

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Charakterisierung der New Hampshire Linie

New Hampshire sind goldbraune, mittelschwere Hühner im Zwiehuhntyp mit sehr guten Aufzucht-, Lege- und Masteigenschaften. Die Rasse entstand in den USA aus Rhode Island und wurde erstmals 1950 nach Deutschland importiert (Oertel und Spörer, 1960). Für die Untersuchungen stand die seit 1955 bis auf wenige Ausnahmen geschlossene New Hampshire Linie der Versuchsstation des Instituts für Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin (Standort Blumberg) zur Verfügung.

3.1.1 Struktur und Umfang

Die Linie bestand 1955 aus einem Hahn und 10 Hennen. Basierend auf einigen ihrer Nachkommen und weiteren Gründertieren aus Brandenburg, Sachsen und Bayern (Dittmann, 1969) wurden 1957 erstmals 8 Stämme mit je einem Hahn und 11 bis 16 Hennen pro Stamm aufgebaut. Die Abstammung der Hähne beruht auf zwei Hahnenlinien (Dittmann, 1969). Diese Unterteilung der gesamten Population in Stämme mit einem angestrebten Paarungsverhältnis von 1 Hahn zu 15 Hennen je Stamm wurde bis heute grundsätzlich beibehalten.

Bis 1975 erfolgte die Anpaarung der Zuchttiere in 6 bis 10 Stämmen einmal pro Jahr. Eine Ausnahme bildete das Jahr 1969, in dem keine Vermehrung stattfand. Der Umfang der Zuchtlinie variierte bis 1975 zwischen 64 und 196 Tieren, die Zahl der Nachkommen zwischen 1012 und 4841 pro Jahr (Abbildung 3.1), wobei einzelne Hähne und Hennen mehrfach (über zwei bis vier Jahre) zur Zucht verwendet wurden. Die Hähne waren zum Zeitpunkt der Paarung überwiegend ein Jahr alt, während die Hennen meist erst zweijährig und älter in der Zucht eingesetzt wurden. Diese überlappenden Generationen wurden ab 1970 vollständig durch diskrete Generationen mit einem einjährigen Generationsintervall ersetzt.

Seit 1976 bestand die New Hampshire Linie aus 15 Stämmen. Der resultierende Populationsumfang lag bei den Zuchttieren mit 145 bis 284 Tieren deutlich höher als in den ersten 20 Zuchtjahren. Insgesamt gab es zwischen 805 und 3388 Nachkommen pro Jahr mit einer Ausnahme von über 5700 Tieren im Jahr 1976. Seit 1995 wurde die Population in einem Verhältnis

von 1 Hahn zu 10 Hennen, seit 1997 im Verhältnis von 1 Hahn zu 4 Hennen erhalten. Der Populationsumfang liegt deshalb aktuell bei rund 75 Zuchttieren je Generation.

Zusammenfassend belief sich die Größe der New Hampshire Zuchtlinie in 44 Generationen auf 8107 Zuchttiere, davon waren 622 Hähne und 7485 Hennen (einschließlich der Reservetiere). Seit 1955 schlüpften insgesamt über 92800 New Hampshire in der Versuchsstation in Blumberg.

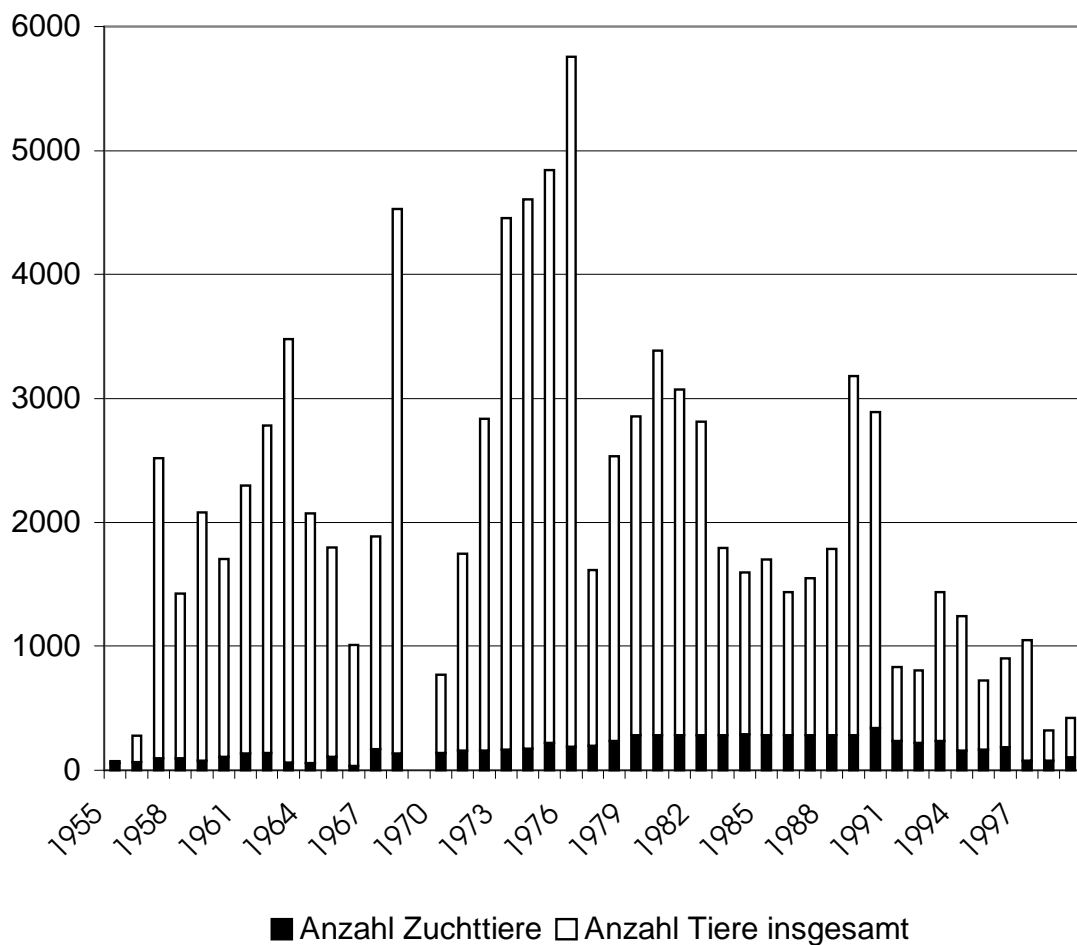


Abbildung 3.1:

Entwicklung des Umfangs der New Hampshire Linie in der Versuchsstation der Humboldt-Universität zu Berlin (Standort Blumberg) von 1955 bis 1999

Die New Hampshire Linie wurde seit 1975 als vollständig geschlossene Population erhalten. Als Gründer der Linie ohne bekannte Abstammung sind in den Zuchtbüchern 42 Tiere verzeichnet, von denen 7 Hähne und 12 Hennen bis 1958 eingesetzt wurden. Aus einer privaten Zucht aus Damsdorf/Brandenburg erfolgte der Zukauf von 1 Hahn (Zuchtjahr 1964) und 7

Hennen (Zuchtjahr 1966). Weiterhin wurden 1965 und 1966 insgesamt 17 Töchter von 6 Eltern (2 Hähnen und 4 Hennen) des privaten Züchters Bergmann aus Wensickendorf/Brandenburg angepaart. Letztmalig erfolgte im Zuchtjahr 1975 die Anpaarung von 9 fremden Hähnen aus dem Kombinat „Industrielle Mast- und Genreserve Spreenhagen“/Brandenburg. Ihr Einfluß blieb jedoch gering, weil sie neben Hähnen aus Blumberg nur selten eingesetzt und nur wenige ihrer Töchter in die Zuchtpopulation aufgenommen wurden.

3.1.2 Elterntierauswahl und Anpaarungsschema

Bis 1976 wurden die Elterntiere nach ihrem 8-Wochen-Gewicht, ihrem Phänotyp und der Reproduktionsleistung der Eltern (Hähne) bzw. der Teillegeleistung bzw. der Mutterlegeleistung (Hennen) ausgewählt. Dabei war das Zuchtziel für die Mastrichtung nach Lützenberg (1966) wie folgt definiert:

- durchschnittliche Legeleistung in 450 Lebenstagen:
165 Eier im ersten Legejahr
- durchschnittliches Eigewicht: 57 – 60 g
- 8-Wochen-Körpermasse der Nachkommen: 800 – 1000 g
- Schlupf mindestens 70%
- Mortalität bis 8 Wochen weniger als 5%

Bei der Hahnenkörnung war für die zukünftigen Stammväter vor allem die Fleischleistung bedeutsam. Bei den Hennen stand die Legeleistung bei konstanter Einzeleimasse im Vordergrund der Selektion (Schramm, 2000b).

Ab 1976 lag der Schwerpunkt der Selektion vor allem auf der Lege- und Reproduktionsleistung der Tiere. Das 8-Wochen-Gewicht wurde zur Vorselektion genutzt (Schramm, 2000a). Hennen, die mit ihren 8-Wochen-Gewichten, ihren Eigen- und Mutterleistungen bezüglich der Eizahl und der Einzeleimasse das Populationsmittel repräsentierten, wurden bevorzugt zur Zucht verwendet und hatten die meisten Nachkommen.

Zur Vermeidung enger Inzucht erfolgte die Anpaarung der Stammhähne nach einem Rotationsschema, so daß sich Anpaarungen innerhalb desselben Stammes erst nach etwa 6 bis 10 Generationen wiederholten. Die Verwandtschaftsverhältnisse aller Tiere wurden seit 1955 lückenlos dokumentiert.

3.1.3 Haltung und Management

Bis 1978 wurden die Tiere in Bodenhaltung bewirtschaftet, wobei die Zuordnung der Eier mit Hilfe der Fallnestkontrolle erfolgte. Seit 1978 werden die Hennen in Einzelkäfigen gehalten und künstlich besamt. Die Besamung findet zu Beginn der Bruteisammlung an zwei aufeinander folgenden Tagen, dann im Abstand von 6 Tagen statt. In den ersten Schlupf werden die Bruteier von 10 Tagen nach dem Beginn der Besamung einbezogen, danach werden die Bruteier jeweils über eine Woche gesammelt. Im Mittel wurden pro Jahr 3 bis 4 Schlüpfbebrütungen durchgeführt. Dabei beträgt die Temperatur in der Vorbrut 37,8° C und die Luftfeuchtigkeit 50 bis 55%. Jeweils am 17. Bruttag werden die Eier umgelegt und im Schlupfbrüter bei 37,4° C und 75 % Luftfeuchtigkeit bis zum 21. Tag bebrütet. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgt mit Kükenmarken im Flügel, später mit Fußringen.

In der Aufzuchtperiode in Bodenhaltung zu maximal 500 Tieren (in Abteilen zu 50 m²) erhalten die Küken bis zum Alter von 8 bis 10 Wochen Kükenaufzuchtfutter, danach Junghennenfutter ad libitum. Im Alter von 20 Wochen werden die Tiere in Einzelkäfigen aufgestellt und erhalten Legehennenfutter ad libitum.

Seit 1974 werden alle Hühner der Versuchsstation in Blumberg am ersten Lebenstag intramuskulär gegen die Mareksche Krankheit geimpft (Marek-Vakzine, Friedrich-Loeffler-Institut für Tierseuchenforschung Insel Riems, seit 1990 Rismavac, Intervet).

Bis 1990 erfolgte die Impfung gegen die atypische Geflügelpest mit der ND-Adsorbat-Vakzine „Dessau“ (VEB Kombinat Veterinärimpfstoffe Dessau), seit 1990 werden Poulvac ND Hitchner B1 (Fort Dodge) zur oralen Immunisierung von Jungtieren in der 2., 4. und 16. Lebenswoche sowie Poulvac ND La Sota (Fort Dodge) zur vierteljährlichen oralen Wiederholungsimpfung adulter Tiere eingesetzt.

Die dreimalige orale Immunisierung der Küken in den ersten 12 Lebenswochen mit dem gefriergetrockneten Salmonella-typhimurium-Lebendimpfstoff Zoosaloral H (Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, seit 1994) schützt die Tiere homolog gegen Salmonella-typhimurium- und heterolog gegen Salmonella-enteritidis-Infektionen (Legehennen).

Gegen Geflügelpocken erfolgte die Impfung adulter Tiere bis 1990 mit Neo Avisan T „Dessau“ (VEB Kombinat Veterinärimpfstoffe Dessau) und ab 1997 mit TAD Pox Vac (Lohmann Animal Health GmbH) einmal jährlich intrakutan.

Lediglich 1997 und 1998 wurde der Impfstoff Talovac 104 MG (Lohmann Animal Health GmbH) zur intramuskulären Impfung der Hühner gegen *Mycoplasma gallisepticum* eingesetzt.

3.1.4 Auswahl der Tiere für die Markeranalysen und Entnahme von Blutproben

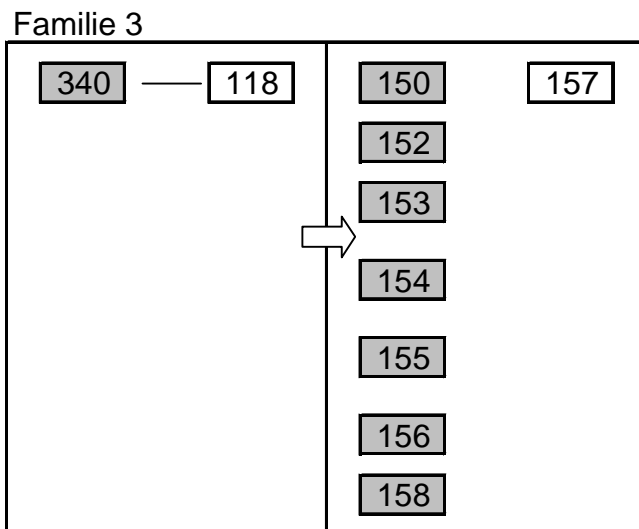
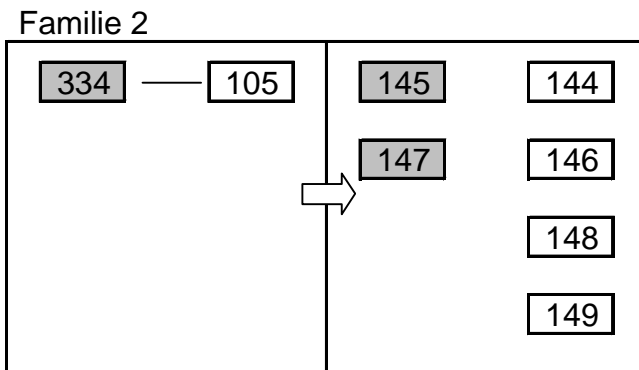
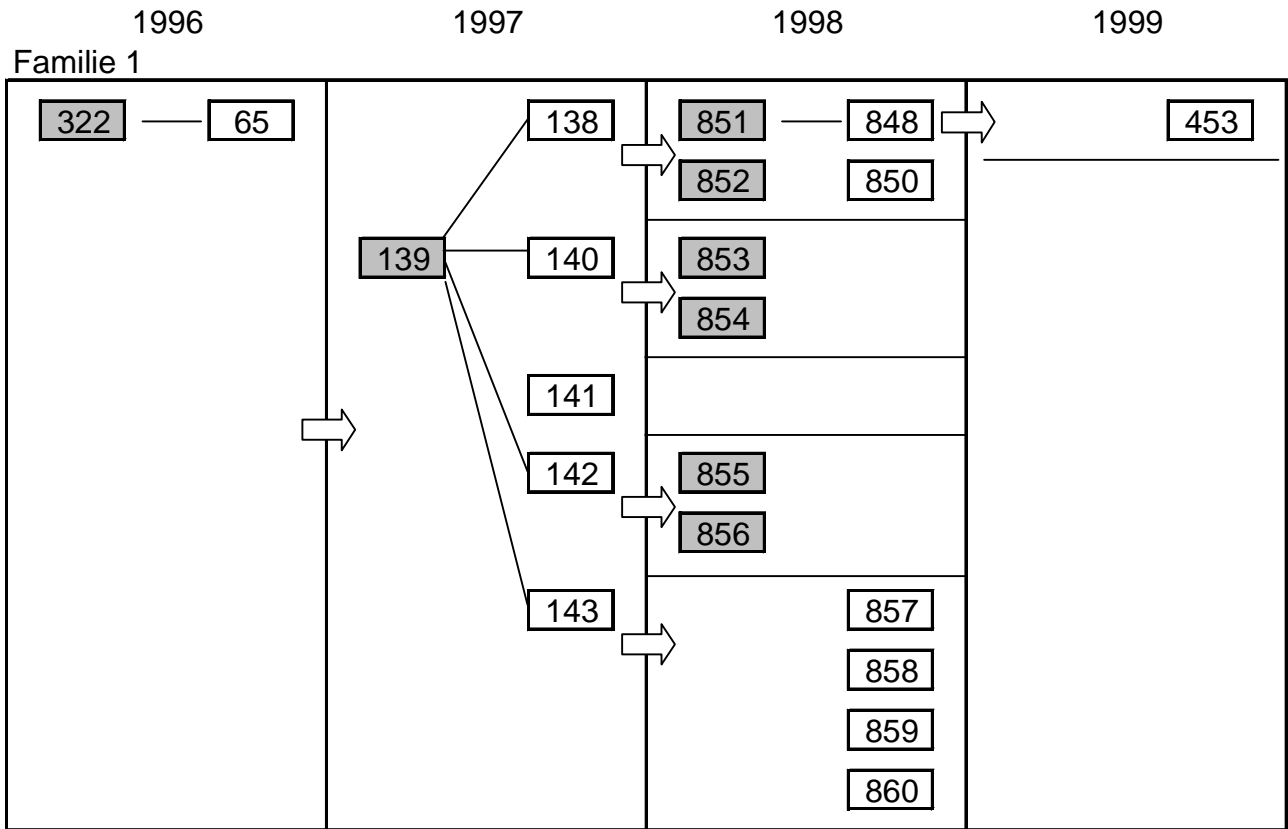
Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurden die Jahrgänge 1982 (58 Tiere) und 1994 (79 Tiere) stichprobenartig ausgewählt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1:
Tierauswahl und Probenmaterial aus der Linie

Jahr	Stichprobe	Hähne	Hennen	Zuchttiere/Jahr	Material
1982	58	3	53	266	Plasma
1994	79	15 + 14 Reservehähne	50	148	Blut

Zusätzlich wurden 39 durch Vollgeschwisterverpaarung über 3 Generationen stark ingezüchtete Tiere ab 1996 in die Untersuchungen mit einbezogen (Abbildung 3.2). Die Vollgeschwisterpaarung erfolgte in 3 Familien aus je einem Bruder-Schwester-Paar (1996). Nur in Familie 1 konnte diese engste Inzucht mit dem Hahn 139 und 4 seiner Schwestern fortgesetzt werden. Das ungleiche Geschlechtsverhältnis und starke Inzuchtdepressionen führten auch 1998 dazu, daß nur ein Vollgeschwisterpaar zur Reproduktion zur Verfügung stand. Mit der Henne 453 als einzigem Nachkommen 1999 endete dieser Zuchtversuch.

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *V. cutanea ulnaris*. Maximal 2,5 ml Blut wurden entnommen, nach Hemmung der Blutgerinnung mittels EDTA zentrifugiert und der Überstand als Plasma bei -20° C gelagert (Material 1982). Bei den Proben ab Jahrgang 1994 wurde das geschlossene S-Monovette-Blutentnahmesystem (sterile Einwegkanülen 0,7x38 mm Hennen bzw. 0,9x38 mm Hähne und 2,7 ml-S-Monovette KE (Kalium-EDTA), Sarstedt, Nümbrecht) zur Blutentnahme verwendet. Die Lagerung des Vollblutes erfolgte bei -80° C. Auf den Probenröhrchen wurden die Nummern der Fußringe der Tiere registriert.



Zeichenerklärung

Anpaarung



Hahn

Henne

KM

Kükenmarke



Eltern und

Nachkommen

Abbildung 3.2:

Anpaarung der Vollgeschwister

3.1.5 Erfassung der Leistungsmerkmale

Bei den New Hampshire wurden Wachstum, Legeleistung, Einzeleimasse und Reproduktionleistung für jeden Jahrgang erfaßt (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2:

Merkmalsdefinition von Leistungen der New Hampshire Linie

Leistung	Merkmalsdefinition
Wachstum	Körpermasse [g] am 56. Lebenstag
Legeleistung	Anzahl Eier je Prüfperiode
Einzeleimasse	mittleres Gewicht [g] von max. 15 Eiern (ab 255.Lebenstag)
Reproduktion	
- Fruchtbarkeit	Anteil befruchteter Eier je Einlage
- Schlupfrate/befr. Eier	Anteil Küken je befruchtete Eier
- Schlupfrate total	Anteil Küken je Einlage

3.2 Molekulargenetische Methoden

Zur Bestimmung der individuellen Homozygotie wurde jedes ausgewählte Tier an 23 Mikrosatelliten-Markergenorten genotypisiert. Dazu war es notwendig, genomische DNA aus den beim Vogel kernhaltigen Blutzellen zu isolieren, die Markerfragmente zu amplifizieren und deren Längenvariation zu analysieren.

3.2.1 Auswahl der Mikrosatelliten-Marker

Die Auswahl der 23 Mikrosatelliten-Marker (Tabelle 3.3) erfolgte nach den folgenden Kriterien:

- weite Verteilung über das Genom (vor allem über die Makrochromosomen, Abbildung 3.3),
- ungekoppeltes Auftreten bei mehreren Markern auf einem Chromosom,
- Lage sowohl in nichtkodierenden als auch in kodierenden DNA-Bereichen.

Die verwendeten Oligonucleotidsequenzen der Primer stammen aus den Veröffentlichungen von Crooijmans et al. (1996b: MCW 1–MCW 75), Cheng et al. (1995: ADL 158–ADL 267), Cheng und Crittenden (1994: ADL 20–ADL 44) sowie von Khatib et al. (1993: HUJ 2–HUJ 8).

Die Mikrosatelliten liegen überwiegend auf den 6 größten Makrochromosomen und zum Teil in noch nicht zugeordneten Kopplungsgruppen mindestens einer der drei Referenzfamilien. Von der FAO wurden 16 der ausgewählten Marker zur Schätzung genetischer Distanzen empfohlen, 6 dieser Marker liegen innerhalb von kodierenden DNA-Abschnitten (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.3:
Charakterisierung der verwendeten 23 Mikrosatelliten

Marker	Lage im Genom*	FAO	Lage in k.R.**	Sequenzwiederholung
MCW 1	3	+		(TG)9
MCW 2	3	+		(TG) 13
MCW 4	3	+		(TG)28
MCW 5	4	+		(TG)6AA(TG)6(A)15(GA)2(GAA)7
MCW 14	6	+		(TG)8G(TG)10
MCW 16	3	+		(TG)16
MCW 41	2	+	O	(T) 23
MCW 43	1	+	O	(T) 21
MCW 49	1	+	O	(GCA)11
MCW 51	2	+	O	(T)25
MCW 59	3	+	O	(T)25
MCW 75	UN	+	O	(T)19GC(T)10
ADL 158	E29C09W09	+		(CA)12
ADL 176	2	+		(GT)12
ADL 210	E30C14W10	+		(AC)15
ADL 267	2	+		(CA)12
ADL 20	1			(CA)10
ADL 39	E18W15			T5(TG)8
ADL 44	E16C17W22			(AC)9
HUJ 2	E41W17			(AC)
HUJ 6	3			(AC)
HUJ 7	5			A(AC)
HUJ 8	C21			(TG)

C: Compton Reference Family, UK
E: East Lansing Reference Family, USA
W: Wageningen Reference Family, NL

* E, C, W kennzeichnen Kopplungsgruppen der Referenzfamilien, Zahlen allein das entsprechende Chromosom, UN: noch nicht kartiert

** kodierender Region

Bei den repetitiven Sequenzen handelt es sich hauptsächlich um perfekte Repeats. Der Mikrosatellit ADL 39 besteht aus einem zusammengesetzten Repeat, die Marker MCW 5, MCW 14 und MCW 75 stellen unterbrochene Repeats dar.

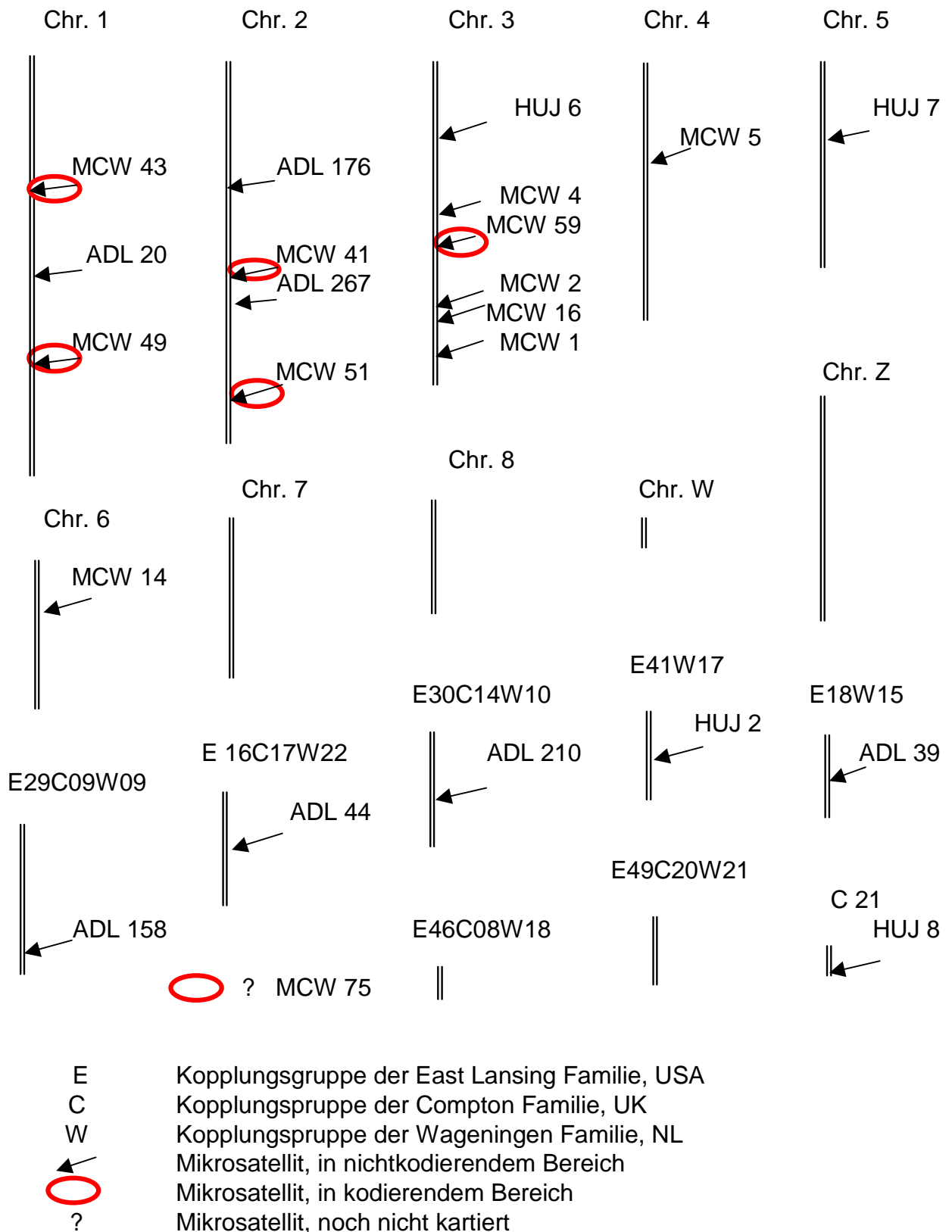


Abbildung 3.3:
Verteilung der 23 Mikrosatelliten im Genom des Huhnes
(Schematische Darstellung anhand Chicken Map 2000 , Groenen et al., 2000)

Die Synthese und Fluoreszenzmarkierung der Primersequenzen erfolgten bei Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg. Gelöst in aqua dest. wurden sie bei – 20° C gelagert.

Tabelle 3.4:
Mikrosatelliten innerhalb von Genen

Mikrosatellit	Chromosom	Gensymbol	Name des Gens
MCW 41	2	OV(Y)	Y Gen der Ovalbuminfamilie
MCW 43	1	LGALS4	Betagalactosid-bindendes Lectin 14 KD
MCW 49	1	LAMP	lysosomyles Membran-Glykoprotein 1A
MCW 51	2	CALB1	Calbindin 1
MCW 59	3	PLN1	Herz-Phospholamban
MCW 75	UN	?	C-ets mRNA für p45 Protein des Huhnes

3.2.2 Chemikalien, Enzyme und Geräte

Die in den Untersuchungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Carl Roth, Karlsruhe und Serva, Heidelberg bezogen. Sie entsprachen in ihrer Reinheit den Kategorien "pro analysi", "ultrapure" und "highly-purified". Spezielle Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen geliefert:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Ammoniumpersulfat (APS) Harnstoff Nukleotide (dNTP) N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Biometra, Göttingen	Proteinase K
BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf	Seakem LE Agarose
Carl Roth, Karlsruhe	TE-Puffer äquilibriertes Phenol Trichlormethan/Chloroform Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) (Rotiphorese Gel 40)
Quantum Appligene, Heidelberg	Taq-DNA-Polymerase
Qiagen, Hilden	QIAamp Blood Kit

Die folgenden Geräte wurden für die Analysen im Labor genutzt:

Elektrophorese:	Elektrophoresekammer DNA Sub Cell TM , Bio-Rad Laboratories GmbH, München Spannungsgerät 200/2.0 Power supply bzw. Spannungsgerät Power PAC 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttler:	Vortex Genie 2 TM , Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Sequenzierer	Automated Laser Fluorescence DNA Sequencer A.L.F., Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer:	Spectronic 601, Milton Roy Corp. USA Faust GmbH, Berlin
Thermocycler:	Uno-Thermoblock, Biometra, Göttingen Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Überlingen
Zentrifugen:	Mikroliterzentrifuge Biofuge 13, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode Kühlzentrifuge "Eppendorf 5403", Faust GmbH, Berlin

Vor der Beschreibung der einzelnen Labormethoden wird auf die benötigten Lösungen eingegangen. Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit aqua dest. hergestellt.

3.2.3 Isolierung von genomischer DNA

Aufgrund des unterschiedlichen Probenmaterials (Blutplasma der Generation 1982 und Vollblut ab Generation 1994) wurden zwei verschiedene Verfahren zur DNA-Isolation angewendet.

3.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Blutplasma

Lösungen:

PBS (Phosphate-Buffered Saline), pH 7,4:

NaCl	137 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	8 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,8 mmol/l
pH 7,4 mit HCl einstellen	

Für die DNA-Isolation aus den Blutplasmaproben der Generation 1982 stand das Blood Kit (Qiagen) zur Verfügung. Um möglichst große Mengen an DNA aus dem nur wenige Zellen enthaltenden Probenmaterial zu gewinnen, wurde das Blood & Body Fluid Protocol (QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit Handbook, 1/97) modifiziert. Die Vorbereitung der Reagenzien erfolgte wie vorgeschrieben. Zwischen 10 und 30 µl Plasma je Probe wurden in 1,5-ml-Tubes mit PBS auf 200 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 25 µl Protease (Qiagen) und 200 µl AL-Puffer (Qiagen) wurden die Bestandteile gründlich durchmischt (Vortex) und zur Lyse der Zellmembranen für 10 min im Wasserbad bei 70° C inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl Ethanol (96-100 %) erfolgte ein erneutes Durchmischen (Vortex). Die entstandene Lösung wurde anschließend in eine QIAamp Spin Column pipettiert und zur Adsorption der DNA an die QIAamp silica membrane bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Mittels wiederholter Zentrifugation (8000 rpm, 1 min/13000 rpm, 3 min) wurde die an die Membran gebundene DNA mit jeweils 500 µl AW-Puffer (Qiagen) gewaschen. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte mit 200 µl auf 70° C erhitztem AE-Puffer (Qiagen), einer Inkubation der QIAamp Spin Column mit dem AE-Puffer (Qiagen) bei 70° C für 5 min und einer erneuten Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. Um die Ausbeute um 15 % zu erhöhen, wurde der Elutionsschritt unter Verwendung der auf 70° C erhitzten AE-Puffer-DNA-Lösung wiederholt.

3.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut

Lösungen:

Chloroform-Isoamylalkohol:

Gemisch 24:1 (v/v)

EDTA-Stammlösung, pH 8,0:

EDTA 500 mmol/l

NaOH 500 mmol/l

PBS (Phosphate-Buffered Saline), pH 7,4:

NaCl 137 mmol/l

KCl 2,7 mmol/l

Na₂HPO₄ 8 mmol/l

KH₂PO₄ 1,8 mmol/l

pH 7,4 mit HCl einstellen

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol:

Gemisch 25:24:1 (v/v)

Proteinase-K-Verdauungspuffer:

NaCl 102 mmol/l

Tris 50 mmol/l

EDTA 0,1 mmol/l

NaOH 0,1 mmol/l

TE-Puffer, pH 7,5:

Tris 10 mmol/l

EDTA 0,1 mmol/l

NaOH 0,1 mmol/l

pH 7,5 mit HCl einstellen

Die Isolierung genomischer DNA aus Blutzellen erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Je Probe wurden 100 µl EDTA-stabilisiertes Vollblut in 3 ml PBS aufgenommen, vorgelegt in einem Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluß. Nach Verschluß des Röhrchens wurden die Zellen durch Zentrifugation (Centrifuge 5403, Eppendorf) für 10 min bei 4000 rpm und 4° C

am Boden konzentriert und der plasmahaltige Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml PBS resuspendiert und der Waschvorgang wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml Proteinase-K-Verdauungspuffer resuspendiert, mit 120 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 200 µl SDS (10 % w/v) versetzt und zur Proteinverdauung im Schüttelwasserbad bei 55° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Eiweißfällung mit jeweils 4 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol je Probe. Durch Schwenken entstand eine trübe Emulsion, die für 10 min bei 4° C und 5000 rpm zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Polypropylenröhrchen überführt und der Fällungsschritt wiederholt. Nach Zugabe von 4 ml Chloroform-Isoamylalkohol entstand durch Schwenken erneut eine Emulsion, deren Phasen durch Zentrifugation (10 min, 4° C, 5000 rpm) wieder getrennt wurden. Auch dieser Schritt wurde mit der klaren, DNA-haltigen Phase wiederholt. Der Überstand wurde dann in neue Reaktionsröhrchen überführt und mit dem 0,1fachen Volumen Natriumacetat (3M, pH 5,6) versetzt. Das vorhandene Volumen wurde durch Isopropanol verdoppelt und die DNA durch vorsichtiges Schwenken ausgefällt. Nach Überführung der genomischen DNA mittels Plastikspatel in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden drei Waschschrirte mit je 1 ml Ethanol (70%) durchgeführt (Zentrifugation 1 min, 13000 rpm, bei Raumtemperatur mittels Biofuge 13, Heraeus). Die DNA wurde bis zum folgenden Tag luftgetrocknet, dann in 1 ml TE-Puffer gelöst und bei 4° C gelagert.

Mit Hilfe eines Spektralphotometers erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit. Von der DNA-TE-Puffer-Lösung (Original) wurden 10 µl mit TE-Puffer im Verhältnis 1:100 verdünnt und die Lichtabsorption in einem Wellenlängenbereich von $\lambda=260$ und $\lambda=280$ nm gemessen. Die optische Dichte (OD) der doppelsträngigen DNA von 1 OD = 50µg/ml (Sambrook et al., 1989) wurde verwendet, um die DNA-Konzentration nach folgender Formel zu berechnen:

$$\text{DNA-Konzentration} = 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{OD}_{260} \times 100$$

Anschließend wurde eine Verdünnung (aqua bidest.) mit einer Endkonzentration von 25 ng/µl DNA hergestellt. Zur Überprüfung der Reinheit der Isolate wurde der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ herangezogen, wobei Werte unter 1,7 auf Verunreinigungen durch Proteine hindeuten.

3.2.4 Amplifikation der Markerfragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle Mikrosatelliten wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der Reaktionsansatz von 25 µl je Probe wurde auf 50 ng genomische DNA abgestimmt und enthielt 200 nM eines jeden Primers, je 200 µM dNTP, 0,2 U Taq-Polymerase (Quantum Appligene), 1 mM TrisHCL, 5mM KCl, 0,15 mM MgCl₂, 0,01% TritonX100 und 0,02 mg BSA (als 1x Inkubationspuffer, Quantum Appligene). Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit DNase- und RNase-freiem aqua dest. (Sigma, Deisenhofen) erreicht. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3.5 zusammengestellt.

Tabelle 3.5:
Primersequenzen der 23 Mikrosatelliten

Mikrosatellit	Primer	Primersequenzen
MCW 1	A	ACTGTCACAGTGGGGTCATGGACA
	B	ACACGTCCTGTGTACATGCCTGT
MCW 2	A	TCCAGAGACAGTTGCTCCACATTC
	B	GCAAGTTAGTTATTGTAGGGGCTC
MCW 4	A	GGATTACAGCACCTGAAGCCACTA
	B	AAACCAGCCATGGGTGCAGATTGG
MCW 5	A	ACCTCCTGCTGGCAAATAAATTGC
	B	TCACTTTAGCTCCATCAGGATTCA
MCW 14	A	AAAATATTGGCTCTAGGAACTGTC
	B	ACCGGAAATGAAGGTAAGACTAGC
MCW 16	A	ATGGCGCAGAAGGCAAAGCGATAT
	B	TGGCTTCTGAAGCAGTTGCTATGG
MCW 41	A	CCCAATGTGCTTGAATAACTTGGG
	B	CCAGATTCTCAATAACAATGGCAG
MCW 43	A	TGACTACTTTGATACGCATGGAGA
	B	CACCAAGTAGACGAAAACACATTT
MCW 49	A	AGCGGCGTTGAGTGAGAGGAGCGA
	B	TCCCCAACCCGCGGAGAGCGCTAT
MCW 51	A	GGAACAAGCTCTTTCTTCTTCCCG
	B	TCATGGAGGTGCTGGTACAAAGAC
MCW 59	A	AAGTGCCTTTGCTATCCTGATTGG
	B	AACTCCTATTGTGCAGCAGCTTAT

Fortsetzung Tabelle 3.5:

Mikrosatellit	Primer	Primersequenzen
MCW 75	A	CGTCAAGCCAGATGCTGATGAGTG
	B	ATTCCAAGGAGAAGTTTGACTCGC
ADL 158	A	TGGCATGGTTGAGGAATACA
	B	TAGGTGCTGCACTGGAAATC
ADL 176	A	TTGTGGATTCTGGTGGTAGC
	B	TTCTCCCGTAACACTCGTCA
ADL 210	A	ACAGGAGGATAGTCACACAT
	B	GCCAAAAAGATGAATGAGTA
ADL 267	A	AAACCTCGATCAGGAAGCAT
	B	GTTATTCAAAGCCCCACCAC
ADL 20	A	GCACTCAAAGAAAACAAAT
	B	TAGATAAAAATCCTTCCCTT
ADL 39	A	GCTACAACGCTTCAAACCTG
	B	ACAAACAAACCAAAAAACCT
ADL 44	A	AAGTGGTTTATTGAAGTAGA
	B	CTGTGGTGTTCGTTAGTTG
HUJ 2	A	CATCTCACAGAGCCAGCAGTG
	B	GAATCCTGGATGTCAAAGCC
HUJ 6	A	GGAACATGTAGACAAAAGC
	B	AGTAGTCCATTTCCACAGCCA
HUJ 7	A	CATAAACTAAAGTCTCAACAC
	B	TTCTTCCACACATCCTTGCTA
HUJ 8	A	CTTAATATGTGTGAGGTGGC
	B	GTTCTCACAATTGCATTAGC

Crooijmans et al., 1996b (MCW 1 – MCW 5)

Cheng et al., 1995 (ADL 158 – ADL 267)

Cheng and Crittenden, 1994 (ADL 20 – ADL 44)

Khatib et al., 1993 (HUJ 2 – HUJ 8)

Die Durchführung der PCR erfolgte mit Thermocyclern nach einem einheitlichen Programm, das in der folgenden Tabelle 3.6 dargestellt ist.

Tabelle 3.6:
Basisprogramm für Thermocycler

	Denaturierung 94° C	Primerspezifische Annealing-Temperatur	Synthese 70° C
Initialer Zyklus	4 min	1 min	1 min
29 Zyklen	1 min	1 min	1 min
Finaler Zyklus	2 min	2 min	4 min

Variationen dieses Programms wurden nur bei der Amplifikation der Mikrosatelliten aus Plasma-DNA vorgenommen, weil diese DNA im Vergleich zu den Isolaten aus Vollblut weniger konzentriert war und eine geringere Qualität aufwies. Diese Variationen bestanden in einer

- Variationen der Annealing-Temperatur,
- Erhöhung der Zyklusanzahlen um 10 auf 39 Zyklen,
- Verdoppelung der finalen Extension bei 70° C um 4 auf 8 min oder
- Wiederholung der gesamten PCR mit dem PCR-Produkt als Matrize.

Der letzte Schritt wurde nur in Ausnahmefällen notwendig, um eine ausreichende Produktmenge für die folgenden Analyseschritte zur Verfügung zu haben. Die primerspezifischen Annealing-Temperaturen und die detektierten Fragmentlängen sind in Tabelle 3.7 zusammengestellt.

Tabelle 3.7:
Annealing-Temperaturen und Fragmentlängen der 23 ausgewählten Mikrosatelliten

Mikrosatellit	Annealing-Temperatur (° C)	Länge (bp)
MCW 1	58	163-165
MCW 2	50	145-147
MCW 4	58	176-182
MCW 5	58	212-220
MCW 14	55	172-186
MCW 16	58	140-154
MCW 41	55	160-170
MCW 43	55	129-135
MCW 49	58	116-128
MCW 51	50	95-105
MCW 59	55	153-156
MCW 75	55	175-179
ADL 158	52	188-194
ADL 176	52	181-192
ADL 210	46	123-126
ADL 267	50	105-109
ADL 20	52	98-107
ADL 39	52	150-156
ADL 44	52	166-172
HUJ 2	58	127-133
HUJ 6	58	114-118
HUJ 7	58	152-162
HUJ 8	58	235

Der PCR-Erfolg wurde in horizontalen Agarosegel-Elektrophoresesystemen kontrolliert (verwendete Geräte: Abschnitt 3.2.2).

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese:

1 % Agarose-Gel:

Agarose 2,5 g

1 x TAE 250 ml

aufkochen (Mikrowelle) und nach Abkühlung 25 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugeben.

Stop-Puffer:

Formamid	40 ml
Amberlite	12 g
30 min rühren (Magnetrührer), filtrieren, 25 ml Filtrat abnehmen und	
EDTA-Stammlösung	1 ml
Bromphenol-Blue-Na-Salt	7,5 mg
Xylene Cyanol FF	7,5 mg
zugeben, Puffer vorsichtig schwenken.	

50 x TAE-Puffer:

Tris	242 g
Essigsäure 100 %	57,1 ml
EDTA-Stammlösung	100 ml
aqua dest.	ad 1 l

1 x TAE-Puffer:

50 x TAE-Puffer im Verhältnis 1:50 mit aqua dest. verdünnen.

Die 1%-Agarose-Gele wurden in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und mit 8 µl PCR-Produkt, das zuvor mit 3 µl Stop-Puffer versetzt wurde, beschickt. Nach einer Laufzeit von 45 min bei 80 V konnte anhand des mit Ethidiumbromid angefärbten PCR-Produkts die Größenordnung des amplifizierten Markerfragments im Vergleich zu mitgeführten, selbsterstellten Standards bestimmt werden. Zur Dokumentation wurden die Gele auf dem UV-Transilluminator (Faust GmbH, Berlin) bei 312 nm mit einer Sofortbildkamera (Polaroid, Offenbach) fotografiert.

In Abbildung 3.4 werden die unterschiedlichen Amplifikationsergebnisse je nach Ausgangsmaterial deutlich. Auf der Basis von DNA aus Vollblut sind die Banden in der ersten Reihe des Gels nach der Einlagerung von Ethidiumbromid deutlich erkennbar. Hingegen bedeuten die schwächeren Banden in der zweiten und dritten Reihe eine geringere DNA-Konzentration bei der Plasma-DNA, obwohl derselbe Mikrosatellit MCW 41 verwendet wurde.

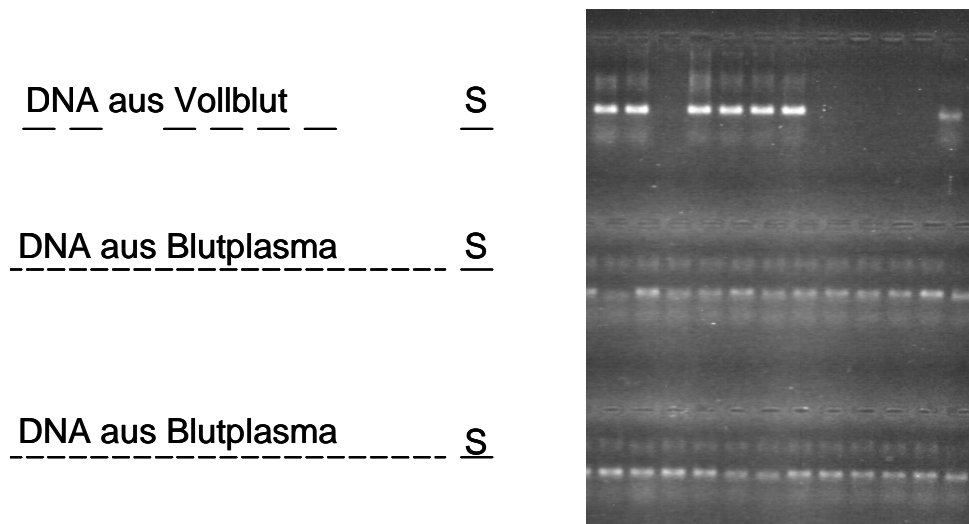


Abbildung 3.4:

Unterschiede im PCR-Erfolg je nach Herkunft der DNA am Beispiel MCW 41 (S: Längenstandard)

3.2.5 Längendetektion der Markerfragmente

Die amplifzierten Mikrosatelliten variieren individuell oft nur um wenige Basenpaare in ihrer Länge aufgrund von Wiederholungen einfacher Sequenzmotive. Da diese geringen Unterschiede im Agarosegel nicht nachzuweisen sind, wurde für diese Analyse ein fein trennendes Polyacrylamid-Gel verwendet.

3.2.5.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Lösungen:

Dextran-Puffer:

Formamid	10 ml
Dextran Blue	4 mg

6 % Polyacrylamid-Harnstoffgel (300 x 350 x 0,5 mm):

Harnstoff	33,6 g
aqua bidest.	ad 50 ml
unter Rühren lösen	
Rotiphorese Gel 40	12 ml
10 x TBE-Puffer	4 ml
aqua bidest.	ad 80 ml

filtrieren (0,22 µm) und entgasen mittels Vakuumpumpe, vor dem Gießen 250 µl Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) und 50 µl TEMED zugeben.

10 x TBE-Puffer, pH 7,5:

Tris	890 mmol/l
Borsäure	890 mmol/l
EDTA	25 mmol/l

0,5 x TBE-Puffer, pH 7,5:

10 x TBE-Puffer im Verhältnis 1:20 mit aqua dest. verdünnen.

Die Feinauftrennung der Markerfragmente erfolgte in einer vertikalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit dem A.L.F.-DNA-Sequencer (Amersham Pharmacia). Das PCR-Produkt wurde je nach Bandenintensität bei der Kontrolle des PCR-Erfolgs verdünnt, mit 3 µl Dextranpuffer und mit 2 µl eines selbst erstellten Längenstandards versetzt und nach Hitzedenaturierung bei 80° C für 1 min und anschließender Kühlung auf Eis auf das denaturierende Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde in der Gelmitte ein sogenannter externer Standard mitgeführt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte mit dem Elektrodenpuffer 0,5x TBE bei 2000 V, 200 mA, 50 W und 50 °C. Sie dauerte abhängig von der Länge der zu analysierenden Fragmente (95 - 235 bp) zwischen 3 und 6 Stunden. Die Längenunterschiede der fluoreszierenden Mikrosatellitenfragmente wurden mit Hilfe der Laser-Photodetektoreinheit des DNA-Sequencers ermittelt.

3.2.5.2 Bestimmung der Markergenotypen

Zur Auswertung wurde die Software "Fragment Manager V1.1" (Amersham Pharmacia, Freiburg) genutzt. Mit Hilfe industrieller Standards definierter Länge (100, 150 und 200 bp) wurden drei eigene Längenstandards entwickelt (Längenstandard 1: 150, 156 bp, Längenstandard 2: 163, 165 bp, Längenstandard 3: 181, 192 bp), die im Labor bei Bedarf hergestellt werden konnten. Anhand des in jeder Spur des Gels vorhandenen internen Längenstandards und des in der Gelmitte mitgeführten externen Längenstandards konnten die Fragmentlängen berechnet werden. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, wurde ein Tier an dem entsprechenden Mikrosatelliten-Genort als homozygot eingestuft, wenn nur eine Fragmentlänge detektiert wurde und heterozygot, wenn zwei verschiedene Peaks auftraten. Aus diesen Genotypen wurde eine Datenbank erstellt.

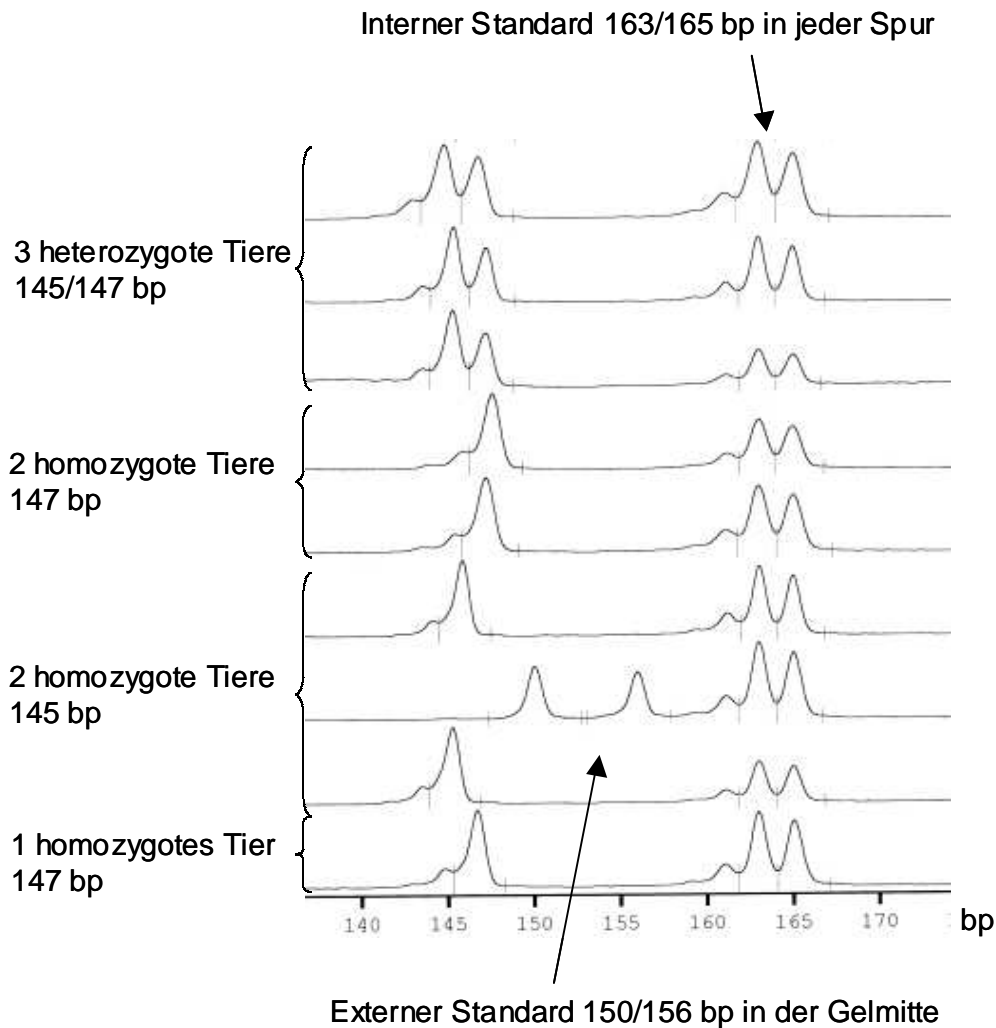


Abbildung 3.5:
Genotypisierung anhand der Fragmentlängenvariation am Beispiel des Markers MCW 2

3.3 Statistische Methoden

3.3.1 Schätzung der Inzuchtkoeffizienten

Die Höhe des Inzuchtgrades wurde sowohl anhand der Verwandtschaftsverhältnisse der Zuchttiere als auch über die Zahl der verpaarten Tiere je Generation (effektive Populationsgröße, N_e) geschätzt.

3.3.1.1 Schätzung der Inzuchtkoeffizienten anhand der Verwandtschaftsmatrix

Basierend auf der Matrixmethode wurden die individuellen Inzuchtkoeffizienten aus allen verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Zuchttieren

innerhalb des seit 1955 dokumentierten Pedigrees mit Hilfe der "INBREED Procedure" des Programmpakets SAS (Version 6.12) berechnet. Dabei entspricht der Inzuchtkoeffizient F dem halben Verwandtschaftsgrad der Eltern. Im Gegensatz zu diskreten Generationen mit je einer Matrix pro Generation wurde aufgrund der überlappenden Generationen bis 1968 bei den New Hampshire eine einzige Matrix für die Berechnungen verwendet, die alle rund 8100 Zuchttiere enthielt. Die Grundlage für die Berechnungen bildet die folgende Formel:

$$(3.1) \quad \text{cov}(AB) = (\text{cov}(AC) + \text{cov}(AD)) / 2$$

$\text{cov}(AB)$ Verwandtschaftsgrad zwischen den Individuen A und B ,
wobei A älter ist als B

$\text{cov}(AC)$ Verwandtschaftsgrad zwischen A und C (Elter von B)

$\text{cov}(AD)$ Verwandtschaftsgrad zwischen A und D (Elter von B)

Die mittlere Inzucht pro Generation wurde als arithmetisches Mittel der individuellen Inzuchtkoeffizienten der Zuchttiere in der jeweiligen Generation bestimmt.

3.3.1.2 Bestimmung des Inzuchtgrades anhand der effektiven Populationsgröße

Weiterhin ist es möglich, die Inzuchtrate je Generation aus der Anzahl der verpaarten Eltern in der vorangegangenen Generation nach der folgenden Formel zu berechnen (Schönmuth et al., 1986):

$$(3.2) \quad \Delta F = \frac{1}{2N_e}$$

ΔF Inzuchtzunahme zwischen den Generationen $t-1$ und t

N_e effektive Populationsgröße in der Generation $t-1$

Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Hähnen und Hennen in der New Hampshire Population wurde die folgende Beziehung nach Wright (1931) genutzt:

(3.3)

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{4N_m} + \frac{1}{4N_w}$$

- N_e effektive Populationsgröße
 N_m Anzahl männlicher Individuen in der Population
 N_w Anzahl weiblicher Individuen in der Population

um die Inzuchtzunahme näherungsweise zu schätzen über

(3.4)

$$\Delta F \approx \frac{1}{8N_m} + \frac{1}{8N_w}$$

Nach Falconer and Mackay (1996) wurde die Inzucht F der Generation t dann wie folgt berechnet:

(3.5)

$$F_t = \Delta F + (1 - \Delta F)F_{t-1}$$

$$F_t = \Delta F(1 - F_{t-1}) + F_{t-1}$$

- F_{t-1} Inzuchtgrad der Generation $t-1$
 ΔF Inzuchtanstieg zwischen den Generationen $t-1$ und t ,
 (geschätzt über die Anzahl männlicher und weiblicher
 Zuchttiere der Generation $t-1$).

3.3.2 Analyse der genetischen Variabilität

Die Genotypisierungsdaten wurden für jeden Mikrosatelliten-Marker in jeder Stichprobe nach folgenden Kriterien ausgewertet:

- Anzahl der aufgetretenen Allele,
- Genotypenfrequenzen (relative Anzahl der möglichen Genotypen)
- Allelfrequenzen (relativer Anteil des Allels an der Gesamtzahl der vorhandenen Allele)
- Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes (Berechnung der erwarteten Genotypenfrequenzen aus den beobachteten Allelfrequenzen)
- Bestimmung des Informationsgehalts (Polymorphic information content, PIC).

3.3.2.1 Homozygotiestatus

Mit Hilfe der Mikrosatelliten-Marker war es möglich, für jedes Tier den individuellen Homozygotiestatus zu bestimmen. Er spiegelt den Anteil homozygoter Genotypen an allen untersuchten 23 Markerloci wider und wurde nach Christensen et al. (1996) wie folgt berechnet:

$$(3.6) \quad HO = \frac{\sum_{i=1}^N HO_i}{N}$$

HO individueller Homozygotiestatus

N Anzahl Mikrosatelliten-Loci

Das arithmetische Mittel der Homozygotiestatus aller Individuen je Stichprobe wurde herangezogen, um die Entwicklung der Homozygotie über 12 Generationen zu verfolgen und mit der Vorhersage durch die Inzuchtkoeffizienten zu vergleichen. Weiterhin wurde der Homozygotiestatus aus bestimmten Markergruppen gebildet, z.B. aus Markern in kodierenden und nichtkodierenden Regionen, und deren Entwicklung bei zunehmender Inzucht beobachtet.

Neben dem individuellen Homozygotiestatus wurde der Anteil homozygoter Tiere je Markergenort und Stichprobe bestimmt und auf signifikante Änderungen innerhalb von 12 Generationen mittels Fisher's Exact Test (SPSS, Version 8) untersucht. Die Änderungen der Allelfrequenzen über 12 Generationen wurde in gleicher Weise geprüft.

3.3.2.2 Beobachtete und erwartete Heterozygotie

Die beobachtete Heterozygotie basiert auf dem Anteil heterozygoter Tiere je Mikrosatellit. Ihre Entwicklung über 12 Generationen wurde analog der Homozygotie verfolgt. Die Berechnung der erwarteten Heterozygotie (HE_{erw}) je Marker erfolgte durch Anwendung des Hardy-Weinberg-Gesetzes unter Berücksichtigung der Inzucht, indem aus den beobachteten Allelfrequenzen die erwarteten Genotypenfrequenzen nach folgender Beziehung geschätzt wurden:

$$(3.7) \quad HE_{erw} = 2pq(1 - F)$$

p, q Allelfrequenzen eines Markers in einer Stichprobe
 F mittlerer Inzuchtkoeffizient dieser Stichprobe

Die beobachtete und die erwartete Heterozygotie wurden je Marker innerhalb der Stichprobe verglichen und auf signifikante Abweichungen mittels Fisher's Exact Test (SPSS, Version 8) geprüft.

3.3.2.3 Informationsgehalt der Marker (PIC)

Der Informationsgehalt eines Markers (Polymorphic information content, PIC) beruht auf der Anzahl seiner Allele und Allelfrequenzen (Botstein et al., 1980). Der Wert wird um so größer, je mehr Allele mit niedriger Frequenz auftreten:

$$(3.8) \quad PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

n Anzahl Allele
 p_i, p_j Frequenz des i-ten bzw. j-ten Allels

Zusätzlich wurde je Stichprobe das arithmetische Mittel der PIC-Werte aller Mikrosatelliten gebildet und verglichen.

3.3.3 Vergleich der erwarteten mit der realisierten Homozygotie

Unabhängig von der Schätzmethode bedeutet eine Inzuchtzunahme eine wahrscheinliche Zunahme der Homozygotie bezogen auf zuvor heterozygote Genorte. Bei den New Hampshire konnte anhand des Inzuchtanstiegs je Generation auf der Grundlage der beobachteten Heterozygotie in der Generation 1982 anhand der folgenden Formel die mittlere Homozygotiezunahme für die Generation 1994 geschätzt werden:

(3.9)

$$HE_t = HE_{t-1}(1 - dF_t)$$

HE_t Heterozygotiegrad in der Generation t

HE_{t-1} Heterozygotiegrad in der Generation $t-1$

dF_t Inzuchtanstieg zwischen den Generationen $t-1$ und t

Zusätzlich wurden die individuellen Inzuchtkoeffizienten auf Korrelationen mit dem jeweiligen individuellen Homozygotiestatus, der auch aus verschiedenen Gruppen von Markern gebildet wurde, für die Stichproben 1982 und 1994 untersucht (Pearson' s Korrelationskoeffizient, Programmpakt SAS, Version 6.12).