

## Aktuelle Forschungsarbeit Genetik

Zum genetischen Nachweis der Wildkatze werden zwei Methoden eingesetzt: die Untersuchung bestimmter Gensequenzen der mitochondrialen DNA und die Untersuchung von Mikrosatelliten in der Kern-DNA.

Hier eine kurze Methodenbeschreibung von Dr. Carsten Nowak vom Senckenberg Institut:

### „Methode 1: Mitochondriale Sequenzanalyse

Eingeschickte Haarproben wurden bei Zimmertemperatur trocken und lichtgeschützt gelagert. Die Extraktion der DNA aus den Haaren wurde entweder mit dem QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Germany) oder nach dem Protokoll von Müller et al. (2007) durchgeführt. Die Unterscheidung von Haus- und Wildkatze erfolgte zunächst mittels eines 138 bp langen DNA-Fragmentes aus der mitochondrialen Kontrollregion (Böhle, mündliche Mitteilung). Die Amplifizierung des Fragmentes wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen in einem Biometra Tetracycler vervielfältigt (nach Freeman et al., 2001): Initiale Denaturierung für 4 min bei 95°C, Denaturierung für 40 sec bei 94°C, Annealing der Primer für 40 sec bei 56°C, Elongation der DNA für 90 sec bei 72°C, 39 x Wiederholung der Schritte 2-4. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl unter Zugabe von 4 µl DNA-Eluat durchgeführt; für genaue Reaktionsbedingungen siehe Freeman et al., (2001). Der Erfolg der Amplifizierungsreaktion wurde durch eine gelelektrophoretische Auftrennung der DNA geprüft. Erfolgreich vervielfältigte Fragmente wurden auf einem ABI 3700 Sequenzierer (Applied Biosystems) der Firma AGOWA, Berlin sequenziert. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Sequencher 4.7 manuell editiert und für die nachfolgende Analyse aligniert. Die Zugehörigkeit der ermittelten Sequenz zu Haus- oder Wildkatze wurde über ein Haplotypennetzwerk ermittelt (TCS 1.06 software; Clement et al., 2000). Zur korrekten Zuordnung der Proben zu der jeweiligen Art wurden 26 morphologisch vorbestimmte Referenzproben verwendet, deren Haplotypen (Sequenz des betreffenden mtDNA-Abschnittes) in das Netzwerk integriert wurden.

Seit März 2008 wird zur genetischen Unterscheidung von Haus- und Wildkatzenhaplotypen ein 276 Basenpaare langer, mitochondrialer Sequenzabschnitt verwendet, welcher auf Grundlage der Daten von Driscoll et al. (2007) eine sichere Unterscheidung von mitochondrialem Haus- und Wildkatzen genom erlaubt. Der neu entwickelte mtDNA-Marker wurde unter ähnlichen Reaktionsbedingungen amplifiziert wie das zunächst verwendete Fragment aus der Kontrollregion.

Erfolgreich amplifizierte Fragmente wurden auf einem DNA-Sequenziergerät (CEQ8800, Beckman Coulter) sichtbar gemacht und die jeweiligen Fragmentlängen mit dem Programm Genemarker 1.7 bestimmt. Über verschiedene multivariate statistische Verfahren können auf Basis der verschiedenen Fragmentlängen der Grad an genetischer Unterschiedlichkeit zwischen Individuen bestimmt und so Tiere in verschiedene genetische Gruppen (= Cluster) eingeteilt werden. Mit Hilfe von morphologisch bestimmten Referenzproben können diese Cluster schließlich der Haus-, bzw. der Wildkatze zugeordnet werden. Die bisher ermittelten genetischen Identifikationen wurden mittels der Programme Genetix 4.05 (Belkhir et al. 1996-2004), sowie Structure (Pritchard et al. 2000) durchgeführt.

### Methode 2: Mikrosatellitenanalyse

Um abgesicherte Aussagen zu Artzugehörigkeit und Hybridisierungsgrad zu erhalten, werden bei Senckenberg Mikrosatellitenanalysen mit Haarproben von Lockstöcken durchgeführt. Im Gegensatz zur mitochondrialen Analyse haben Mikrosatellitenuntersuchungen zwei entscheidende Vorteile, da sie zum

einen genetische Muster in der Kern-DNA untersuchen, welche Rekombinationsereignissen unterliegt; zum anderen werden hier zahlreiche Genorte (Loci) gleichzeitig sichtbar gemacht. Die hohe Variabilität an den Mikrosatelliten-Loci erlaubt eine sichere Individualisierung und wird zukünftig Populationsgrößenabschätzungen erlauben.

Für die Mikrosatellitenuntersuchungen werden bei Senckenberg 12 Marker verwendet, welche ursprünglich aus der Arbeit von Menotti-Raymond et al., (1999) stammen und bereits in anderen Arbeiten ihre Eignung zur Differenzierung von Haus- und Wildkatze gezeigt haben (z. B. Stoeckle, 2008). Zusätzlich wurde ein Geschlechtsmarker verwendet, welcher auf Längenunterschieden der Zinkfingerregion der Geschlechtschromosomen basiert (Pilgrim et al., 2005). Die Mikrosatellitenregionen wurden in einem Multiplex-Ansatz mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert, wobei aufgrund der Fehleranfälligkeit der Reaktion bei nicht-invasiv gesammeltem Probenmaterial mindestens drei Wiederholungen pro Probe angesetzt wurden. Durch diesen sogenannten „multiple tubes“-Ansatz (Taberlet et al., 1996) wird gewährleistet, dass fehlerhafte Amplifikationen, wie allelic dropouts oder null alleles zu einer unkorrekten Genotypisierung führen.“