi-Quadrattests zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen den verschiedenen Exterieurmerkmalen und histologischen Befunden. Dabei konnte erwartungsgemäß festgestellt werden, dass bei einer optimalen Winkelung der vorderen Gliedmaße auch eine optimale Winkelung der Hinterhand vorlag. Außerdem war erkennbar, dass, wenn ein Gelenk einer Gliedmaße betroffen war, das zweite Gelenk derselben Gliedmaße ebenfalls Veränderungen aufwies.

Ergebnisse

Beim Vergleich von Histologiedaten und transformierten Daten der Exterieurbeurteilung konnten signifikante mittlere Übereinstimmungen der Beurteilungen der Gelenkoberflächen mit den Exterieurmerkmalen festgestellt werden (Tabelle 7).

Vor allem zwischen den histologischen Beurteilungen der distalen Gelenkoberflächen von Humerus und Femur sowie des proximalen Humerus mit der Winkelung bzw. Stellung der hinteren Gliedmaße ließen sich signifikante mittlere Übereinstimmungen beobachten. Dies wurde weiter durch den Zusammenhang zwischen der Winkelung vorne mit der Winkelung hinten bestätigt.

Tabelle 7: Darstellung signifikanter Kontingenzen aus dem Chi-Quadratstest zwischen den verschiedenen Beurteilungsmerkmalen von Exterieur und Histologie

Merkmal	<u>Histologie</u>				<u>Exterieur</u>		
	prox. Humerus	dist. Humerus	prox. Femur	dist. Femur	Winkel vorne	Winkel hinten	Stellung hinten
<u>Histologie</u>							
prox. Humerus							
dist. Humerus	*						
	0,339						
prox. Femur							
dist. Femur		**					
		0,478					
<u>Exterieur</u>							
Winkel vorne		*	*				
		0,325	0,291				
Winkel hinten			*		**		
			0,233		0,439		
Stellung hinten				**			
				0,272			

wenn signifikant: Kontingenzkoeffizient aufgeführt; * $p \leq 0,055$; ** $p \leq 0,01$

3.1.4 Zusammenhang zwischen Fundament-, Mast- und Fleischleistungsmerkmalen

Bei der zur Komprimierung der großen Anzahl von Fleischleistungsmerkmalen durchgeführten Hauptkomponentenanalyse wurden zwei Faktoren mit einem Eigenwert größer 1 extrahiert, die zusammen 50 % der Varianz der unabhängigen Variablen (Fleischleistungsmerkmale) erklärten.

Bei Betrachtung der relativen Bedeutung der jeweiligen Fleischleistungsmerkmale durch die Korrelationsmatrix innerhalb der Faktoren zeigte sich, dass der erste Faktor primär durch Schlachtkörpermerkmale wie z. B. Speckdicke über *M. longissimus dorsi* (SUER), Fettfläche (FEFL) und Speckdicke über der Lende (SPECKLE) beeinflusst wird. Die Korrelation zwischen diesen Merkmalen zum Faktor 1 überstieg einen Betrag von 0,5, während die Korrelation der übrigen Merkmale stark abfiel (Abbildung 17). Aufgrund dieser Faktorladung des Faktors 1 wurde er als Faktor „Schlachtkörperbeschaffenheit“ benannt.

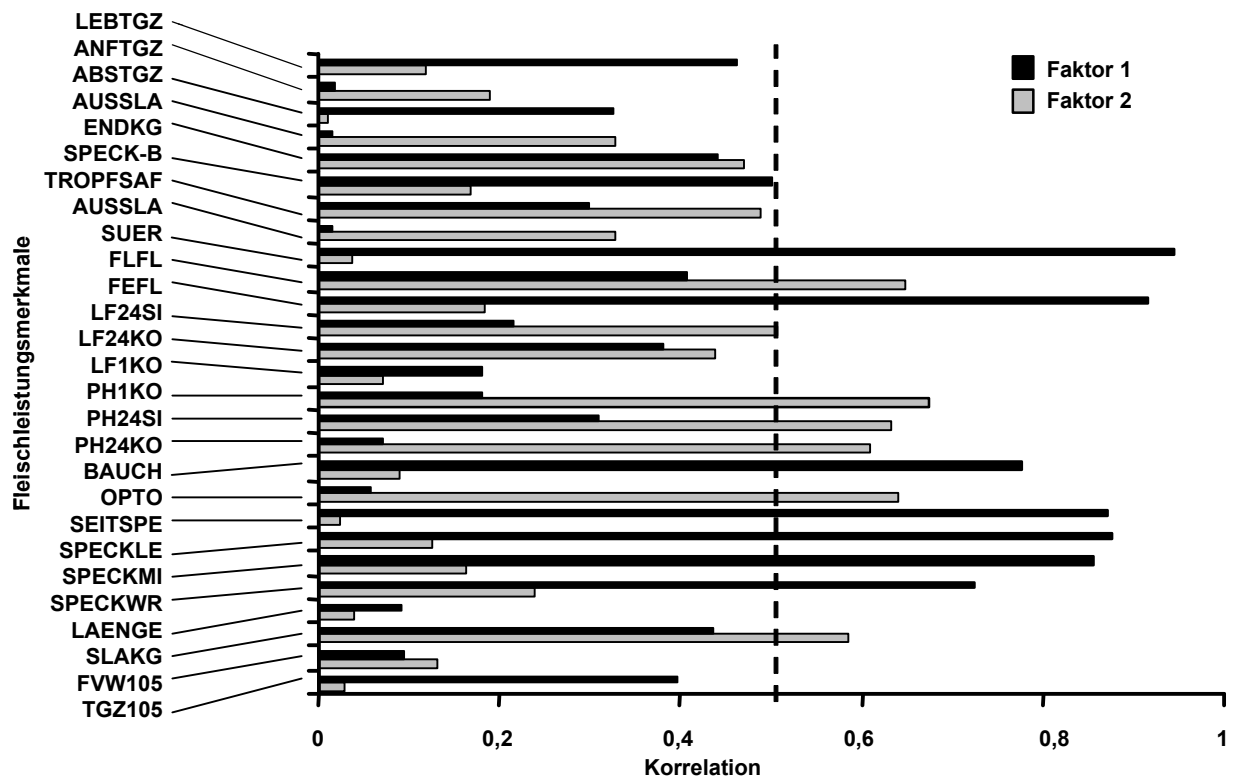


Abbildung 17: Gewichtung der Fleischleistungsmerkmale

Darstellung der Korrelationsmatrix innerhalb der Faktoren 1 („Schlachtkörperbeschaffenheit“) und 2 („Fleischbeschaffenheit“); alle Fleischleistungsmerkmale mit einer Korrelation > 0,5 wurden in die Interpretation und Benennung der Faktoren mit einbezogen. Die Abkürzungen der Fleischleistungsmerkmale sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Ergebnisse

Der zweite Faktor konnte mit den Prädiktoren der Fleischbeschaffenheit, wie z. B. pH-Wert 24 Stunden p. m. im Kotelett und Schinken (PH24KO und PH24SI) sowie Fleischfarbe (OPTO) und der Fleischfläche (FLFL), assoziiert werden (Abbildung 17). Daher wurde der Faktor 2 als Faktor „Fleischbeschaffenheit“ benannt.

Die Einflüsse der zusammenfassenden Faktoren „Schlachtkörperbeschaffenheit“ bzw. „Fleischbeschaffenheit“ sowie des Geschlechts und der Rasse der Muttersau auf die Zielmerkmale konnten teilweise abgesichert werden (Tabelle 8). Das Geschlecht der Mastschweine übte einen signifikanten Einfluss auf die Pathohistologie der distalen Humerusfläche und auf die Winkelung des vorderen Fundaments aus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Einfluss durch die Saurasse auf die Hinterhandstellung der Nachkommen existiert. Nachkommen mit einer Pietrain x Duroc-Muttersau haben eine eher enge, x-beinige Hinterhandstellung als die Nachkommen einer Duroc x Pietrain-Muttersau.

Ein genereller Einfluss von Faktor 1 („Schlachtkörperbeschaffenheit“) konnte auf das hintere Fundament im Exterieur und in Abhängigkeit vom Geschlecht auch auf zwei pathohistologische Befunde nachgewiesen werden. Sauen präsentierten bei einem höheren Speckanteil gleichzeitig eine bessere Knorpelstruktur der distalen Gelenkflächen von Humerus und Femur. Im Vergleich zu den weiblichen Tieren stellten sich bei Börgen mit höherem Speckanteil häufiger Abweichungen in der Stellung der Hintergliedmaße dar.

Ergebnisse

Tabelle 8: Signifikante Ergebnisse der kategorischen Varianzanalyse: Einfluss der Kovarianten auf die Zielmerkmale (Exterieur und Histologie), Vergleich der Regression

Zielmerkmal/ Kovariable	Sex	Sau- rasse	Faktor 1	Faktor 2	Sex x Faktor 1	Sex x Faktor 2
<u>Histologie</u>						
Proximaler Humerus						
Distaler Humerus	** ♀: 1,15 ♂: 0,0				*** ♀: -1,73 ♂: 0,0	
Proximaler Femur				* 0,64		* ♀: -0,65 ♂: 0,0
Distaler Femur					* ♀: -0,74 ♂: 0,0	
<u>Exterieur</u>						
Winkel vorne original	* ♀: 0,83 ♂: 0,0			* 0,32		
transformiert				** -0,53		
Winkel hinten original						** ♀: -0,86 ♂: 0,0
transformiert			* 0,22			
Stellung hinten original		**				
transformiert					* ♀: -0,74 ♂: 0,0	

* $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$; ♀: weibliche Tiere, ♂: männliche Tiere

Der Faktor 2 („Fleischbeschaffenheit“) zeigte bei drei Zielmerkmalen einen tendenziellen ($p \leq 0,1$), bei zwei weiteren einen signifikanten ($p \leq 0,05$) Einfluss (vgl. Tabelle 8). Es konnte dargestellt werden, dass die Fleischbeschaffenheit vor allem mit der Winkelung des Fundaments assoziiert war und Sauen bei gleicher Fleischbeschaffenheit signifikant steilere Hintergliedmaßen vorwiesen als Börgen. Die Struktur der hyalinen Gelenkfläche des proximalen Femurs war bei gleicher Fleischbeschaffenheit bei den weiblichen Tieren tendenziell besser als bei den männlichen.

3.2 Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen

3.2.1 Qualität der isolierten Gesamt-RNA

Bei der Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine gute RNA-Integrität erhalten. Die rRNA-Banden sind Indikatoren für die Beurteilung der Qualität der isolierten RNA (IVELL 1998).

Abbildung 18 illustriert das Ergebnis einer Gelelektrophorese eines SYBRGreen II[®]-gefärbten 2 %igen Agarosegels auf das jeweils 2 μ l des Knorpelextraktionseluats aufgetragen wurden. Da verschiedene Konzentrationen (280,7 ng RNA/ μ l; \pm 99,1 ng RNA/ μ l) eingesetzt wurden, ist eine unterschiedliche Intensität erkennbar. Die Ausbeute der Gesamt-RNA-Isolierung betrug 0,06 mg (\pm 0,2 mg) Gesamt-RNA/g Knorpelhomogenat.

Aus der Abbildung 18 geht hervor, dass bei der extrahierten RNA die 28S-rRNA-Bande eine etwa doppelt so starke Fluoreszenz aufwies als die 18S-Bande. Somit konnte hochwertige Gesamt-RNA gewonnen werden.

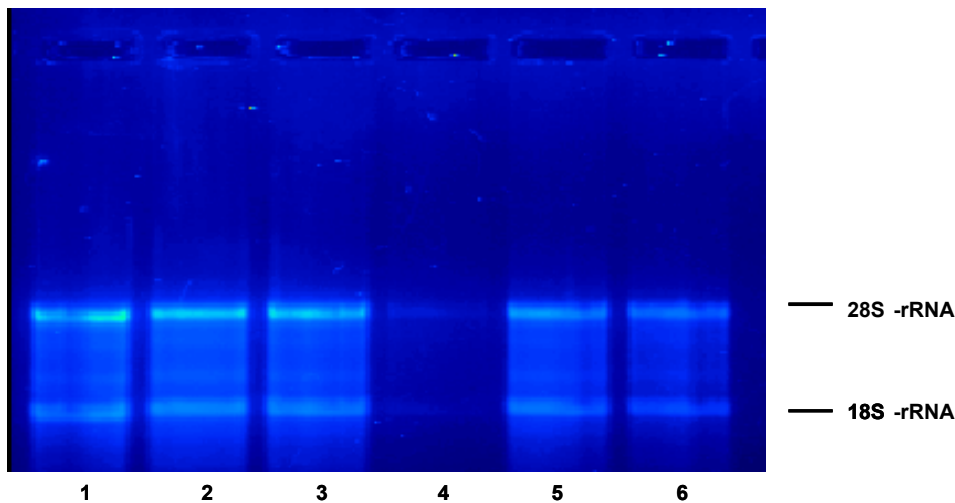


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses einer Gelelektrophorese eines SYBRGreen II[®]-Agarosegels von Gesamt-RNA aus Knorpelhomogenat (Proben 1 bis 6) Erkennbare 28S- und 18S-rRNA-Banden bei den Proben 1 bis 6 mit unterschiedlicher Intensität, verursacht durch die Auftragung von verschiedenen Konzentrationen.

3.2.2 PCR-Produkt-Standardreihe

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte im Vergleich zu einer genspezifischen Standardreihe aus gereinigtem PCR-Produkt. Zur Spezifizierung dieses gereinigten PCR-Produkts des Haushaltgens GAPDH (bp 178) sowie der mRNA der Gene Kollagen I (127 bp), II (168 bp), V (139 bp) und X (109 bp) sowie TGF- β 3 (214 bp) wurden deren Fragmentgrößen (bp) gegen einen Molekulargewichtsmarker Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) aufgetragen. Alle PCR-Produkte wiesen die theoretisch zu erwartenden Produktgrößen auf. Mithilfe der Sequenzierung konnte die Spezifität der PCR-Produkte verifiziert werden.

3.2.3 mRNA-Quantifizierung

Effizienz der Echtzeit-RT-PCR und Bestimmtheitsmaß der Standardreihen

Die Standardreihen aus PCR-Produkten erfüllten die Qualitätsanforderungen einer Effizienz von $100\% \pm 15\%$ und einem Bestimmtheitsmaß von mindestens 98% ($r^2 = 0,980$). Die einzelnen Ergebnisse der Standardreihen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Die Interassayvarianz, ermittelt durch eine Varianzbestimmung der Poolprobe auf verschiedenen Platten, war kleiner als 40% und lag bei $20,6\%$ ($\pm 5,1\%$).

Tabelle 9: Effizienz und Bestimmtheitsmaß der Standardreihen von GAPDH, Kollagen I, II, V, X und TGF- β 3

Gen	Effizienz (%)	Bestimmtheitsmaß (%)
GAPDH	92,0	99,3
Kollagen I	93,9	99,8
Kollagen II	99,3	98,9
Kollagen V	103,9	99,5
Kollagen X	85,2	99,4
TGF- β 3	106,5	99,0

Als Beispiel sind die Standardreihen, Amplifikations- sowie Dissoziationskurven im Folgenden anhand des Kollagen I in Abbildung 19 bis Abbildung 21 dargestellt.

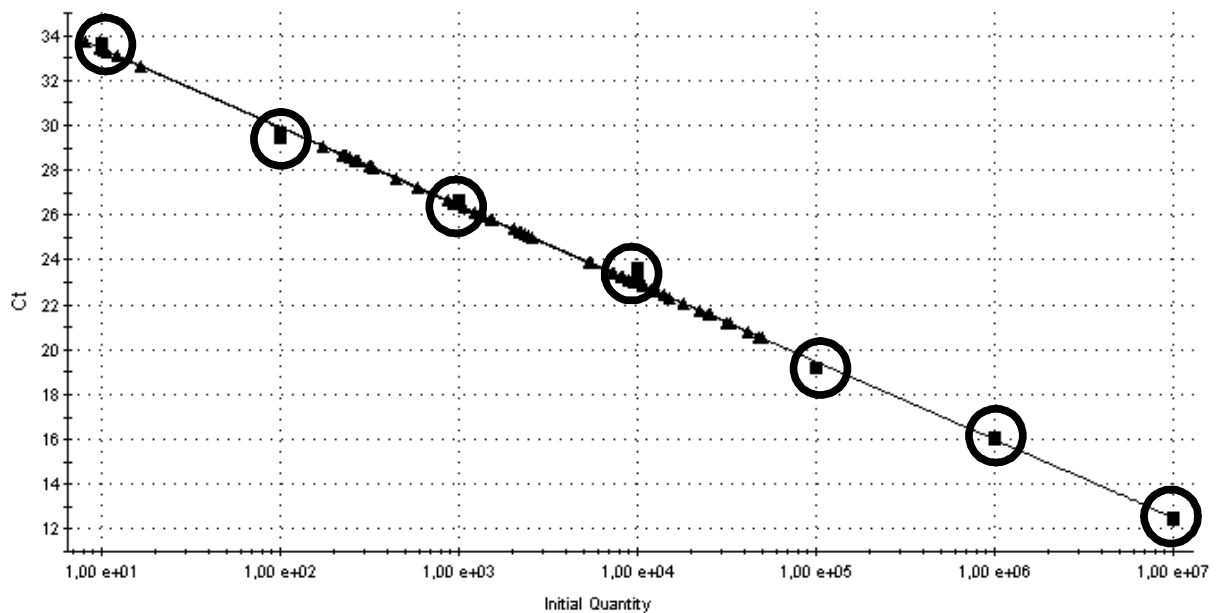


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung einer Kollagen I-PCR-Produkt-Standardkurve

Die Standardkurve besteht aus sieben eingesetzten PCR-Produkt-Standards (rot umkreist) mit Konzentrationen von 10^1 bis 10^7 Molekülen/ μ l aufgetragen gegen die Ct-Werte. Der Standardkurve liegt eine Effizienz von 93,9 % und ein Bestimmtheitsmaß von 99,8 % ($r^2 = 0,998$) zugrunde. Die Proben, als kleine Dreiecke auf der Geraden zu erkennen, lagen alle innerhalb der Standardreihe.

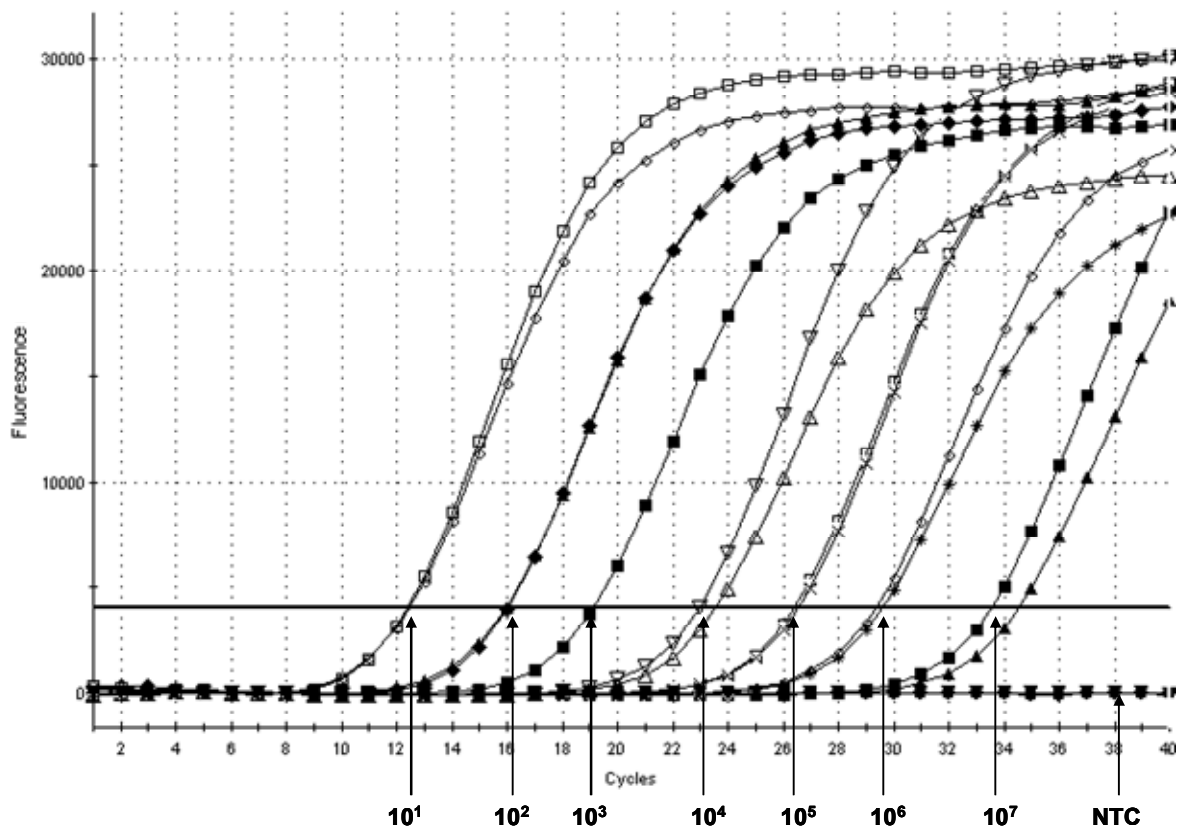


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung einer Kollagen I-Amplifikationskurve der PCR-Produkt-Standards

Die Amplifikationskurven der PCR-Produkt-Standards sind als Doppelbestimmung mit einer Konzentration von 10^1 bis 10^7 Molekülen/ μl im Bezug der Zyklen (*Cycles*) zu der gemessenen Fluoreszenz (*Fluorescence*) aufgetragen. Die Negativkontrolle (NTC) demonstriert nach 40 Zyklen noch kein Signal.

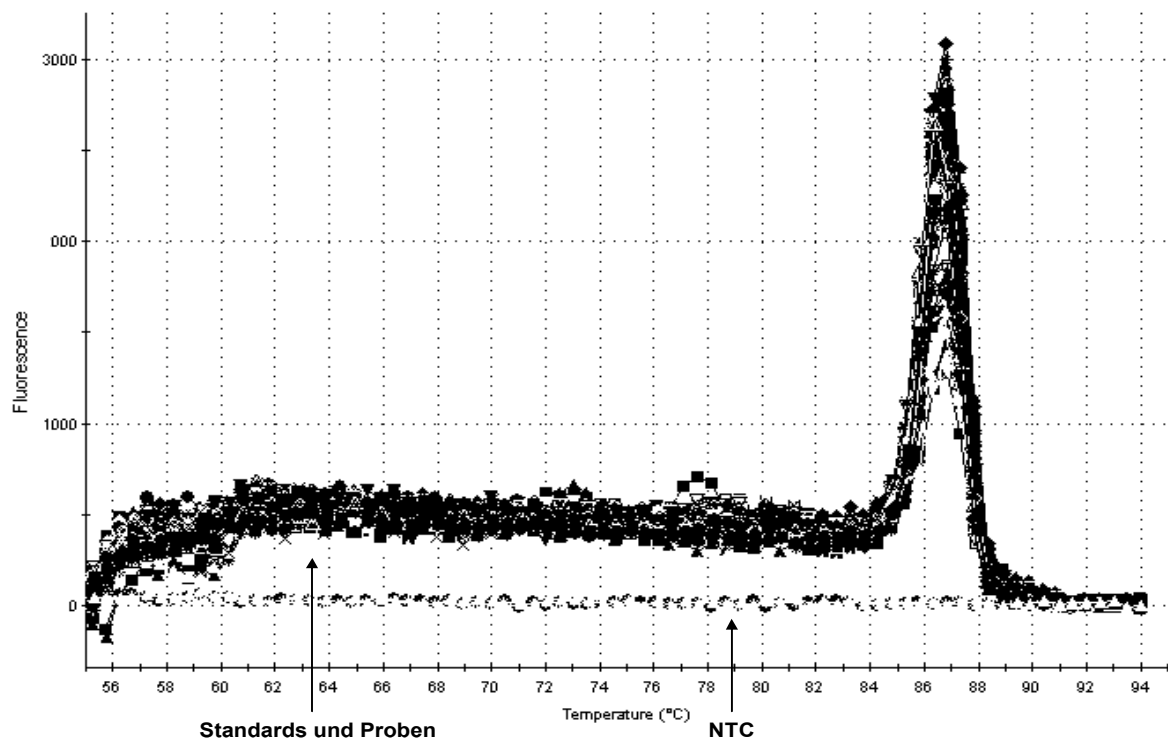


Abbildung 21: Kollagen I-Dissoziationskurve der PCR-Produkt-Standards 10^1 bis 10^7 Moleküle/ μ l sowie von einzelnen Proben

Standards und Proben zeigen im Vergleich zur negativen Kontrolle (NTC) einen deutlichen Dissoziationspeak bei einer Schmelztemperatur (T_m) von genau $86,9^\circ\text{C}$, der auf nur ein vorliegendes Produkt ohne Dimere schließen lässt.

3.2.4 Vergleich der Expressionsniveaus

Genexpression des Haushaltgens GAPDH

Genexpressionsergebnisse werden häufig in Relation zu stabil exprimierten Genen, sogenannten Haushaltsgenen, dargestellt. GAPDH, welches in der Literatur oft als Haushaltsgen ausgewiesen wird (IVELL 1998, MCKENNA et al. 2000, CLEMENTS et al. 2006), zeigte bei der einfaktoriellen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Histologieklassen 0 und 3 sowie zwischen den vier verschiedenen Gelenkoberflächen.

Vergleich der mRNA-Expression der Kollagene I, II, V, X sowie TGF- β 3 zwischen den Histologieklassen und Gelenken

Beim Vergleich der mRNA-Konzentrationen von Kollagen I, Kollagen II, Kollagen X sowie TGF- β 3 zwischen den beiden Histologieklassen 0 und 3 konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 22). Der Mittelwertsvergleich unter Verwendung der ANOVA zeigte signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression des Kollagen I ($p = 0,007$), Kollagen V ($p = 0,004$) sowie des Kollagen X ($p = 0,015$) zwischen den Gelenkoberflächen der verschiedenen Lokalisationen. Der Mittelwertsvergleich der verschiedenen mRNA-Expressionen zwischen den einzelnen Gelenkoberflächen ist in Abbildung 23 dargestellt.

Ergebnisse

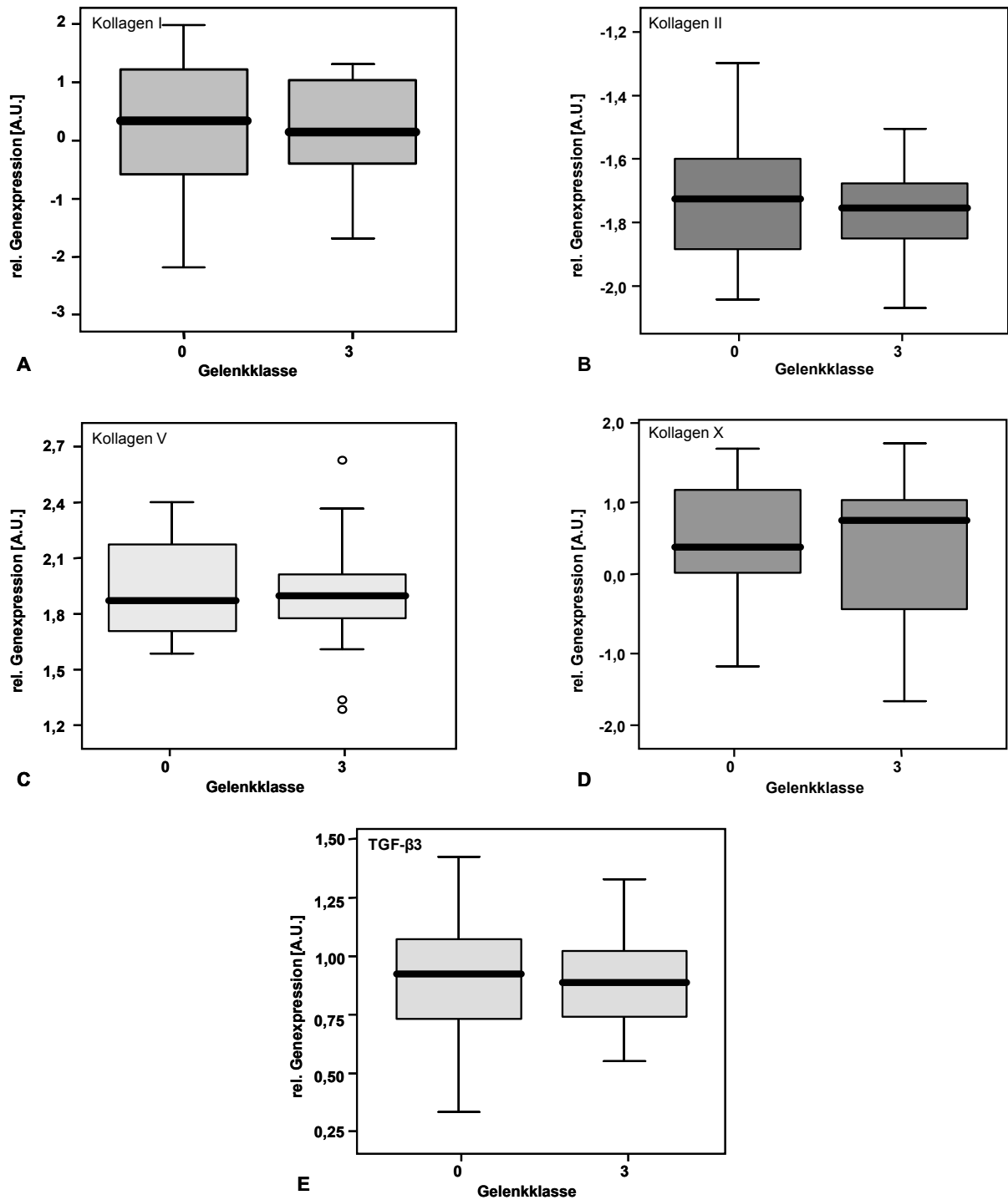


Abbildung 22: Boxplots zum Vergleich der rel. Genexpression in *arbitrary units* [A.U.] der einzelnen Gene (Kollagen I (A), II (B), V (C), X (D) und TGF-β3 (E)) zwischen den histologischen Gelenkklassen 0 und 3

Anzahl je Gelenkkategorie = 20; beim Vergleich der Mittelwerte durch eine ANOVA konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gelenkklassen 0 und 3 festgestellt werden.

Ergebnisse

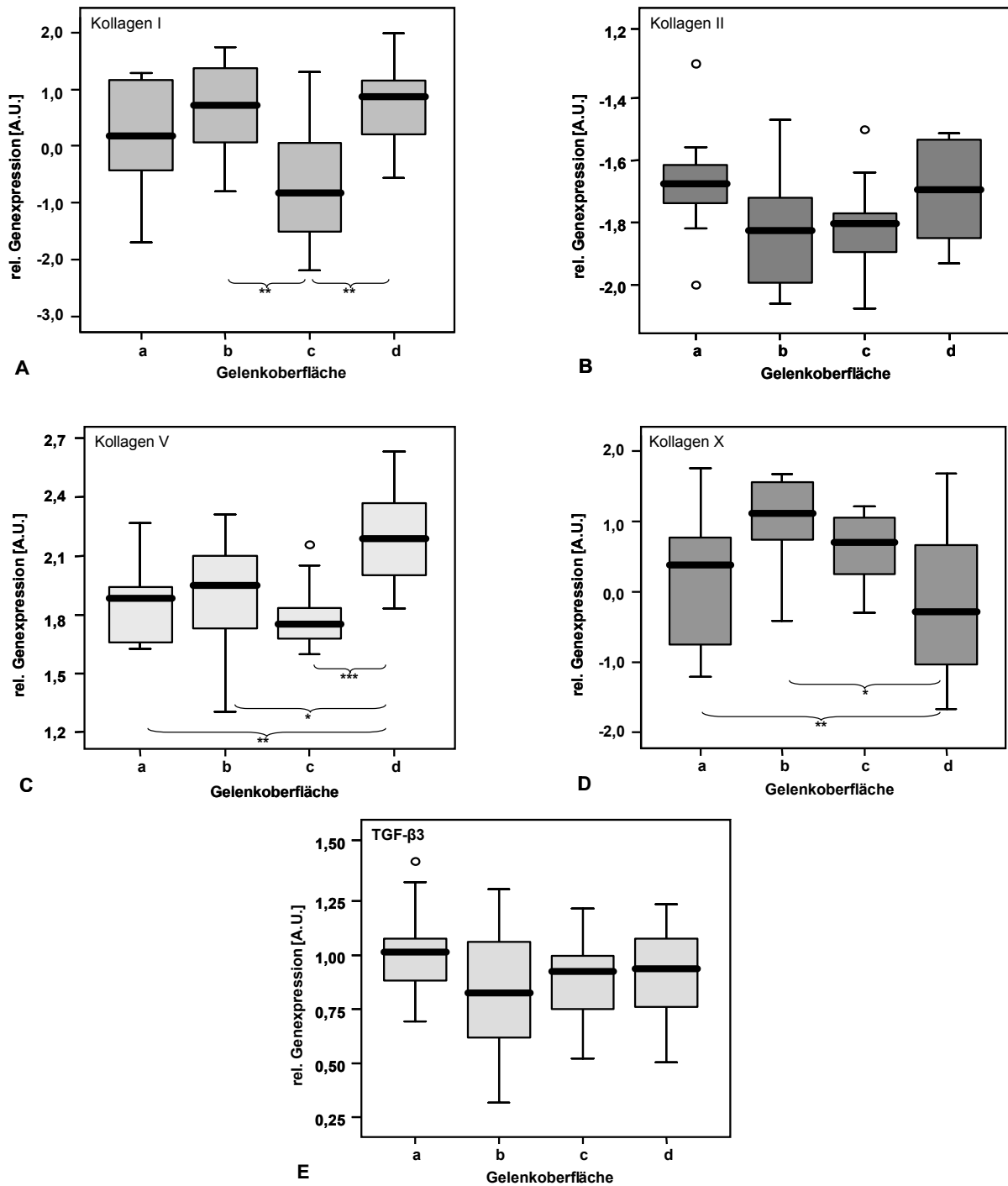


Abbildung 23: Boxplots zum Vergleich der rel. Genexpression in *arbitrary units* [A.U.] der einzelnen Gene (Kollagen I (A), II (B), V (C), X (D) und TGF- β 3 (E)) zwischen verschiedenen Gelenkoberflächen

Anzahl je Gelenkoberfläche = 10; Signifikanzen wurden durch eine ANOVA mit integriertem Post-Hoc-Test nach Tukey ermittelt.

a = prox. Humerus, b = dist. Humerus, c = prox. Femur, d = dist. Femur;

* $p \leq 0,10$; ** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$

4 Diskussion

Fundamentprobleme gehören zu den wichtigsten Gründen für eine verkürzte Lebensdauer, reduziertes Wohlbefinden und eine verminderte Produktivität aller wichtigen landwirtschaftlichen Nutztierarten. Durch einen immer größer werdenden Absatzmarkt für Schweinefleischprodukte und das wachsende Interesse der Kunden an artgerechter Haltung und Wohlbefinden der Tiere nehmen Tiergesundheit und Tierschutz eine immer größere Rolle ein.

Bei Schweinen sind die meisten Ursachen für Lahmheiten bei den Klauen oder den Gliedmaßen zu finden. Das BS-Syndrom verursacht vor allem ein reduziertes Wohlbefinden der Tiere mit Leistungseinbußen und erhöhten Schlachtraten der betroffenen Tiere.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Studien zum Exterieur in Form von linearen Klassifizierungsschemata und Schätzungen von Zusammenhängen zwischen BS, Exterieurmerkmalen und Leistungsparametern durchgeführt. BS wird hauptsächlich mit OC assoziiert. Dabei sind Daten zur genetischen Ursache und Prädisposition von OC kaum vorhanden. Die Integration von molekularen Markern für funktionale Merkmale zur Fundamentstabilität in züchterische Aktivitäten erscheint damit als zielführend, jedoch fehlen bislang derartige Marker. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie versucht, den Kenntnisstand zu den molekularen Hintergründen von BS bzw. OC zu erweitern. Dabei wurden vier verschiedene Gelenkoberflächen von 139 Schweinen in Bezug auf degenerative Veränderungen untersucht. Zudem sollte ein möglicher Einfluss von verschiedenen Leistungsmerkmalen auf die Fundamentbeschaffenheit aufgedeckt werden. Um weiterführende, molekularbiologische Untersuchungen durchführen zu können, sollte ein definierter Phänotyp aus Histologie- und Exterieurbefunden erstellt werden. Außerdem wurde in dieser Studie die mRNA-Konzentration ausgewählter funktionaler Kandidatengene für BS bzw. OC in Knorpelgewebe bestimmt und verglichen.

Erfassung eines definierten Phänotyps mit objektiven, histologischen Merkmalen in einer Experimentalpopulation einer F2-Generation aus Duroc x Pietrain

Zur Beurteilung der Objektivität und Qualität der durchgeführten histologischen Klassifizierung ist die Betrachtung der im einzelnen durchgeführten Schritte angebracht. Dabei wird im Detail auf die beobachteten Veränderungen, die gewählte Färbungsmethode sowie auf die Einordnung der Veränderungen in das Klassifizierungssystem eingegangen. Anschließend werden die Ergebnisse aus dieser Beurteilung mit vorhandener Literatur diskutiert.

Degenerative Gelenkerkrankungen, wie OC oder OA, sind die häufigsten Ursachen für BS (REILAND 1978b). Um die Diagnose OC oder OA stellen zu können, müssen verschiedene Symptome auftreten. Die nach der Literatur bisher beste Möglichkeit, den Befund OC selbst bei kleinen Läsionen zu erheben, liegt in der p. m. Adspektion der arthrodialen Gelenkflächen und Wachstumsfugen (HILL et al. 1984, FUKAWA und KUSUHARA 2001). Einige Studien haben sich bereits nur mit der OC der Wachstumsfuge beschäftigt und die artikuläre Knorpelfläche ignoriert (HILL et al. 1985a, YTREHUS et al. 2004a, YTREHUS et al. 2004b). In dieser Studie wurde der Schwerpunkt auf die OC der Gelenkknorpeloberfläche gelegt und die Wachstumsfuge nicht mit einbezogen.

SANDELL und AIGNER (2001) fassen die Degeneration von Gelenkknorpel bei OA in zwei Phasen zusammen: In der ersten biosynthetischen Phase versuchen die Chondrozyten das zerstörte Knorpelgewebe zu reparieren. In der zweiten, der degenerativen Phase, verdauen Enzyme, synthetisiert von Chondrozyten, die Matrix, wobei die Matrixsynthese gleichzeitig gehemmt ist. Dadurch kommt es zur Erosion des Knorpelgewebes. In Phase eins verläuft die Matrixsynthese schneller als sonst, da diese durch anabole Cytokine stimuliert wird. Das Gleichgewicht zwischen anabolen (z. B. TGF- β , BMP oder IGF-1) und katabolen (z. B. IL-1, TNF- α) Cytokinen ist dabei gestört, sodass die zelluläre Reaktion in drei Kategorien eingestuft werden kann (AIGNER et al. 2004): Zu Beginn kann die anabole Synthese durch entsprechende Cytokine aktiviert oder deaktiviert werden. Daran schließt sich eine Modulation an, in der eine Änderung des Expressionsprofils erfolgt. Zum Schluss bleibt der Zelltod – programmiert oder nicht programmiert – oder die Proliferation, um Zellverluste zu kompensieren bzw. um die Syntheseleistung zu erhöhen. Der Zelltod spielt laut SANDELL

und AIGNER (2001) im Rahmen der OA allerdings nur eine untergeordnete Rolle. In einer weiteren Arbeit zeigten AIGNER et al. (2004) jedoch, dass der Zelltod in osteoarthritischem Knorpel eine Hauptrolle bei der Degeneration des Gewebes spielt. Durch die fehlenden Gefäße kann kein Zellersatz von abgestorbenen Zellen erfolgen.

Auch bei der OC ist der Zelltod von großer Relevanz (AIGNER und KIM 2002). Aufgrund der verminderten Diffusion sterben viele Chondrozyten aus Nährstoffmangel ab. Dadurch sind viele Lacunen im Gelenkknorpel leer, welches als Zeichen der OC angesehen wird (NAKANO 1987, AIGNER und KIM 2002, AIGNER und MCKENNA 2002). Dabei bestehen die ersten Veränderungen der OC bzw. OA in Form von PG-Verlust an der Knorpeloberfläche, da in den tieferen Knorpelzonen aktive Chondrozyten vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM) synthetisieren (SANDELL und AIGNER 2001). Unsicher ist, welche Veränderung zuerst beginnt: der Verlust an PG oder der Verlust des kollagenen Netzwerkes. Sicher ist, dass das eine jeweils das andere bedingt. Der Verlust der PG und des kollagenen Netzwerkes führt in den Bereichen der Faserdegeneration zu einer pH-Wert-Änderung der EZM (AIGNER und MCKENNA 2002). Diese pH-Wert-Änderung konnte in der eigenen Dissertationsstudie als eosinophile Matrix (Matrix physiologisch = homogen blau-grün, eosinophil = rötliche Anfärbung) erkannt werden. Auch in der durchgeführten histologischen Beurteilung waren die beginnenden Oberflächenveränderungen bei fast allen Gelenkoberflächen zu finden. Zu diesen Veränderungen gehörten geringgradige Asbestfaserung sowie eine eosinophile Matrix und eine angeraute Oberfläche. Alle Veränderungen konnten bei den untersuchten Schweinen deutlich beobachtet, dokumentiert und klassifiziert werden. Massivere Veränderungen der EZM in Form von starker Asbestfaserung, daraus resultierenden vertikalen Spalten, Vaskularisierung, Nekrosen und Ossifikationszentren konnten ebenfalls erkannt und in die histologischen Gelenkclassen eingeordnet werden. Geröllzysten konnten nur in einzelnen Gelenkoberflächen ausgemacht werden, erhielten aber jedes Mal die Gelenknote 3, welche als hochgradige pathologische Veränderung der Gelenkknorpeloberfläche definiert wurde. GRONDALEN (1974b) findet diese Geröllzysten in der Nähe von Nekrosen und penetrierendem Knorpelgewebe in den subchondralen Knochen. Diese Beobachtung konnte möglicherweise aufgrund der nur vereinzelt auftretenden Geröllzysten nicht gemacht werden, könnte jedoch ggf. anhand einer höheren Tierzahl doch noch bestätigt werden.

Vertikale Spalten werden mit Verdickung des Knorpels assoziiert und Geröllzysten mit subchondralen Läsionen. Diese Veränderungen sind deutliche Konsequenzen der OC (JORGENSEN 2000b). Ebenso penetrieren Fibroblasten und Kapillaren die degenerative Knorpelmatrix und im Falle von Chondrozytenproliferation sind Zellcluster zu finden. Diese Veränderungen werden ebenfalls beim Schwein von HILL et al. (1984) bei OC analysiert. Auch in der vorliegenden Untersuchung konnten Zellcluster beobachtet und mit dem Klassifizierungsschema in die Gelenkkategorie 2 eingeordnet werden.

Zur weiteren qualitativen Beurteilung der durchgeführten histologischen Beurteilung soll die gewählte Färbung diskutiert werden. Um das Spektrum und Ausmaß der Läsionen genau beurteilen zu können, führen GARDNER et al. (1997) sowie HILL et al. (1990) Studien zur histologischen Färbetechnik und Untersuchungen zu Knorpel- und Knochengewebe als spezielles Bindegewebe durch. Die EZM-Struktur und die Organisation von PG und Kollagenmolekülen sind ebenfalls bereits elektronenmikroskopisch untersucht worden (BHATNAGAR et al. 1981, HESSE et al. 1990).

Bei der gewählten Masson-Goldner-Färbung handelte es sich um eine trichrome, spezifische Bindegewebsfärbung mit Hämalan, Ponceau-Säurefuchsin und einer Gegenfärbung mit Lichtgrün (ROMEIS 1998), die bereits eingehend im Material- und Methodenteil (vgl. Kapitel 2.3.1) dargestellt wurde. Die meisten Studien zur Histologie der OC verwenden die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung (GRONDALEN 1974b, REILAND 1978a, HILL et al. 1984, GOEDEGEBUURE et al. 1988). Bei dieser Färbemethode handelt es sich um eine dichrome, einfache Übersichtsfärbung, wobei das Hämatoxylin als basophiler Farbstoff alle sauren Bestandteile blau, das Eosin als acidophiler Farbstoff alle basischen Bestandteile rot färbt. Dadurch entsteht ein Schnitt mit unterschiedlichen Blau- und Rottönen. HILL et al. (1990) untersuchen verschiedene Färbetechniken, mit der sich OC-Läsionen im Gelenkknorpel besser darstellen lassen. Er vergleicht die Übersichtsfärbung HE mit verschiedenen anderen Färbungen mit Toluidinblau, Lichtgrün, Safarin O und mit einer Gegenfärbung mit Lichtgrün, Toluidinblau mit Lichtgrün oder Alcianblau-van Gieson (trichrome Färbung), um die PG und Kollagene anzufärben. Er schlussfolgert, dass alle dichromen Färbungen mehr Informationen über die Pathogenese der Läsionen erkennen lassen als monochrome oder einfache HE-Färbungen. Die Kombinationen von Toluidinblau oder Safarin O mit Lichtgrün sind beide effektiver als ohne Gegenfärbung und die

Alcianblau-van Gieson-Färbung (als trichrome Färbemethode) kann die Zerstörung des Kollagenetzes am deutlichsten darstellen. In der Masson-Goldner-Färbung findet das Prinzip der trichromen Färbemethode Anwendung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass ebenfalls hoch sensitive Veränderungen der EZM erfasst werden können. Dieses konnte mit der Darstellung der eosinophilen Matrix, durch Verluste der PG und Kollagene und damit dem Verlust der sauren Bestandteile und Anfärbbarkeit mit acidophilem Farbstoff (Hämalaun) belegt werden. Als Merkmal der eosinophilen Matrix stellte sich diese statt blaugrün orange-rot dar. Die Darstellung war kritisch zu betrachten, da sich eine Überfärbung mit Säurefuchsin ebenfalls orange-rot darstellt. Eine Überfärbung konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch wurde der Unterschied zwischen Eosinophilie und Überfärbung durch Übung weitgehend objektiviert. Vergleiche zwischen der Masson-Goldner-Färbung und anderen Färbemethoden für Knorpelgewebe liegen in der Literatur bisher noch nicht vor.

Die histologische Darstellung und Auswertung wurde allen Ansprüchen und Erkenntnissen der Literatur gerecht, sodass eine zur Literatur vergleichbare, objektive, histologische Beurteilung durchgeführt werden konnte. Die verwendete Färbung bot im Vergleich zu den anderen Methoden den Vorteil, dass pH-Wert-Änderungen erfasst wurden und somit Proteinverluste detektiert werden konnten. Ein weiterer Punkt zur Beurteilung der Qualität war die Klassifizierung.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, gibt es verschiedene Studien zur Befunderhebung von OC durch makroskopische und mikroskopische Pathologie sowie Radiologie. Die Erhebung von histopathologischen Befunden gehört dabei zu den objektivsten Evaluierungsmethoden (FUKAWA und KUSUHARA 2001), da genaue Parameter der OC-Pathologie bekannt sind und sich die Klassifizierung nach diesen richten kann. In der Literatur sind allerdings mehrere Studien bezüglich OC oder OA zu finden, die alle unterschiedliche Einteilungen der histopathologischen Veränderungen vornehmen. In der Forschung zur OC beim Schwein in den 1970er- bis 80er-Jahren werden von drei Forschergruppen ebenfalls drei verschiedene Histologieklassifizierungen verwendet und eingeführt. GRONDALEN (1974b) beurteilt histologisch die Gelenkflächen des Humerus und Femurs in zehn Merkmalen auf einer Skala von 1 bis 8 sowie der Ossa antebrachii in fünf Merkmalen auf einer Skala von 1 bis 5. Allein in dieser einen Studie wird eine

unterschiedliche Anzahl von Merkmalsklassen verwendet. REILAND et al. (1978) wählen in ihrer Studie, in der Absicht einen Standard für die Beurteilung von OC-Läsionen einzuführen, eine Skala von 0 bis 5 zur Klassifizierung vom Gelenkknorpel des Humerus und Femurs. Eine weitere unterschiedliche Anzahl von Merkmalausprägungen zur Evaluierung der OC wählt GOEDEGEBUURE et al. (1988). Die proximalen Gelenkflächen von Humerus und Femur beurteilt er auf einer Skala von 0 bis 3, ebenso wie die Wachstumsfugen beider Knochen und der proximalen Wachstumsfuge der Ossa antebrachii. Die histologischen Veränderungen der distalen Gelenkflächen von Humerus und Femur werden von GOEDEGEBUURE et al. (1988) in sechs Klassen von 0 bis 5 eingeteilt. Wird die makroskopische Pathologie noch hinzugenommen, ergeben sich erneut andere Klassifizierungsskalen. So wählen JORGENSEN (2000b) und SERENIUS et al. (2001) eine pathologische Beurteilung auf einer Skala von 1 bis 5 und SCHWOERER (1991) eine Klassifizierung von 1 bis 4 bzw. 6. Diese Auflistung lässt deutlich erkennen, dass ein einheitliches Klassifizierungsschema in der Literatur nicht vorhanden ist. So wurde in der durchgeführten Dissertationsstudie die histologische Einteilung in Anlehnung an GOEDEGEBUURE et al. (1988) vorgenommen. Die von ihm gewählte Klassifizierung in eine unterschiedliche Anzahl von Merkmalausprägungen (proximale Gelenkflächen 0 bis 3, distale Gelenkflächen 0 bis 5) wurde hier vereinheitlicht mit einer Skala von 0 bis 3 angewendet. Dabei wurde die Skala von 0 bis 5 aufgrund der geringen Tierzahl ausgeschlossen, da die Randgruppen mit einer zu geringen Tierzahl besetzt gewesen wären. Eine gewisse Anzahl von Tieren in einer Gruppe muss vorhanden sein, um die Auswertung der Klassifizierung, besonders die Randgruppen, statistisch absichern zu können. So verwenden z. B. JORGENSEN (2000a, 2000b) jeweils über 100 und SERENIUS (2001) sogar 11.000 Tiere. Mit einer nur geringen Anzahl von 60 Tieren können in der Studie von GOEDEGEBUURE et al. (1988) nicht alle Randgruppen besetzt werden.

Bei der in der vorliegenden Studie vorgenommenen, histologischen Klassifizierung der Gelenkoberflächen in Gelenkklassen waren 84,8 % der Gelenke von Veränderungen betroffen, wobei sogar 9,3 % der Gelenkoberflächen hochgradige pathologische Veränderungen aufwiesen. In einer anderen Studie sind sogar 93,4 % der untersuchten Gelenke von Läsionen der OC berührt (HEINONEN et al. 2007). Möglichkeiten für den Unterschied zu anderen Studien sind vor allem durch die Grenze, ab der Veränderungen

erkannt werden, das Alter und durch die verschiedenen Klassifizierungen zu begründen. Die verschiedenen Klassifizierungssysteme sowie der Einfluss des Alters werden später aufgegriffen und diskutiert.

In der vorliegenden Dissertationsstudie war der distale Femur am häufigsten verändert, was mit den Ergebnissen von GRONDALEN (1974b), HILL et al. (1984) sowie JORGENSEN und ANDERSON (2000) übereinstimmt. GRONDALEN (1974b) findet allerdings ebenfalls viele Veränderungen am distalen Humerus, der in dieser Studie am wenigsten betroffen war. Auch andere Studien belegen eine hohe Prävalenz der OC der distalen Humerusgelenkflächen, die z. T. höher ist als die des distalen Femurs (NAKANO 1987, JORGENSEN et al. 1995). Dazu wird die Hypothese aufgestellt, dass das Ellenbogengelenk empfindlicher für Traumata sowie Überlastung ist als das Knie und somit vermehrt Veränderungen aufweist (JORGENSEN et al. 1995, JORGENSEN 2000b). Allen aufgeführten Studien liegen allerdings andere Rassen zugrunde, sodass ein Einfluss der Rasse auf die Prävalenz der Gelenkoberflächen nicht ausgeschlossen werden kann, und das Ellenbogengelenk nicht bei allen Rassen prädisponiert sein muss. Unterschiede von OC-Ausprägungen auf verschiedene Gelenkoberflächen bei unterschiedlichen Rassen können KADARMIDEEN et al. (2004) sowie GOEDEGEBUURE et al. (1980) zwischen Schwedische Large White, Schwedische Landrasse und Duroc bzw. zwischen Belgische Landrasse, Duroc, Holländische Landrasse, Holländische Yorkshire, Hampshire and Pietrain belegen. GOEDEGEBUURE et al. (1980) isolieren bei ihrer Duroc-Population signifikant mehr OC-Veränderungen an den Vordergliedmaßen als bei den anderen Rassen. Bei den Hintergliedmaßen weisen die Belgische Landrassetiere die meisten Läsionen auf, während die Holländische Landrasse dort mehr Läsionen zeigt als die Tiere der Duroc-, Holländische Yorkshire-, Hampshire- oder Pietrain-Population. KADARMIDEEN et al. (2004) bestätigen bei der Duroc-Population die meisten OC-Läsionen in der distalen Ulna-Epiphyse sowie der Gelenkfläche des *Condylus medialis femoris*. Bei der Schwedische Large White-Population treten am meisten OC-Läsionen an der Gelenkfläche des *Condylus medialis humerus* und der proximalen Gelenkfläche von Radius und Ulna auf. Bei Schwedische Landrasse-Tieren sind die meisten OC-Läsionen an der Gelenkfläche des *Condylus lateralis humerus* zu finden. In beiden Studien ist die Duroc-Population prädisponiert für OC.

Bei den OC-Befunden der Gelenkoberflächen konnte in der vorliegenden Studie eine positive Assoziation zwischen Veränderungen des Humerus hergestellt werden, die auch KADARMIDEEN et al. (2004) verfolgen. Hier konnte nun die von JORGENSEN et al. (1995, 2000b) bestätigte Hypothese, dass das Ellenbogengelenk sensibler als das Knie sei, in modifizierter Form Anwendung finden. Sie konnte sogar auf die vorliegende Population dahingehend erweitert werden, als dass die vordere Gliedmaße empfindlicher ist als die hintere und sich Veränderungen direkt auf beide Gelenkoberflächen des Humerus auswirken. Veränderungen der Hintergliedmaße bzw. des Femurs blieben dabei auf ein Gelenk beschränkt.

Die Veränderungen der distalen Gelenkoberflächen des Humerus und Femurs waren positiv miteinander assoziiert, welches im Gegensatz zu den Korrelationen von KADARMIDEEN et al. (2004) steht: Dieser stellt negative Zusammenhänge zwischen der vorderen und hinteren Extremität her. Positive Assoziationen beschreiben dagegen auch GOEDEGEBUURE et al. (1988) zwischen der proximalen Gelenkfläche von Radius und Ulna mit der proximalen Gelenkfläche des Femurs. Keine Korrelationen zwischen unterschiedlichen OC-Läsionen finden REILAND et al. (1978). Diese unterschiedlichen Zusammenhänge sind vor allem, wie die Läsionen selber, auf verschiedene Rassen zurückzuführen, da jede Studie eine andere Rasse betrachtet.

In der vorliegenden Studie wurde durch die Erstellung einer Ressourcenpopulation versucht, einen möglichst großen Genpool mit der größtmöglichen Vielfalt an Phänotypen zu erhalten. Dadurch sollte eine große Streuung der Merkmale stattfinden, um den Rasseneffekt in der Versuchspopulation zu verkleinern.

Alle Tiere wiesen auf mindestens einem Gelenk OC-Veränderungen der Knorpelmatrix auf. Dies wurde bereits oben mit einer Prävalenz der Gelenkknorpelveränderungen in Höhe von 84 % beschrieben. Um eine Beurteilung der einzelnen Tiere zu ermöglichen, wurden die vier einzelnen Beurteilungen der Gelenkoberflächen (Gelenkklassen von 0 bis 3) jedes Tieres addiert („Histologie/Tier“ 0 bis ≥ 9) und zur Veranschaulichung in vier Histologiegruppen (I bis IV) zusammengefasst. Auch andere Studien stellen OC-Prävalenzen von 100 % bei anderen Schweinepopulationen fest (GRONDALEN 1974b, REILAND 1978b, FUKAWA und KUSUHARA 2001) und belegen diese durch Prävalenzen der pathologischen

Veränderungen von Gelenkoberflächen von 93 % (HEINONEN et al. 2007). Der Grad der Veränderungen konnte ebenfalls in der eigenen Studie erfasst werden: 14,2 % der Schweine hatten geringgradige bis mittelgradige Veränderungen auf ein bis zwei Gelenken (Histologiegruppe I), 15,5 % hatten mittelgradige bis hochgradige Veränderungen auf fast allen Gelenken (Histologiegruppe IV), wobei kein Tier hochgradige Veränderungen auf allen vier Gelenkoberflächen aufwies („Histologie/Tier“-Gruppe 10 bis 12). So wurden zwar bei allen Tieren OC-Veränderungen festgestellt, diese haben aber offenbar noch nicht überall zu massiven Veränderungen führen können. Das ist vor allem auf das übliche geringe Alter der Masttiere zurückzuführen. Die Schweine wurden alle mit 185 Tagen (± 17 Tage) geschlachtet und erreichten Lebendendgewichte von 110 kg (± 8 kg). HILL et al. (1984) sowie BHATNAGAR et al. (1981) demonstrieren, dass mit dem Alter die Stärke der Veränderungen in Bezug auf OC oder OA zunimmt und die kleinsten, einfachen Läsionen bei den jüngsten Tieren nachzuweisen sind (HILL et al. 1990). Die Prävalenz bei älteren Tieren liegt also höher und Veränderungen des Knorpels und des subchondralen Knochengewebes nehmen stärkere Ausmaße an als bei jüngeren Tieren. Die initialen Veränderungen der OC sind aber in allen Altersklassen zu finden (GRONDALEN 1974b). HILL et al. (1984) können Gelenkknorpelläsionen bei Schweinen im Alter von 59 Tagen beobachten. So berichten HILL et al. (1985b) über mikroskopische Läsionen im Knorpel von Schweinen im Alter von einem Tag und GRONDALEN (1974b) von Schäden in den tieferen Knorpelschichten bei Tieren mit einem Gewicht von 18 kg. Es wären vermutlich mehr Tiere in die „Histologiegruppe“ IV bzw. überhaupt Tiere in der „Histologie/Tier“-Gruppe 10 bis 12 zu finden gewesen, wenn sie ein höheres Alter erreicht hätten. Mit diesem Altersunterschied und den damit verbundenen stärkeren Veränderungen der Knorpeloberfläche lassen sich auch die oben beschriebenen höheren Prävalenzen erklären. Auch bei Zuchttieren liegt die Prävalenz, wie bereits in der Einleitung beschrieben, höher, da diese aufgrund ihres jahrelangen Einsatzes ein deutlich höheres Alter und Gewicht als Masttiere erreichen.

Die durchgeführte histologische Klassifizierung, in Anlehnung an GOEDEGEBUURE et al. (1988), entsprach den zugrunde gelegten Qualitätsanforderungen. Es wurden Veränderungen, wie sie in der Literatur beschrieben sind, erkannt und klassifiziert. Dadurch konnte ein objektiv nachvollziehbarer, definierter Phänotyp der Ressourcenpopulation aus DuPi x PiDu

abgeleitet werden und als Grundlage für weitere Analysen im Rahmen dieser Studie Anwendung finden.

Vergleich und Analyse der Fundamentmerkmale bestehend aus Exterieurbeurteilung und Histologiebefunden

BS und Gelenkveränderungen können zu beträchtlichen wirtschaftlichen Verlusten führen und gehören neben den infektiös bedingten Arthritiden zu den häufigsten Gelenkerkrankungen (JORGENSEN 2000a). Obwohl mehrere Untersuchungen einen engen Zusammenhang zwischen BS und OC bestätigen (GRONDALEN 1974a, REILAND et al. 1978, NAKANO 1987, HILL 1990a), werden die Zusammenhänge kontrovers diskutiert. LUNDEHEIM (1987) bestätigt einen Zusammenhang zwischen BS und OC nur, wenn massive Gelenkveränderungen vorliegen. Um den Zusammenhang von BS mit OC für die vorliegende Ressourcenpopulation zu untersuchen, wurden in der vorgenommenen Studie die BS durch eine Exterieurbeurteilung und die OC durch histologische Befunderhebung in Zusammenhang gebracht.

Die Erfassung der OC wurde schon eingehend beschrieben. Nun soll auf die Erfassung der BS eingegangen werden. Bei der Exterieurbeurteilung handelt es sich eher um eine mehr subjektive Beschreibung, die vor allem von dem jeweiligen Begutachter abhängt. Dieser Einfluss wurde in der vorliegenden Studie so minimiert, dass nur ein Begutachter die Schweine beurteilte. Dadurch sollte die Subjektivität so weit wie möglich eingeschränkt oder zumindest sollten dieselben subjektiven Beobachtungsmerkmale an alle Tiere gestellt werden. STEENBERGEN (1989) beschäftigt sich mit einer genauen Evaluierung eines linearen Klassifizierungssystems zur Erfassung von Exterieurmerkmalen beim Schwein und beurteilt 21 Merkmale auf einer Skala von 0 bis 9 in 0,5-Intervallen (19 Klassen). Die Tiere werden von zehn verschiedenen Inspektoren klassifiziert, die einen signifikanten Unterschied in der Beurteilung ausmachen. Die Merkmalsausprägung mit 19 Klassen wird nicht ausgenutzt und es wird keine genaue Anzahl für eine optimale Klassifizierung festgestellt. Allgemein ist in der Literatur keine einheitliche Exterieurklassifizierung zu finden. In der Zuchtwertprüfung verschiedener Länder werden ebenfalls unterschiedliche Skalen verwendet. So beschreiben KLINIENÉ und KLIMAS (2002) eine obligatorische OC-Evaluierung für das schwedische Zuchtprogramm. In Dänemark und Finnland werden Stationstests mit radiologischer

Beurteilung auf einer Skala von 1 bis 5 durchgeführt und Tiere mit einem positiven Befund von der Zucht ausgeschlossen. In Holland und den USA wird auf einer Skala von 1 bis 9 auf BS getestet und klassifiziert. Die internationale Zuchtwertschätzung – selbst innerhalb der EU – ist dadurch nicht vergleichbar. Genauso werden in der internationalen Forschung wie in der Histologieklassifizierung der OC und für BS bzw. das Exterieur der Tiere überall unterschiedliche Skalen sowie Skalenniveaus verwendet. ROTHSCCHILD und CHRISTIAN (1988) beurteilen BS-Merkmale in Form der Gliedmaßenstellung und Bewegung auf einer nicht linearen Skala von 1 bis 9 (4 und 5 als Optimum), andere verwenden ein lineares System mit einer Skala von 1 (normal, Optimum) bis 5 (starke Veränderungen, Abweichungen vom Optimum) (JORGENSEN und VESTERGAARD 1990, JORGENSEN et al. 1995, STERN et al. 1995) oder umgekehrt (SERENIUS et al. 2001) oder mit mehr oder weniger Merkmalsausprägungsklassen (SCHWOERER 1991, JORGENSEN 2000a). Der Unterschied einer linearen zu einer nicht linearen Beschreibung liegt in der Aussage über die Art und Häufigkeit. Die lineare Beschreibung ermöglicht beides, während bei der nicht linearen Beschreibung nur eine Aussage über die Höhe der Abweichung vom Optimum erfasst werden kann (SCHULZE et al. 1998). In der hier erfolgten Dissertationsstudie wurden lineare Merkmale erfasst und in ordinale (nicht lineare) transformiert. In der linearen Beurteilung wurde eine Punkteskala von 1 bis 5 verwendet, wie sie in Deutschland bei der Exterieurbeurteilung zur Zuchtwertbestimmung beim Schwein vorgeschrieben ist und der von BREM (1998) entspricht.

In der hier durchgeführten Zuchtwertschätzung konnten nur 12 % der Tiere ein dem Zuchtziel entsprechendes, optimales Fundament vorweisen. Dagegen wurden bei 28 % mehrere Abweichungen vom Optimum der Fundamentbeschaffenheit festgestellt. Alle anderen Tiere zeigten leichte Fundamentveränderungen. Auch zur Fundamentnote wurden Studien durchgeführt. Ihre Heritabilität liegt bei $h^2 = 0,23$ (SCHWOERER 1991) und steht in starkem Zusammenhang mit BS (ROTHSCCHILD und CHRISTIAN 1988, ROTHSCCHILD et al. 1988). Wie bereits in Zusammenhang der Prävalenz von histologischen Veränderungen beschrieben, handelte es sich bei den verwendeten Tieren in dieser Dissertationsstudie um Tiere aus einer Ressourcenpopulation mit einem möglichst großen Genpool. Aus diesem Grund konnte auch nicht von einem einheitlichen Exterieur ausgegangen werden.

Es stellte sich heraus, dass eine optimale Winkelung der Vordergliedmaße mit einer optimalen Winkelung der Hinterbeine in Zusammenhang steht. Dies lässt sich mit der Statik zur Erhaltung des Gleichgewichts begründen. Von großer Bedeutung ist dabei die Lage des Körperschwerpunktes, der sich in der Unterstützungsfläche befinden muss. Die Unterstützungsfläche wird durch die Gliedmaßenstellung hergestellt und kann durch verschiedene Körperhaltungen und Gliedmaßenstellungen vergrößert oder verkleinert werden (NICKEL et al. 1992). Durch diese Stellungsänderungen der Gliedmaßen verändern sich auch deren Winkelungen, wovon zur Erhaltung des Schwerpunktes sowohl Vorder- als auch Hintergliedmaßen betroffen sind.

Allgemein schien das Exterieur in dieser Studie in vielen Punkten nicht in Zusammenhang mit der Gelenkknorpelbeschaffenheit zu stehen. Dies bestätigt die Theorie, dass OC nicht unbedingt mit BS zusammenhängt, wie einige Forscher beschreiben (GOEDEGEBUURE et al. 1988, JORGENSEN et al. 1995). Ein Bezug zwischen Histologie und Exterieur ließ sich dennoch zwischen einzelnen Merkmalen herstellen. Die Winkelung der vorderen Extremität zeigte einen Zusammenhang mit OC-Läsionen des proximalen und distalen Femurs, die Winkelung hinten nur mit Läsionen des proximalen Femurs. JORGENSEN und ANDERSON (2000) assoziieren eine positive Korrelation der Alterationen an den Femurkondylen mit einer Abduktion der Hintergliedmaße. In der Literatur werden vor allem durchtrittige, schwache Fesseln als Zeichen von BS angesehen. Sie sollen zu pathologischen Veränderungen im Kniegelenk führen (SCHWOERER 1991). JORGENSEN (2000b) stellt allerdings eine negative Korrelation zwischen weichen Fesseln an den Hintergliedmaßen und OC-Läsionen fest. Er beschreibt einen positiven Zusammenhang zwischen allgemeinen Knorpelveränderungen und einer steilen Fesselung an der hinteren Extremität. In der vorliegenden Dissertationsstudie wurde der Einfluss der Winkelung auf die Knorpelbeschaffenheit mithilfe der nicht linearen Beurteilung isoliert. Daher war es nicht möglich zu beurteilen, welche Art der Winkelung eine Prädisposition für OC darstellte. Es kann nur gesagt werden, dass es vermehrt zu OC-Läsionen kommt, wenn eine Abweichung von der optimalen Winkelung vorliegt.

Eine weitere Korrelation zeigte sich zwischen der Stellung der Hinterbeine und der Knorpelbeschaffenheit des distalen Femurs. Auch in anderen Studien (SCHWOERER 1991, JORGENSEN 2000a, JORGENSEN 2000b) können positive Verbindungen zwischen der

Stellung bzw. Abduktion der Extremitäten und OC bzw. OA hergestellt werden. Dabei beeinflusst die Knorpelbeschaffenheit und -belastbarkeit die Stellung der Gliedmaße und umgekehrt. Allein bei der Verlagerung des Körperschwerpunktes durch Veränderung der Gliedmaßenstellung wird der Belastungsschwerpunkt innerhalb der Gelenkflächen verschoben (NICKEL et al. 1992), was zu OC-Läsionen führen kann.

Sauen zeigten bei weicherer Fesselung mehr OC-Läsionen am distalen Humerus als Börgen. Andere Studien stimmen mit dieser Erkenntnis insoweit überein, als Sauen allgemein häufiger von BS betroffen sind (ROTHSCHILD und CHRISTIAN 1988) und bei einer schwachen Fesselung der Hintergliedmaße häufig Veränderungen im Kniegelenk zu finden sind (SCHWOERER 1991). Ein allgemeiner Geschlechtsunterschied konnte allerdings in der Versuchspopulation nicht bestimmt werden. Es wurde nur belegt, dass Sauen am distalen Humerus mehr Knorpelveränderungen aufwiesen als Börgen.

Wenn, wie bereits oben beschrieben, eine weiche Fesselung der Hinterbeine mit Veränderungen des Kniegelenks in Zusammenhang steht, nimmt die Winkelung der Gliedmaßen Einfluss auf die Knorpelbeschaffenheit. Dadurch sollte eine weiche Fesselung der Vorderextremität auch mit OC-Läsionen im Ellenbogengelenk assoziiert sein können. Dies steht im Gegensatz zur Erkenntnis von JORGENSEN (2000a), wonach weiche Fesseln negativ mit BS und OC-Läsionen korreliert sind. REILAND et al. (1978) stellen alternativ bei Börgen mehr OC-Läsionen im *Condylus femoris* fest als bei Sauen. Diesen Studien liegen unterschiedliche Schweinerassen zugrunde, sodass ein Geschlechtsunterschied in den unterschiedlichen Rassen möglicherweise unterschiedliche Auswirkungen auf BS- bzw. OC-Veränderungen zur Folge hat. Dies kann vor allem durch die unterschiedliche Beckenstellung zwischen den Geschlechtern zustande kommen (ROTHSCHILD und CHRISTIAN 1988), aber auch durch andere rassenspezifische Stellungen der Gliedmaße.

Wie bereits bei der Auswertung der histologischen Befunde beschrieben, hat auch bei der Exterieurerrfassung die Rasse einen deutlichen Einfluss. Dabei scheint das Exterieur in dieser Studie in vielen Punkten nicht in Zusammenhang mit der Gelenkknorpelbeschaffenheit gestanden zu haben. Dass im Rahmen der vorliegenden Studie lediglich eine geringe Übereinstimmung von nur wenigen Exterieurmerkmalen mit den histologischen Befunden vorlag, könnte an der relativ geringen Anzahl an Tieren liegen. Es konnte allerdings, wie

bereits oben dargestellt, von einer qualitativ hochwertigen Klassifizierung durch die Histologie ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu stand die vergleichsweise subjektive Exterieurbeurteilung, die die Auswertung negativ beeinflussen könnte. Im Vergleich wurden in anderen Studien bis zu 11.000 Schweine untersucht. Ähnlich wenige Zusammenhänge zwischen BS- und OC-Merkmalen werden aber auch von JORGENSEN und ANDERSON (2000) beschrieben, sodass, trotz der wenigen Zusammenhänge in der vorliegenden Studie, von einer weitestgehend objektiven Beurteilung des Exterieurs ausgegangen wurde.

Prüfung der Zusammenhänge zwischen einzelnen Fundamentmerkmalen und Parametern der Mast- und Schlachtleistung sowie der Fleischbeschaffenheit

Vor allem auf die Fleischleistungsparameter und Produktionsmerkmale haben die Elternrassen einen bedeutenden Einfluss. Durch eine Kombination der Rassen Duroc und Pietrain mit ihren gegensätzlichen Fleisch- und Produktionsqualitätsmerkmalen (vgl. Kapitel 2.2) ist in der F2-Generation ein großer Genpool mit verschiedenen Phäno- und Genotypen entstanden. Dadurch konnte eine ausgesprochene Vielfalt an Merkmalen erreicht und bereits QTL für pH-Wert-assoziierte Merkmale wie Fleischfarbe und Leitfähigkeit sowie QTL für Schlachtkörperbeschaffenheit und Wachstum als multiple QTL detektiert werden (LIU et al. 2007). Die Heritabilität für Fleischleistungsmerkmale liegt zwischen 0,12 und 0,66, wie z. B. bei Tageszunahme ($h^2 = 0,28$), Futtermittelverwertung ($h^2 = 0,42$) oder Fleischanteil ($h^2 = 0,60$) (SERENIUS et al. 2001, KADARMIDEEN et al. 2004, KADARMIDEEN 2005). Die mittleren bis hohen Heritabilitäten von einigen Fleischleistungsmerkmalen sind von besonderer Bedeutung für die Zucht. Vor allem der Einfluss der Produktions- und Fleischleistungsmerkmale in Zusammenhang mit BS bzw. OC ist von großem züchterischem Interesse. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, untersuchen bereits mehrere Studien den Einfluss von Produktions- und Fleischleistungsmerkmalen auf Fundamentmerkmale, BS und OC. SCHULZE et al. (1998) bestimmen einen geringen Zusammenhang zwischen Fundamentmerkmalen und Mastleistung, sodass eine Selektion auf Fundamentkriterien wenige Auswirkungen auf diese haben sollte. BERESKIN (1979) schätzt niedrige bis moderate Korrelationen zwischen BS an den vorderen Extremitäten mit der täglichen Zunahme und Rückenspeckdicke. Andere Studien belegen niedrig bis moderate nachteilige

Zusammenhänge zwischen Rückenspeckdicke, TGZ und Magerfleischanteil mit BS-Merkmalen (WEBB 1983, LUNDEHEIM 1987).

In der vorliegenden Studie konnten Beziehungen zwischen der Schlachtkörperbeschaffenheit und der Winkelung des hinteren Fundaments sowie zwischen der Schlachtkörperbeschaffenheit und – in Abhängigkeit vom Geschlecht – den histologischen Befunden der distalen Gelenkoberflächen nachgewiesen werden. Bei steigendem Faktor 1 „Schlachtkörperbeschaffenheit“ nahm der Speckanteil bzw. die Speckdicke zu, wie die Korrelationsmatrix der Faktorladung mit sämtlichen Speckmerkmalen belegt. Bei höherem Speckanteil wurde bei Sauen eine bessere Knorpelstruktur der distalen Gelenkflächen an Humerus und Femur beobachtet. Sauen zeigen in der Jugendphase ein langsames Wachstum als Börgen, setzen weniger Speck an und verfügen über einen geringeren intramuskulären Fettanteil. Da vor allem zunehmende Speckmaße mit Veränderungen der distalen Gelenkflächen assoziiert werden konnten, waren diese Veränderungen bei Börgen massiver zu finden als bei Sauen. Auch GOEDEGEBUURE et al. (1988) entdecken mehr Läsionen bei Ebern als bei Sauen. Eine gute Fleischbeschaffenheit, die bei den langsamer wachsenden Sauen eher zu finden ist als bei Börgen, sprach für eine höhere Prävalenz von Läsionen und weicheren Fesseln bei den männlichen Tieren.

Im Vergleich zu den weiblichen Tieren traten bei Börgen mit höherem Speckanteil häufiger Abweichungen in der Hinterhandstellung auf. In Anlehnung an die Zusammenhänge der Vordergliedmaße wurde die nicht optimale Hinterhandstellung in dieser Studie vor allem mit OC-Läsionen assoziiert. Auch BERESKIN (1979) bringt die Rückenspeckdicke positiv mit BS der Vordergliedmaße in Verbindung.

Die Fleischbeschaffenheit wurde vor allem mit der Winkelung vorne sowie mit der Ausprägung von Läsionen der proximalen Gelenkfläche des Femurs assoziiert. Ein steigender Faktor 2 „Fleischbeschaffenheit“ führte zu niedrigen pH-Werten sowie einer dunkleren Fleischfarbe (OPTO) mit steigender Fleischfläche (FLFL), also zu einer steigenden Fleischqualität. Außerdem stand ein steigender Faktor 2 mit weicheren Fesseln und einer schlechteren histologischen Klassifizierung des proximalen Femurs in Beziehung. Diese Ergebnisse stehen auch in Zusammenhang mit Ergebnissen von SCHWOERER (1991) und bestätigten die Angaben, dass große Winkel der Fesseln mit Lahmheiten sowie schwache

Fesseln der Hinterhand mit Veränderungen im Kniegelenk verbunden sind. Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse von JORGENSEN (2000b), der weiche Fesseln mit guter Bewegung und gesunden Gliedmaßen assoziiert. Außerdem sollen weiche Fesseln positiv mit der TGZ korreliert sein (SCHULZE et al. 1998). Weitere Einflüsse der Fleischbeschaffenheit konnten in der vorliegenden Studie im Zusammenhang mit dem Geschlecht auf die Winkelung hinten nachgewiesen werden. Sauen wiesen bei gleicher Fleischbeschaffenheit steilere Hintergliedmaßen auf als Börgen. Vor allem zeigten Sauen bei gleicher Fleischqualität (pH-Werte sowie Fleischfarbe) eine bessere Knorpeloberfläche des proximalen Femurs als Börgen. Ein Geschlechtseinfluss lag allerdings bei der Assoziation einer schlechteren Histologieklassifizierung mit einer besseren Fleischbeschaffenheit nicht vor. Diese nachteiligen Zusammenhänge zwischen der Fleischqualität und OC-Veränderungen sind bereits in einigen Studien beschrieben (KADARMIDEEN et al. 2004, LUNDEHEIM 1987). KADARMIDEEN et al. (2004) zeigen positive Zusammenhänge zwischen dem Magerfleischanteil sowie pH-Werten eine und 24 Stunden p. m. mit Knorpelveränderungen am distalen Humerus und Femur auf. Außerdem decken sie unvorteilhafte Korrelationen der Fleischfarbe und Läsionen des Humeruskopfs mit den medialen Femurkondylen auf. Alle diese Fleischbeschaffenheitsmerkmale laden mit einem großen Einfluss auf den Fleischbeschaffenheitsfaktor (Korrelationsbetrag größer 0,5) und bestätigen die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich des Zusammenhangs mit BS oder OC-Veränderungen.

Quantifizierung der mRNA-Expression einiger funktionaler Kandidatengene zur Aufdeckung möglicher Unterschiede zwischen OC bzw. OA und gesundem Gelenkknorpel

Als Grundlage für die durchgeführte mRNA-Quantifizierung in der Aufbaustudie konnten zielsicher definierte Untersuchungsgruppen ausgewählt werden. Die Untersuchungsgruppen wurden in der Basisstudie charakterisiert und durch die histologische Klassifizierung phänotypisiert.

Kriterien für die Auswahl der einzelnen Kandidatengene zu OC bzw. OA wurden bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben. Effizienz, Bestimmtheitsmaß und Schmelzpunktcurven lagen alle im Rahmen der Werte, die vom Geräte-Hersteller vorgegeben

wurden. Die Güte der PCR-Messungen konnte durch die Variationskoeffizienten beurteilt werden und wird im Folgenden diskutiert. Das Haushaltsgen GAPDH wurde als geeignet betrachtet.

Die Basis für allgemeine RT-PCR-Analysen liegt in einer qualitativ hochwertigen RNA, um eine mögliche Varianz der Ergebnisse aufgrund von RNA mit verschiedener Integrität auszuschließen (BENGTSSON et al. 2007). Eine qualitativ hochwertige Gesamt-RNA konnte sowohl in der Qualitätsbestimmung durch Messungen der Absorption bei zwei verschiedenen Wellenlängen (260 und 280 nm), als auch durch eine verhältnismäßige Darstellung der rRNA-Banden im SYBRGreen II®-Gel sichergestellt werden. Ein Verhältnis der optischen Dichten (Verhältnis OD_{260}/OD_{280}), die bei 260 und 280 nm gemessen werden, von größer 1,8 (FLEIGE et al. 2006), einhergehend mit einer verhältnismäßigen Auftrennung der 18S- und 28S-Banden der rRNA (IVELL 1998), spricht für eine gute Qualität der Gesamt-RNA (FLEIGE et al. 2006).

Die Ausbeute an Gesamt-RNA in Höhe von 0,06 $\mu\text{g RNA/g Gewebe}$ (Minimum: 0,02 $\mu\text{g RNA/g Gewebe}$; Maximum: 0,09 $\mu\text{g RNA/g Gewebe}$), die im Rahmen der Dissertation erzielt wurde, lässt sich mit der Ausbeute von MCKENNA et al. (2000) vergleichen. Diese erhalten im Mittel eine Gesamt-RNA-Ausbeute bei Knorpelgewebe von humanen Kniegelenken in Höhe von 0,08 $\mu\text{g/g}$ bei unverändertem Knorpel und 0,06 $\mu\text{g/g}$ bei Knorpel mit OA. Allerdings wird dort mit einem Minimum von 0,01 $\mu\text{g/g}$ bzw. Maximum von 0,18 $\mu\text{g/g}$ eine deutlich größere Schwankung der Ausbeute dokumentiert als bei den vorliegenden Ergebnissen.

Die Güte der Echtzeit-RT-PCR konnte vor allem durch die Inter- und Intraassayvarianz als Variationskoeffizient bestimmt werden. Die Intraassayvarianz lag bei 9,9 % ($\pm 6,4$ %). Im Vergleich mit Kalibrierungsplatten, die vom Hersteller des Echtzeit-PCR-Cyclers geliefert wurden, lag die Intraassayvarianz einer Probe in der eigenen Studie deutlich niedriger. Die Kalibrierungsplatten zeigten Variationskoeffizienten einer Doppelbestimmung von bis zu 45 %; bei der Variationskoeffizienten-Bestimmung von 36 Messungen einer Probe lag dieser sogar bei 480 %. Eine andere Kalibrierungsplatte zeigte bei einer Wiederholung von mehr als 30 Proben eine Intraassayvarianz von 9 %. Die Darstellung dieser unterschiedlichen Intraassayvarianzen verdeutlicht, wie groß die möglichen Messunterschiede derselben Probe

auf einer Platte sein können. Damit war es notwendig, eine Standardanforderung an alle gemessenen Proben und Platten zu stellen, um eine vergleichbare Güte der Messungen zu gewährleisten. Das Ziel, einen Variationskoeffizienten von unter 30 % zu erhalten, konnte bei allen Assays erreicht werden, sodass in allen Assays von einer niedrigen Intraassayvarianz ausgegangen werden konnte.

Auch die Grenze der akzeptablen Interassayvarianz befand sich auf einem ähnlich hohen Niveau. Die Interassayvarianz wurde durch den Variationskoeffizienten derselben Probe bei verschiedenen Messungen mit verschiedenen Platten bestimmt. Als Probe wurde durchgehend eine Poolprobe verwendet. Bisher stufen OVSTEBE et al. (2003) Interassayvarianzen zwischen 18 % und 38 % als gutes Qualitätsmerkmal einer reproduzierbaren, validen Echtzeit-RT-PCR-Analyse ein. Da die Interassayvarianz in der durchgeführten Dissertationsstudie bei 20,6 % ($\pm 5,1$ %) lag, konnte – in Kombination mit einer niedrigen Intraassayvarianz – davon ausgegangen werden, dass eine qualitativ hochwertige, reproduzierbare Quantifizierung der mRNA von Kandidatengenen erfolgte.

Die Expression der Kandidatengene sollte durch einen Vergleich der mRNA-Expression zwischen gesundem und erkranktem Knorpel (Gelenkhistologieklasse 0 und 3) und für jede Gelenkoberfläche geprüft werden. Die meisten signifikanten Unterschiede zwischen den Gelenkoberflächen ließen sich bei der mRNA-Expression des Kollagen V detektieren: Die mRNA-Expression von Kollagen V in der distalen Femuroberfläche war zu jeder anderen Gelenkoberfläche verschieden. Auch die mRNA-Expression des Kollagen X der Femurkondylen zeigte einen signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschied zum Humeruskopf sowie einen tendenziellen ($p \leq 0,1$) Unterschied zur Humeruskondyle. Bei der Analyse der Kollagen I-Expression konnten signifikante Unterschiede zwischen der proximalen Gelenkfläche des Femurs isoliert werden. Kollagen II und TGF- β 3 ließen keine Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Gelenkoberflächen erkennen. Ein Einfluss der Gelenkoberfläche auf die Expression verschiedener mRNAs kann vor allem durch die unterschiedliche Belastung begründet werden. Die Knorpeldicke richtet sich nach der Belastung und mit dieser die Dicke der verschiedenen Zonen des hyalinen Gelenkknorpels. Gerade die Menge an Kollagen X, welches vor allem in der hypertrophen Zone oder in calcifizierenden Regionen vorkommt (WARDALE und DUANCE 1993, AIGNER et al. 1997), und damit einhergehend die Menge der mRNA, kann durch die Dicke des Knorpels

und damit auch die Dicke der hypertrophen Zone beeinflusst werden. Eine standardisierte Knorpeldicke wurde nur bedingt auf dem Schlachthof genommen, da die Knorpelproben immer an den gleichen Stellen der Gelenkoberflächen und bis auf den subchondralen Knochen genommen wurden. Der immer gleiche Ort der Probenahme sollte eine Objektivität der mRNA-Messungen gewährleisten. Bei einer Probenahme von schon makroskopisch erkennbaren Läsionen ist der objektive Vergleich der mRNA-Quantität nicht mehr gegeben. Da die Knorpelproben überall gleich bis auf den subchondralen Knochen genommen wurden, sei vorausgesetzt, dass die Knorpeldicke auf alle Kandidatengene den gleichen Einfluss ausübt. Zusätzlich sollte die standardisierte Probenahme gewährleisten, dass die Verhältnisse der einzelnen Zonen innerhalb des Gelenkknorpels, und somit zwischen den Knorpelproben, gleich blieben.

Auffallend war, dass die meisten Unterschiede in der Expression verschiedener Kandidatengene zwischen dem distalen Femur und anderen Gelenkoberflächen zustande kamen. Der distale Femur wies die größte Prävalenz von Knorpelveränderungen auf (s. o.). Die Veränderungen konnten allerdings nicht in die Expressionsanalyse mit eingehen, da ein definiertes Schema mit jeweils fünf Proben pro histologischer Gelenkkategorie verwendet wurde. Dieses Schema sah vor, dass nur die beiden Gelenkhistologieklassen 0 und 3 in die Analyse mit gleicher Anzahl für jede Gelenkoberfläche eingingen. So bleibt die Hypothese bestehen, dass aufgrund von statischen Einflüssen, die bereits im Zusammenhang mit den Gelenkveränderungen beschrieben wurden, das jeweilige Gelenk einen Einfluss auf die mRNA-Expression nimmt.

Der Vergleich der Expressionsmuster der Kandidatengene zwischen den Histologieklassen 0 und 3 ergab keine Unterschiede. Dagegen isolieren JEFFERIES et al. (2002) mRNA-Expressionsunterschiede von Kollagen II und X. Die abweichenden Ergebnisse sind möglicherweise durch eine unterschiedliche Histologieklassifizierung zu begründen. Wie bereits oben beschrieben, ist noch keine einheitliche Klassifizierung in der Literatur vorhanden. Dagegen ist belegt, dass verschiedene Merkmalsausprägungen die Ergebnisse beeinflussen können (FUKAWA und KUSUHARA 2001). Ein weiterer Aspekt ist die verwendete Rasse, wobei dieser Einfluss anhand eines Vergleichs der Studie von JEFFERIES et al. (2002) mit der vorliegenden Dissertationsstudie weitestgehend reduziert werden kann. Auch JEFFERIES et al. (2002) verwenden eine Duroc-Einkreuzung, wobei allerdings nur

Eber analysiert werden. Ein Geschlechtseinfluss auf die mRNA-Expression konnte in der eigenen Studie aufgrund der relativ geringen Tierzahl beider Geschlechter nicht gezeigt werden. Zudem wurden nicht Eber, sondern Börgen betrachtet. Bei der mRNA-Quantifizierung mussten von fünf Tieren je Gelenk und Gelenkhistologieklasse mindestens zwei Tiere jeweils männlich und weiblich sein, um so eine Homogenität der Geschlechter zwischen den Gruppen zu gewährleisten.

JEFFERIES et al. (2002) schlachten die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten, und zwar in einem Alter zwischen sieben und 21 Wochen. Die Tiere in der Dissertationsstudie wurden in einem Alter von ca. 27 Wochen (189 Tage) geschlachtet. Das höhere Alter spricht für deutlichere Zusammenhänge in der Dissertationsstudie. Denn, wie bereits beschrieben, nehmen die Veränderungen mit dem Alter der Tiere zu (GRONDALEN 1974b). Auch JEFFERIES et al. (2002) bestätigen diese These mit einem Prävalenzanstieg der Läsionen mit 16 Wochen und einer steigenden Inzidenz mit 21 Wochen. Dabei gehen in die Untersuchung der Prävalenz- und Inzidenzunterschiede im Alter jeweils zehn Tiere pro Schlachtung ein. Bei der Schlachtung von zwölf Wochen alten Schweinen sind keine Tiere mit OC-Läsionen zu finden, nach 16 Wochen sind es sechs und in einem Alter von 21 Wochen sind es zehn Tiere. Im Vergleich der allgemeinen Gruppenstärke der beiden Untersuchungen ist erkennbar, dass die Besetzung der Randgruppen in der Dissertationsstudie sehr gering ausfiel und diese Ergebnisse dadurch nicht die gleiche Validität zeigen können wie die von JEFFERIES et al. (2002). Die Verteilung der Tieranzahlen auf die Extremgruppen wird von JEFFERIES et al. (2002) nicht beschrieben und kann somit nicht mit der vorliegenden Studie verglichen werden.

Dennoch mag das Alter der Tiere noch nicht ausreichend gewesen sein, um genügend Veränderungen zu klassifizieren. Vor allem die nur mittelmäßigen Übereinstimmungen zwischen Exterieur und Histologie legen die Vermutung nahe, dass entsprechende Stadien, in denen Haltungsveränderungen oder Stellungsfehler aufgrund von Schmerzen vorkommen, altersbedingt noch nicht erreicht wurden. Beim Menschen lassen sich nach BUCKWALTER und MARTIN (2006) vier Stadien der OCD erkennen: A) Latenzphase oder auch Schlummerphase, in der keine klinischen Anzeichen vorhanden sind, B) Stadium der Dissektion, in der beginnende Lahmheiten und Schmerzen auftreten, C) Stadium des freien Knorpelkörpers, in dem vermehrt Lahmheiten und Einklemmungserscheinungen auftreten,

sowie D) es zur Bildung der sekundären Arthrose mit Weichteilverdickung und/oder chronischer Synovitis kommen kann. Nach einer Orientierung an diesen Stadien wird vermutet, dass aufgrund des geringen Alters der Schweine noch keine OC der Stadien C und D vorlag. Gelegentliche Lahmheiten machen noch keine Haltungs- oder Stellungsanomalien aus. Die beschriebenen Veränderungen wurden vor allem in der Phase der Pubertät der Tiere beobachtet. Die Pubertätsphase beginnt üblicherweise in einem Alter von vier bis fünf Monaten und ist durch ein schnelles Wachstum charakterisiert (REILAND 1978a). Dieses Alter wird gewöhnlich von Schlacht- und Masttieren so gerade erreicht. Die Schlachttiere der Dissertationsstudie erreichten ein Alter von ca. sechs Monaten, sodass die weiblichen Tiere bereits die Pubertät durchlaufen hatten. Dennoch ist eine weitere Zunahme der Prävalenz von OC mit dem Alter wahrscheinlich, sodass das Alter möglicherweise noch nicht ausreichend war, um solide Befunde zur Ursache von OC bzw. BS zu erhalten.

JEFFERIES et al. (2002) entnehmen Knorpelproben direkt neben makroskopisch erkennbaren Läsionen bzw. direkt das Gewebe, in dem die Läsion auftritt. Dadurch wird gewährleistet, dass im Vergleich zur unveränderten Kontrolle definitiv verändertes Gewebe verwendet wird. Daher liegt hier eine subjektive Beurteilung der allgemeinen Knorpelbeschaffenheit vor, indem schon vorher als verändert deklariertes Gewebe entnommen wird. In der vorliegenden Dissertationsstudie erfolgte eine standardisierte Probenahme. Sie wurde immer an den gleichen Stellen für die Expressionsanalysen und histologischen Beurteilungen durchgeführt. Das Knorpelgewebe für die mRNA-Quantifizierung wurde möglichst großflächig abgenommen. Dadurch konnte in der mRNA-Analyse Material verwendet werden, welches einen breiten Raum für Veränderungen darstellte. Dies kann auf der einen Seite positiv betrachtet werden, da ggf. vorhandene Veränderungen erfasst werden können. Auf der anderen Seite könnten diese kleinen fokalen Veränderungen durch eine Mischung mit unverändertem Gewebe so weit verdünnt worden sein, dass die veränderten mRNA-Konzentrationen nicht mehr zu detektieren waren.

Die Knorpelproben für den molekularbiologischen Teil wurden an den medialen Kondylen des Humerus und Femurs sowie craniomedial an den Köpfen der beiden Knochen entnommen. Das Gewebe für die histologischen Schnitte wurde von den lateralen Kondylen sowie der caudoventralen Seite der Köpfe von Humerus und Femur gezogen. Dadurch war der Abstand zwischen dem Bereich, der histologisch beurteilt wurde, und dem Gewebe,

welches für die Expressionsanalyse diente, möglicherweise zu groß. Aufgrund von nur fokal vorkommenden Veränderungen konnte es vorkommen, dass histologische Bereiche als hochgradig verändert beurteilt wurden, die aber in den Bereichen, die für die molekularbiologische Untersuchung entnommen wurden, keine Veränderungen mehr aufwiesen oder umgekehrt. Diese Ungenauigkeit wurde durch eine Beurteilung von zwei histologischen Schnitten möglichst weit ausgeschlossen. Wenn hochgradige Veränderungen nur in zwei möglichst weit auseinander liegenden Schnitten auftraten, wurde das entsprechende Gelenk als allgemein hochgradig verändert in die histologische Gelenkkategorie 3 eingestuft. Genauso wurde mit den Schnitten für die Gelenkkategorie 0 verfahren. Dafür durften beide Schnitte keine Veränderungen aufzeigen. Der Unterschied zwischen den Bereichen der histologischen und molekularbiologischen Analyse kann dennoch eine nicht zu messende Beeinflussung des Ergebnisses ausgemacht und so zu mangelnder Übereinstimmung zwischen mRNA-Expression und histologischer Klassifizierung geführt haben.

In der weiteren Untersuchung der Expression des TGF- β 3 am Schwein stimmte das Ergebnis mit dem von JEFFERIES et al. (2002) überein, da auch dort kein Unterschied zwischen normalem und OC-Knorpel nachgewiesen wird. Keine Expressionsunterschiede liegen ebenfalls beim Menschen und beim Pferd vor (FRENKEL et al. 2000, SEMEVOLOS et al. 2001). Dies konnte für das Schwein in der vorliegenden Studie bestätigt werden.

In Bezug auf die mRNA-Expression sah es beim Kollagen V anders aus, obwohl beim Hund eine signifikant höhere mRNA-Expression in OC-Knorpel gefunden wird (CLEMENTS et al. 2006). WARDALE und DUANCE (1993) waren nicht in der Lage, Kollagen V-Protein im Gelenkknorpel vom Schwein darzustellen. Damit konnte keine Aussage über das Vorliegen von Kollagen V-Protein bei OC oder in gesundem Knorpel gemacht werden. In der vorliegenden Dissertationsstudie wurde Kollagen V-mRNA in allen Gelenkknorpelproben gefunden. Allerdings konnte ein Unterschied in der Quantität der mRNA zwischen OC und gesundem Knorpel nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist der Expressionsunterschied zwischen Protein und RNA durch eine unterschiedliche Sensitivität der Messmethoden zu erklären. Ein anderes Argument könnte eine mögliche Regulation der Translation sein. Dabei kann eine Transkription der DNA zur RNA erfolgen, die Translation aber ganz oder teilweise gehemmt sein, so dass zwar RNA für Kollagen V vorliegt, aber kein Protein nachweisbar ist.

Kollagen I wurde in Knorpelproben der Histologieklassen 0 und 3 detektiert. Es konnte allerdings kein Unterschied zwischen verändertem und unverändertem Knorpel ausgemacht werden. Auf Proteinebene wurden Expressionsunterschiede an Tieren mit einem Gewicht von ca. 60 kg beobachtet (WARDALE und DUANCE 1994). Das lässt auf ein deutlich jüngeres Alter der Tiere im Vergleich zu den Tieren aus der Dissertationsstudie schließen. Auch verwenden WARDALE und DUANCE (1994) eine Kreuzung aus Yorkshire und Landrasse, die nicht mit einer Duroc x Pietrain-Population zu vergleichen ist. Beide Kreuzungspopulationen weisen andere rassetypische Merkmale vor, auch im Hinblick auf Fundamentmerkmale. Die Probenahme von WARDALE und DUANCE (1994) erfolgt ebenfalls auf andere Weise als hier. Es wurden zudem makroskopisch veränderte Bereiche entnommen und diese gegen unveränderten Knorpel gemessen. Wie tief die Knorpelentnahme in den subchondralen Knochen reichte und inwiefern dort ggf. Knochenmaterial mitgenommen wurde, kann nicht gesagt werden. Bei der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung standardisierten Probenahme waren die Regionen, an denen die Probenahme erfolgte, genau festgelegt. Dadurch war ausgeschlossen, dass fremdes Gewebe in die Probe gelangte.

Die mRNA-Expressionsmessung der funktionalen Kandidatengene wurde valide und qualitativ hochwertig durchgeführt. Die Ergebnisse waren wiederholbar. Allerdings konnten keine Unterschiede zwischen OC- und unverändertem Knorpel zwischen den Extremgruppen der Histologieklassen nachgewiesen werden. Dies kann möglicherweise auf die Tierzahl, das Tieralter und die Art der Probenahme zurückgeführt werden. Ein definierter Ort der Probenahme hatte seine Vorteile in Bezug auf die Veränderungen eines Bereichs. Da Veränderungen aber gerade bei den jungen Tieren nur fokal vorliegen, konnten diese möglicherweise nur unzureichend erfasst werden. Außerdem ist das Alter der Tiere zu berücksichtigen. Ältere Tiere könnten verwendet werden, um massive Veränderungen analysieren zu können. Jüngere Tiere könnten dagegen Aufschluss über die Anfangsstadien der Knorpelveränderungen und Hinweise zur Rolle der Genetik bringen. Ein weiterer Ansatzpunkt, um Veränderungen und deren Genetik genauer zu erfassen, wäre, Klontiere zu verwenden, um an verschiedenen Zeitpunkten verschiedenes Material in Form von Proteinen, mRNAs bzw. Knorpel zur Beurteilung von OC zu erhalten. Dadurch könnte das Zeitfenster von der Maturation über den Fetus bis zum adulten Tier erweitert und die Entwicklung von

OC-Läsionen deutlicher erfasst und verglichen werden. Des Weiteren könnte die Klassifizierung weiter optimiert werden und die Ergebnisse mit einer größeren Tierzahl abgesichert werden.

Bisher durchgeführte Selektionsprogramme für BS hatten aufgrund der geringen Heritabilitäten der BS- oder OC-Merkmale nur mäßigen Erfolg. Studien mit BS-Selektion über fünf Generationen von drei Linien mit unterschiedlichen BS-Graden (GOEDEGEBUURE et al. 1988, ROTHSCHILD und CHRISTIAN 1988, ROTHSCHILD et al. 1988) stellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Generationen heraus.

So ist die Forschung weiter auf der Suche nach Markern, die sich durch die Zucht positiv beeinflussen lassen, um BS und degenerative Gelenkveränderungen zu reduzieren. Die Möglichkeit, diese Marker durch funktionale Kandidatengene in die Zucht mit einzubeziehen, sind gegeben. Allerdings ist hierfür ein breiteres Screening nötig, um mögliche Kandidatengene zu entdecken. Der Mikroarray bietet dafür die geeignetsten Voraussetzungen und die Möglichkeit, mehrere Hundert bis Tausende von Kandidatengenen gleichzeitig zu erfassen.

Basisdaten zur Erfassung von BS und degenerativen Gelenkveränderungen konnten erfolgreich analysiert und ein definierter Phänotyp der Ressourcenpopulation erstellt werden. Die Ressourcenpopulation diente dem Zweck, mögliche Merkmale der Ausgangsrassen Duroc und Pietrain weit zu streuen und so einen möglichst großen Pool an Phäno- und Genotypen zu erhalten. Allerdings konnten in dieser Studie keine geeigneten Kandidatengene für diese Rassenkombination isoliert werden, die in degeneriertem und unverändertem Gelenkknorpel unterschiedlich exprimiert werden.

5 Zusammenfassung

Christiane Theune:

Phänotypisierung von Schweinen einer F2-Ressourcenpopulation für molekular-genetische Untersuchungen zum Beinschwächesyndrom: histologische Klassifizierung von Knorpelstrukturen, Vergleich mit Exterieur- und Leistungsmerkmalen sowie mRNA-Expressionsanalysen einzelner funktionaler Kandidatengene

Gliedmaßenkrankungen sind von besonderem Interesse für die Schweinezucht, weil sie mit Tierverlusten und Leistungseinbußen einhergehen und deshalb nachhaltige Strategien zur Etablierung gliedmaßengesunder Populationen nötig sind. Aus diesem Grund befassen sich bereits mehrere Forschungsvorhaben mit der Erfassung von Gliedmaßenkrankungen und mit der Identifikation von Kandidatengen, um die Voraussetzungen für derartige Strategien zu schaffen.

Ziel dieser Studie war eine Experimentalpopulation von 139 Schweinen einer F2-Generation einer Duroc x Pietrain-Ressourcenpopulation hinsichtlich der Gliedmaßengesundheit exakt zu phänotypisieren und Zusammenhänge zwischen pathologischen Knorpelveränderungen und Merkmalen der Mast- und Schlachtleistung zu prüfen. Des Weiteren sollte die mRNA-Expression einiger funktionaler Kandidatengene mittels Echtzeit-RT-PCR zur Detektion möglicher Unterschiede zwischen degeneriertem und unverändertem Gelenkknorpel quantifiziert werden. Die histologischen Befunde der proximalen und distalen Gelenkflächen von Humerus und Femur wurden mit den Exterieurdaten (Fundamentmerkmale der Winkelungen von Vorder- und Hintergliedmaßen sowie der Stellung der Hintergliedmaße) in Beziehung gesetzt. Um mögliche Zusammenhänge zwischen Fundamentproblemen und genetischen Einflüssen durch einige funktionelle Kandidatengene zu prüfen, wurden die histologischen Befunde als Basis verwendet. Die pathohistologische Beurteilung erfolgte an Schnitten der proximalen und distalen Gelenkoberflächen von Humerus und Femur. Das verwendete Klassifizierungsschema wurde aus der Literatur abgeleitet und sah die Unterteilung in vier Klassen von 0 bis 3 vor. Der Klasse 0 wurden die Schnitte zugeordnet, die keine pathohistologischen Veränderungen aufwiesen. Hochgradig massive Veränderungen mit Nekrosen und/oder Verknöcherungszonen kennzeichneten dagegen die Schnitte der Klasse 3. Im Exterieur

wiesen nur 12 % der beurteilten Tiere ein optimales Fundament auf. In der pathohistologischen Beurteilung wurden bei allen Tieren Alterationen unterschiedlicher Schweregrade festgestellt. Eine Übereinstimmung der Exterieur- und der histopathologischen Beurteilungssysteme konnte bei einigen Merkmalen bestätigt werden. Die Daten der Mast- und Schlachtleistung wurden in einer Faktorenanalyse zu zwei Faktoren – „Schlachtkörperbeschaffenheit“ und „Fleischbeschaffenheit“ – komprimiert. Ein genereller Einfluss des Faktors „Schlachtkörperbeschaffenheit“ konnte u. a. auf die Winklung hinten sowie, in Abhängigkeit vom Geschlecht, auf den Grad der Alterationen an den distalen Gelenkflächen von Humerus und Femur abgesichert werden. Der Faktor „Fleischbeschaffenheit“ konnte mit mehreren Merkmalen der Pathohistologie sowie des Exterieurs assoziiert werden. Ein genereller Geschlechtsunterschied in den verschiedenen Merkmalen wurde in der Ressourcenpopulation nicht festgestellt.

Als funktionale Kandidatengene wurden die mRNAs von Kollagen I, II, V, X sowie TGF- β 3 in Knorpelgeweben von Gelenken untersucht, die histopathologisch als „Histologie/Tier“-Gruppe 0 und 3 klassifiziert wurden. Ein Expressionsunterschied zwischen gesundem und erkranktem Gelenkknorpel der einzelnen Gelenkoberflächen konnte durch einen Mittelwertsvergleich nicht abgesichert werden. Dagegen wurden signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression des Kollagen I, Kollagen V sowie des Kollagen X zwischen einzelnen Gelenkoberflächen aufgedeckt.

Der hier definierte, anhand des erstellten histologischen Beurteilungsschemas objektivierbare Phänotyp der Ressourcenpopulation aus Duroc- und Pietrain-Schweinen war als Basis der weiteren Analysen geeignet. Die Übereinstimmung zwischen den Histologiebefunden und Exterieurmerkmalen war nicht überall vorhanden, weshalb auf die histologische Erfassung der Gelenkveränderungen im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen zu den genetischen Grundlagen der Fundamentstabilität nicht verzichtet werden sollte. Der negative Zusammenhang von Gelenkveränderungen mit Produktionsmerkmalen, insbesondere der Fleischbeschaffenheit, konnte mit neuen Merkmalen ergänzt und belegt werden. Die untersuchten mRNAs zeigten in dieser Studie keine Unterschiede zwischen gesundem und krankem Gelenkknorpel und daher erscheinen die entsprechenden Gene als Kandidatengene nicht geeignet. In weiterführenden Untersuchungen sollte neben einer Erweiterung der Tier- und Probenzahlen auch das Spektrum möglicher Kandidatengene erweitert werden, wobei Screeningmethoden wie z. B. Mikroarrays vielversprechend erscheinen.

6 Summary

Christiane Theune:

Phenotypisation of a F2-resource population for molecular genetic studies regarding leg weakness in pigs: histological scoring of articular cartilage and comparison with exterior and performance traits as well as mRNA expression analyses of some functional candidates genes

Leg problems are of special interest for pig breeding as they are associated with animal and performance losses; therefore, sustainable strategies for the establishment of limb disease free populations are necessary. For this reason, several research projects deal with gathering of leg unsoundness and identification of candidate genes to establish the prerequisites for those strategies.

The aim of this study was to accurately phenotype an experimental F2 Duroc x Pietrain population of 139 pigs regarding leg soundness and to evaluate the relations between pathological cartilage alterations and fattening and slaughtering performance. In addition, the mRNA expression of few functional candidate genes should be quantified via real time RT-PCR to detect potential differences between diseased and modified cartilage. The histological findings of proximal and distal joint surfaces of humerus and femur were set in relation with exterior data (fundament angle of the front legs and hind legs as well as position of the hind legs). To be able to highlight the relation among fundament problems and genetic influences of candidate genes, the histological findings were used as base. The pathohistological evaluation was carried out using histological sections of proximal and distal joint surfaces of humerus und femur. The classification scheme was derived from literature and used a categorisation in four classes from 0 to 3. All sections with no pathohistological changes were assigned to class 0. Severe alterations with necroses and/or ossification were classified into class 3. Regarding the exterior, only 12 % of the animals had an optimal fundament. The pathohistological evaluation detected alterations of varying severity in all animals. An accordance of exterior and histopathological scoring could be confirmed for some traits.

Data of performance and meat quality were condensed by factor analysis into two factors – “carcass composition” and “meat composition”. A general influence of the factor “carcass

Summary

composition” could be detected, e.g. on the angle of the hind legs as well as depending on sex on the severity of the alterations of the distal joint surfaces of humerus and femur. The factor “meat composition” was associated with various traits of pathohistology as well as exterior. A general gender difference among the different traits could not be detected within the experimental population.

For the analysis of the candidate genes collagen I, II, V, X and TGF- β 3 mRNA in cartilage tissue of joints with a histological classification of class 0 and 3 was used. A difference in expression between healthy and diseased cartilage of joint surfaces could not be statistically confirmed by comparison of means. In contrast, significant differences in the mRNA expression of collagen I, collagen V as well as collagen X between individual joint surfaces were found.

In the mode of classifying the phenotype by histopathological evaluation established herein for the Duroc x Pietrain resource population was a suitable basis for the present work. The accordance of histological findings and exterior traits was not always present. Therefore the histological recordings of joint alterations should not be neglected in further studies on the genetic principles of leg soundness. The negative relation of joint alterations on production traits, in particular meat composition, could be replenished and supported with new traits. In this study, the selected candidate genes proved to be unsuitable for the distinction of healthy and diseased cartilages. Further studies should in addition to enlargement of animal and sample numbers also increase the spectrum of potential candidate genes. Screening methods as for example microarrays seem promising.

7 Literaturverzeichnis

AIGNER T, FRISCHHOLZ S, DERTINGER S, BEIER F, GIRKONTAITE I, VON DER MARK K (1997):

Type X collagen expression and hypertrophic differentiation in chondrogenic neoplasias. *Histochem Cell Biol* 107, 435-440

AIGNER T und KIM HA (2002):

Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 46, 1986-1996

AIGNER T, KIM HA, ROACH HI (2004):

Apoptosis in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 30, 639-653, xi

AIGNER T und MCKENNA L (2002):

Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 59, 5-18

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990):

Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410

ALZ (Ausschuss für Leistungsprüfungen und Zuchtwertfeststellungen, 2003):

Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein. Ausschuss für Leistungsprüfungen und Zuchtwertfeststellungen beim Schwein des Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion (ZDS)

ANDERSSON-EKLUND L, UHLHORN H, LUNDEHEIM N, DALIN G, ANDERSSON L (2000):

Mapping quantitative trait loci for principal components of bone measurements and osteochondrosis scores in a wild boar x large white intercross. *Genet Res* 75, 223-230

AURICH M, ANDERS J, TROMMER T, LIESAUS E, SEIFERT M, SCHOMBURG J, ROLAUFFS B, WAGNER A, MOLLENHAUER J (2006):

Histological and cell biological characterization of dissected cartilage fragments in human osteochondritis dissecans of the femoral condyle. *Arch Orthop Trauma Surg* 126, 606-614

BENGTSSON MS, A, RORSMAN P, KUBISTA M (2007):

Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels.
Genome Res 15, 1388-1392

BERESKIN B (1979):

Genetic-aspects of feet and legs soundness in swine.
J Anim Sci 48, 1322-1328

BHATNAGGAR R, CHRISTIAN RG, NAKANO T, AHERNE FX, THOMPSON JR (1981):
Age related changes and osteochondrosis in swine articular and epiphyseal cartilage: light and electron microscopy.

Can J Comp Med 45, 188-195

BITTEGEKO SB und ARNBJERG J (1994):

Radiological aspects on the course of development of porcine epiphyseal osteochondrosis (OCD) from 42 up to 147 days of age.
Zentralbl Veterinarmed A 41, 369-376

BRAY D (1995):

Protein molecules as computational elements in living cells.
Nature 376, 307-312

BREM G (1998):

Exterieurbeurteilung landwirtschaftlicher Nutztiere.
Ulmer, Stuttgart

BRENNER RE, NERLICH A, HEINZE E, VETTER U, TELLER WM (1993):

Different regulation of clonal growth by transforming growth factor-beta 1 in human fetal articular and costal chondrocytes.
Pediatr Res 33, 390-393

BRUNNBERG M (2007):

Anatomische, röntgenologische, computertomografische und klinische Untersuchungen zur Osteochondrose dissecans am caninen Sprunggelenk.
Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

BUCKWALTER JA, MANKIN HJ, GRODZINSKY AJ (2005):

Articular cartilage and osteoarthritis.
Instr Course Lect 54, 465-480

BUCKWALTER JA und MARTIN JA (2006):

Osteoarthritis.
Adv Drug Deliv Rev 58, 150-167

CALABOTTA DF, KORNEGAY ET, THOMAS HR, KNIGHT JW, NOTTER DR, VEIT HP (1982):

Restricted energy-intake and elevated calcium and phosphorus intake for gilts during growth .1. Feedlot performance and foot and leg measurements and scores during growth. J Anim Sci 54, 565-575

CANALIS E, ECONOMIDES AN, GAZZERRO E (2003):

Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. Endocr Rev 24, 218-235

CENTRELLA M, MCCARTHY TL, CANALIS E (1991):

Transforming growth-factor-beta and remodeling of bone. J Bone Joint Surg Am 73A, 1418-1428

CENTRELLA M, HOROWITZ MC, WOZNEY JM, MCCARTHY TL (1994):

Transforming growth factor-beta gene family members and bone. Endocr Rev 15, 27-39

CHUBINSKAYA S, KUETTNER KE (2003):

Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. Int J Biochem Cell Biol 35, 1323-1340

CLEMENS T (2004):

Genetic strategies for elucidating insulin-like growth factor action in bone. Growth Horm IGF Res 14, 195-199

CLEMENTS DN, CARTER SD, INNES JF, OLLIER WE, DAY PJ (2006):

Analysis of normal and osteoarthritic canine cartilage mRNA expression by quantitative polymerase chain reaction. Arthritis Res 8, R158

CORNISH J, CALLON KE, BAVA U, LIN C, NAOT D, HILL BL, GREY AB, BROOM N, MYERS DE, NICHOLSON GC, REID IR (2002):

Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. J Endocrinol 175, 405-415

CRUICKSHANK J, GROSSMAN DI, PENG RK, FAMULA TR, OBERBAUER AM (2005):

Spatial distribution of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I receptor and apoptotic chondrocytes during growth plate development. J Endocrinol 184, 543-553

DRAPPER DD (1992):

Effects of divergent selection for leg weakness on muscle and bone characteristics in duroc swine.

Genet Sel Evol 24, 363-374

DUMOND H, PRESLE N, TERLAIN B, MAINARD D, LOEUILLE D, NETTER P, POTTIE P (2003):

Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis.

Arthritis Rheum 48, 3118-3129

ERNST CW, ROTHSCHILD MF, CHRISTIAN LL, EWAN RC (1990):

Effect of dietary sodium bicarbonate on leg structure in duroc swine that differ genetically for leg weakness.

J Anim Sci 68, 2583-2590

FLEIGE S, WALF V, HUCH S, PRGOMET C, SEHM J, PFAFFL MW (2006):

Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR.

Biotechnol Lett 28, 1601-1613

FRENKEL SR, SAADEH PB, MEHRARA BJ, CHIN GS, STEINBRECH DS, BRENT B, GITTES GK, LONGAKER MT (2000):

Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling.

Plast Reconstr Surg 105, 980-990

FUKAWA K und KUSUHARA S (2001):

The genetic and non-genetic aspects of leg weakness and osteochondrosis in pigs – review.

Asian-Aust J Anim Sci 14, 114-122

GANGL M, SERTEEYN D, LEJEUNE JP, SCHNEIDER N, GRULKE S, PETERS F, VILA T, DEBY-DUPONT G, DEBERG M, HENROTIN Y (2007):

A type II-collagen derived peptide and its nitrated form as new markers of inflammation and cartilage degradation in equine osteochondral lesions.

Res Vet Sci 82, 68-75

GARDNER DL, SALTER DM, OATES K (1997):

Advances in the microscopy of osteoarthritis.

Microsc Res Tech 37, 245-270

GERARD GF und GRANDGENETT DP (1975):

Purification and characterization of DNA-Polymerase and RNase-H-activities in Moloney Murine Sarcoma-Leukemia Virus.

J Virol 15, 785-797

GLADE MJ, LUBA NK, SCHRYVER HF (1986):

Effects of age and diet on the development of mechanical strength by the third metacarpal and metatarsal bones of young horses.

J Anim Sci 63, 1432-1444

GOEDEGEBUURE SA, HANI HJ, VAN DER VALK PC, VAN DER WAL PG (1980):
Osteochondrosis in six breeds of slaughter pigs. I. A morphological investigation of the status of osteochondrosis in relation to breed and level of feeding.

Tijdschr Diergeneeskd 105, 28-41

GOEDEGEBUURE SA, ROTHSCHILD MF, CHRISTIAN LL, ROSS RF (1988):

Severity of osteochondrosis in three genetic lines of duroc swine divergently selected for front-leg weakness.

Livest Prod Sci 19, 487-498

GRONDALEN T (1974a):

Leg weakness in pigs. II. Litter differences in leg weakness, skeletal lesions, joint shape and exterior conformation.

Acta Vet Scand 15, 574-586

GRONDALEN T (1974b):

Osteochondrosis and arthrosis in pigs. I. Incidence in animals up to 120 kg live weight.

Acta Vet Scand 15, 1-25

GRONDALEN T (1974c):

Osteochondrosis and arthrosis in pigs. II. Incidence in breeding animals.

Acta Vet Scand 15, 26-42

GRONDALEN T (1974d):

Osteochondrosis and arthrosis in pigs. VI. Relationship to feed level and calcium phosphorus and protein levels in the ration.

Acta Vet Scand 15, 147-169

HEINONEN M, HAKALA S, HAMEENOJA P, MURRO A, KOKKONEN T, LEVONEN K, PELTONIEMI OA (2007):

Case-control study of factors associated with arthritis detected at slaughter in pigs from 49 farms.

Vet Rec 160, 573-578

HENSON FM, DAVIES ME, JEFFCOTT LB (1997):

Equine dyschondroplasia (osteochondrosis) – histological findings and type VI collagen localization.

Vet J 154, 53-62

HESSE I, MOHR W, HESSE W (1990):

Morphologic changes in the early stages of arthrosis.

Orthopade 19, 16-27

HILL MA (1990a):

Causes of degenerative joint disease (osteoarthrosis) and dyschondroplasia (osteocondrosis) in pigs.

J Am Vet Med Assoc 197, 107-113

HILL MA (1990b):

Economic relevance, diagnosis, and countermeasures for degenerative joint disease (osteoarthrosis) and dyschondroplasia (osteocondrosis) in pigs.

J Am Vet Med Assoc 197, 254-259

HILL MA, KINCAID SA, VISCO DM (1990):

Use of histochemical techniques in the characterisation of osteochondroses affecting pigs.

Vet Rec 127, 29-37

HILL MA, RUTH GR, HILLEY HD, HANSGEN DC (1984):

Dyschondroplasias, including osteochondrosis, in boars between 25 and 169 days of age: histologic changes.

Am J Vet Res 45, 903-916

HILL MA, RUTH GR, BAGENT JK, TORRISON JL, LEMAN AD (1985a):

Angiographic investigation of the vessels associated with physes in young pigs.

Res Vet Sci 38, 151-159

HILL MA, RUTH GR, HILLEY HD, TORRISON JL, BAGENT JK, LEMAN AD (1985b):

Dyschondroplasias of growth cartilages (osteocondrosis) in crossbred commercial pigs at one and 15 days of age: radiological, angiographic and histological findings.

Vet Rec 116, 40-47

HITZ MF, JENSEN JB, ESKILDSEN PC (2006):

Bone mineral density in patients with growth hormone deficiency - does a gender difference exist?

J Bone Miner Res 21, 323-323

HUNZIKER EB und SCHENK RK (1984):

Cartilage ultrastructure after high-pressure freezing, freeze substitution, and low-temperature embedding. 2. Intercellular matrix ultrastructure – preservation of proteoglycans in their native-state.

J Cell Biol 98, 277-282

ITOH S, ITOH F, GOUMANS MJ, TEN DIJKE P (2000):
Signaling of transforming growth factor-beta family members through smad proteins.
Eur J Biochem 267, 6954-6967

IVELL R (1998):
A question of faith-or the philosophy of RNA controls.
J Endocrinol 159, 197-200

JEFFERIES D, FARQUHARSON C, THOMSON J, SMITH W, SEAWRIGHT E,
MCCORMACK H, WHITEHEAD C (2002):
Differences in metabolic parameters and gene expression related to osteochondrosis/
osteoarthritis in pigs fed 25-hydroxyvitamin D3.
Vet Res 33, 383-396

JONAS E (2006)
Ansätze zur Untersuchung der genetischen Ursachen für den Erbfehler Stülpzitze beim
Schwein.
Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

JORGENSEN B (2000a):
Longevity of breeding sows in relation to leg weakness symptoms at six months of age.
Acta Vet Scand 41, 105-121

JORGENSEN B (2000b):
Osteochondrosis/osteoarthritis and claw disorders in sows, associated with leg weakness.
Acta Vet Scand 41, 123-138

JORGENSEN B und ANDERSON S (2000):
Genetic parameters for osteochondrosis in danish landrace and yorkshire boars and
correlations with leg weakness and produktion traits.
Anim Sci 71, 427-434

JORGENSEN B, ARNBJERG J, AASLYNG M (1995):
Pathological and radiological investigations on osteochondrosis in pigs, associated with leg
weakness.
Zentralbl Veterinarmed A 42, 489-504

JORGENSEN B und VESTERGAARD T (1990):
Genetics of leg weakness in boars at the danish pig breeding stations.
Acta Agric Scand 40, 59-69

KADARMIDEEN HN (2005):

Genetic predisposition on OC diseases in pigs: consequence of long-term breeding for high meat quality and growth and feeding traits.

Feedinfo

KADARMIDEEN HN, SCHWOERER D, ILAHI H, MALEK M, HOFER A (2004):

Genetics of osteochondral disease and its relationship with meat quality and quantity, growth, and feed conversion traits in pigs.

J Anim Sci 82, 3118-3127

KIELTY CM, KWAN AP, HOLMES DF, SCHOR SL, GRANT ME (1985):

Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes.

Biochem J 227, 545-554

KLIMIENÉ A und KLIMAS R. (2002):

Monitoring of osteochondrosis in pig selection.

Biologija 3, 20-22

KLOPP E, GRAFF D, STRUCKMEIER J, BORN M, CURTZE S, HOFMANN M, JONES D (2002):

The osteoblast mechano-receptor, microgravity perception and thermodynamics.

J Gravit Physiol 9, P269-270

KORNEGAY ET, COMBS NR, VEIT HP, LINDEMANN MD (1990):

Articular-cartilage condition score of distal humerus and femur of swine as influenced by dietary Ca-P levels, sex and age.

Can J Anim Sci 70, 255-258

LEE GJA, GARTH GB, LAW AS, NICHOLSON D, BARR A, ALEY CS (2003):

Detection of quantitative trait loci for locomotion and osteochondrosis-related traits in large white x meishan pigs.

Anim Sci J 76, 155-165

LIEBICH H (1993):

Funktionelle Histologie. 2

Schattauer GmbH, Stuttgart, Deutschland

LIU G, JENNEN DGJ, THOLEN E, JUENGST H, KLEINWAECHTER T, HOELKER M, TEFAYE D, UN G, SCHREINEMACHERS HJ, MURANI E, PONSUKSILI S, KIM JJ, SCHELLANDER K, WIMMERS K (2007):

A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a duroc-pietrain resource population.

Anim Genet 38, 241-252

LIU YF, CHEN WM, LIN YF, YANG RC, LIN MW, LI LH, CHANG YH, JOU YS, LIN PY, SU JS, HUANG SF, HSIAO KJ, FANN CSJ, HWANG HW, CHEN YT, TSAI SF (2005):

Type II collagen gene variants and inherited osteonecrosis of the femoral head.
N Engl J Med 352, 2294-2301

LJUNGGREN G und REILAND S (1970):

Osteochondrosis in adolescent animals: an endocrine disorder?
Calcif Tissue Res, Suppl: 150-151

LUNDEHEIM N (1987):

Genetic-analysis of osteochondrosis and leg weakness in the swedish pig progeny testing scheme.

Acta Agric Scand 37, 159-173

MABINTI BUSCHE S (2005):

Die Supplementierung der Selektion gegen Osteochondrose in ein Zuchtprogramm beim Warmblutpferd.

Dissertation, Georg-August Universität Göttingen

MCGAVIN A, CARLTON W, ZACHARY J (2000):

Thomson's Special Veterinary Pathology. 3
Ullstein-Mosby, Berlin, Deutschland

MCKENNA LA, GEHRSTZ A, SODER S, EGER W, KIRCHNER T, AIGNER T (2000):

Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage.
Anal Biochem 286, 80-85

MIER RJ, HOLDERBAUM D, FERGUSON R, MOSKOWITZ R (2001):

Osteoarthritis in children associated with a mutation in the type II procollagen gene (COL2A1).

Mol Genet Metab 74, 338-341

MOLPROBES (2001):

Produkt information, SYBRGreen II RNA gel stain.

MORRONI M, DE MATTEIS R, PALUMBO C, FERRETTI M, VILLA I, RUBINACCI A, CINTI S, MAROTTI G (2004):

In vivo leptin expression in cartilage and bone cells of growing rats and adult humans.
J Anat 205, 291-296

NAKANO T (1987):

Leg weakness and osteochondrosis in swine: a review.
Can J Anim Sci 67, 883-901

NERLICH AG, KIRSCH T, WIEST I, BETZ P, VON DER MARK K (1992):
Localization of collagen X in human fetal and juvenile articular cartilage and bone.
Histochem 98, 275-281

NICKEL RS, SCHUMMER A, SEIFERLE E (1992):
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I. 1
Paul Parey, Berlin/Hamburg, Deutschland

OVSTEBO R, HAUG KBF, LANDE K, KIERULF P (2003):
PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human
monocytes: development and evaluation.
Clin Chem 49, 425-432

POOLE AR, KOBAYASHI M, YASUDA T, LAVERTY S, MWALE F, KOJIMA T, SAKAI
T, WAHL C, EL-MAADAWY S, WEBB G, TCHETINA E, WU W (2002):
Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis.
Ann Rheum Dis 61 Suppl 2, ii78-81

QIAO B, PADILLA SR, BENYA PD (2005):
Transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-beta-
induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1
transcription and smad3 signaling.
J Biol Chem 280, 17562-17571

REILAND S (1978a):
Morphology of osteochondrosis and sequelae in pigs.
Acta Radiol Suppl 358, 45-90

REILAND S (1978b):
Pathology of so-called leg weakness in the pig.
Acta Radiol Suppl 358, 23-44

REILAND S, HAGLIN L, SJOBERG HE (1991):
Experimental hypophosphatemia in growing pigs – effects on endochondral ossification in
comparison to osteochondrosis.
J Comp Path 105, 247-254

REILAND S, ORDELL N, LUNDEHEIM N, OLSSON SE (1978):
Heredity of osteochondrosis, body constitution and leg weakness in the pig. A correlative
investigation using progeny testing.
Acta Radiol Suppl 358, 123-137

RENO C ML, SCIORE P, FRANK CB, HART DA (1997):
Rapid isolation of total RNA from small samples of hypocellular, dense connective tissues.
BioTechniques 22, 1082-1086

ROELEN BA und DIJKE P (2003):
Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members.
J Orthop Sci 8, 740-748

ROMEIS (1998):
Mikroskopische Technik. 17
Urban & Schwarzenberg, München, Deutschland

ROTHSCHILD MF und CHRISTIAN LL (1988):
Genetic control of front-leg weakness in duroc swine. I. Direct response to five generations of
divergent selection.
Livest Prod Sci 19, 459-471

ROTHSCHILD MF, CHRISTIANE LL, JUNG YC (1988):
Genetic control of front-leg weakness in duroc swine. II. Correlated response in growth rate,
backfat and reproduction from five generations of divergent selection.
Livest Prod Sci 19, 473-485

SABATINI M, LESUR C, THOMAS M, CHOMEL A, ANRACT P, DE NANTEUIL G,
PASTOUREAU P (2005):
Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig
model of osteoarthritis.
Arthritis Rheum 52, 171-180

SAKOU T, ISHIDOU Y, YAMAMOTO T, NAGAMINE T, MATSUNAGA S, SAMPATH
TK, IMAMURA T, MIYAZONO K, TEN DJIKE P (1999):
Intricate localization of smads, the TGF- β family signaling components during
endochondral ossification.
Bone 24, 409-409

SAMBRAUS HH (1994)
Atlas der Nutztierassen
Ulmer, Stuttgart, Deutschland

SANDELL LJ und AIGNER T (2001):
Articular cartilage and changes in arthritis an introduction: cell biology of osteoarthritis.
Arthritis Res 3, 107-113

- SCHULZE V, ROEHE R, LOOFT R, KALM E (1998):
Möglichkeiten zur züchterischen Verbesserung des Exterieurs beim Schwein unter besonderer Berücksichtigung des Fundaments.
Züchtungskunde 70, 43-60
- SCHWOERER (1991):
Bedeutung gesunder Gliedmaße in der Schweinezucht.
Der Tierzüchter
- SEMEVOLOS SA, NIXON AJ, BROWEER-TOLAND BD (2001):
Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II, and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis.
Am J Vet Res 62, 1088-1094
- SERENIUS T, SEVÓN-AIMONEN M-L, MAETYSÄARI EA (2001):
The genetics of leg weakness in finnish large white and landrace populations.
Livest Prod Sci 69, 101-111
- STEENBERGEN EJV, KANIS E, VANDERSTEEN HAM (1990):
Genetic-parameters of fattening performance and exterior traits of boars tested in central stations.
Livest Prod Sci 24, 65-82
- STEENBERGEN EV (1989):
Description and evaluation of a linear scoring system for exterior traits in pigs.
Livest Prod Sci 23
- STERN S, LUNDEHEIM N, JOHANSSON K, ANDERSSON K (1995):
Osteochondrosis and leg weakness in pigs selected for lean tissue growth rate.
Livest Prod Sci 44, 45-52
- TESFAYE D, PONSUKSILI S, WIMMERS K, GILLES M, SCHELLANDER K (2004):
A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo.
Reprod Domest Anim 39, 396-404
- THORP BH, EKMAN S, JAKOWLEW SB, GODDARD C (1995):
Porcine osteochondrosis: deficiencies in transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I.
Calcif Tissue Int 56, 376-381

TIERZUCHTGESETZ

vom 28.12.2006

BG Bl. I Seite 3294

TRANGERUD C, MEUWISSEN T, ROPSTAD E, INDREBO A, GRONDALEN J, MOE L (2007):

Risk factors affecting metaphyseal irregularities in the radius and ulna of growing newfoundland dogs.

J Anim Sci 85 (10), 2437-2444

VAN BEUNINGEN HM, GLANSBEEK HL, VAN DER KRAAN PM, VAN DEN BERG WB (1998):

Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation.

Osteoarthr Cartil 6, 306-317

VAN DER WAL PG, VAN DER VALK PC, GOEDEGEBUURE SA, VANESSEN G (1980):

Osteochondrosis in 6 breeds of slaughter pigs. 2. Data concerning carcass characteristics in relation to osteochondrosis.

Vet Q 2, 42-47

VON DER MARK K, FRISCHHOLZ S, AAIGNER T, BEIER F, BELKE J, ERDMAN S, BURKHARDT H (1995):

Upregulation of typ X collagen expression in osteoarthritic cartilage.

Acta orthop Scand (Suppl) 266, 125-129

VON ENGELHARDT WB und BREVES G (2000):

Physiologie der Haustiere.

Enke, Stuttgart, Deutschland

WARDALE RJ und DUANCE VC (1993):

Quantification and immunolocalisation of porcine articular and growth plate cartilage collagens.

J Cell Sci 105 (Pt 4), 975-984

WARDALE RJ und DUANCE VC (1994):

Characterisation of articular and growth plate cartilage collagens in porcine osteochondrosis.

J Cell Sci 107 (Pt 1), 47-59

WEBB AJR, RUSSEL WS, SALES DI (1983):

Genetics of leg weakness in performance-tested boars.

Anim Prod 36, 117-130

WILSON W, VAN BURKEN C, VAN DONKELAAR C, BUMA P, VAN RIETBERGEN B, HUISKES R (2006):

Causes of mechanically induced collagen damage in articular cartilage.
J Orthop Res 24, 220-228

YATES KE, FORBES RL, GLOWACKI J (2004):

New chondrocyte genes discovered by representational difference analysis of chondroinduced human fibroblasts.
Cells Tissues Organs 176, 41-53

YTREHUS B, CARLSON CS, LUNDEHEIM N, MATHISEN L, REINHOLT FP, TEIGE J, EKMAN S (2004a):

Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs - development with age, growth rate, weight and joint shape.
Bone 34, 454-465

YTREHUS B, EKMAN S, CARLSON CS, TEIGE J, REINHOLT FP (2004b):

Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs.
Bone 35, 1294-1306

YTREHUS B, GRINDFLEK E, TEIGE J, STUBSJEN E, GRONDALEN T, CARLSON CS, EKMAN S (2004c):

The effect of parentage on the prevalence, severity and location of lesions of osteochondrosis in swine.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 51, 188-195

ZEHENTNER BK, DONY C, BURTSCHER H (1999):

The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling.
J Bone Miner Res 14, 1734-1741

ZETKIN und SCHALDACH (1999):

Lexikon der Medizin. 16
Ullstein, Wiesbaden, Deutschland

8 Anhang

8.1 SYBRGreen II[®]-Versuchsprotokolle nach Sigma & Aldrich

Nach dem Protokoll von Sigma & Aldrich wurden drei verschiedene Versuchsprotokolle auf Handhabung und Sensitivität getestet. Die Gelhöhe der 1 %igen Agarosegele wurde auf ca. 4 mm eingestellt und eine Spannung von 4 V/cm für 40 min an die Flachbettelektrophoreseapparatur angelegt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des SYBRGreen II[®] wurden alle Behälter mit SYBRGreen II[®]-Lösungen mit Alufolie abgeklebt. Die Messung der rRNA-Banden erfolgte im Fluorimager SI mit dem Filter 530 DF 30 und wurde durch die Software ImagequaNT[™] sichtbar gemacht.

Zur Bestimmung der Sensitivität wurde intakte RNA aus Leber mit Verdünnungen von 1 µg RNA/µl, 0,1 µg RNA/µl, 0,01 µg RNA/µl und 0,001 µg RNA/µl sowie eine Negativkontrolle ohne RNA verwendet.

Variante 1: Färbung der RNA nach der Gelelektrophorese (Waschung)

Durchführung: Für die nicht denaturierten Agarosegele wurde eine Verdünnung von 1 : 5.000 der Stammlösung in TBE gewählt, für denaturierte Agarose/Formaldehydgele 1 : 10.000. Um eine optimale Sensitivität zu erreichen, sollte ein pH-Wert von 7,5 bis 8,0 vorliegen.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel auf Raumtemperatur abgekühlt und in eine mit Alufolie abgeklebte Plastikdose gelegt. SYBRGreen II[®] weist eine hohe Glasaffinität auf, sodass das vom Hersteller angegebene Plastik Polypropylen im Umgang mit SYBRGreen II[®] verwendet wurde.

Das Gel wurde mit reichlich SYBRGreen II[®]-Lösung (1 : 10.000) überschichtet, für 30 min geschüttelt und so bei Raumtemperatur angefärbt. Die Färbelösung konnte bei dunkler und kühler Lagerung bis zu viermal wieder verwendet werden.

Die RNA wurde jeweils mit 2 µl Probe, 3 µl 5 x Bromphenolblau-Ladepuffer sowie 6 µl Reinstwasser bei 60°C für 10 min denaturiert und auf das Gel in die Taschen aufgetragen.

Ergebnis: Das Agarosegel wies einen hohen Hintergrund auf, sodass die Sensitivität herabgesetzt war. Die 28S- sowie 18S-Banden der Verdünnung mit 0,001 µg RNA/µl Probe

waren nicht zu erkennen. Die Handhabung und Lagerung der Dose mit der Färbelösung des SYBRGreen II[®] war umständlich und zeitaufwendig.

Variante 2: Färbung der RNA durch ein vorgefärbtes Gel

Durchführung: Bei diesem Versuchsprotokoll wurde das Gel vorab angefärbt. Für Agarosegele wurde eine 1 : 10.000 Verdünnung der Stammlösung, für Formaldehydgele eine 1 : 5.000 Verdünnung der Stammlösung des SYBRGreen II[®] verwendet.

Die Agarosegele wurden 1 %ig hergestellt und vor dem Ausgießen mit einer intermediären Verdünnung von 1 : 100 der Stammlösung des SYBRGreen II[®] auf 1 : 10.000 verdünnt. Die intermediäre Verdünnung wurde aus der Stammlösung mit TBE hergestellt, zu je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die RNA wurde jeweils mit 2 µl Probe, 3 µl 5 x Bromphenolblau-Ladepuffer und 6 µl Reinstwasser, wie bereits oben beschrieben, denaturiert und auf das Gel in die Taschen pipettiert.

Ergebnis: Das visualisierte Gel zeigte deutliche, scharfe 28S- und 18S-RNA-Banden bis zu einer RNA-Konzentration von 0,001 µg/µl. Die nicht verwendeten Gele können, wie vom Hersteller angegeben, bis zu zwei Tage dunkel und kühl aufbewahrt werden.

Die Handhabung erwies sich als einfach und zügig mit sehr gutem sensitiven Ergebnis.

Variante 3: Färbung der RNA innerhalb der Proben

Durchführung: Auch bei dieser Variante wird eine Endverdünnung von 1 : 10.000 der Stammlösung des SYBRGreen II[®] angewendet. Dafür wurde 1 µl intermediäre Verdünnung von 1 : 100 der Stammlösung zu 9 µl Ladepuffer gegeben. Die 1 : 1.000 Verdünnung wurde mit 1 µl zu 2 µl Probe, 2 µl 5 x Bromphenolblau-Ladepuffer und 5 µl Reinstwasser gegeben. Anschließend wurde die Lösung, wie oben beschrieben, denaturiert und auf das Agarosegel in die Taschen aufgetragen.

Ergebnis: Im Gel waren schleierhafte 28S- und 18S-Banden mit geringer Sensitivität zu erkennen. Die Banden der 0,01 µg/µl sowie der 0,001 µg/µl RNA-Verdünnungen waren nicht mehr erkennbar. Die Handhabung erwies sich als einfach mit schlechtem Ergebnis hinsichtlich der Sensitivität.

Zusammenfassung

Aufgrund der einfachsten Handhabung und hohen Sensitivität wurde im weiteren Versuch die Variante 2 mit dem vorgefärbten Gel verwendet. Im weiteren Vergleich innerhalb dieser Variante wurde erkannt, dass die 1 %igen Agarosegele mit TBE-Puffer die gleiche Sensitivität aufwiesen wie 1 %ige Agarose Formaldehyd/MOPS-Gele. Aufgrund der intermediären Verdünnung des SYBRGreen II[®] in TBE wurde das native Agarosegel mit TBE-Puffer benutzt. Außerdem wurde getestet, ob eine Denaturierung in diesem System nötig war. Das Ergebnis zeigte, dass nicht denaturierte RNA bei allen Varianten eine geringere Sensitivität aufwies. Die Sensitivität des SYBRGreen II[®] mit denaturierter RNA konnte nicht erreicht werden.

8.2 Material

Für alle Puffer, Lösungen und Ansätze wurde Reinstwasser verwendet, d. h. Leitungswasser aufbereitet durch zweistufige Umkehrosiose (Elga Vivendi Water Systems, Bucks, UK).

8.2.1 Puffer

10 x MOPS-Puffer

0,2 M = 41,8 g MOPS

800 ml Reinstwasser

pH-Wert auf 7,0 einstellen

50 mM = 16,6 ml 3 M Natriumacetat

10 mM = 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

auf 1.000 ml mit Reinstwasser auffüllen

autoklavieren und bei Raumtemperatur vor Licht geschützt lagern

10 x TBE-Puffer

890 mM = 108 g Tris-Base

890 mM = 55 g Borsäure

20 mM = 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

auf 1.000 ml mit Reinstwasser auffüllen

autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern

TRIS-Puffer (10 mM, pH 8,5)

0,61 g Tris-Base
auf 800 ml mit Reinstwasser auffüllen
pH-Wert auf 8,5 einstellen
auf 1.000 ml mit Reinstwasser auffüllen
autoklavieren

Bouin'sche Lösung

150 ml Pikrinsäure
50 ml Formalin
10 ml Essigsäure

Orange G-Ladepuffer für DNA-Gele

Ansatz mit Glycerin als 5 x Puffer
50 mg Orange G
2 ml Glycerin
400 µl EDTA 0,5 M
auf 10 ml mit Reinstwasser auffüllen
Aliquote bei -20°C lagern

Bromphenolblau-Ladepuffer für RNA-Gele

Ansatz als 5 x Ladepuffer
83 µl gesättigte Bromphenolblaulösung
7,4 µl 500 mM EDTA, pH 8,0
9 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
66,2 µl 37 % (= 12,3 M) Formaldehyd
183,6 µl 100 % Glycerin
283,2 µl deionisiertes Formamid
367,4 µl 10 x MOPS-Puffer
Aliquote bei 4°C lagern, maximal 3 Monate haltbar

8.2.2 Materialliste

Material	Hersteller
8er Strips (PCR)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
96-Well-Platten (PCR)	Labomedic Gesellschaft für Medizin- und Laborbedarf GmbH, Bonn, D
10 x BioTherm-Puffer	Gene Craft GmbH, Lüdinghausen, D
Abdeckfolien für 96-Well-Platten	Starlab GmbH, Ahrensburg, D
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Borsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Bromphenolblaulösung, gesättigt	Sigma & Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Chloroform (BioChemica)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Deckel für 8er-Strips	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Dermatril Einmal-Schutz-Handschuhe	Felten & Horn Arbeitsschutz GmbH, Köln, D
DNase Set	Quiagen, Hilden, D
dNTP Mix (je 10 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Essigsäure (100 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol vergällt	KMF Laborchemie Handels-GmbH, Sankt Augustin-Buisdorf, D
Ethidiumbromid	Eurobio, Courtaboeuf Cedex, F
Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Formaldehyd	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Iso-2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Lichtgrün	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, D
Molekulargewichtsmarker ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII)	Fermentas, Sankt Leon-Rot, D
MOPS	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumacetat (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

Anhang

Nitril-Handschuhe	Felten & Horn Arbeitsschutz GmbH, Köln, D
Orange G	Chroma Gesellschaft, Stuttgart, D
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
PCR-Softtubes 0,2 ml	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D
PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂	Gene Craft GmbH, Lüdinghausen, D
Phosphormolybdänsäure	Chroma Gesellschaft, Stuttgart, D
Pikrinsäure	Sigma & Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Pipettenspitzen 100-1.000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Pipettenspitzen 10-20 µl	Labomedic Gesellschaft für Medizin- und Laborbedarf GmbH, Bonn, D
Pipettenspitzen 0,2-10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Ponceau-Säurefuchsin	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, D
Primer (20 pmol/µl)	Sigma & Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
QIAquick PCR Purification Mini Kit [®]	Qiagen GmbH, Hilden, D
Random Hexamer (50 pmol/µl)	Sigma & Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße 0,6 ml	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D
Revert Aid [™] M-MuLV RT (Reverse Transkriptase [®])	Fermentas, Sankt Leon-Rot, D
Revert Aid 5 x Puffer	Fermentas, Sankt Leon-Rot, D
RiboLock [™] Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	Fermentas, Sankt Leon-Rot, D
RNeasy Mini Kit [®]	Qiagen GmbH, Hilden, D
Roti-Histokit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Schnellentkalker (RDO)	Apex Engineering Products Co., Plainfield, Illinois, USA
Serdolit [®] MB	Serva Feinbiochemika GmbH & Co., Heidelberg, D
Superfrost Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
SupraTherm DNA Polymerase [®] (5 U/µl)	Gene Craft GmbH, Lüdinghausen, D
SYBRGreen [®] JumpStart Taq ReadyMix [™]	Sigma & Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D

SYBRGreen II [®]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
TRIREAGENT [®]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

8.2.3 Software

BLAST Programm <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (ALTSCHUL et al. 1990)

ImagequaNT[™] Version 4.1, Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, S

OLIGO Explorer Version 1.1.0, e-oligos, Hawthorne, New York, USA

Statistical Analysis System (SAS) Version 9.1, SAS Institute GmbH, Heidelberg, D

Statistik Software SPSS für Windows Version 11, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

8.2.4 Geräteliste

Gerät	Hersteller
Flachbettelektrophoreseapparatur	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Fluorimager SI	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Lichtmikroskop	Leica DML, Leica Camera AG, Solms, D
Mikrotom	Leitz GmbH & Co. KG, Oberkochen, D
Programmierbarer Gradient-Cycler PTC-200	MJ Research, Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf, D
Echtzeit-PCR-Cycler MX 3000P	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, NL

Danksagung

Während meiner Doktorarbeit haben mir viele Menschen Hilfestellung gegeben, mich bei Problemen beraten, mich bei meinen Ideen unterstützt oder auch einfach bei einem Kaffee zugehört oder mit mir diskutiert. Danke an alle, die mir geholfen haben.

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Sauerwein, meiner Doktormutter, sowie bei Herrn Prof. Dr. Breves, meinem Doktorvater, bedanken. Sie haben mir, und das ist sicher das Wichtigste, die Möglichkeit einer Promotion am Institut für Tierwissenschaften in Bonn gegeben. Vor allem Frau Prof. Dr. Sauerwein hat mich in schwierigen Abschnitten immer unterstützt.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schellander, Abteilung für Tierzucht und Genetik für seine Unterstützung.

Besonders bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. Manfred Mielenz, der mich in die Methoden der Molekularbiologie einführte und stets Antworten und Gedanken zu meinen Fragen und Ideen beisteuerte.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. Ernst Tholen, Abteilung für Tierzucht und Genetik, Danke sagen. Er hat mich in den schwierigen Wirren der Statistik unterstützt.

Danke auch an Dr. Frank Seeliger, der in der Anfangszeit mit mir histologische Feinheiten diskutierte und meine Auswertung auf den richtigen Weg brachte.

Dankeschön auch an Frau Dr. Petra Regenhard, Frau Dr. Steffanie Hiss und Frau Dr. Ute Müller. Sie alle waren immer unterstützend an meiner Seite.

Dankeschön auch an die Lebensretter im Laborbereich Claudia Beford-Trimborn, Isabella Israel und vor allem Inga Hofs. Sie waren immer zur Stelle, wenn mal etwas schief lief. Danke für die aufmunternden Worte, Cappuccinos oder einfach fürs Zuhören. Ich habe es trotz anderer Prognosen geschafft, meinen Optimismus zu behalten!

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Team aus Frankenforst, bei Herrn Dr. Heinz Jüngst und Herrn Görtz, sowie bei Helga Brodesser und Nadine Leyer aus der Abteilung Tierzucht und Genetik sowie bei Barbara Heitkönig aus der Abteilung Physiologie und Hygiene. Sie haben alle auf dem einen oder anderen Weg zu meiner Promotion beigetragen.

Dankeschön an meine Doktoranden-Kollegen und -Kolleginnen aus der Abteilung Physiologie und Hygiene mit denen ich Hochs und Tiefs teilen und Ideen besprechen oder diskutieren konnte. Auch meinen Dank an die Doktoranden aus der Abteilung für Tierzucht und Genetik für ein offenes Ohr, guten Rat und Erkenntnisse beim Mensaessen.

Danke auch an alle meine Freunde, die mich unterstützt und ertragen, getröstet oder gedrängt haben. Auch wenn sie nicht alle in Bonn wohnen waren sie doch sehr wichtig für mich!

Danke, Danke, Danke an meine Familie! Die große und die kleine Familie! Sie waren da in der größten Not. Immer unterstützend. Ihr habt meine Fehler übersehen und immer an mich geglaubt, nie gezweifelt. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen. Ein ganz besonderes Dankeschön an meinen Mann Carsten Theune – für alles! Ich denke, mehr muss ich dazu nicht sagen.