

Aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen

Abteilung Allgemeine Humangenetik

Kommissarischer Leiter: Professor Dr. O. Rieß

**„Analysen der genetischen Variabilität am Modell von Populationen der
Spezies *Parus major*“**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen,**

**vorgelegt von
Simon Peter Driesel
aus
Neuss**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Kömpf

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Kloor

Inhalt:	Seite:	
1	Einleitung	5
1.1	Genetische Variabilität	5
1.2	Populationsgenetik	6
1.3	Ziel der Arbeit	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Untersuchungsgut	8
2.2	Material	8
2.3	Methoden	8
2.3.1	Trennmethoden	8
2.3.2	Horizontale Stärkegelelektrophorese (SGE)	9
2.3.3	Aufbereitung der Blutproben	10
2.3.4	Färbetechniken	10
2.3.5	analytische Isoelektrische Fokussierung (IEF)	11
2.3.5.1	Gelrezepturen IEF allgemein	11
2.3.5.2	pH-Gradienten und Laufbedingungen	12
2.3.5.3	Esterasen-Zymogramme	14
2.3.5.4	Färbelösungen und Methoden zur Darstellung der Carboxylesterasen	14
2.3.5.5	Phosphoglucose-Isomerase-Zymogramme	14
2.3.6	Dokumentation der Zymogramme	15
2.4	Präparation genomischer DNA aus Meisenblut	15
2.4.1	DNA-Extraktion mit dem Quiagen „Blood- Extraction-Kit“	15
2.4.1.1	Testgel zur DNA Extraction	16
2.4.2	Mikrosatellitenvariation	16
2.4.2.1	PCR	16
2.4.2.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.4.2.3	Silberfärbung	19
2.5	Statistische Auswertungsmethoden	19
2.5.1	Formalgenetische Analysen	19
2.5.2	Populationsgenetische Analysen	19
2.5.3	Kopplungsanalyse	19
2.6	Weitere Programme	20
2.6.1	Textverarbeitung	20
2.6.2	Bildverarbeitung	20
2.6.3	Tabellenkalkulation	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Genetische Variabilität von Enzymen	21
3.2	Zymogramme	22
3.2.1	Carboxylesterasen (EST)	22
3.2.2	PGI	29
3.2.3	Mikrosatelliten	30
3.2.3.1	Locus PK-12	30

3.2.3.2	Locus PAT-14	30
3.2.3.3	Locus PAT-43	30
3.2.3.4	Locus POCC-8	30
3.3	Formale Genetik	34
3.3.1	Aufspaltungsanalyse	34
3.3.1.1	Carboxylesterasen	36
3.3.1.2	PGI	39
3.3.1.3	Mikrosatelliten	40
3.3.3	Ausschlüsse	44
3.4	Populationsgenetik	45
3.5	Nullallele	47
3.5.1	Auszählung entgegengesetzter Homozygoter im System der Esterasen	47
3.5.2	Geschätzte Häufigkeit von Nullallelen unter Zuhilfenahme populationsgenetischer Programme	47
3.6	Kopplungsanalyse	48
4	Diskussion	52
4.1	Formale Analysen	52
4.2	Genetisch Variabilität	53
4.2.1	Enzyme	53
4.2.2	Mikrosatelliten	55
4.2.3	Nullallele	55
4.3	Populationsgenetik	56
4.3.1	Ausschlußchance	57
4.4	Kopplungsanalyse	57
5	Zusammenfassung	60
6	Literatur	61
7	Anhang	68
7.1	Puffer, Lösungen und Medien, Färbelösungen	68
7.2	Chemikalien, Trägerampholyte, Verbrauchsmaterial, Enzyme, Oligonukleotidproben und Primer	69
7.3	Danksagung	72
7.4	Lebenslauf	73

1 Einleitung

1.1 Genetische Variabilität

Genetische Variabilität manifestiert sich auf phänotypischer Ebene durch: 1. die Variabilität quantitativer Merkmale (z.B.: Körperhöhe, Pigmentierung), 2. durch die Variabilität qualitativer Merkmale. (Bsp.: Struktur- und Funktionsproteine, Marker von Zelloberflächen, DNA-Variabilität nicht-kodierender Loci).

Die quantitative Variabilität stellt eine graduelle Merkmalsausprägung im Sinne einer Gaußschen Normalverteilung über der untersuchten Population dar. Sie ist also Ausdruck der genetischen Variabilität von Polygensystemen (Sperlich, 1988). Zur Bestimmung der Variabilität quantitativer Merkmale werden die statistischen Methoden der quantitativen Genetik eingesetzt.

Qualitative Variabilität manifestiert sich durch diskrete und alternative Merkmalsausprägungen. Der Rückschluss vom Phäno- auf den Genotypus ist indirekt (Elektromorphe von Proteinen) oder direkt (DNA-Sequenzen) möglich. Sie ist somit Ausdruck der genetischen Variabilität von Monogensystemen; ein Locus mit mindestens zwei Allelen kontrolliert die Expression entsprechend vieler Phänotypen. Proteinvariabilität wird durch die Methoden der Serologie und der biochemischen Humangenetik (Elektrophorese) erfasst. Qualitative Merkmale der DNA werden durch Methoden der Molekulargenetik (z.B. Sequenzierung) nachgewiesen.

Allele für variable Merkmale können in Populationen selten oder polymorph sein. Definitionsgemäss wird von Polymorphismus dann gesprochen, wenn seltene Allele mit einer Frequenz von mindestens 2% in der Population auftreten (Ford, 1941). Bei Allozymopolymorphismen wird ein Locus dann als polymorph betrachtet, wenn die Frequenz des häufigsten Alleles $< 95\%$ ist (Ayala, 1984).

Polymorphismen werden in transiente und balancierte Polymorphismen unterteilt. Bei transienten Polymorphismen sind die Merkmale selektionsneutral, und der Genotypus ist für die Fitness ohne Belang. Hierzu zählen die meisten Proteinpolymorphismen und die DNA-Polymorphismen nichtcodierender DNA (z.B. Mikrosatelliten).

Umwelteinflüsse wie z.B. UV-Strahlung führen dazu, dass bestimmte Merkmale vorteilhaft für die Fitness ihres Trägers sind. Es besteht eine gerichtete, negative Selektion gegen das benachteiligende Merkmal. Balancierte Polymorphismen (z.B. Sichelzell-Hämoglobin, HbS) entwickeln sich, wenn die homozygoten Genotypen (HbSS, HbAA) einen Selektionsnachteil gegenüber den heterozygoten Genotypen (HbAS) haben.

Die Analyse genetisch determinierter, qualitativ variabler Merkmale ermöglicht die Prüfung genetischer Individualität (Forensik), die Klärung von Abstammungsfragen, Aussagen über die genetische Ausstattung von Populationen und die Untersuchung von Mecha-

nismen, die die Zusammensetzung von Genpools verändern (Isolation, Migration, Drift, Inzucht und Selektion). Als Markersysteme für populationsgenetische Analysen kommen z.B. Enzym polymorphismen, Blutgruppensysteme (AB0, MN), HLA-Merkmale, RFLP- (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) oder Mikrosatellitensysteme in Frage.

Die genetische Variabilität qualitativer Merkmale kann mittels drei folgenden Meßgrößen erfasst werden. Zum 1. der genetische Polymorphiegrad mit der Bedingung, dass die Frequenz des häufigsten Allels unter 95% liegt, zum 2. der genetische Heterozygotiegrad, der das Ausmaß der Heterozygotie für alle genetischen Merkmale in einer Population beschreibt, zum 3. die Anzahl der Allele.

1.2 Populationsgenetik

Is Population ist nach Wright (1921) eine Gemeinschaft von Individuen definiert, die ein geographisch zusammenhängendes Areal bewohnen, dieselbe Reproduktionsweise besitzen und denselben erblichen Schwankungen und gleichen Selektionswirkung unterliegen.

Als Genpool wird die Summe aller Erbmerkmale einer Population über Zeit und Raum bezeichnet. Je nach der Konstanz des Genpools wird in Standpopulationen und Wanderpopulationen unterschieden (Sperlich, 1988): Der Genpool geographisch isolierter Fortpflanzungsgemeinschaften oder habitatabhängiger Nahrungsspezialisten verändert sich beispielsweise durch Inzucht (der Genpool verarmt als Folge von Inzucht), Adaptationsphänomene oder bestimmte Fortpflanzungsstrukturen oder -verhalten. Sind die Individuen einer Population wenig spezialisiert und vom Habitat unabhängig, kann sich der Genpool durch Drift, Genfluss (v.a. in den Randbezirken) und durch Vermischung mit anderen Populationen verändern. Starke Genpoolveränderungen können auch durch Schwankungen der Populationsgröße entstehen. Bei sogenannten Bottleneckphänomenen, wie Seuchen und Kriege, wird die Population kurzfristig sehr viel kleiner, um sich danach wieder zu vergrößern. Dabei ist es möglich, dass seltene Allele aus der Population verschwinden oder sich Neumutanten anhäufen. Fortdauernder Selektionsdruck führt 1. zu balancierten Polymorphismen oder 2. zu genetischer Fixierung optimaler Eigenschaften (z.B. Vermehrung des HbS-Allels in menschlichen Populationen in Malariagebieten) und damit in beiden Fällen indirekt zur Erhöhung der Populationsfitness.

Viele ökologische Untersuchungen konzentrierten sich auf Populationen in heterogenen Umwelten (Review: Kareiva, 1990). Dabei wirken sich unterschiedliche Habitatqualitäten signifikant auf Wachstum, Überleben und Reproduktionserfolg einzelner Individuen aus. Das heisst, der Reproduktionserfolg einzelner Individuen hängt von ihren Nahrungsressourcen ab. Das Konkurrenz-Ausschlussprinzip („competitive-exclusion-principle“) sagt vorher, dass konkurrierende Arten in einem gemeinsamen Habitat die vorhandenen

Ressourcen unterschiedlich nutzen müssen (Gause, 1934). Bei den sympatrisch lebenden *Parus* Spezies beobachtet man dementsprechend, dass die Nahrung der grösseren Arten aus grösseren „Beutetieren“ als die der kleineren Arten besteht (Gibb und Betts, 1963). *P. caeruleus* und *P. major* nutzen zwar ähnliche Nahrungsressourcen, aber sie verwerten diese unterschiedlich (Lack, 1971). Blaumeisen sind während der Brutsaison vergleichsweise bessere Konkurrenten (Minot, 1981), da sie ihre Nahrungsressourcen besser ausbeuten und ein engeres Nahrungsspektrum als Kohlmeisen nutzen können (Gibb und Betts, 1963). Im Vergleich dazu ist das Nahrungsangebot von Kohlmeisennestlingen wesentlich breiter (Gibb und Betts, 1963).

Im Zusammenhang mit der Exploitation von Ressourcen wird die Bedeutung von Enzymvariationen diskutiert. Sie kann sich signifikant auf die Fitness einzelner Individuen auswirken, vgl. Esterase-Varianten bei *Drosophila mulleri*, (Lourenço et al, 2001) oder die Esterasen-bedingte Insektizidresistenz bei Pfirsich-/Kartoffelläusen (Devonshire, 1977). Der positive Entgiftungseffekt von Serumesterasen bei Vögeln ist ebenfalls bekannt (Thompson, 1993; Walker, 1995). Der Effekt von Allozym-Variation auf die individuelle Fitness wird kontrovers diskutiert (Hansson und Westerberg, 2002): Die „general effect hypothesis“ vermutet einen Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Heterozygotiegrad und der Fitness und benutzt die Allozymvariation als einen Marker für den durchschnittlichen, genetischen Heterozygotiegrad. Die „direct effect hypothesis“ postuliert hingegen einen direkten Effekt der Allozymvariabilität auf die Fitness. Die Allozymfunktion ist hiernach direkt mit der Fitness verbunden (Thelen und Allendorf, 2001).

1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der genetischen Variabilität von Kohlmeisen-Brutpopulationen in verschiedenen Habitaten mit Enzym- und Mikrosatellitensystemen als genetische Marker.

Die Untersuchungen umfassen: Formale Analysen der einzelnen Systeme; Kopplungsanalysen; Bestimmung des Ausmasses der Variabilität; Selektionsnachweis, d.h. Prüfung auf Hardy-Weinberg-Verteilung der Genotypenhäufigkeiten; Prüfung der genetischen Homogenität der Brutpopulationen; Ausschlusschancen der Systeme; Häufigkeit von „extra-pair-paternity“ (EPP).

Der gewählte Untersuchungsansatz besteht aus zwei Stichproben von Kohlmeisenfamilien aus den Jahren 1999 und 2000, aus jeweils zwei verschiedenen Habitaten unterschiedlicher Qualität (Laubwald vs. Laub-Nadel-Mischwald), mit einem Probenumfang von insgesamt 862 untersuchten Tieren, davon 205 Alttiere.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Für die biochemisch-genetischen und molekulargenetischen Studien dieser Arbeit werden Blutproben von Kohlmeisen (*Parus major*) eingesetzt. Zwei Brutpopulationen der Jahrgänge 1999 und 2000 im Waldgebiet Schönbuch bei Tübingen in Baden-Württemberg werden untersucht. Die Beringung von Alt- und Jungtieren erlaubt u.a. die Identifizierung von Individuen verschiedener Jahrgänge.

Die Blutproben werden mit Acidum-Citricum-Dextrose versetzt und bei -30°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Pro Individuum stehen etwa 200 μl Probenmenge zur Verfügung. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Anzahl und Zusammensetzung der Brutpopulationen in den Jahrgängen 1999 und 2000.

Tabelle 1: Untersuchungsgut aus den Jahren 1999 und 2000. Auflistung der Anzahl der untersuchten Alt- und Jungtiere zweier Brutpopulationen von *Parus major*.

Brutpopulation	Alttiere	Jungtiere	Gesamt
Jahrgang 1999:	94	311	405
Jahrgang 2000:	111	346	457
Summe:	205	657	862

2.2 Material

Die verwendeten Puffer sowie die Chemikalien, Trägerampholyte, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Oligonukleotidproben und Primer sind am Ende dieses Kapitels in den Anhängen 1 bzw. 2 zu finden.

2.3 Methoden

2.3.1 Trennmethode

Die Elektrophorese ist eine Methode, um Moleküle im elektrischen Feld nach Größe und Ladung zu sortieren. Proteine besitzen als amphotere Polypeptide einen isoelektrischen Punkt (IEP). Dieser entspricht dem pH-Wert, an dem die Nettoladung eines Proteins gleich Null ist. Die Wanderungsrichtung und -strecke von Proteinen werden in der Elektrophorese durch ihren IEP, sowie durch die pH-Werte des Gel- und Elektrodenpuffers, Laufzeit, Temperatur und die elektrischen Bedingungen bestimmt. Durch Modifikation der elektrophoretischen Bedingungen lassen sich daher Laufstrecke, Position und Auflösung

einzelner Fraktionen eines Proteins verändern. Bei Elektrophoresen mit einheitlichem pH-Wert im Gelpuffer bestimmt die Differenz zwischen elektrophoretischem pH und IEP die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld. Bei Elektrophoresen in Gelen mit einem pH-Gradienten wird das Protein an die Stelle wandern, an welcher der pH-Wert im Gradienten mit dem IEP des Proteins übereinstimmt.

Zur qualitativen Darstellung elektromorpher Proteinvariabilitäten werden im allgemeinen trägergebundene elektrophoretische Verfahren eingesetzt. Als Träger dienen Stärke-, Agarose- oder Polyacrylamid-(PAA-)Gele.

Durchgeführt werden sowohl kontinuierliche (Gel- und Elektrodenpuffer sind identisch) und diskontinuierliche (Gel- und Elektrodenpuffer sind unterschiedlich) Elektrophoresen als auch isoelektrische Fokussierungen (IEF) in mobilen oder immobilen pH-Gradienten. In der IEF werden Proteine in einem pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) aufgetrennt.

Der pH-Gradient bei der IEF in mobilen Gradienten wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an ein Gemisch amphoterischer Puffersubstanzen (Trägerampholyte) erzeugt, wobei ein linearer pH-Gradient entsteht, mit dem niedrigsten pH-Wert an der Anode und dem höchsten an der Kathode.

Für die Herstellung immobilier Gradienten werden Acrylamidlösungen mit verschiedenen pK-Werten eingesetzt. Sie werden als schwere und leichte Lösung mit einem Gradientenmischer in die Gelkassette gegossen. Nach Polymerisation des Gels ist der pH-Gradient in der Gelmatrix fixiert.

Gibt man nun eine Probe eines Proteins in das System, dessen IEP im Bereich des pH-Gradienten liegt, so wird das Protein an die Stelle des Gradienten wandern, der mit dem spezifischen IEP korrespondiert.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Trägerampholyte lassen sich beliebig weite oder enge pH-Gradienten zwischen pH 2 und pH 11 konstruieren, so daß sich für die gesuchten Proteine optimale Trennbedingungen ergeben.

2.3.2 Horizontale Stärkegelelektrophorese (SGE)

In dieser Arbeit wird eine SGE (Abbildung 1) mit einem diskontinuierlichen System durchgeführt mit 0.03 M Histidin x HCl – NaOH pH 6.2 im Gel und 0.4 M Zitronensäure, 1.13 M NaOH pH 6.0 in der Brücke. Die Laufbedingungen sind: 7 V/cm, für 16 h bei 8°C. Die Proben (je 80 µl) werden in vorgefertigte Impfschlitze 10 cm von der Kathode entfernt einpipettiert.

2.3.3 Aufbereitung der Blutproben

Für die Stärkegelelektrophorese (SGE) werden von den Blutproben je 40 µl entnommen (evtl. störende Koagulate werden mit Ultraschall zerkleinert) und mit 10 µl DTT

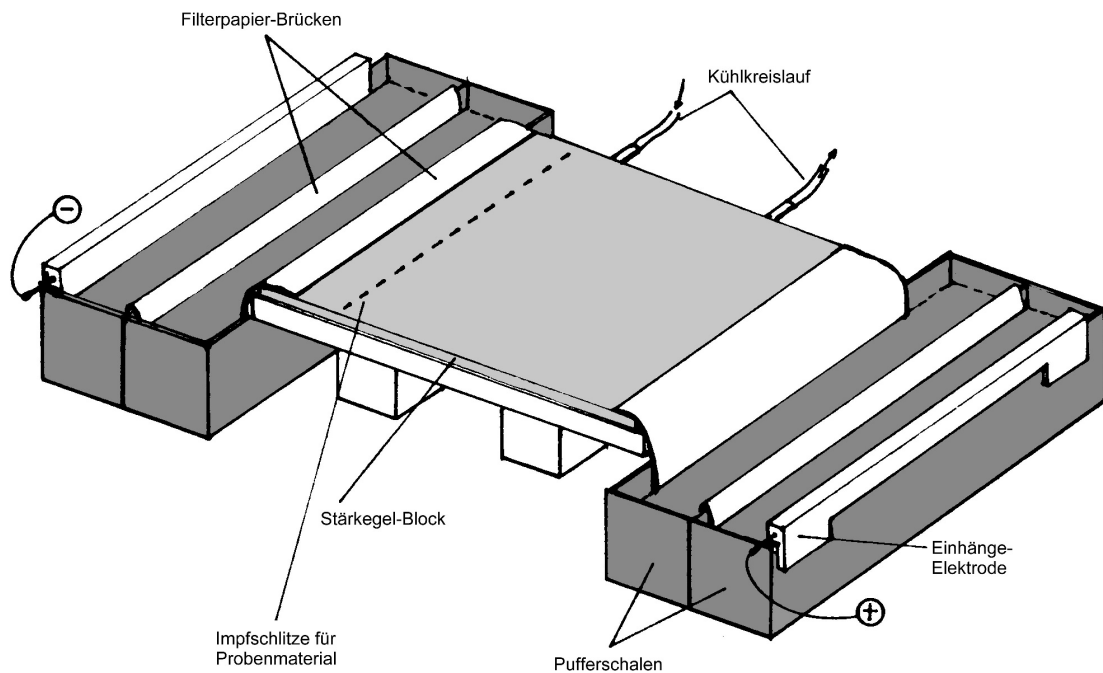


Abbildung 1: Aufbauskitze einer horizontalen Stärkegelelektrophorese (nach R. Kondler, 1984). Das Gel liegt auf einer mit Wasser gekühlten Platte und ist über mit Elektrodenpuffer getränkte Filterpapier-Brücken mit den Pufferkammern verbunden. Die Proteine werden in Impfschlitze einpipettiert, die mit einem Metallkamm in das Gel eingegossen werden.

(2 mg/ml H₂O) vermischt. Das Gemisch wird in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 50 µl Sephadex-Gel (10g Saccharose, 1,25 g Sephadex G 200, 25ml H₂O) gegeben, mit Ultraschall hämolysiert und danach 3 min in der Mikrozentrifuge bei 10000 rpm zentrifugiert.

2.3.4 Färbetechniken

Nach der Auftrennung können Proteine unspezifisch oder spezifisch nachgewiesen werden. Unspezifische Proteindarstellungen sind z.B. Färbungen mit Coomassie-Blue Farbstoff oder Silbernitrat. Mit immunologischen oder autoradiographischen Techniken können Proteine jedoch auch spezifisch nachgewiesen werden. Enzyme werden spezifisch mit einer Kombination aus biochemischen und histochemischen Verfahren visualisiert (Zymogramme). In dieser Arbeit werden Zymogramme für 12 Enzyme nach horizontaler SGE angefertigt, um genetisch determinierte Variabilitäten aufzudecken (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die mit SGE analysierten Enzyme:

	Untersuchte Enzyme	EC-Nr.:	Abkürzungen:
1.	Laktat-Dehydrogenase	1.1.1.27	LDH
2.	Malat-Dehydrogenasen	1.1.1.37	MDH1. MDH2
3.	Phospho-Gluconat-Dehydrogenase	1.1.1.44	PGD
4.	NADH-Diaphorase	1.6.2.2	DIA
5.	Glutamat-Oxalacetat-Transaminasen	2.6.1.1	GOT1. GOT2
6.	Adenylatkinase	2.7.4.3	AK
7.	Uridinmonophosphat-Kinase	2.7.4.49	UMPK
8.	Phospho-Gluco-Mutasen	2.7.5.1	PGM
9.	α -Naphthylacetat-Carboxylesterasen	3.1.1.1	EST2; EST3
10.	4-Methylumbelliferylacetat-Carboxylesterase	3.1.1.1	EST1
11.	Saure Phosphatase	3.1.3.2	ACP
12.	Phospho-Glucose-Isomerase	5.3.1.9	PGI

Von den in der Tabelle 2 genannten 12 Enzymsystemen werden die EST-1, EST-2 und EST-3, sowie die PGI bei den Individuen der Stichprobe untersucht. Im folgenden werden die Zymogrammtechniken dieser Enzyme genauer beschrieben. Für die anderen Enzymsysteme wurde nur eine Teilstichprobe analysiert.

2.3.5 Analytische isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten in Agarose-, bzw. Polyacrylamid-(PAA-)Gelen des Formats 250 mm x 120 mm x 0.5 mm, wird für die Analyse der im nachfolgenden Abschnitt beschriebenen Enzyme herangezogen.

2.3.5.1 Gelrezepturen IEF

Folgende Grundrezepturen werden verwendet:

a) Zusammensetzung der PAA-Gele:

9.2 ml	H ₂ O d.d.
2.0 g	Saccharose
2.5 ml	30% Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel A)
1.2 ml	2% Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel B)
0.9 ml	Trägerampholyte
1.0 ml	Ammoniumpersulfat (APS, 25 mg/4 ml H ₂ O d.d.)
0.1 ml	TEMED (30 μ l/1 ml H ₂ O d.d.)

Gelherstellung:

Die Saccharose wird in H_2O gelöst, und Acrylamid, Bisacrylamid und die Trägerampholyte als Lösungen zugegeben. Dieses Gemisch wird im Erlenmeyerkolben kurz geschwenkt und mit der Wasserstrahlpumpe entgast.

Als nächster Schritt werden APS und TEMED zugegeben und die fertige Gellösung wird nach erneutem Mischen in die Gelkassette gegossen. Anschliessend wird die Kassette mit Tesafilm abgedeckt und eine Stunde bei $60^{\circ}C$ inkubiert, damit das Gel polymerisiert. Das fertige Gel wird danach bis zur Verwendung bei $4 - 10^{\circ}C$ gelagert.

b) Zusammensetzung der Agarosegele:

15 ml	H_2O d.d.
2.0 g	Saccharose
170 mg	Agarose (IEF)
1.3 ml	Trägerampholyte

Gelherstellung:

Kassette und Gießtrichter werden auf $60^{\circ}C$ vorgewärmt. Die Saccharose wird in H_2O gelöst und danach unter Aufkochen die Agarose. Die Gellösung wird auf $60^{\circ}C$ abgekühlt, die Trägerampholyte dazugegeben und sofort in die Kassette gegossen. Nach 10 min bei Raumtemperatur wird die Gelkassette über Nacht in den Kühlschrank ($4^{\circ}C$) gestellt.

2.3.5.2 pH-Gradienten und Laufbedingungen:

Carboxylesterasen werden mit einem Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetrennt, das einen mobilen Gradienten pH 4 bis pH 8 besitzt. Die Zusammensetzung der einzelnen Trägerampholyte, sowie Elektrolyte und Laufbedingungen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die IEF mit mobilen pH-Gradienten pH 7 bis pH 9.5 wird im Agarosegel zur Darstellung der Phosphoglucoseisomerase verwendet (siehe Tabelle 4).

Table 3: Zusammensetzung und Laufbedingungen des PAA-Gels mit einem pH-Gradienten von pH 4 bis pH 8. Die Gele werden 30 min vor der Probenapplikation vorfokussiert und laufen bis konstante Spannungsverhältnisse erreicht sind.

PAA-Gel für Esterasen			
Trägerampholyte:		400 µl pH 4 – 6.5	(Pharmalyte)
		200 µl pH 4 – 6	(Fluka)
		200 µl pH 5 – 7	(Fluka)
		100 µl pH 6 – 8	(Pharmalyte)
Elektrolyte:	Anolyt:	0.1 M H ₃ PO ₄	
	Katholyt:	0.5 M NaOH	
Probenapplikation:		1.5 cm vor der Kathode	
Laufbedingungen:		max.: 1500 V, 10 mA, 5 W, 10°C	

Table 4: Zusammensetzung und Laufbedingungen des Agarose-Gels mit einem pH-Gradienten von pH 7 – 9.5. Das Gel wird nicht vorfokussiert. Die Fokussierung ist hier beendet, sobald die kathodische Hämoglobin-Fraktion fokussiert.

Agarose-Gel für Phosphoglucoseisomerase:			
Trägerampholyte:		650 µl pH 7 – 9	(Pharmalyte)
		650 µl pH 8 – 9.5	(Fluka)
Elektrolyte:	Anolyt:	40 mM Glutaminsäure	
	Katholyt:	0.5 M NaOH	
Probenapplikation:		2 cm vor der Anode	
Laufbedingungen:		max.: 1500 V, 25 mA, 5 W, 10° C	

Blutprobenaufbereitung für die IEF:

Für die Isoelektrische Fokussierung werden die Original-Hämolysate in Impfpapiere aufgenommen und auf die Geloberfläche aufgelegt.

2.3.5.3 Esterasen-Zymogramme

Carboxylesterasen katalysieren die Hydrolyse von Carboxylester zu Alkohol und Carboxylsäureanionen. Diese Eigenschaft wird genutzt, um diese Enzyme anzufärben. Mit 4-Methylumbelliferylacetat als Substrat entstehen als Produkte Acetat und 4-Methylumbelliferon. Letzteres fluoresziert unter UV-Licht und lokalisiert somit die Esterase im Gel. Mit α -Naphthylacetat als Substrat entstehen Acetat und Naphthol. Letzteres reagiert mit Fast-Blue-RR-Salz zu einem Farbstoff, der auf der Geloberfläche präzipitiert (Harris und Hopkinson, 1976).

Beide Färbungen werden nacheinander aus einem Lauf durchgeführt und ergeben zwei verschiedene Zymogramme. Mit 4-Methylumbelliferylacetat ergibt sich ein einfaches, mit α -Naphthylacetat ein komplexes Bandenmuster.

Die Färbesequenz ist also: Zymogramm 1 mit 4-Methylumbelliferylacetat als Substrat und Celluloseacetatfolien (CAF) – Overlay, Zymogramm 2 nach Abzug der CAF mit α -Naphthylacetat als Substrat durch Flüssigfärbung.

2.3.5.4 Färbelösungen und Methoden zur Darstellung der Carboxylesterasen

EST1:

5 mg 4-Methylumbelliferylacetat (Koch light) werden in 0.5 ml Aceton gelöst und mit 1.2 ml H₂O sowie 0.5 ml 1 M Na.Acetat pH 4.6 versetzt. Die Färbelösung wird in 50 x 260 mm CAF aufgenommen und blasenfrei auf das Gel aufgebracht. Der Färbeaufbau wird 10 bis 15 Minuten bei 30° C in der feuchten Kammer inkubiert und die Banden im UV-Durchlicht markiert.

EST2 und EST3:

30 mg α -Naphthylacetat werden in 1 ml Aceton gelöst und auf 4 ml mit H₂O aufgefüllt, und 70 mg Fast Blue RR Salz werden in 4 ml H₂O unter vortexen gelöst. Beide Lösungen werden zu 100 ml Tris x His-HCl-Puffer, pH 7.4 zugefügt.

Die Gele werden in der Färbelösung für ca. 20 min auf der Wippe bei Raumtemperatur inkubiert, mit H₂O gewaschen, mindestens 1 h in 5% Glycerinlösung auf der Wippe fixiert und im Anschluss über mindestens 24 h bei 30°C getrocknet.

2.3.5.5 PGI-Zymogramme

Die Phosphoglucoseisomerase katalysiert die Reaktion von Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat. Das entstehende Glucose-6-Phosphat wird mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, NAD, Meldolablauf und MTT nachgewiesen. Dabei entsteht ein blaues Präzipitat aus Formazan, welches spezifisch die Banden der PGI im Gel markiert (Harris und Hopkinson, 1976).

Zusammensetzung der Nachweislösung:

In 1 ml Färbepuffer (0.2 M Tris, 0.19 M Histidin x HCl, 0.023 M Imidazol und 0.005 M MgCl₂, pH 7.8) werden gelöst: 1 mg Fructose-6-Phosphat (F-6-P), 2 mg NAD, 1 mg MTT, 1.84 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*Leuconostoc mesenteroides*) und 4 µl Meldolablauf (2 mg/ml). Die Nachweislösung wird mittels Papier-Overlay blasenfrei auf die Geloberfläche aufgebracht. Das Gel wird bei 37°C inkubiert, bis die Banden deutlich sichtbar sind. Die Gele können sofort ausgewertet und nach Waschen in H₂O bei 30°C zur Dokumentation getrocknet werden.

2.3.5.6 Dokumentation der Zymogramme

Die Zymogramme werden mit einem Scanner digitalisiert und am PC weiterverarbeitet. (s.a. 2.6.2).

2.4 Präparation genomischer DNA aus Meisenblut

2.4.1 DNA-Extraktion mit dem Qiagen „Blood-Extraction-Kit“

Zur DNA-Extraktion aus den Blutproben wird ein Blut-Extraktions-Kit („Blood-Extraction-Kit“, Qiagen) verwendet. Die benötigten Puffer werden gemäss den Herstellerangaben fertiggestellt (siehe Anhang 1). Es werden jeweils 100 µl Blut zusammen mit etwas Koagulat in Eppendorf-Reaktionsgefässe überführt und mit 1 x PBS-Puffer auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dann wird 1 µl RNase (10 mg/ml), 25 µl Proteinase-Lösung und 200 µl Lysepuffer zugegeben und 15 s gevortext. Das Gemisch wird nun 60 min bei 70°C inkubiert und alle 10 min gevortext. Anschließend werden 210 µl Ethanol zugefügt und gevortext. Nach der Entfernung der koagulierten Bestandteile werden die Extraktionssäulen mit dem Blutgemisch beschichtet und dreimal abzentrifugiert (8000 rpm). Anschliessend wird das Säulchen mit 500 µl Waschpuffer 1 gefüllt, danach mit 500 µl Waschpuffer 2 beschichtet und der Durchfluß, der neben Proteinen auch RNA-Fragmente enthält, verworfen. Nach dem dritten Durchgang wird das auf 70°C vorgewärmte Röhrchen mit 200 µl Elutionspuffer beschichtet und 5 min inkubiert. Das Säulchen wird auf neue 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefässe gesetzt, wieder 1 min bei 8000/rpm zentrifugiert und die DNA im Eluat aufgefangen. Um sicherzustellen, dass die DNA vollständig aus der Säule eluiert wird, werden die Säulchen bis zum anschliessenden Test auf Reinheit und Menge aufbewahrt. Gegebenenfalls erfolgt erneut eine Elution.

2.4.1.1 Testgel zur DNA Extraktion

Rezeptur:

Zu 5 µl DNA-Eluat werden 3 µl „Gel-loading-buffer“ hinzugefügt. Dieses Gemisch wird auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen (600 mg auf 60 ml 1 x TBE-Puffer), eine Laufspur wird für einen DNA-Marker (5 µl = 500 ng Lambda DNA/ Hind III Marker, Promega) reserviert, um die DNA-Qualität und -Menge abschätzen zu können.

Da die DNA in diesem Puffer positiv geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld zur Kathode. Wenn die Farbfront des Stopp-Mixes das Gelende erreicht hat (je nach Prozent Agarosegehalt und angelegter Stromstärke nach ca. 30 – 45 min), wird das Gel mit Ethidiumbromid für 5 min gefärbt und danach 2 min lang in 1 x TBE-Puffer gewaschen, um bei der späteren UV-Licht Fotografie die Hintergrundfärbung zu verringern. Die Gele wurden zur Dokumentation fotografiert.

2.4.2 Mikrosatellitenvariation

2.4.2.1 PCR

Die PCR („polymerase-chain-reaction“) Amplifikation (Mullis und Faloona, 1987) benötigt zwei entgegengesetzt orientierte Oligonukleotide (antiparallele Primer) in vielfachem Überschuß, die an den jeweils komplementären DNA-Strang hybridisieren. Die von den Primern aus neusynthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus als Matritze. Die zyklische DNA-Denaturierung und die Hybridisierung („Annealing“) der Oligonukleotide mit DNA-Extension durch die DNA-Polymerase (Saiki et al., 1988) reichert die DNA-Kopien zwischen den Primern exponentiell an.

Ausserdem werden MgCl₂, dNTP, PCR-Puffer, H₂O d.d. und hitzestabile Taq-Polymerase (*Thermophilus aquaticus*) zu dem PCR-Ansatz hinzugefügt. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die im einzelnen verwendeten PCR-Ansätze mit Konzentrationen der einzelnen Inhaltsstoffe für die jeweiligen Mikrosatellitenloci.

Die DNA wird zu Beginn eines jeden Replikationszyklus auf 94°C erhitzt (denaturiert). Nach der Denaturierung wird der PCR-Ansatz auf die „Annealing“-Temperatur von 59°C abgekühlt. Es kommt zur Hybridisierung der beiden Oligonukleotide an die jeweils komplementären DNA-Stränge. Die Oligonukleotide umschliessen somit eine DNA-Region, d.h. sie stellen das 3`-Ende für die anschliessende DNA-Synthese bereit, die bei 72°C stattfindet. Nach erfolgter Synthese werden die entstandenen DNA Doppelstränge wieder durch Erhitzen getrennt, und der Vorgang wiederholt sich.

Die PCR-Ansätze der einzelnen Mikrosatelliten werden nach einer Reihe von Vorversuchen festgelegt. In Tabelle 5 sind die PCR-Ansätze der 4 untersuchten Mikrosatelliten aufgelistet. Es wurde ein PCR-Ansatz von 25 µl gewählt.

Zur Herkunft und Sequenz der Primer siehe Anhang 2 und Tabelle 26.

Tabelle 5: PCR-Ansätze für die verschiedenen STR-Loci:

	Konzentrationen	Pk 12 (μ l)	Pat 14 (μ l)	Pat 43 (μ l)	Pocc 8 (μ l)
H ₂ O d.d.		6.0	9.4	8.7	9.4
PCR-Puffer	10xEppendorf Taq-Buffer with 15 mM Mg ²⁺	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂	25mM	1.5	1.0	1.0	2.0
dNTP	2.0 mM	4.0	4.0	4.0	4.0
direkter Primer	10 pmol/ μ l	4.0	3.0	3.0	2.3
reverser Primer	10 pmol/ μ l	4.0	3.0	3.0	2.3
Taq-Polymerase	5u/ μ l	1.0	0.2	0.8	0.5
DNA	50-100ng/ μ l	2.0	2.0	2.0	2.0
Summe:		25.0	25.1	25.0	25.0

Die Polymerasekettenreaktion wird mit einem Thermocycler der Firma Biometra (Uno-Thermoblock) durchgeführt. Tabelle 6 gibt die optimalen PCR-Bedingungen für die „Annealing“-Temperaturen der einzelnen Loci wieder:

Tabelle 6: Übersicht über die PCR-Bedingungen der einzelnen Mikrosatelliten-Loci. Ein Zyklus besteht aus Denaturierungs-, Annealing- und Synthese-Phase. Touch-Down und Elongations-Phase werden einmalig vor, bzw. nach den regulären Zyklen durchlaufen.

	PK-12		PAT-14		PAT-43		POCC-8	
	Temp. (°C)	Zeit (s)	Temp. (°C)	Zeit (s)	Temp. (°C)	Zeit (s)	Temp. (°C)	Zeit (s)
Touch-Down-Phase:			94	180	94	180	94	180
					57	60	55	60
					72	60	72	60
Denaturierungs-Phase:	94	30	94	30	94	30	94	30
Annealing-Phase:	59	60	58	30	55	30	52	30
Synthese-Phase:	72	90	72	30	72	40	72	40
Elongations-Phase:			72	300				
Anzahl der Zyklen:	25 x		30 x		27 x		29 x	
Deckeltemperatur	105°C		105°C		105°C		105°C	

2.4.2.2 Denaturierende PAA-Gelelektrophorese

Vor dem Einbringen des Trägermaterials muss eine Gelkassette der Größe 250 mm x 120 mm x 0.5 mm vorbereitet werden. Glas- und Spacerplatte werden gründlich mit Wasser gereinigt, und die Spacerplatte mit AcryleaseTM (Stratagene) behandelt. Ein Gelbond-PAG-Film (FMC BioProducts) wird mit Wasser luftblasenfrei auf die unbehandelte Glasplatte aufgewalzt. Glas- und Spacerplatte werden zu einer Kassette mit Metallklammern so zusammengefügt, dass der Abstandsgummi der Spacerplatte bündig mit der Glasplatte abschliesst. In diese Kassette wird später die Gellösung luftblasenfrei gegossen. Die Gelrezeptur sowie die Elektrodenpuffer und die Laufbedingungen werden im Detail in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Rezeptur des PAA-Gels für die Mikrosatellitenauftrennung mit Elektrodenpuffer und Laufbedingungen. Der Lauf ist jeweils dann beendet, wenn die blaue Front der mitlaufenden Allelleiter ~ 1 cm von der Anode entfernt ist. Das Gel wird 1 cm vor der Kathode mit Impfplättchen (je ca. 7µl Probe/Plättchen) beimpft und läuft bei 10° C.

Rezeptur des 3.7 M Harnstoff-PAA-Gels für die Mikrosatellitenauftrennung:	
3.5 ml	Tris-Formiat-Puffer
13.667 ml	Harnstofflösung (11g Harnstoff ad 20.5 ml H ₂ O d.d., (unter Erwärmen lösen, unbedingt filtern)
11.733 ml	30% Acrylamid-Piperazin-Diacrylamid
3.2 ml	CHES (0.28 M)
12.2 µl	TEMED
240 µl	10% APS (w/v)
<u>Elektrodenpuffer:</u>	
Tris-Borat Puffer	
<u>Laufbedingungen:</u>	
½ Gel:	2 W, ~230 V, ~ 2 h
1 Gel:	4 W, 500 – 600 V, ~ 1.5 h

Die Polyacrylamid-Lösung wird gemischt, in die Gelkassette gefüllt, und über Nacht bei Raumtemperatur oder 1h bei 60°C zum Polymerisieren stehen gelassen. Auf Vorrat produzierte Gele werden bei 4 - 10°C gelagert.

2.4.2.3 Silberfärbung

Um die DNA-Fragment-Banden sichtbar zu machen, wird nach der gelelektrophoretischen Auftrennung eine Silbernitratfärbung durchgeführt: Zuerst wird das Gel in 1% Salpetersäure 10 min fixiert. Danach erfolgt die Färbung in einer Silbernitratlösung über 20 min. Daraufhin wird das Gel zweimal in H₂O d.d. gewaschen, wobei auch die Gelfolie selbst kurz abgespült wird. Anschliessend wird durch Zugabe der Entwicklerlösung das Gel entwickelt, bis die Banden gut sichtbar sind. Die Entwicklerlösung wird nach Trübung der Lösung mehrfach gewechselt. Abschliessend wird das so behandelte Gel 2 min in H₂O d.d. gespült. Ist das Gel ausreichend entwickelt, was sich durch eine scharfe Abgrenzung der Banden zum Gelhintergrund darstellt, wird die Entwicklung gestoppt. Dies geschieht durch 10 minütige Imprägnierung in 10%-iger Essigsäure. Um das entwickelte Gel für spätere Auswertungs- und Dokumentationszwecke haltbar zu machen, wird es über Nacht in 10%-iger Glycerinlösung inkubiert und anschliessend bei Raumtemperatur auf Fliesspapier getrocknet.

2. 5.Statistische Auswertungsmethoden

2.5.1 Formalgenetische Analysen

Überprüfung der Segregation in Familien:

Für die formale Prüfung der allelischen Segregation der Enzym- und Mikrosatellitenloci wird die Mutter-Kind-Statistik gewählt (Weir, 1996). Die Auswertung berücksichtigt das jeweils erste Kind pro Familie. Die Übereinstimmung zwischen den beobachteten und erwarteten Häufigkeiten wird mit Hilfe des χ^2 -Tests geprüft.

2.5.2 Populationsgenetische Analysen

Die populationsgenetische Auswertung der Daten (Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Allel- und Genotypfrequenzen, genotypisches Disequilibrium) wird mit den PC-Programmen *Genepop* (Raymond und Rousset, 1995), *Cervus* (Slate et al., 2000) und SAS (SAS Institute 1987) durchgeführt.

2.5.2 Kopplungsanalyse

Für statistische Kopplungsanalysen in den einzelnen Familien werden Voruntersuchungen auf populationsgenetischer Ebene durchgeführt. Mit den Programmen *Genepop* (Raymond und Rousset, 1995) und *Cervus* (Slate et al., 2000) werden die genotypischen Kopplungsungleichgewichte zwischen zwei Loci geprüft, um Kandidaten für die familienbezogene Kopplungsanalyse zu identifizieren.

Die klassische Kopplungsanalyse in Familien wird nach Ott (1988) durchgeführt.

2.6 Weitere Programme

2.6.1 Textverarbeitung

Der Text der vorliegenden Arbeit wird mit den Programmen Word 2000 (Microsoft Corporation) und Adobe InDesign 2.0 (Adobe Systems Inc.) geschrieben.

2.6.2 Bildverarbeitung

Zur Bildverarbeitung werden im wesentlichen die Programme Paint Shop Pro 4 bzw. 7 (Jasc Software) benutzt. Ferner wird auch das Programm Corel Draw 8 (Corel Corporation), sowie die Scanner-Software Fotolook 3.0 (Agfa) verwendet.

2.6.3 Tabellenkalkulation

Die Tabellen werden mit dem Programm Adobe InDesign 2.0 (Adobe Systems Inc.) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Genetische Variabilität von Enzymen

Orientierende Untersuchungen wurden an 16 Enzymsystemen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst. 7 von 16 untersuchten Loci sind polymorph mit Heterozygotiegraden grösser 3%. Ohne Berücksichtigung der Esterasen beträgt der mittlere beobachtete Heterozygotiegrad aller Loci 2.86%.

Unter Berücksichtigung der Esterasen steigt der mittlere Heterozygotiegrad aller Loci auf 13.32% an. Demzufolge besitzen die Esterasen eine hervorstechende Variabilität. Der mittlere Heterozygotiegrad aller polymorpher Loci ist < 10%, der der Esterasenloci dagegen > 50%.

Tabelle 8: Ergebnisse der Enzymuntersuchungen bei Kohlmeisen (*Parus maior*). Zusammengefasst sind die unterschiedlichen Enzymloci, die Stichprobengrößen, die jeweilige Anzahl an Allelen und die jeweils beobachteten und erwarteten Heterozygotiegrade pro Locus. 7 von 16 Loci sind polymorph (43.75%). Der mittlere beobachtete Heterozygotiegrad über alle Loci beträgt 13.32% ($H_{erw.} = 13.03\%$). Die Carboxylesterasen (EST) präsentieren sich mit 3 Loci, 6 Allelen pro Locus und einem durchschnittlichen $H_{beob.}$ von 58.63% ($H_{erw.} = 57.13\%$).

Enzymlocus	Stichprobenzahl	Anzahl Allele	Heterozygotiegrad	
			beobachtet	erwartet
EST-1	209	6	0.550	0.521
EST-2	204	6	0.633	0.620
EST-3	188	6	0.576	0.573
PGI	201	4	0.182	0.184
6-PGD	52	2	0.038	0.038
PGM-1	33	2	0.061	0.060
PGM-2	33	1	-	-
AK	22	2	0.091	0.089
GOT-1	36	1	-	-
GOT-2	36	1	-	-
LDH-1	26	1	-	-
LDH-2	26	1	-	-
MDH-1	14	1	-	-
MDH-2	14	1	-	-
NADH-DIA 1	10	1	-	-
UMPCK	10	1	-	-

3.2 Zymogramme

Von allen 16 untersuchten Enzymloci zeigen nur die Carboxylesterasen und die Phosphoglucoseisomerase grosse genetische Variabilität mit Heterozygotiegraden zwischen 20 und 60% und werden daher ausschliesslich im Folgenden untersucht.

3.2.1 Carboxylesterasen (EST)

Die Esterasen werden in einem Polyacrylamidgel im pH-Gradienten 4-8 aufgetrennt. Zunächst wird das Gel mit 4-Methylumbelliferylacetat als Substrat bei pH 4.5 in CAF inkubiert. Die Position der Esteraseaktivität wird unter UV-Licht sichtbar und die Banden können auf der Celluloseacetatfolie markiert werden. Danach wird das Gel mit α -Naphthylacetat und Fast Blue RR als Farbstoff bei pH 7.5 gefärbt. Das Zymogramm mit α -Naphthylacetat zeigt, wie in Abb. 2 dargestellt ist, ein komplexes Bandenmuster, welches pro Individuum aus drei bis sechs Banden besteht.

Im Gegensatz zu der Färbung mit α -Naphthylacetat ergibt sich im Zymogramm mit 4-Methylumbelliferylacetat als Substrat ein Muster aus jeweils ein oder zwei Banden, die mit einem Teil der Banden aus Abb. 2 zur Deckung gebracht werden können. In Abb. 3 wird dies durch Rotmarkierung der entsprechenden Banden veranschaulicht. Ein Satz von Genprodukten der Carboxylesterasen lassen sich also spezifisch mit 4-Methylumbelliferylacetat nachweisen. Sie werden im Folgenden mit EST-1 bezeichnet.

Da Carboxylesterasen als monomere Enzyme beschrieben sind, wird für die Interpretation der Zymogramme folgende Arbeitshypothese getroffen: Die Bandenmuster in Abb. 2 repräsentieren Genprodukte von drei separaten Loci (Isozyme). Diese Arbeitshypothese wird im weiteren durch die formale Analyse der Segregation innerhalb der Familien geprüft und gefestigt. In Abb. 4 ist die formale Interpretation der Carboxylesterasen EST-2 und EST-3 dargestellt. Die einzelnen, farbig hinterlegten Phänotypen weisen Muster aus einer oder zwei Banden pro Individuum auf. Die grün hinterlegten Banden entsprechen Genprodukten des als EST-2 bezeichneten Enzyms. Die blau hinterlegten Banden stellen diejenigen des als EST-3 bezeichneten Enzyms dar. In Diagramm 1 sind alle beobachteten Bandenpositionen der drei Isoenzyme, bezogen auf das jeweilige Genprodukt est*1, massstabsgetreu zusammengefasst. Für die EST-1 und EST-3 lassen sich sechs, für EST-2 fünf verschiedene, allelisch kontrollierte Genprodukte ableiten. Tabelle 8 enthält den Bestimmungsschlüssel für die Abbildungen 2-4 und die phänotypische Interpretation entsprechend der in Diagramm 1 angegebenen Nomenklatur.

Die vergleichende Darstellung in Abb. 5 der Carboxylesterase-Isoenzyme mit verschiedenen Substraten (α - und β -Naphthylacetat, Naphthylpropionat und Naphthylbutyrat) ergibt keine qualitativen Unterschiede zwischen den Bandenmustern

von fünf verschiedenen Proben. Somit werden die gleichen Genprodukte mit vier verschiedenen Substraten nachgewiesen. Die verschiedenen Isoenzyme besitzen also für die verschiedenen Naphthylester dieselbe Spezifität. Die geringen quantitativen Unterschiede sind für die genetische Interpretation der Muster ohne Bedeutung.

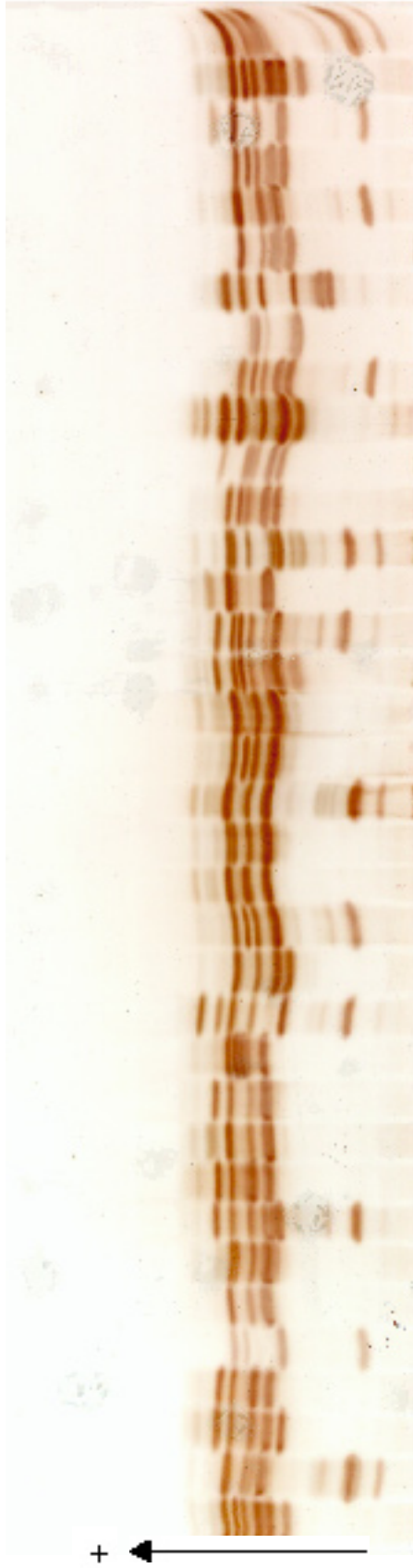


Abb. 2: Zymogramm der Carboxylesterasen von Kohlmeisen nach IEF im pH-Gradienten: Die Hämolyse von 36 adulten Tieren werden aufgetrennt. Es werden pro Position zwischen drei (Position 6) und sechs Banden (Position 13) bewertet. Der Nachweis erfolgt mit α -Naphthylacetat als Substrat und Fast Blue RR als Farbstoff. Die genetische Zuordnung der einzelnen Genprodukte geschieht durch den simultanen Zymogrammnachweis mit 4-Methylumbelliferylacetat (MUA) als Substrat (s. Abb. 3) und durch die Familienanalyse. Die Bandenmuster in Abb. 2 repräsentieren die Genprodukte von 3 separaten Loci. Eine Übersicht über die einzelnen Phänotypen gibt Tabelle 9.

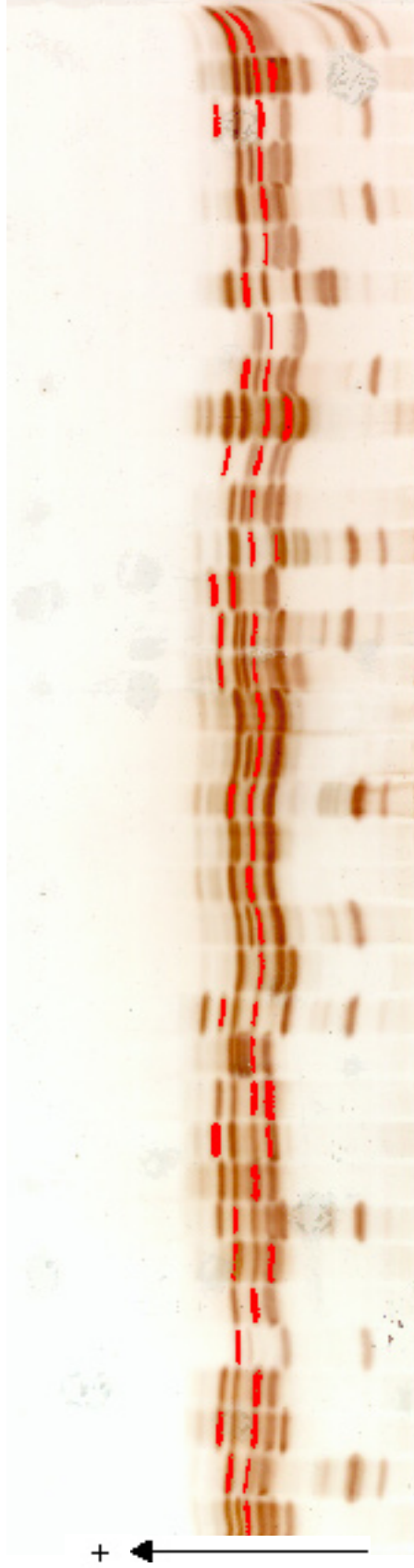


Abb. 3: Zymogramm der Carboxylesterasen von Kohlrabi nach IEF im pH-Gradienten. Rot markierte Banden stellen die Positionen der 4-Methylumbelliferylacetat verstoffwechselnden Esterasen im Gel dar. Es zeigen sich acht Bandenmuster mit ein bzw. zwei Banden. Dementsprechend deuten zwei Banden auf Heterozygotie und eine Bande auf Homozygotie hin. Der Nachweis erfolgte mit 4-Methylumbelliferylacetat als Substrat an CAF. Die unter UV-Licht fluoreszierenden Banden sind in der Abbildung rot markiert. Verschiedene homozygote und heterozygote Phänotypen stellen sich dar. Die Genprodukte eines der drei Loci lassen sich also spezifisch mit dem Substrat nachweisen. Dieser Methylumbelliferylacetat verarbeitende Esterasentyp wird in der Folge mit EST-1 bezeichnet.

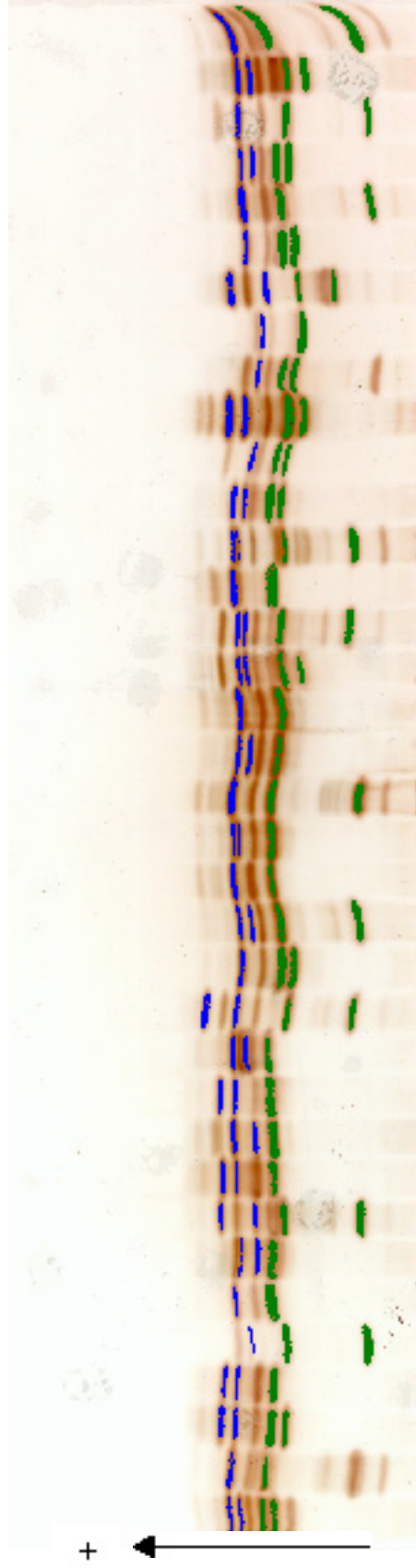


Abb. 4: Interpretation der Bandenmuster in Abb. 2 nach Abzug der markierten Genprodukte aus Abb. 3. Aufgrund der Segregation in Familien ergeben sich zwei weitere Sätze von α -Naphthylacetat-Esterasen mit jeweils ein bzw. zwei Banden. Auch diese zwei Enzyme sind monomere Proteine. Analog zu EST-1 werden diese Esterasen-Isozyme mit EST-2 (grün) und EST-3 (blau) benannt. Die nicht markierten, kathodisch gelegenen Banden stellen möglicherweise Genprodukte eines weiteren Esterase Locus dar.

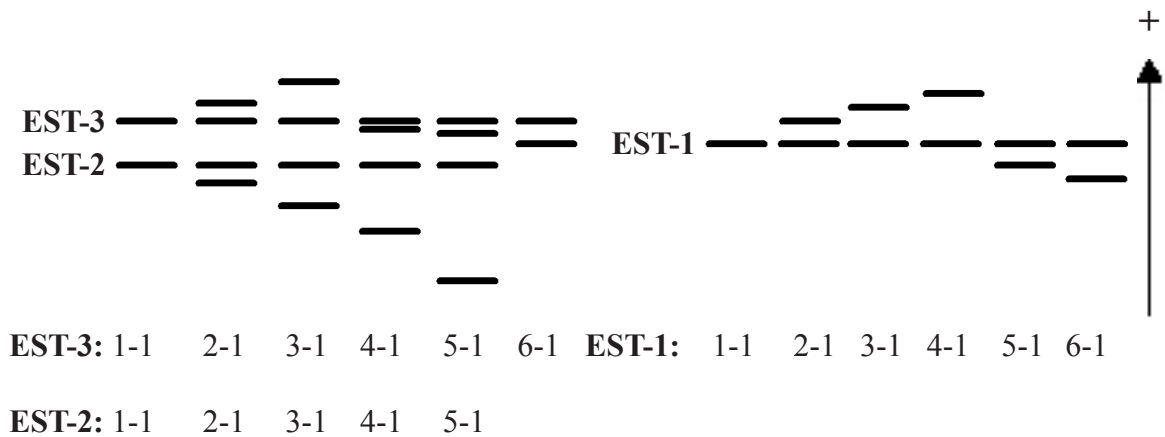


Diagramm 1: Nomenklatur der Carboxylesterasen-Phänotypen.
 Beobachtete Positionen der verschiedenen Genprodukte der EST 1-3, bezogen auf das jeweilige Genprodukt est *1.

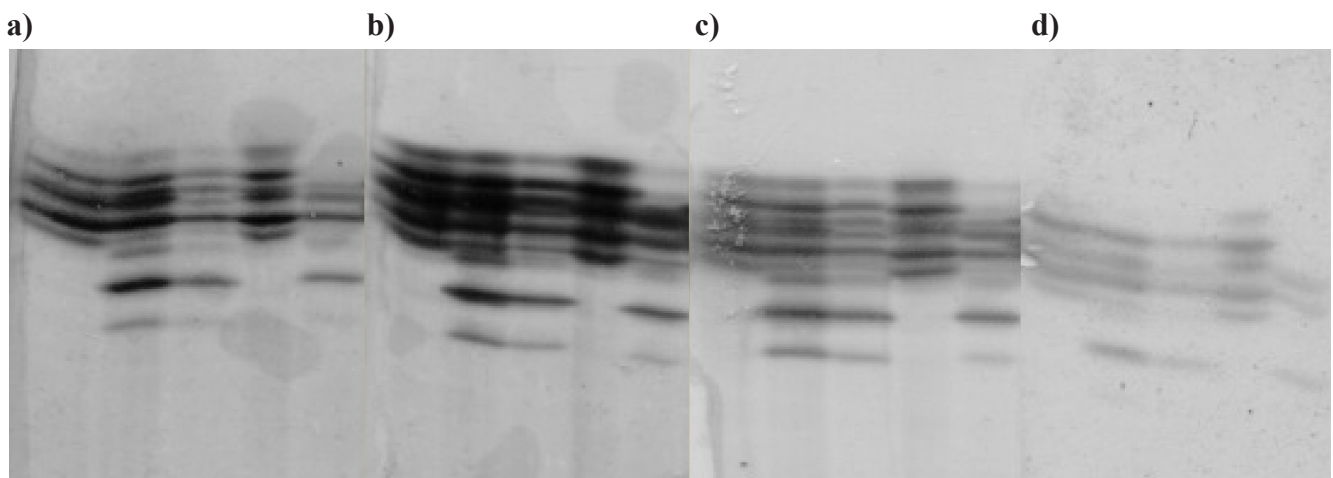


Abb. 5: Zymogramme der Carboxylesterasen. Färbung mit α -Naphthylacetat (a), α -Naphthylpropionat (b), α -Naphthylbutyrat (c) und β -Naphthylacetat (d). Vergleichende Darstellung der Carboxylesterasen mit verschiedenen Substraten unter gleichen Lauf- und Färbebedingungen mit identischen Proben. α -Naphthylester färbt sich braun, β -Naphthylester rot. Die vier verschiedenen Zymogramme weisen keine qualitativen Unterschiede auf, lediglich die Intensität anodischer und kathodischer Zusatzbanden ist verschieden.

Tabelle 9 : Phänotypen der Esterasen 1, 2 und 3 aus Abb. 2 – 4.

Laufende Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Familie	901	901	876	876	861	861	874	874	896	896	892	811	811	840	840	890	890	888
Geschlecht	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	m	f	m	f	m	f	m
EST1	1	21	31	1	2	1	52	2	1	53	51	1	31	1	1	1	1	21
EST2	21	1	21	1	52	1	1	52	1	1	1	1	52	21	51	1	1	51
EST3	51	1	21	21	5	1	61	62	21	61	21	51	31	1	51	1	41	1

Laufende Nr.	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Familie	888	891	894	894	889	872	714	HK90	214	79	79	337	337	13	FA164	FA164	901	901
Geschlecht	f	m	m	f	f	f	f	f	f	m	f	m	f	m	m	f	m	f
EST1	1	1	31	31	32	51	1	31	51	21	1	2	1	1	1	1	51	21
EST2	1	1	32	52	1	52	21	21	21	21	2	42	21	51	21	21	32	51
EST3	51	1	54	54	1	41	51	5	21	5	1	62	1	1	51	51	51	1

3.2.2 PGI

Die Phänotypen der Phosphoglucoisomerase werden nach IEF in einem Agarosegel mit einem pH-Gradienten 7-10 durch eine Formazanfärbung nachgewiesen (Abbildung 6). Die Zymogramme zeigen Einzelbanden und Triplets in verschiedenen Positionen. Dies ist mit der Dimerstruktur der PGI vereinbar, d.h. jedes PGI-Molekül besteht aus 2 Untereinheiten. Homozygote zeigen eine Bande aus Homodimeren, Heterozygote dagegen drei Banden aus Homo- und Heterodimeren. Die Bandenmuster lassen sich durch vier verschiedene allelische Genprodukte pgi 1, pgi 2, pgi 3 und pgi 4 erklären, die insgesamt 10 mögliche Genotypen bilden können. In Abb. 6 sind fünf dieser Phänotypen und ihre genotypische Interpretation dargestellt.

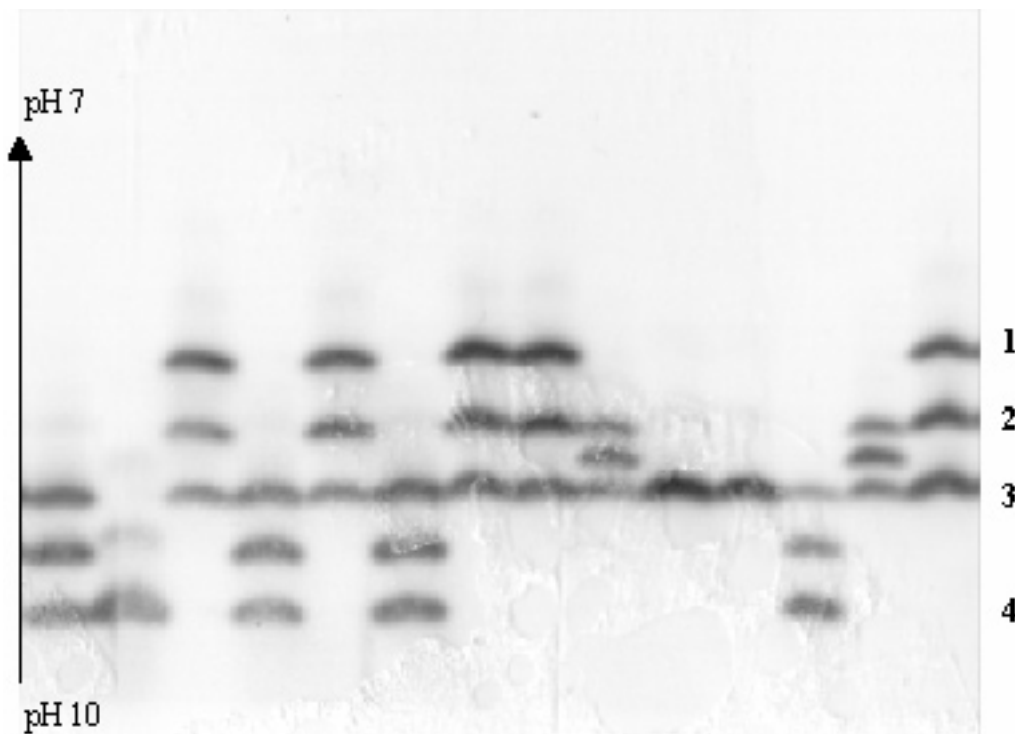


Abb. 6: Zymogramm der Phosphoglucoisomerase von *Parus major*. Nach IEF im Agarosegel mit einem pH-Gradienten 7 –10 wird die PGI mittels Formazan-Nachweis dargestellt. Homozygote weisen eine Bande auf, Heterozygote besitzen ein Dreibandemuster. Insgesamt lassen sich 4 verschiedene, allelisch kontrollierte PGI-Genprodukte nachweisen (Positionen am rechten Bildrand).

3.2.3 Mikrosatelliten

Die PCR-Produkte von Mikrosatelliten stellen sich nach der Elektrophorese stets mit nur einer oder zwei Banden dar: Homozygote Individuen zeigen eine Bande, heterozygote Individuen zwei Banden. Kleine Fragmente wandern weiter zur Anode als grosse. Um die ungefähre Grösse der Mikrosatelliten abschätzen zu können und um sicher zu sein, dass das richtige DNA-Fragment bewertet wird, werden zur Kontrolle sogenannte Alleleitern auf das Gel mit aufgetragen. Diese bestehen aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten definierter Länge, die sich wie eine Leiter auf dem gefärbten Gel abbilden (s. Abb. 7 - 9). Es wird ausschliesslich mit dem 100 bp Marker von MBI (GeneRuler, MBI Fermentas, # SM0243) gearbeitet. Die genetische Variabilität von vier Mikrosatellitenloci wird nachgewiesen.

3.2.3.1 Locus PK-12 (Abb. 7)

Dieser Mikrosatellit besitzt eine Grösse von etwa 200 bp. Die allelischen Produkte der Mikrosatelliten wurden ihrer Fragmentlänge entsprechend mit 1 bis 8 durchnummeriert. Der grössten Fragmentlänge wird die Nummer 1 zugeordnet. Die seltenen Varianten 1, 6 und 8 sind auf diesem Gel nicht dargestellt.

3.2.3.2 Locus PAT-14 (Abb. 8a)

Es können fünf verschiedene, allelische Fragmente nachgewiesen werden. Die Allele werden entsprechend ihrer aufsteigenden „Repeatzahl“ nummeriert. Die seltene Variante 1 ist nicht abgebildet.

3.2.3.3 Locus PAT-43 (Abb. 8b)

Die Länge der Mikrosatelliten-DNA dieses Locus liegt etwas unter 200 bp. Es werden hier ebenfalls fünf Allele nachgewiesen. Die Benennung der verschiedenen Banden erfolgt nach aufsteigender Fragmentlänge. Die Position 2 ist auf diesem Gel nicht dargestellt.

3.2.3.4 Locus POCC-8 (Abb. 9)

Es zeigen sich Banden mit Fragmentlängen zwischen 200 und 300 bp. Es sind hier drei allelische Fragmente nachweisbar. Die Bande des kleinsten Fragments wurde dabei mit 1, die des grössten mit 2 bezeichnet. Die seltene Position 3 liegt zwischen den Banden 1 und 2 und ist auf diesem Gel nicht abgebildet. Ausserdem sind im Bereich zwischen 300 und 400 bp zusätzliche Banden zu sehen. Diese „Spiegelbanden“ haben keine Bedeutung für die Auswertung.

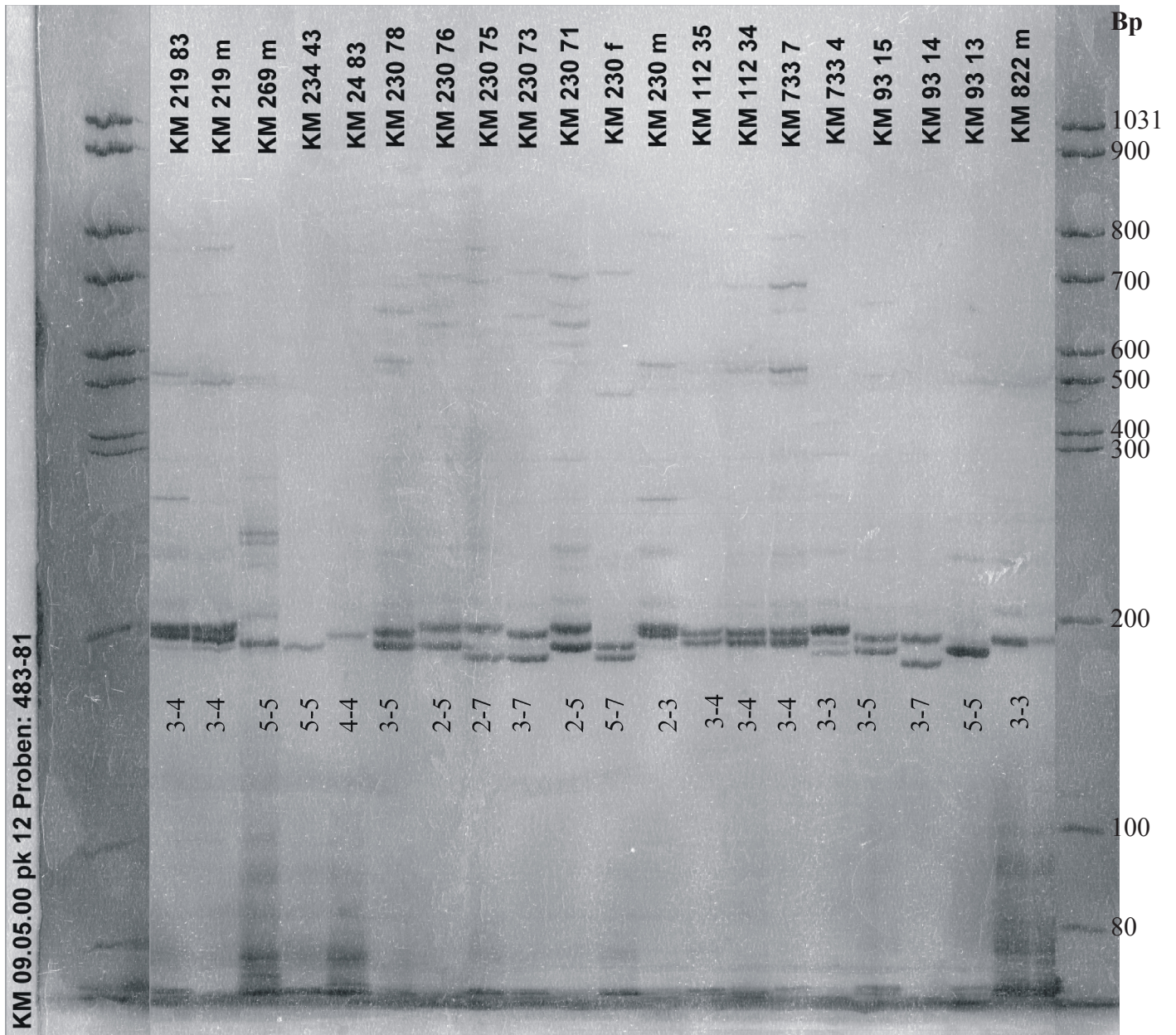


Abb. 7: Homo- und heterozygote Genotypen des Mikrosatelliten PK-12 nach Elektrophorese in einem PAA- Harnstoffgel und Silberfärbung:
 Die Allelleiter am Rande dient der Abschätzung der Grösse der Mikrosatellitenfragmente (MBI GeneRuler, MBI Fermentas # SM0241). Die Mikrosatelliten besitzen eine Grösse von etwa 200 bp. Die allelischen Produkte der Mikrosatelliten sind ihrer „Repeatzahl“ entsprechend von 1-8 durchnummeriert; dabei wurde der größten „Repeatzahl“ die kleinste Nummer zugeordnet.

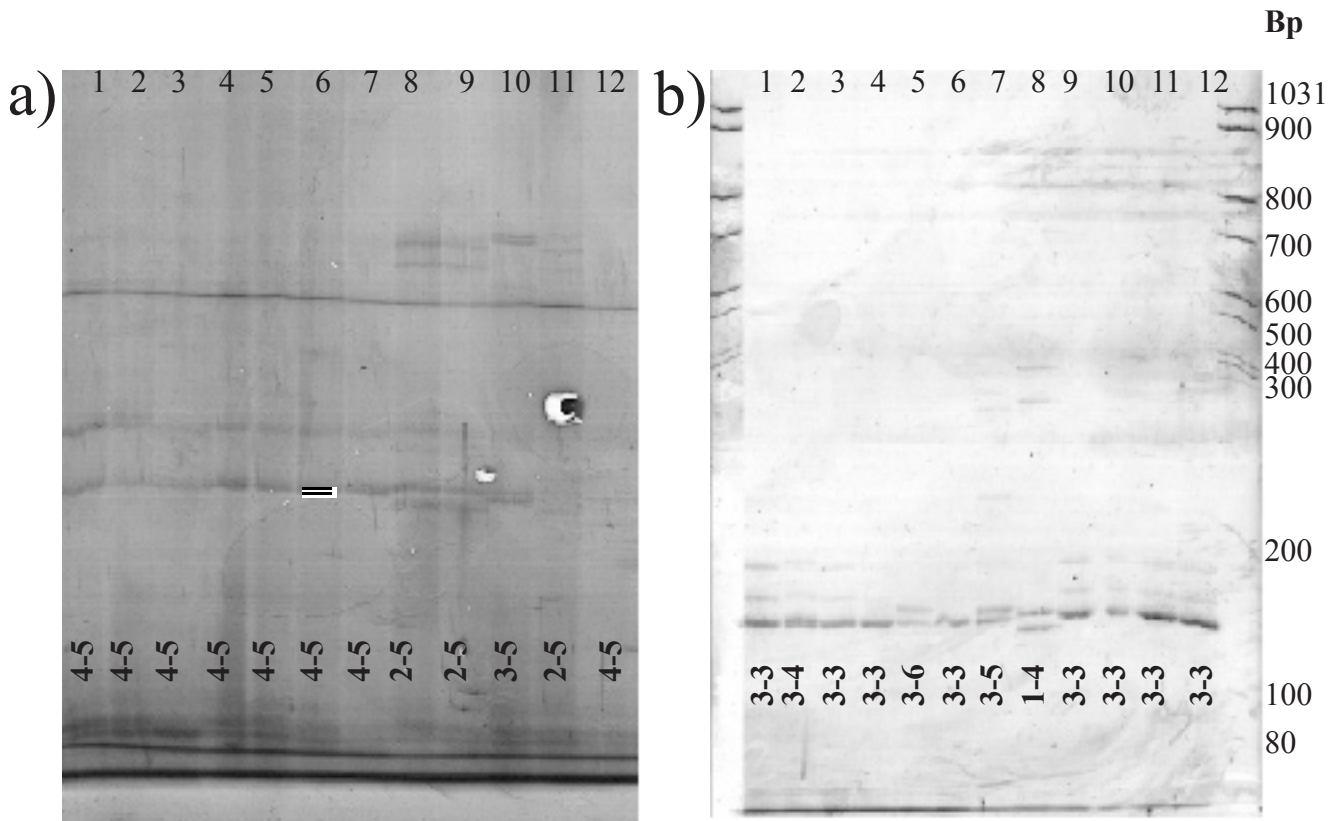


Abb. 8: Mikrosatellitenvariation der Loci PAT-14 und PAT-43. Die allelischen Produkte werden nach aufsteigender Fragmentlänge durchnummeriert, der entsprechende Genotyp ist unter dem zugehörigen Bandenmuster angegeben.

a) Genotypen des Mikrosatellitenlocus PAT-14. Die Banden 4 und 5 lassen sich auf dieser Abbildung nur schwer auseinanderhalten, sie wurden daher exemplarisch in Position 6 markiert.

b) Genotypen des Mikrosatellitenlocus PAT-43. Mit dem hier gewählten Nachweisverfahren können 5 Allele beschrieben werden.

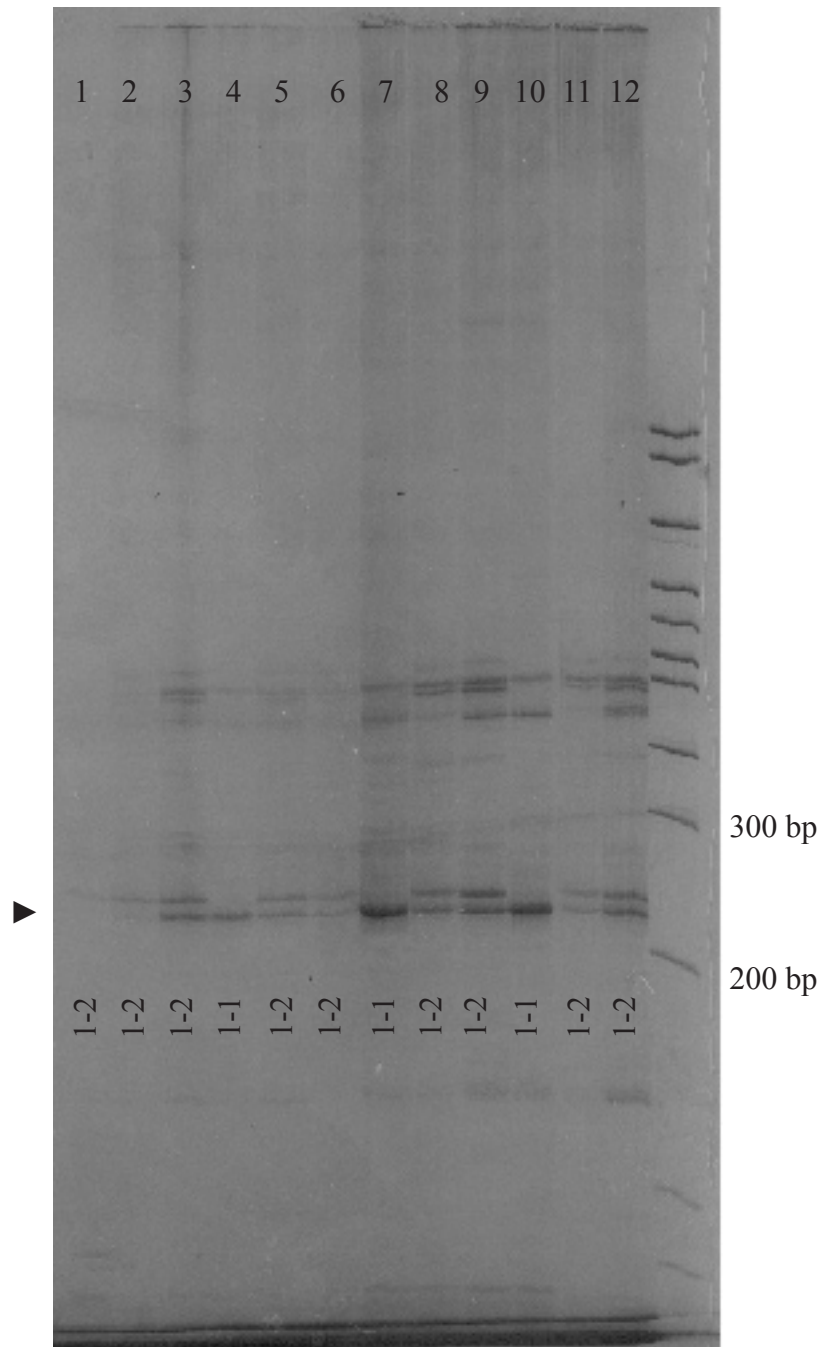


Abb. 9: Mikrosatellitenvariation am Locus POCC-8. Es zeigen sich Banden im Bereich zwischen 200 und 300 bp. Die Bande des kleineren Fragments wurde mit 1 die des grösseren mit 2 bezeichnet. Die Banden im Bereich zwischen 400 und 500 bp werden als „Spiegelbanden“ (vgl. Banden 1 - 3) betrachtet; sie beeinträchtigen die Auswertung nicht.

3.3 Formale Genetik

3.3.1 Aufspaltungsanalyse

Für die formale Prüfung der allelischen Segregation der Enzym- und Mikrosatellitenloci wird die Mutter-Kind-Statistik gewählt (Weir, 1996). Bei dieser Methode der formalen Analyse sind die Häufigkeiten sich entsprechender Mutter-Kind-Kombinationen ausschlaggebend. Bei korrekter Aufspaltung sind die Kombinationen aa x ab und ab x aa in gleichen Häufigkeiten zu erwarten. Die Erwartungswerte z.B. p^2q für die Kombination aa x ab und ab x aa werden aus den Allelhäufigkeiten von Müttern und Kindern unter der Annahme eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts berechnet (s. Tabelle 10). Die Auswertung berücksichtigt dabei das jeweils erste Kind pro Familie. Die Übereinstimmung zwischen den beobachteten und erwarteten Häufigkeiten wird mit Hilfe des χ^2 - Tests geprüft. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11 - 14 für die Enzymloci und in den Tabellen 15 - 18 für die Mikrosatellitenloci dargestellt. Genotypklassen werden für die Berechnung zusammengefasst, wenn eine Auswertung mittels χ^2 -Tests durch zu kleine Erwartungswerte nicht mehr möglich war. Klassenweise zusammengefasste Werte sind mit einem oder zwei Sternen markiert. Dabei wird in allen Systemen eine zufällige Abweichung der Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen von ihren korrespondierenden Erwartungswerten unter Hardy-Weinberg-Bedingungen ermittelt (Tabellen 11 - 18).

Tabelle 10: Theoretisch erwartete Häufigkeiten für Mutter-Kind Kombinationen in einem System mit sechs Allelen

	11	12	13	14	15	16	22	23	24	25	26	33	34	35	36	44	45	46	55	56	66
KM/Kd	p ²	2pq	2pr	2ps	2pt	2pu	q ²	2qr	2qs	2qt	2qu	r ²	2rs	2rt	2ru	s ²	2st	2su	t ²	2tu	u ²
11	p ³	p ² q	p ² r	p ² s	p ² t	p ² u															
12	p ² q	pq(p+q)	pqr	pqs	pqt	pqu	pq ²	pqr	pqs	pqt	pqu	pr ²	prs	prr	pru	ps ²	pst	psu	pt ²	ptu	
13	p ² r	pqr	pr(p+r)	prs	prr	pru							prs								
14	p ² s	pqs	prs	ps(p+s)	pst	psu							prs								
15	p ² t	pqt	prr	pst	pt(p+t)	ptu							prt						pt ²	ptu	
16	p ² u	pqu	pru	psu	ptu	pu(p+u)							prt					psu		ptu	pu ²
22	q ²	qq ²					q ³	q ² r	q ² s	q ² t	q ² u										
23	2qr	pqr	pqr				q ² r	qr(q+r)	qrs	qrr	qru	qr ²	qrs	qrr	qru	qs ²	qst	qsu			
24	2qs	pqs		pqs			q ² s	qrs	qs(q+s)	qst	qsu	qrs	qrs	qrr	qru	qs ²	qst	qsu			
25	2qt	pqt			pqt		q ² t	qrr	qst	qt(q+t)	qtu			qrr	qru		qst	qtu	qt ²	qtu	
26	2qu	pqu				pqu	q ² u	qru	qsu	qtu	qu(q+u)			qrr	qru		qst	qtu		qtu	qu ²
33	r ²		pr ²					qr ²	qrs	qrr		r ³	r ² s	r ² t	r ² u						
34	2rs		prs	prs				qrs	qrs			r ² s	rs(r+s)	rst	rsu	rs ²	rst	rsu			
35	2rt		prr		prr			qrr	qst	qrr		r ² t	rst	rt(r+t)	rtu		rst		rt ²	rtu	
36	2ru		pru			pru		qru	qsu	qru		r ² u	rsu	ru(r+u)	ru ²		rsu	rsu		rtu	ru ²
44	s ²			ps ²					qs ²				rs ²			s ³	s ² t	s ² u			
45	2st			pst	pst				qst	qst			rst			s ² t	st(s+t)	stu	st ²	stu	
46	2su			psu		psu			qsu				rsu			s ² u	su(s+u)	su(s+u)		stu	su ²
55	t ²				pt ²				qst	qt ²				rt ²			st ²		t ³	t ² u	
56	2tu				ptu	ptu			qru	qtu	qtu			rtu	ru ²		stu	stu	t ² u	tu(t+u)	tu ²
66	u ²					pu ²			2qs		qu ²							su ²		tu ²	u ³
Summe	p ²	2pq	2pr	2ps	2pt	2pu	q ²	2qr	2qs	2qt	2qu	r ²	2rs	2rt	2ru	s ²	2st	2su	t ²	2tu	u ²

3.3.1.1 Carboxylesterasen

Table 11: Formale Genetik der Esterasen (Locus EST-1). Beobachtungs- und Erwartungswerte für 97 Mutter-Kind Kombinationen. Das Modell „Ein Locus EST-1 mit sechs Allelen“ wird zu einem Modell „Ein Locus EST-1 mit drei Allelen a, b und c“ vereinheitlicht: a = Allel 1, b = Allel 3, c = Allele 2+4+5+6. Kombinationen mit * werden für die Berechnung klassenweise zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.675, b = 0.160, c = 0.165. Die Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung der Genotypen weichen zufällig voneinander ab: $\sum \chi^2_b = 4.874 < \chi^2_e$ ($P_{0.05} = 15.05$; $df = 8$). Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus EST-1 mit drei häufigen Allelen kontrolliert die Expression von sechs Phänotypen.

EST 1	aa	ab	ac	bb	bc	cc	n Kf	n Klassen
aa	29	7	7				43	3
	29.83	7.30	7.07				44.20	
ab	5	11	1*	0*	3*		20	3
	7.30	9.07	1.73	1.78	1.73		21.61	
ac	10	2*	7		2*	4*	25	3
	7.07	1.73	8.75		1.73	1.67	20.95	
bb		2*		0*	0*		2	1
		1.78		0.43	0.42		2.63	
bc		3**	2**	1**	0**	0**	6	1
		1.73	1.73	0.42	0.83	0.41	5.13	
cc			1**		0**	0**	1	0
			1.67		0.41	0.40	2.48	
n F1	44	25	18	1	5	4	97	Σ : 11
	44.20	21.61	20.95	2.63	5.13	2.48	97.00	

Tabelle 12: Formale Genetik der Esterasen (Locus EST-2). Beobachtungs- und Erwartungswerte für 99 Mutter-Kind Kombinationen. Das Modell „Ein Locus EST-2 mit fünf Allelen“ wird zu einem Modell „1 Locus EST-2 mit drei Allelen a, b und c“ vereinheitlicht: a = Allel 1, b = Allel 2, c = Allele 3+4+5. Kombinationen mit * werden für die Berechnung klassenweise zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.520, b = 0.306, c = 0.174. Die Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung der Genotypen weichen zufällig voneinander ab: $\Sigma \chi^2_b = 12.77 < \chi^2_e (P_{0.05} = 18.3; df = 10)$. Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus EST 2 mit drei häufigen Allelen kontrolliert die Expression von 6 Phänotypen.

EST 2	aa	ab	ac	bb	bc	cc	n Kf	n Klassen
aa	14	7	2				23	3
	13.92	8.19	4.66				26.77	
ab	10	13	5*	9*	1*		38	3
	8.19	13.01	2.74	4.82	2.74		31.50	
ac	4	5*	6		0*	0*	15	3
	4.66	2.74	6.22		2.74	1.56	17.92	
bb		0*		1*	2*		3	1
		4.82		2.84	1.61		9.27	
bc		6*	2*	4**	1**	1**	14	2
		2.74	2.74	1.61	2.53	0.92	10.54	
cc			5*		0*	1*	6	1
			1.56		0.92	0.52	3.00	
n F1	28	31	20	14	4	2	99	$\Sigma: 13$
	26.77	31.50	17.92	9.27	10.54	3.00	99.00	

Table 13: Formale Genetik der Esterasen (Locus EST-3). Beobachtungs- und Erwartungswerte für 97 Mutter-Kind Kombinationen. Das Modell „Ein Locus EST-3 mit sechs Allelen“ wird zu einem Modell „Ein Locus EST-3 mit drei Allelen a, b und c“ vereinheitlicht: a = Allel 1, b = Allel 5, c = Allele 2+3+4+6. Kombinationen mit * werden für die Berechnung klassenweise zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.611, b = 0.229, c = 0.160. Die Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung der Genotypen weichen zufällig voneinander ab: $\Sigma \chi^2_b = 10.76 < \chi^2_e (P_{0.05} = 16.9; df = 9)$. Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus EST 3 mit drei häufigen Allelen kontrolliert die Expression von sechs Phänotypen.

EST 3	aa	ab	ac	bb	bc	cc	n Kf	n Klassen
aa	28 22.13	5 8.29	3 5.79				36 36.22	3
ab	7 8.29	9 11.40	4* 2.17	5* 3.11	3* 2.17		28 27.14	3
ac	6 5.79	2* 2.17	6 7.31		2* 2.17	4* 1.52	20 18.97	3
bb		3* 3.11		2* 1.16	0* 0.81		5 5.08	1
bc		2* 2.17	0* 2.17	2* 0.81	0* 1.38	2* 0.57	6 7.10	1
cc			1* 1.52		1* 0.57	0* 0.40	2 2.49	1
n F1	41 36.22	21 27.14	14 18.97	9 5.08	6 7.10	6 2.49	97 97.00	$\Sigma: 12$

3.3.1.2: PGI

Table 14: Formale Genetik der Phosphoglucoseisomerase. Beobachtungs- und Erwartungswerte für 75 Mutter-Kind Kombinationen. Das Modell „Ein Locus PGI mit 4 Allelen“ wird zu einem Modell „Ein Locus PGI mit 3 Allelen a, b und c“ vereinheitlicht: a = Allel 4, b = Allel 3, c = Allele 1+2. Kombinationen mit * werden für die Berechnung klassenweise zusammengefasst. Alle Kombinationen mit ** werden zu einer Klasse zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.880, b = 0.080, c = 0.040. Die Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung der Genotypen weichen zufällig voneinander ab: $\Sigma \chi^2_b = 1.57 < \chi^2_e$ ($P_{0.05} = 5.99$; $df = 2$). Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus PGI mit drei häufigen Allelen kontrolliert die Expression von sechs Phänotypen.

PGI	aa	ab	ac	bb	bc	cc	n Kf.	n Klassen
aa	51	5*	1*				57	2
	51.11	4.65	2.32				58.08	
ab	6*	5	1*	0*	1*		13	2
	4.65	5.07	0.21	0.42	0.21		10.56	
ac	1**	0**	1**		0**	0**	2	1
	2.32	0.21	2.43		0.21	0.11	5.28	
bb		0**		0**	0**		0	
		0.42		0.04	0.02		0.48	
bc		1**	2**	0**	0**	0**	3	
		0.21	0.21	0.02	0.03	0.01	0.48	
cc			0**		0**	0**	0	
			0.11		0.01	0.00	0.12	
n F1:	58	11	5	0	1	0	75	Σ: 5
	58.08	10.56	5.28	0.48	0.48	0.12	75.00	

3.3.1.3: Mikrosatelliten

Tabelle 15: Formale Genetik des Locus PK-12. Beobachtungs- und Erwartungswerte für 88 Mutter-Kind-Kombinationen. Das Modell „Ein Locus PK-12 mit acht Allelen“ wird zu einem Modell „Ein Locus PK-12 mit drei Allelen a, b und c“ vereinheitlicht: a = Allel 7, b = Allel 5, c = Allele 1+2+3+4+6+8. Kombinationen mit * bzw. ** werden für die Berechnung klassenweise zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.310, b = 0.327, c = 0.363. Die Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg Verteilung der Genotypen weichen zufällig voneinander ab: $\sum \chi^2_b = 7.956 < \chi^2_e$ ($P_{0.05} = 16.9$; $df = 9$). Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus PK-12 mit drei häufigen Allelen kontrolliert die Expression von sechs Phänotypen.

PK12	aa	ab	ac	bb	bc	cc	n Kf	n Klassen
aa	6 2.62	2 2.76	3 3.07				11 8.45	1
ab	2* 2.76	6 5.68	3* 3.24	4** 2.92	4** 3.24		19 17.84	3
ac	3* 3.07	1* 3.24	4 6.66		2** 3.24	4** 3.59	14 19.80	3
bb		5* 2.92		5* 3.08	2* 3.42		12 9.42	1
bc		3* 3.24	2* 3.24	2** 3.42	7 7.21	2** 3.79	16 20.90	3
cc			3* 3.59		2* 3.79	11* 4.21	16 11.59	1
n F1	11 8.45	17 17.84	15 19.80	11 9.42	17 20.90	17 11.59	88 88.00	Σ : 12

Table 16: Formale Genetik des Locus PAT-14. Beobachtungs- und Erwartungswerte für 100 Mutter-Kind Kombinationen. Das Modell „Ein Locus PAT-14 mit fünf Allelen“ wird zu einem Modell „Ein Locus PAT-14 mit zwei Allelen a und b“ vereinheitlicht: a = Allel 4, b = Allele 1+2+3+5. Kombinationen mit * werden für die Berechnung zu einer Klasse zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.950, b = 0.050. Die Häufigkeiten der erwarteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg Verteilung weichen zufällig voneinander ab: $\sum \chi^2_b = 0.249 < \chi^2_e$ ($P_{0.05} = 3.84$; $df = 1$). Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus PAT-14 mit zwei häufigen Allelen kontrolliert die Expression von drei Phänotypen.

pat 14	aa	ab	bb	n Kf	n Klassen
aa	84	5		89	2
	85.74	4.51		90.25	
ab	8*	3*	0*	11	1
	4.51	4.75	0.24	9.50	
bb		0*	0*	0	
		0.24	0.01	0.25	
n F1	92	8	0	100	$\Sigma: 3$
	90.25	9.50	0.25	100.00	

Table 17: *Formale Genetik des Locus PAT-43. Beobachtungs- und Erwartungswerte für 99 Mutter-Kind Kombinationen. Das Modell „Ein Locus PAT-43 mit fünf Allelen“ wird zu einem Modell „Ein Locus PAT-43 mit drei Allelen a, b und c“ vereinheitlicht: a = Allel 3, b = Allel 4, c = Allele 1+2+5. Kombinationen mit * bzw. ** werden für die Berechnung klassenweise zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.937, b = 0.023, c = 0.040. Die Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung der Genotypen weichen zufällig voneinander ab: $\Sigma \chi^2_b = 0.76 < \chi^2_e (P_{0.05} = 5.99; df = 2)$. Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus PAT-43 mit drei häufigen Allelen kontrolliert die Expression von sechs Phänotypen.*

PAT-43	aa	ab	ac	bb	bc	cc	n Kf	n Klassen
aa	81 81.44	2* 2.00	3* 3.48				86 86.92	2
ab	2* 2.00	2* 2.05	0* 0.09	0* 0.05	0* 0.09		4 4.27	1
ac	4* 3.48	1* 0.09	4* 3.62		0* 0.09	0* 0.15	9 7.42	1
bb		0** 0.05		0** 0.00	0** 0.00		0 0.05	1
bc		0** 0.09	0** 0.09	0** 0.00	0** 0.01	0** 0.00	0 0.18	
cc			0** 0.15		0** 0.00	0** 0.01	0 0.16	
n F1	87	5	7	0	0	0	99	$\Sigma: 5$
	86.92	4.27	7.42	0.05	0.18	0.16	99.00	

Tabelle 18 : Formale Genetik des Locus POCC-8. Beobachtungs- und Erwartungswerte für 98 Mutter-Kind-Kombinationen. Das Modell „Ein Locus POCC-8 mit 3 Allelen“ wird zu einem Modell „Ein Locus PAT-43 mit 3 Allelen a, b und c“ vereinheitlicht: a = Allel 1, b = Allel 2, c = Allel 3. Kombinationen mit * bzw. **werden für die Berechnung klassenweise zusammengefasst. Die Erwartungswerte werden mit Hilfe folgender Allelfrequenzen berechnet: a = 0.482, b = 0.513, c = 0.005. Die Häufigkeiten der beobachteten Kombinationen und die korrespondierenden Erwartungswerte unter Annahme einer Hardy-Weinberg Verteilung weichen zufällig voneinander ab: $\Sigma \chi^2_b = 7.97 < \chi^2_e$ ($P_{0.05} = 9.49$; $df = 4$). Es lässt sich das formale Modell ableiten: Ein Locus PAT-43 mit 3 häufigen Allelen kontrolliert die Expression von 6 Phänotypen.

POCC-8	aa	ab	ac	bb	bc	cc	n Kf	n Klassen
aa	7*	12	2*				21	2
	10.97	11.68	0.11				22.76	
ab	8	34*	0*	12	0*		54	3
	11.68	24.11	0.12	12.43	0.12		48.46	
ac	0*	0*	0*		0*	0*	0	1
	0.11	0.12	0.12		0.12	0.00	0.47	
bb		15**		8	0**		23	1
		12.43		13.23	0.13		25.79	
bc		0**	0**	0**	0**	0**	0	
		0.12	0.12	0.13	0.13	0.01	0.51	
cc			0**		0**	0**	0	
			0.00		0.01	0.00	0.01	
n F1	15	61	2	20	0	0	98	$\Sigma: 7$
	22.76	48.46	0.47	25.79	0.51	0.01	98.00	

3.3.3. Ausschlüsse

Mit Hilfe des Programmes *Cervus* werden die Ausschlusswahrscheinlichkeiten für die Paternität eines Elter bei einem bekannten Elternteil der einzelnen genetischen Systeme aus den elterlichen Allelfrequenzen geschätzt (Tabelle 19). Zusammen ergeben alle acht Enzym- und Mikrosatellitensysteme eine durchschnittliche Ausschlusswahrscheinlichkeit (AEP) von 91.9% .

Tabelle 19: Ausschlusswahrscheinlichkeiten der einzelnen Enzym- und Mikrosatellitensysteme. Nach *Cervus 2.0*

Locus	„average exclusion probability“ (AEP)
PGI	0.097
EST-1	0.327
EST-2	0.379
EST-3	0.334
PK-12	0.524
PAT-14	0.097
PAT-43	0.054
POCC-8	0.205
Gesamt	0.919

Von der Abstammung ausgeschlossen sind Nachkommen, die ein Merkmal besitzen, das keiner der beiden Elter aufweist, beispielsweise Nachkommen der Elternkombination 1-1 x 1-1 mit dem Genotypus 2-1. Um die Ausschlusssicherheit zu erhöhen, werden Nachkommen erst dann als ausgeschlossen betrachtet, wenn dies in mindestens zwei verschiedenen Systemen bestätigt werden kann. Diese Mehrfachausschlüsse, die laut Tabelle 20 6.9% ausmachen, repräsentieren die Rate der „extra pair copulation“. Es stammen ca. 7% der F1-Generation nicht von ihrem sozialen Vater ab.

Tabelle 20: Übersicht über die Anzahl von Singulär- und Mehrfachausschlüssen. Insgesamt werden 141 von insgesamt 657 Jungtieren, also 21.5% aller Nachkommen in mindestens einem Enzym- oder Mikrosatellitensystem ausgeschlossen. Um die Ausschlusssicherheit zu erhöhen, werden aber nur Mehrfachausschlüsse gewertet.

	singulär	mehrfach (>1 System)	gesamt
ausgeschlossene Jungtiere:	96	45	141
Jungtiere gesamt:			657
Ausschlüsse in Prozent:	14.60%	6.90%	21.50%

3.4 Populationsgenetik

Die genetischen Daten der Alttiere werden mit den populationsgenetischen Statistikprogrammen *Genepop* (Raymond und Rousset, 1995) und *Cervus* (Slate et al., 2000) ausgewertet. Der Vergleich der genotypischen Verteilungen in den Stichproben der Jahrgänge 1999 und 2000 ergibt für keinen der analysierten Loci signifikante genotypische Unterschiede (Fehler 1. Art $p > 0.100$). Folglich können die Einzelstichproben für die weitere statistische Bewertung zusammengefasst werden. In Tabelle 21 sind die Allelfrequenzen für die einzelnen Loci, die Anzahl N der Elterntiere, die Anzahl der Allele n_a , die erwarteten und beobachteten Heterozygotiegrade, der Informationsgehalt des Polymorphismus, die Ausschlusswahrscheinlichkeiten, die Frequenzen der Nullallele und die Wahrscheinlichkeiten für den Fehler 1. Art für den Test auf Hardy-Weinberg-Verteilung aufgelistet.

Die genotypischen Verteilungen für die Loci PGI, PK-12 und POCC-8 weichen signifikant von einer Hardy-Weinberg-Verteilung ab (PGI: $p = 0.010$; PK-12: $p \approx 0.000$; POCC-8: $p = 0.018$). Die Genotypverteilungen der verbleibenden Loci (EST-1, EST-2, EST-3, PAT-14, PAT-43) zeigen keine signifikante Abweichung von einer Hardy-Weinberg-Verteilung ($p > 0.098$). Das mehrfache Anwenden eines Testverfahrens kann allerdings fälschlicherweise zur Ablehnung der Arbeitshypothese eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts führen. Daher wird hier das Bonferroni-Verfahren bei der Festlegung der Irrtumswahrscheinlichkeit angewandt ($\alpha_{\text{neu}} = \alpha/\text{Anzahl der Einzeltests}$; $\alpha_{\text{neu}} = 0.05/8$). Demzufolge weichen nur die Genotyphäufigkeiten des Locus PK-12 signifikant von einer Hardy-Weinberg-Verteilung ab. Die Abweichungen zwischen Beobachtungs- und Erwartungswerten erklären sich durch ein Heterozygotendefizit bei einem grossen Anteil von Nullallelen in den Populationen. Der Anteil Nullallele am Locus PK-12 wird auf 12.76% geschätzt (Tabelle 21).

Die einzelnen Loci tragen sehr unterschiedlich zur Gesamtausschlusswahrscheinlichkeit von ca. 92% bei (Tabelle 21). Die Ausschlusswahrscheinlichkeit der vier Enzymloci beträgt 0.739, die der Mikrosatellitenloci 0.650. Die Enzymloci besitzen vier bis sechs, die Loci der Mikrosatelliten drei bis acht Allele. Der mittlere beobachtete Heterozygotiegrad beträgt bei den Enzymen 0.487, bei den Mikrosatelliten 0.344. Errechnet man den mittleren Informationsgehalt, so ergibt sich ein durchschnittlicher PIC von 0.439 für die Enzyme und von 0,323 für die Mikrosatelliten (Tabelle 21). Die allelische Variabilität der ausgewählten Loci lässt keine Unterschiede zwischen den Gruppen von Enzym- und Mikrosatellitenloci erkennen.

Table 21: Populationsgenetische Analyse der Alttiere von *P. major* aus den Jahren 1999 und 2000. Für 8 Loci sind die Anzahl der Elterntiere (N), die Anzahl Allele (n_a), die erwartete und beobachtete Heterozygotie ($H_{erw.}$, $H_{beob.}$), der Informationsgehalt des Polymorphismus (PIC), die Ausschlusswahrscheinlichkeit eines Elter (AW), die Allelfrequenzen, die Frequenz der Nullallele und die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art für den Test auf Hardy-Weinberg Verteilung (p -Wert) angegeben.

Locus	N	n_a	$H_{erw.}$	$H_{beob.}$	PIC	AW	Allelfrequenz	Frequenz d. Nullallele	p -Wert*
PGI	208	4	0.193	0.192	0.180	0.095	0.007	0.0325	0.010
							0.012		
							0.894		
							0.087		
EST-1	209	6	0.529	0.550	0.491	0.313	0.655	-0.0290	0.408
							0.081		
							0.175		
							0.012		
							0.072		
							0.005		
EST-2	207	6	0.622	0.633	0.565	0.373	0.536	-0.0062	0.860
							0.285		
							0.046		
							0.036		
							0.087		
							0.010		
EST-3	205	6	0.571	0.571	0.518	0.330	0.600	-0.0061	0.975
							0.083		
							0.015		
							0.051		
							0.246		
							0.005		
PK-12	204	8	0.746	0.574	0.702	0.515	0.027	0.1276	0.000
							0.015		
							0.203		
							0.078		
							0.326		
							0.032		
							0.316		
							0.003		
PAT-14	206	4	0.098	0.102	0.096	0.050	0.022	-0.0166	1.000
							0.027		
							0.949		
							0.002		
PAT-43	209	5	0.120	0.115	0.117	0.062	0.014	0.0449	0.098
							0.005		
							0.938		
							0.024		
							0.019		
POCC-8	209	3	0.502	0.584	0.378	0.190	0.529	-0.0767	0.018
							0.469		
							0.002		

* Fehler 1. Art für Hardy-Weinberg-Test, signifikante Werte sind fett unterlegt.

3.5 Nullallele

3.5.1 Scheinbarer Elternschaftsausschluss durch Nullallele

Nullallele werden auch als stumme Gene bezeichnet und können als entgegengesetzte Homozygotie zwischen Eltern und Nachkommen manifest werden (scheinbarer Elternschaftsausschluss). Exemplarisch werden die Familien des Jahrgangs 1999 auf entgegengesetzte Homozygotie ausgezählt. Dabei werden nur solche Familien berücksichtigt, in denen keine weiteren Ausschlüsse vorkommen. Die Summe der Nullallele pro Locus beträgt etwa 3, das Geschlechterverhältnis ist gleich. Die nach der Genzählmethode geschätzte Frequenz des Nullallels beträgt ~ 0.02 (Tabelle 22).

Tabelle 22: Entgegengesetzte Homozygotie der Esterasen des Jahrgangs 1999. Dargestellt ist eine Auflistung der ausgeschlossenen Nachkommen aller Familien (m = male, f = female). Mehrfachausschlüsse werden nicht berücksichtigt.

	EST - Loci			Summe:
	1	2	3	
m	2	2	1	5
f	1	2	2	5
Summe:	3	4	3	10

3.5.2 Geschätzte Häufigkeit von Nullallelen unter Zuhilfenahme populationsgenetischer Programme

Die über das Programm *Genepop* geschätzten Frequenzen sogenannter stummer Allele sind in Tabelle 21 angegeben. Die negativen Werte sind Rechenartefakte und für die weitere Auswertung ohne Belang. Bei Betrachtung der geschätzten Werte für die EST stimmt das Ergebnis mit der nach der Genzählmethode geschätzten Frequenz relativ gut überein ($\sim 3\%$ vs. $\sim 2\%$). Ein auffallend hohen Anteil von Nullallelen wird für den Locus PK-12 geschätzt (12.76%). Im Vergleich zu den Enzymen sind die Frequenzen geschätzter Nullallele bei den Mikrosatelliten im allgemeinen höher.

3.6 Kopplungsanalyse

Für die statistischen Kopplungsanalysen in den einzelnen Familien werden Voruntersuchungen auf populationsgenetischer Ebene durchgeführt. Mit den Programmen *Genepop* und *Cervus* werden die genotypischen Kopplungsungleichgewichte zwischen zwei elterlichen Loci geprüft (Tabellen 23 und 24). Signifikante Ungleichgewichte ergeben sich für acht Locuspaare: PGI/PK-12, EST-1/EST-2, EST-1/EST-3, EST-2/EST-3, EST-2/PK-12, EST-3/PK-12, PK-12/POCC-8 und PK-12/PAT-14.

Für diese Kombinationen wird die statistische Kopplungsanalyse in Familien mit zweifelsfreier Abstammung durchgeführt. In Tabelle 25 sind die kopplungsinformativen Daten und in Tabelle 26 die Ergebnisse der statistischen Kopplungsanalyse zusammengefasst. Für Lodscores ≥ 3.0 wird die Hypothese der Kopplung angenommen. Für alle anderen Kombinationen mit Lodscores ≤ 3.0 wird die Hypothese nicht angenommen. Für Lodscores ≤ -2 wird sie abgelehnt.

Tabelle 23: Genotypisches Kopplungsungleichgewicht zwischen vier elterlichen Enzym- und vier elterlichen Mikrosatellitenloci (Programme: Genepop; Cervus). Der Fehler 1. Art p ist für jedes Locuspaar angegeben. Signifikante Abweichungen vom Kopplungsungleichgewicht (fett markierte Werte) ergeben sich für die Loci der Esterasen ($p \leq 0.01$) und für die Kombinationen des Locus PK-12 mit den Loci für PGI, EST-2, EST-3, POCC-8 und PAT-14.

	Locus						
Locus	EST-1	EST-2	EST-3	PK-12	POCC-8	PAT-14	PAT-43
PGI	0.773	0.998	0.916	0.000	0.215	0.604	0.820
EST-1		0.000	0.013	0.084	0.713	0.426	0.208
EST-2			0.000	0.000	0.255	0.104	0.217
EST-3				0.031	0.901	0.940	0.080
PK-12					0.038	0.001	0.388
POCC-8						0.182	0.148
PAT-14							0.847

Table 24: Statistische Kopplungsanalyse in Familien von *Parus major*. Die lodmax-Werte berücksichtigen nicht das Geschlecht. Fett markiert sind die lodmax-Werte > 3.0.

	locus						
locus	EST-1	EST-2	EST-3	PK-12	POCC-8	PAT-14	PAT-43
PGI	0.847	9.062	4.013	0.028	0.000	0.000	n.t.
EST-1		28.752	8.432	0.000	0.000	0.000	0.291
EST-2			27.504	0.128	0.000	0.000	0.000
EST-3				0.000	0.000	0.000	0.000
PK-12					18.435	0.000	0.244
POCC-8						0.000	0.000
PAT-14							0.588

Table 25: Anzahl der für die Kopplungsuntersuchungen informativen Familien und Kinder (F und Kd), getrennt nach väterlicher (m) und mütterlicher (f) Information.

Locus	Geschlecht	n	EST-1	EST-2	EST-3	PK-12
PGI	m	F	4	8	8	12
		Kd	20	41	32	64
	f	F	7	7	8	13
		Kd	39	48	46	68
EST-1	m	F		20	17	13
		Kd		120	101	86
	f	F		31	20	20
		Kd		218	131	134
EST-2	m	F			19	18
		Kd			107	107
	f	F			30	24
		Kd			185	161
EST-3	m	F				15
		Kd				92
	f	F				21
		Kd				139

Table 26: Statistik der Kopplungsanalyse für die Loci PGI, EST-1, EST-2, EST-3 und PK-12 in Kohlmeisenfamilien. Dargestellt sind die kumulativen Kopplungswahrscheinlichkeiten (max. lodscore), nach Geschlechtern getrennt, sowie die Rekombinationsraten (θ). Für Locuspaare mit lodmax* wird die Hypothese der Kopplung angenommen. Signifikante Geschlechtsunterschiede sind mit ^a markiert.

Männliches Geschlecht:

		Locus			
Locus		EST-1	EST-2	EST-3	PK-12
PGI	lodscore	3.372*	3.708*	0.552	0.104
	θ_{male}	0.048	0.127	0.253	0.371
EST-1	lodscore		13.256*	5.769*	~0.000
	θ_{male}		0.102	0.177	0.500
EST-2	lodscore			16.255*	~0.000
	θ_{male}			0.076	0.500
EST-3	lodscore				~0.000
	θ_{male}				0.5

Weibliches Geschlecht:

		Locus			
Locus		EST-1	EST-2	EST-3	PK-12
PGI	lodscore	0.000	5.377*	3.777*	~0.000
	θ_{female}	0.500	0.104	0.135	0.500
EST-1	lodscore		15.987*	3.130*	0.181
	θ_{female}		0.161	0.263	0.39
EST-2	lodscore			14.712*	~0.000
	θ_{female}			0.145	0.500
EST-3	lodscore				~0.000
	θ_{female}				0.5

Beide Geschlechter:

		Locus			
Locus		EST-1	EST-2	EST-3	PK-12
PGI	lodscore	0.847 ^a	9.062*	4.013	0.028
	θ_{total}	0.288	0.115	0.178	0.425
EST-1	lodscore		28.752*	8.432*	~0.000
	θ_{total}		0.140	0.225	0.500
EST-2	lodscore			27.504 ^a	~0.000
	θ_{total}			0.121	0.500
EST-3	lodscore				~0.000
	θ_{total}				0.5

Die geschätzten Rekombinationsraten vom weiblichen und männlichen Geschlecht, sowie beider Geschlechter zusammen sind für lod_{max} gleich: θ_{male} , θ_{female} , θ_{gesamt} . Die Hypothese der Kopplung ($\text{lod} \geq 3.0$) ist anzunehmen für die Locuspaare PGI/EST-1, PGI/EST-2, EST-1/EST-2 und EST-3, sowie für EST-2/EST-3. Das Ergebnis für das Locuspaar PGI/EST-3 ist inkonsistent und erfordert weitere Analysen. Die Hypothese der Kopplung des Locus PGI mit dem Locus PK12 kann nicht abgewiesen werden ($\text{lod}_{\text{max}} > -2.0$) und ist nur durch weitere Untersuchungen prüfbar.

Die Loci EST-1, EST-2 und EST-3 bilden einen Kopplungsverband. Aus den Rekombinationsraten im männlichen Geschlecht ergibt sich die in Diagramm 2 dargestellte Rekombinationskarte. Die beobachteten Abstände von EST-1 zu EST-3 von 17.7% entsprechen in etwa der Summe der Einzelabstände von EST-1 zu EST-2 (10.2%) und von EST-2 zu EST-3 (7.6%). Durch Berechnung der Streuung lässt sich die Additionsungenauigkeit einiger Werte erklären: Streuung $f = \sqrt{\theta \times (1 - \theta)/n}$ (gezählte Nachkommen) Die Streuung der Rekombinationsrate PGI/EST-1 = 0.048 beträgt demnach 0.048 ± 0.048 . Sie liegt also zwischen 0 und 9.6%.

Die Rekombinationsrate für die Loci EST-2 und EST-3 im weiblichen Geschlecht (RF) liegt etwa 1.5 mal höher als die Rekombinationsrate im männlichen Geschlecht (RM). Die Geschlechtsunterschiede der Rekombinationsraten für die Loci EST-2 und EST-3 ($\theta_{\text{male}} = 0.076$, $\theta_{\text{female}} = 0.145$) sind mit $p > 0.05$ bei weiblichen Tieren signifikant höher als bei männlichen Tieren.

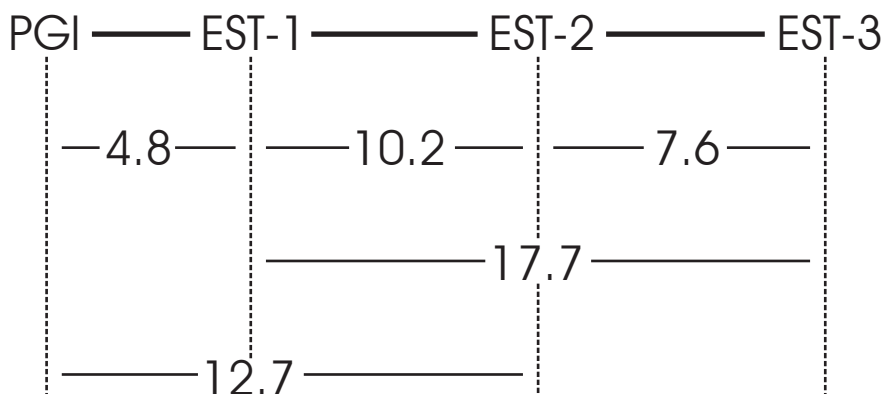


Diagramm 2: Mögliche Anordnung der Loci für PGI und Esterasen. Zugrunde liegen RM (θ_{male}) für die Locuspaare PGI/EST-1, PGI/EST-2, EST-1/EST-2, EST-1/EST-3 und EST-2/EST-3. Abstandsangaben in % RM (θ_{male}) nach Tabelle 22 für lodscore - Werte > 3 . Die beobachteten Abstände PGI/EST-2 von 12.7% entsprechen in etwa der Summe der beobachteten Abstände von PGI/EST-1 (10.2%) und EST-1/EST-2 (4.8%) [= 15%].

4 Diskussion

Vor der Anwendung von genetischen Merkmalsystemen in der Humangenetik und verschiedenen biologischen Disziplinen zur Lösung von Problemstellungen müssen deren Eigenschaften und Eignung geprüft werden. Genetische Merkmale, die für einen Identitätsnachweis herangezogen werden, müssen eindeutig interpretierbar sein, frei aufspalten und dürfen statistisch nicht gekoppelt sein. Für eine effektive Kopplungsanalyse zur Ermittlung der Lokation von Genen werden genetische Marker benötigt, die bei bekannter Position im Genom ebenfalls eindeutig interpretierbar sind, aber darüber hinaus noch eine grosse allelische Variation besitzen. Bezüglich des letzten Punktes muss allerdings bedacht werden, dass grosse genetische Variabilität ihre Ursache in einer hohen Mutationsrate hat, häufige Mutationsereignisse jedoch die Interpretation von genetischen Zusammenhängen innerhalb von Stammbäumen erschweren. Im nachfolgenden werden diese Gesichtspunkte im einzelnen diskutiert.

4.1 Formale Analysen

Formalgenetische Modelle, wie z.B. „ein Locus mit zwei Allelen kontrolliert die Expression von drei Genotypen“, können in der Tier- und Pflanzenzüchtung mit Kreuzungsexperimenten geprüft werden (Seyffert et al., 1998). In der Humangenetik ist man dagegen beim Testen dieser Hypothese auf formale Untersuchungsansätze wie die Familienanalyse oder die Mutter-Kind-Statistik angewiesen (Weir, 1996). Die Familienanalyse untersucht die Segregation der Kinder genotypen in Familien mit bestimmten Elternkombinationen; die Mutter-Kind-Statistik prüft die Verteilung bestimmter Mutter-Kind-Kombinationen und stützt sich dabei auf die Schätzung von Allelfrequenzen, die aus populationsgenetischen Voruntersuchungen gewonnen wurden, ohne dabei den Genotypus des Vaters zu berücksichtigen.

Für eine verlässliche Durchführung einer Segregationsanalyse müssen zunächst „Elter-Kind“ Kombinationen, die eine genetische Unverträglichkeit aufweisen, aus der Stichprobe ausgeschlossen werden. Um etwaige aussereheliche Vaterschaften auszuschliessen, wird daher in der Humangenetik oftmals der formalgenetische Analyseansatz einer Mutter-Kind-Statistik gewählt. Weiterhin nehmen die genetische Variabilität des jeweils betrachteten Locus in einer Population sowie der Stichprobenumfang bei der Erhebung familienbezogener genetischer Daten gleichermassen Einfluss auf die Wahl und das Design statistischer Prüfverfahren in der Formalgenetik. In der vorliegenden Arbeit sind 103 Familien mit durchschnittlich sieben Nachkommen untersucht worden. Im Falle einer grossen Anzahl von Allelen eines Locus kann allerdings auch dieser relativ grosse

Stichprobenumfang nicht die gesamte erwartete genotypische Variabilität erfassen. So sind schon bei fünf Allelen 15 verschiedene Genotypen möglich, die ohne Berücksichtigung des Geschlechts 120 Elterkombinationen fordern, und die Anzahl von möglichen Elterkombinationen steigt sogar noch um beinahe das Doppelte an ($N = 225$), wenn mütterlicher und väterlicher Genotypus unterschieden werden. Damit ergab sich auch in dieser Arbeit ein Problem bei der direkten Anwendung statistischer Verfahren für die hoch variable Esteraseloci und den Mikrosatelliten PK-12. Die Segregationsanalyse für diese vier Loci konnte nur nach der Zusammenfassung von Genotypklassen durchgeführt werden. Die vorgefundene Variabilität aller untersuchter Enzymloci und Mikrosatelliten lässt sich dennoch widerspruchsfrei mit dem freien Aufspalten und Segregieren mehrerer Allele eines Locus erklären. Insbesondere gilt für die vier Enzymsysteme, dass jeweils ein Locus mit multipler Allelie die Expression der Phänotypen kontrolliert. Somit sind die gewählten Enzyme und Mikrosatelliten gleichermaßen als Merkmalssysteme für die weiteren populationsgenetischen Untersuchungen geeignet.

4.2 Genetische Variabilität

4.2.1 Enzyme

16 zufällig ausgewählte Enzymloci weisen einen Polymorphiegrad von 43% und einen beobachteten durchschnittlichen Heterozygotiegrad von etwa 13% auf (vgl. Tabelle 8). Diese Durchschnittswerte werden von der aussergewöhnlich grossen Variabilität der drei Esteraseloci dominiert (Tabelle 8). So haben die Esteraseloci einen durchschnittlichen Heterozygotiegrad von 60%, während die restlichen 13 Loci nur einen durchschnittlichen Heterozygotiegrad von etwa 3% besitzen. Ohne Berücksichtigung der Esteraseloci ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von einigen anderen Vogelarten. Randi et al. (1991) beschreiben Heterozygotiegrade von 1 - 4% bei Eulen, Möwen und Seeschwalben, und auch Avise et al. (1982) finden bei Spottdrosseln einen durchschnittlichen Heterozygotiegrad von 2% und bei Laubbürgern von etwa 4%. Ward et al. (1992) beschreiben dagegen einen beinahe doppelt so hohen Heterozygotiegrad (7%) bei Vogelarten. Schliesst man in der vorliegenden Studie nicht die Variabilität jedes einzelnen Esteraseloci in die Schätzung mit ein, sondern betrachtet die durchschnittliche Variabilität über alle drei Loci, dann ergibt sich insgesamt ein Heterozygotiegrad von ebenfalls 7%. Ein ähnliches Bild für die Variabilität von Esteraseloci und einer zufälligen Auswahl weiterer Enzymloci zeigt sich auch für zwei weitere *Parus*-Arten, Blaumeise (*P. caeruleus*) und Tannenmeise (*P. ater*; Driesel et al., zur Publikation angenommen).

Die Variabilität der Esterasen bei Kohlmeisen manifestiert sich als phänotypische Expression von drei gekoppelten Loci mit jeweils multipler Allelie. Bei anderen Spezies wurde ebenfalls eine derartig hohe Variabilität an Esteraseloci gefunden: Morton und Singh (1985) fanden in *Drosophila pseudoobscura* 26 Allele am α -Esteraselocus und einen durchschnittlichen Heterozygotiegrad von 80%. Bei der Hausmaus *Mus musculus* (Wassmer et al., 1985) und der Ratte *Rattus norvegicus* (Hedrich et al., 1987) wurden je zwei Esterase-Cluster mit insgesamt neun Loci beschrieben. Die Anzahl verschiedener Esteraseloci und ihre allelische Variabilität werden durch Genduplikationen und Punktmutationen erklärt.

Die grosse genetische Vielfalt von Enzymloci stellt zwingend die Frage nach ihrer selektiven Bedeutung. So findet sich bei vielen Spezies eine enge Assoziation zwischen einer Resistenz gegen Umweltverschmutzung, z.B. durch Pestizide und/oder Insektizide, und Proteinpolymorphismen. Allgemeine Hinweise für Entgiftungsfunktionen von Enzymen liefern zum Beispiel Untersuchungen von Pasteur und Sinègre (1975) und Spackman et al. (1994). Zahlreiche Untersuchungen belegen einen Zusammenhang zwischen Esterasenvariabilität und Umwelt: Insektizidresistenz bei Pfirsich-/Kartoffelblattläusen lässt sich mit der enzymatischen Aktivität von bestimmten Esterasen in Verbindung bringen (Devonshire, 1977). Jordaens et al. (1999) berichten über eine Induzierbarkeit von Esterasen bei *Carinarion* spp. in Abhängigkeit vom Nahrungsspektrum. In ähnlicher Weise lässt sich auch die grosse Variabilität von Esterasen bei Kohlmeisen erklären: Verschiedene enzymatische Varianten bieten eine breite Basis, um den Stoffwechsel effektiv zu entgiften und Individuen mit grosser Heterogenität erhalten einen grösseren Schutz vor Toxinen in Nahrung und Umwelt.

Die Erhaltung von genetischer Variabilität durch Selektion auf den Esterasekomplex lässt sich auch noch indirekt begründen. Nach Nei und Rouchoudhury (1973) treten häufig Nullallele an duplizierten Loci auf, da die Funktion fehlender Genprodukte durch andere kompensiert werden kann. Die Esterasen zeigen jedoch einen erstaunlich geringen Anteil von Nullallelen (etwa 1.5% pro Locus). Driesel et al. (zur Publikation angenommen) schliessen daher, dass die hohe genetische Variabilität und die geringe Anzahl von Nullallelen die Folge von natürlicher Selektion ist.

4.2.2 Mikrosatelliten

Alle vier Mikrosatellitenloci waren polymorph. Der durchschnittliche Heterozygotiegrad lag bei etwa 40% und damit etwas unter der Variabilität, die beim Menschen (60%) beschrieben wird. Ob die in dieser Arbeit festgestellte Mikrosatellitenvariation bei *P. major* repräsentativ ist, müssen weiterführende Untersuchungen mit mehr Loci zeigen. Ein Vergleich von Blau- und Kohlmeise bestätigen zunächst diese etwas geringere Variabilität (Stauss et al., zur Publikation angenommen). Jedoch muss die Auswahl von Primern, die zur Amplifikation der Mikrosatellitenregionen herangezogen worden sind, ebenfalls Berücksichtigung finden. Die untersuchten Mikrosatelliten sind nicht speziell für *P. major* sondern für engverwandte Arten beschrieben worden; die PCR-Bedingungen sind nur für *P. major* optimiert worden und machen es wahrscheinlich, dass nicht die vollständige Variabilität dieser Mikrosatelliten innerhalb dieser Art aufgedeckt worden ist und daher der Heterozygotiegrad unterschätzt wird.

4.2.3 Nullallele

Nullallele manifestieren sich *phänotypisch* 1. innerhalb von Familien durch scheinbare, entgegengesetzte Homozygotie zwischen Eltern und ihren Nachkommen und 2. in Populationen durch einen Homozygotenüberschuss. Darüber hinaus führt Nullallelie bei Proteinen zu *funktionellen* Veränderungen, die in homozygoter Form zu angeborenen Stoffwechselerkrankungen führen können; Nullallelie bedeutet, dass entweder kein Protein oder aber ein funktionsloses Protein vorhanden ist. Die durchschnittliche Häufigkeit von Nullallelen in der menschlichen Bevölkerung liegt für „elektromorphe“, selektionsneutrale Proteine bei etwa 0.5% (Kömpf und Ritter, 1979). Selektionsneutrale Nullallele einiger Loci können aber durchaus mit hohen Frequenzen in Populationen auftreten, so wird das Nullallel des AB0-Blutgruppensystems mit einer Häufigkeit von mehr als 60% in der mitteleuropäischen Bevölkerung beobachtet (Prokop und Göhler, 1986). Für einzelne Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. der Zystischen Fibrose, liegt die Häufigkeit von Nullallelen bei etwa 2% (Stanbury et al., 1983). In isolierten, abgeschlossenen Gesellschaften können derartige Defektallele aber auch mehr als das Zehnfache dieser Werte erreichen (z.B. die Häufigkeit der Galaktosämie in der Bevölkerung auf der Schwäbischen Alb; Kömpf, 1988).

Bei den funktionslosen Mikrosatelliten ist der Anteil von Nullallelen in der Kohlmeisenpopulation deutlich höher; im Schnitt liegt er bei 7% mit einem Minimum von 2% (Locus PAT-14) und einem Maximum von fast 13% (Locus PK-12). So lässt sich der beobachtete Heterozygotenmangel am Locus PK-12 auch durch das häufige Auftreten von Nullallelen erklären, die im heterozygoten Zustand nicht aufgedeckt werden können.

4.3 Populationsgenetik

Die genotypische Zusammensetzung einer sich sexuell vermehrenden Population gibt Auskunft über den Einfluss von Kräften, die auf die genetische Struktur dieser Population wirken. Unter idealen mathematischen Bedingungen, wie einer infiniten Populationsgrösse, Zufallspaarung zwittriger Individuen und dem Ausschluss von Selektion, stellt sich in Abhängigkeit der Allelzahl und -häufigkeiten an einem Locus eine binomiale Genotypverteilung - das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht - ein (Sperlich, 1988). Der Genpool einer solchen idealen Population bleibt über die Generationen hinweg in seiner allelischen Zusammensetzung unverändert. Trotz seiner strengen Voraussetzungen bietet das Hardy-Weinberg-Gesetz der Genetik eine testbare Grundhypothese, um genotypische Populationsstrukturen zu analysieren. Finden sich statistisch signifikante Abweichungen der Genotypverteilung von einem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, gilt dies als Beweis, dass gerichtete Kräfte auf den betrachteten Genort wirken. Selektion, Inzucht aber auch Stichprobenfehler können Ursachen für Abweichungen sein.

Mit Ausnahme des Mikrosatelliten PK-12 finden sich keine signifikanten Abweichungen der Genotypverteilung von einer Hardy-Weinberg-Verteilung für die verbleibenden Enzym- und Mikrosatellitenloci. Als Ursachen für diese Abweichung am PK-12-Locus kommen hauptsächlich zwei Aspekte in Betracht: 1. Heterozygotenmangel durch die Vermischung verschiedener Stichproben (Wahlund-Effekt, Wahlund, 1928) oder 2. durch eine hohe Anzahl von Nullallelen am PK-12-Locus. Ein Wahlund-Effekt (Wahlund 1928) lässt sich nicht sicher ausschliessen, da aus dem gleichen Brutgebiet Individuen ohne Kenntnis über deren Verwandtschaftsgrad und Herkunft über zwei Jahren hinweg untersucht wurden.

Die Stichproben aus zwei Jahrgängen und verschiedenen Habitaten belegen mit Homogenitätstests, dass keine räumlichen und zeitlichen Unterschiede in der genetischen Zusammensetzung der Brutpopulationen vorhanden sind. Starke Fluktuationen der Populationsgrösse, extreme Migrationsereignisse und Habitatstrukturen können ausgeschlossen werden. Die untersuchte Kohlmeisenpopulation besitzt also einen räumlich und zeitlich konstanten Genpool.

4.3.1 Ausschlusschance

Die Ausschlusswahrscheinlichkeit eines adulten Tieres von der Vaterschaft bei sicherem Kenntnis eines Elters beträgt über 90%, wenn alle Loci berücksichtigt werden. Die Gruppe der Enzymsysteme und Mikrosatelliten tragen jeweils mit einer Ausschlusswahrscheinlichkeit von etwa 70% bei. Allerdings muss bei den Enzymen einschränkend erwähnt werden, dass die Kopplung der Esteraseloci den Ausschlusswert nach oben verfälschen kann.

Die vorgefundene Fremdjungenrate von 7% in süddeutschen Kohlmeisenpopulationen liegt etwas unter dem für Vogelarten beschriebenen Durchschnittswert von 11% (Griffith et al., 2002); dieser relativ niedrige Wert wird ebenfalls durch andere genetische Untersuchungen bestätigt (Gullberg et al., 1992; Krokene et al., 1998; Verboven und Materman, 1997; Strohlbach et al., 1998 und Lubjuhn et al., 1999). Betrachtet man die Verteilung der Häufigkeiten von „extra-Pair-Paternity“ (EPP) zwischen Vogelarten, stellt man eine grosse Variationsbreite fest - die Häufigkeit von EPPs kann nahe 0% sein (Weisswangengans, *Branta leucopsis*, Choudhury et al., 1993), aber auch über 70% liegen (Pracht-Staffelschwanz. *Malurus cyaneus*, Double und Cockburn, 2000).

4.4 Kopplungsanalyse

Assoziationstests gestatten eine einfache Voruntersuchung bei Kopplungsanalysen, da sie keine familienbezogenen Daten fordern. Eine genotypische Assoziation bzw. eine nicht-zufällige Verteilung der Genotypen an zwei Loci lässt eine physikalische Kopplung dieser Loci vermuten. Die Stichprobenszusammensetzung kann jedoch das Ergebnis entscheidend beeinflussen, und Interpretationen zur Kopplung müssen zunächst mit Zurückhaltung gemacht werden. Weiterhin gilt, dass sich bei gekoppelten Loci die ursprünglichen allelischen Kopplungszustände über die Generationen hinweg durch Mutation und Rekombination auflösen, so dass ein Assoziationstest auf Populationsebene Ungleichgewichte nicht mehr statistisch aufzudecken vermag. Verlässlicher erscheint die Kopplungsanalyse mit familienbezogenen Daten, da hier die Weitergabe von Haplotypen von der Elter- auf die Kindergeneration direkt verfolgt werden kann. Dennoch muss festgestellt werden, dass bei einer unverfälschten Stichprobenwahl Assoziationstests präziser Rekombinationsereignisse erfassen können als die klassische Kopplungsanalyse mit familienbezogenen Daten.

In dieser Studie werden alle acht Loci anhand ihrer Genotypverteilung in der Gruppe von Altvögeln auf ein mögliches genotypisches Ungleichgewicht geprüft. Darüber hinaus wird der direkte Nachweis von Kopplung zwischen Loci mittels Familienanalysen

geführt (Kopplungsanalyse). Im Assoziationstest finden sich relativ konsistente, signifikante genotypische Ungleichgewichte nur für eine Gruppe von vier Loci (drei Esterasen und Mikrosatellit PK-12; Tabelle 21). Signifikante Zusammenhänge werden auch für die Paare PGI/PK-12, PK-12/POCC-8 und PK-12/PAT-14 gefunden, doch ergeben diese kein konsistentes Bild wechselseitiger Abhängigkeiten. Die Kopplungsanalyse in Familien ergibt schliesslich, dass die Esteraseloci einen engen Kopplungsverband mit einer relativen Reihenfolge EST-1 - EST-2 - EST-3 bilden (Diagramm 2). Darüber hinaus findet man zwischen dem PGI-Locus und der Esterasegruppe eine Kopplung. Die Position des PGI-Locus im Kopplungsverband der Esterasen ist allerdings noch nicht hinreichend statistisch abgesichert. Die Familienanalyse deckt sich damit nur teilweise mit den Ergebnissen des Assoziationstests. Die Diskrepanz beider Testverfahren lässt sich für den PGI-Locus mit Mutations- und Rekombinationsereignissen erklären, deren Folgen einen statistischen Nachweis eines genotypischen Ungleichgewichts auf Populationsebene nicht mehr gestatten. Weiterhin fällt auf, dass der PK-12-Locus oftmals ein genotypisches Ungleichgewicht mit anderen Loci zeigt (populationsbezogene Analyse), der Nachweis einer Kopplung für diese Loci innerhalb von Familien jedoch nicht erfolgreich ist (familienbezogene Analyse). Der oben beschriebene hohe Anteil von Nullallelen an diesem Locus, der einen Heterozygotenmangel auf Populationsebene erklärt, könnte daher auch ein genotypisches Ungleichgewicht vortäuschen.

Eine enge Kopplung von drei Esteraseloci kann auch bei Blaumeisen nachgewiesen werden (Stauss et al, zur Publikation angenommen). Während allerdings bei *P. major* alle drei Esteraseloci eng miteinander gekoppelt sind, ist die Kopplung für zwei Esterasen bei *P. caeruleus* nicht signifikant. Die Genfamilie von Esterasen ist im Laufe der Evolution durch Duplikationsereignisse entstanden, hat sich aber in beiden, eng verwandten Arten offensichtlich eigenständig entwickelt.

Schon 1928 postulierte Huxley, dass die Rekombinationswahrscheinlichkeit im heterogametischen Geschlecht einer sich sexuell vermehrenden Art kleiner als im homogametischen Geschlecht ist. Diese Behauptung ist durch Ergebnisse aus zahlreichen Untersuchungen beim Menschen gestützt worden (Ott, 1988; Strachan und Read, 1996), doch wurden auch Ausnahmen bei der Hausmaus *Mus musculus* (Dunn und Bennett, 1967) und dem Mehlkäfer *Tribolium castaneum* (Sokoloff, 1964) beschrieben. Somit kann der Huxley-Regel keine Allgemeingültigkeit zugesprochen werden. Im Rahmen dieser Diskussion sind insbesondere Arten interessant, deren chromosomale Geschlechtsdetermination anders ist als bei Säugetieren. Bei Vögeln ist zum Beispiel das weibliche Geschlecht heterogametisch (WZ).

Neben der Struktur der Esterasefamilie wurden daher die Rekombinationsraten in den Geschlechtern zwischen den beiden eng verwandten Meisenarten *P. major* und *P. caeruleus* verglichen. Die Rekombinationsrate zwischen den Loci EST-2 und EST-3 ist bei Kohlmeisen im männlichen Geschlecht niedriger als im weiblichen Geschlecht. Frühere Untersuchungen von Landauer (1933), Hollander (1938), sowie Fisher und Landauer (1953) an verschiedenen Vogelarten ergaben ebenfalls höhere Rekombinationsraten im weiblichen Geschlecht. Bei Blaumeisen hingegen finden Stauss et al. (zur Publikation angenommen) mit signifikant höheren Rekombinationsraten im männlichen als im weiblichen Geschlecht die Regel von Huxley bestätigt. So ergeben sich selbst bei diesen eng verwandten *Parus* Arten konträre Ergebnisse, die dadurch erklärt werden können, dass Rekombinationsereignisse zwischen Loci einer genetischen Kontrolle unterliegen und chromosomale Umstrukturierungen während der Evolution diese Kontrollfunktionen grundsätzlich verändern können (Nei, 1969; Laurie, 1997; Orr, 1993; Wu und Davies, 1993).

5 Zusammenfassung

Es werden formal- und populationsgenetische Untersuchungen zur genetischen Variabilität von *Parus major* durchgeführt. Das gewählte Untersuchungsgut besteht aus zwei Stichproben von Kohlmeisenfamilien aus den Jahren 1999 und 2000 mit insgesamt 205 Alt- und 657 Jungtieren.

Als genetische Marker werden vier polymorphe Enzym- (drei Carboxylesterasen EST-1, EST-2, EST-3, EC-Nr. 3.1.1.1; Phosphoglucoseisomerase, PGI, EC-Nr. 5.3.1.9) und vier Mikrosatellitensysteme (PAT-14, PAT-43, PK-12 und POCC-8) verwendet. Die Esterasen sind mit fünf bis sechs Allelen pro Locus hochvariabel, mit einem durchschnittliche Heterozygotiegrad von 58.6%. Die PGI besitzt vier Allele und einen beobachteten Heterozygotiegrad von 18.2%. Alle Mikrosatelliten sind polymorph mit drei bis acht Allelen pro Locus und Heterozygotiegraden zwischen 10.2% PAT-14 und 57.4 % (PK-12). Die Ausschlußchance der vier Enzymloci beträgt 73.9%, die der vier Mikrosatellitenloci 65.0% und bei Kombination aller 8 Loci 91.9%. Die Frequenz geschätzter Null-Allele liegt bei den Enzymloci bei ca. 3% und bei den Mikrosatellitenloci bei ca.7%. Ein auffallend hoher Anteil von Nullallelen (12.76%) wird für den Locus PK-12 geschätzt.

Die Rate der „extra-pair-paternity“ (EPP) beträgt 6.9% bei Ausschlüssen in mindestens zwei Systemen. Sie liegt damit im Rahmen der bisher bekannten EPP-Rate bei Kohlmeisen. Die formalgenetischen Modelle für jeden Locus werden mit der Mutter-Kind-Statistik überprüft. Die Variabilität aller Enzym- und Mikrosatellitenloci lässt sich widerspruchsfrei mit der freien Aufspaltung mehrerer Allele eines Locus interpretieren. Mit Ausnahme des Mikrosatelliten PK-12 finden sich keine signifikanten Abweichungen von einer Hardy-Weinberg-Verteilung für die verbleibenden Enzym- und Mikrosatellitenloci. Im Homogenitätstest zeigen sich keine Unterschiede in der genetischen Zusammensetzung der Brutpopulationen beider Jahrgänge. Es liegen keine zufälligen oder gerichteten Veränderungen, z.B. durch eine Fluktuation der Populationsgröße, Migration oder Selektion, vor. Alle Loci werden mit dem populationsbezogenen Assoziationstest und durch die statistische Kopplungsanalyse in Familien auf Kopplung untersucht. Die Loci der Esterasen bilden einen Kopplungsverband, mit dem der Locus PGI gekoppelt ist. Weiter wird die Kopplung der Loci PK-12 und POCC-8 nachgewiesen. Bei Kohlmeisen zeigt das Locuspaar EST-2/EST-3 eine signifikant niedrigere Rekombinationsrate im männlichen (homogametischen) als im weiblichen (heterogametischen) Geschlecht. Dies steht im Widerspruch zur Regel von Huxley (1928), die besagt, daß die Crossing-over-Häufigkeit im heterogametischen Geschlecht deutlich geringer als im homogametischen Geschlecht ist.

6 Literaturverzeichnis:

- Avise, J.C., Aquadro, C.F. und Patton, J.C. (1982)
Evolutionary Genetics of Birds. V. Genetic Distances within Mimidae (Mimic Trushes) and Vireonidae (Vireos)
Biochem. Gen. 20: 95 - 104
- Ayala, F.J. (1982)
Population and evolutionary genetics.
Benjamin Publishing Company
- Bensch S., Price T. und Kohn J. (1997)
Isolation and characterization of micrasatellite loci in a Phylloscopus warbler
Molecular Ecology 6: 91 - 92
- Charlesworth, D. (1991)
The apparent selection on neutral marker loci in partially inbreeding populations.
Genet. Res. 57: 159 - 175
- Choudhury, S., Jones, C.S., Black, J.M. und Prop, J. (1993)
Adoption of young and intraspecific nest parasitism in barnacle geese.
The Condor 95: 860 - 868
- Devonshire, A.L. (1977)
The properties of carboxylesterase from peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) has its role in conferring insecticide resistance.
Biochem. J. 167: 675 - 683
- Double, M. und Cockburn, A. (2000)
Pre-dawn infidelity: females control extra-pair mating in superb fairy wrens.
Proceedings of the Royal Society, London, Series B, 267: 465 - 470
- Driesel, S., Bachmann, L., Stauss, M., Segelbacher, G., Flach, D., Tomiuk, J. und Kömpf, J.
High Genetic Variability of Esterase Loci in Natural Populations of *Parus major*, *P. caeruleus* and *P. ater*.
Biochem. Genet. (zur Publikation angenommen)
- Dunn, L.C. und Bennett, D., (1967)
Sex differences in recombination of linked genes in animals.
Genet. Res. Camb. 9: 211 - 220
- Fisher, R.A. und Landauer, W. (1953)
Sex differences of crossing-over in close linkage.
Am. Nat. 87: 116

- Ford, E.B. (1971)
Ecological genetics.
Methuen and Co.
- Gause, G.F. (1934)
The struggle for existence.
Williams and Wilkins, Baltimore
- Gibb, J. und Betts, M.M. (1963)
Food and food supply of nestling tits (Paridae) in Breckland pine.
J. Anim. Ecol. 32: 489 - 533
- Gullberg, A, Tegelström, H. und Gelter, H.P. (1992)
DNA fingerprinting reveals multiple paternity in families of great and blue tits (*Parus major* and *P. caeruleus*)
Hereditas 117: 103 - 108
- Hansson, B., Bensch, S., Hasselquist, D. und Åkesson, M. (2001)
Mikrosatellite diversity predicts recruitment of sibling great reed warblers.
Proc. R. Soc. Lond. 268: 1287 - 1291
- Hansson, B. und Westerberg, L. (2002)
On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations.
Mol. Ecol. 11: 2467-2474.
- Harris, H. und Hopkinson, D.A. (1976)
Handbook of Enzyme Elektrophoresis in Human Genetics.
North Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford;
American Elsevier Publishing Company, Inc., New York
- Hedrich, H.J., von Deimling, O.H. und Kluge, R. (1987)
Biochemical genetics of *Es-14* (formerly *Es-Si*) and a new esterase variation, *Es-15*, of the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). Biochemistry, tissue expression, and linkage to *Es-1* in lineage group V.
Biochem. Genet. 25: 79.
- Hollander, W.F. (1938)
A sex difference in linkage intensity of three autosomal factors in the domestic pigeon.
Genetics 23: 24 - 27
- Huxley, J.S. (1928)
Sexual differences of linkage in *Gammarus chevreuxi*.
J. Genetics 20: 145 - 156

Jordaens, K., Van Riel, P., Verhagen, R. und Backeljau, T. (1999)
Food-induced esterase electromorphs in *Carinarion* spp. and their effects on taxonomic data analysis (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae)
Electrophoresis 1999, 20: 473 - 479

Kareiva, P. (1990)
Population dynamics in spatially complex environments: theory and data.
Phil. Trans. R. Soc. London B 330: 175 - 190

Kömpf, J. (1988)
Formalgenetische und populationsgenetische Aspekte bei Koppelungsanalysen
Enke Copythek
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

Kömpf, J. und Ritter, H. (1979)
Polymorphism of Alanin Aminotransferase (E.C.2.7.6.1.): Common and rare alleles.
Hum.Genet. 51: 287 - 292

Kondler, R. (1982)
Studie zur Populationsgenetik der Peptidase A (E.C. 3.4.11) und des mitochondrialen Malatenzyms (E.C. 1.1.1.40)
Med. Dissertation, Universität Würzburg

Krokene, C., Anthonisen, K., Lifjeld J.T. und Ammundsen, T (1996)
Paternity and paternity assurance behaviour in the bluethroat, *Luscinia s svecica*.
Animal Behaviour 52: 405-417

Lack, D. (1971)
Ecological Isolation in Birds.
Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Landauer, W. (1933)
Creeper and single comb linkage in fowl.
Nature 132: 606

Laurie, C.C.; (1997)
The weaker sex is heterogametic: 75 years of Haldane's rule.
Genetics 147: 937 - 951

Lourenço, M.F., Ceron, C.R. und Carareto, C.M. (2001)
Evaluation of fitness components in strains of *Drosophila mulleri* carrying different genotypes for an esterase.
Cytobios. 106: 125 - 138

Lubjuhn, T., Gerken, T., Brün, J. und Epplen, J.T. (1999)
High frequency of extra-pair paternity in the coal tit.
Journal of Avian Biology, 30: 229 - 233.

- Manwell, C. und Baker, C.M.A. (1970)
Molecular Biology and the Origin of Species: Heterosis, Protein Polymorphism and Animal Breeding.
Biology Series, Sidgwick and Jackson Limited, 1 Tavistock Chambers, Bloomsbury Way, London W.C.1
- Minot, E.O. (1981)
Effects of interspecific competition for food in breeding blue and great tits.
J. Anim. Ecol. 50: 375 - 385
- Morton, R.A. und Singh R.S. (1985)
Biochemical Properties, Homology, and Genetic Variation of *Drosophila* "Nonspecific" Esterases
Biochem. Genet. 23: 959 - 973
- Mullis, K.B. und Faloona, F. A. (1987)
Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction.
Meth. Enzymol. 155: 335 - 350
- Nei, M. (1969)
Linkage modification and sex difference in recombination.
Genetics 63: 681 - 699
- Nei, M. und Rouchoudhury, A.K. (1973)
Probability of fixation of nonfunctional genes of duplicate loci.
Am. Nat. 107: 362 - 372
- Orr, H.A. (1993)
Haldane's rule has multiple genetic causes.
Nature 361: 532 - 533
- Otha, T. (1971)
Associative overdominance caused by linked detrimental mutations.
Genet. Res. 18: 277 - 286
- Ott, J. (1988)
Analysis of human genetic linkage.
The Johns Hopkins University Press,
Baltimore, Maryland
- Pasteur, N. und Sinègre, G. (1975)
Esterase Polymorphism and Sensitivity to Dursban Organophosphorus Insecticide in *Culex pipiens pipiens*
Biochem. Genet. 13: 789 - 803

- Prokop, O. und Göhler, W. (1986)
Die menschlichen Blutgruppen
5. neugestaltete Auflage
Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Randi, E., Lorenzini, R. und Fusco, G. (1991)
Biochemical variability in four species of Strigiformes.
Biochem. Syst. Ecol. 19: 13 - 16
- Raymond M. und Rousset F. (1995)
GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism.
J. Hered. 86: 248 - 249
- Rousset, F. und Raymond, M. (1995)
Testing heterozygote excess and deficiency.
Genetics 140: 1413 - 1419
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487 - 491
- SAS Institute (1987)
SAS User's Guide: Statistics, Cary, N.C. (ed.)
SAS Institute Inc.
- Seyffert, W., Gassen, H.G., Hess, O., Jäckle, H. und Fischbach, K.-F. (1998)
Lehrbuch der Genetik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Slate, J., Marshall, T. und Pemberton, J. (2000)
A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS.
Mol.Ecol. 9: 801 - 808
- Sokoloff, A., (1964)
Sex and crossing-over in *Tribolium castaneum*.
Genetics 50: 491 - 496
- Spackman, M.E., Oakeshott, J.G., Smyth, K.-A., Medveczky, K.M. und Russell, R.J. (1994)
A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*
Biochem. Genet. 32: 39-62

Sperlich, D. (1988)
Populationsgenetik.
2. Auflage
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S.
(1983)
The Metabolic Basis of inherited Disease
Fifth Edition
McGraw-Hill Book Company, New York

Stauss, M. Bachmann, L., Segelbacher, G., Fietz, J., Kömpf, J. und Tomiuk, J.
Habitat quality, individual heterozygosity and reproductive success in two sympatric
species *Parus major* and *P. caeruleus*.
(Publikation in Vorbereitung)

Stauss, M., Tomiuk, J., Segelbacher, G., Driesel, S., Fietz, J., Bachmann, L. und Kömpf,
J.:
Sex-specific recombination rates in *Parus major* and *P. caeruleus*, an exception from
Huxley's rule.
Hereditas (zur Publikation angenommen)

Strachan, T. und Read, A.P. (1996)
Human Molecular Genetics.
BIOS Scientific Publishers

Strohbach, S., Curio, E., Bathen, A., Epplen, J.T. und Lubjuhn, T. (1998)
Extrapair paternity in the great tit (*Parus major*) a test of the "good genes" hypothesis.
Behavioral Ecology 9: 388 - 396

Thelen, G.C. und Allendorf, F.W. (2001)
Heterozygosity-fitness correlations in rainbow trout: effects of allozyme loci or associa-
tive overdominance?
Evolution 55: 1180 - 1187

Thompson, H.M. (1993)
Avian serum esterases: species and temporal variations and their possible consequences.
Chem. Biol. Interact. 87: 329 - 338

Verboven, N. und Mateman, A.C. (1997)
Low frequency of extra-pair fertilization in the great tit *Parus major* revealed by DNA
fingerprinting.
Journal of Avian Biology 28: 231 - 239

Wahlund, S. (1928)
Compositions of populations from the perspective of the theory of heredity.
Hereditas 11: 65 - 105

- Walker, C.H. (1995)
Biochemical biomarkers in ecotoxicology - some recent developments.
Sci. Total Environ 171: 189 - 195
- Ward, R-H., Skibinski, D.O.F. und Woodwark, M. (1992)
Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation.
Evol. Biol. 26: 73 - 159
- Wassmer, B.; De Looze, S. und von Deimling, O.H. (1985)
Biochemistry and Genetics of esterase-20 (ES-20), a second trimeric carboxylesterase
of the house mouse (*Mus musculus*) II. A unique recombination reveals ES-20 as a hybrid enzyme.
Biochem. Genet. 23: 759
- Weir, Bruce S. (1996)
Genetic Data Analysis II.
2nd edition
Sinauer Associates, Inc.; 23 Plumptree Road/P.O.Box 407, Sunderland, MA 01375 USA
Sinauer Associates, Inc.
- Wright, S. (1921)
Systems of Mating I - V.
Genetics 6: 111 - 178
- Wu, C.-I. und Davies, A.W. (1993)
Evolution of postmating reproductive isolation: The composite nature of Haldane's rule
and its genetic basis.
Amer. Nat. 142: 187 - 212
- Zeuner, F. (1963)
A History of Domesticated Animals.
Hutchinson, London

7 Anhang

7.1 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Lösungen werden als Stocklösungen angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die Reinigung der DNA werden die mit dem Quiagen „DNA-Extraction-Kit“ mitgelieferten Puffer gemäss der beiliegenden Anleitung hergestellt und verwendet:

Elutionspuffer, Lyse-Puffer, PBS-Puffer, Waschpuffer 1, Waschpuffer 2.

Der „TAQ-Poly-Kit“ für die PCR wird gemäss den Herstellerangaben von MWG-Biotech verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente in der Elektrophorese wird anhand der 100 bp DNA-Ladder von Fermentas (GeneRuler) bewertet.

Gel-Lade-Puffer: 0.25% Bromphenolblau, 15% Ficoll (Type 400, Pharmacia) in H₂O d.d.

PGI-Färbepuffer: 0.2 M Tris, 0.19 M Histidin x HCl, 0.023 M Imidazol, 0.005 M MgCl₂, pH 7.6

TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.2.

Tris-Borat Puffer: 0.50 M Tris, 0.28 M Borsäure, pH 8.8

Tris-Formiat-Puffer: 2.82 M, Tris-Ameisensäure pH 9

Tris-Histidin-HCl-Puffer: 0.12 M Tris, 0.1 M Histidin HCl, pH 7.4

Färbelösungen für die Silberfärbung:

Entwicklerlösung: 0.28 M Natriumcarbonat, 1mM Formaldehyd

Färbelösung: 0.2 % Silbernitrat-Lösung in Aqua bidest.

Fixierungslösung: 1% Salpetersäure in Aqua bidest.

Imprägnierlösung: 5% Glycerinlösung

Stoplösung: 10% Essigsäure

7.2 Chemikalien, Trägerampholyte, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Oligonukleotidproben und Primer

Chemikalien:

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien sind nachfolgend in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet und die Hersteller in Klammern benannt.:

Aceton (Carl Roth)

Acrylamid-Lösung, 30% (Rotiphorese Gel A; Roth)

Allelleiter: MBI GeneRuler (MBI Fermentas, # SM0241)

Piperazin-Diacrylamid (BioRAD)

Acrylease (Stratagene)

Ammoniumpersulfat, APS (Amersham Pharmacia Biotech)

Bisacrylamid-Lösung 2% (Rotiphorese Gel B; Roth)

Borsäure (Merck)

Zitronensäure (Merck)

dNTP (MWG Biotech)

Dithiotreitol (DTT; Serva)

Essigsäure (Merck)

Ethidiumbromid (Merck)

Fast Blue RR Salz (Sigma)

Ficoll (Type 400, Pharmacia)

Fruktose-6-Phosphat (Boehringer Mannheim)

Glutaminsäure (Serva)

Glyzerin (Merck)

L-Histidin-HCl (Biomol)

L-Histidin (Sigma)

IEF Agarose (Amersham Pharmacia Biotech)

Imidazol (Merck)

Magnesiumchlorid (Merck)

Meldolablau (Boehringer Mannheim)

4-Methylumbelliferylacetat (Koch light)

Methyltetrazoliumbromid, MTT (Biomol)

Natriumacetat (Merck)

NaOH (Merck)

Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (Serva)

Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (Boehringer Mannheim)

α -Naphthylacetat (Serva)
Phosphorsäure (Merck)
Phenacimethosulfat, PMS (Roth)
Saccharose (Merck)
Sephadex G 200 (Amersham Pharmacia Biotech)
TEMED (Amersham Pharmacia Biotech)
Tris (Biomol)

Trägerampholyte (TA):

TA pH 3.5 – 10 (Pharmacia)
TA pH 4 – 6 (Merck)
TA pH 4 – 6.5 (Pharmacia)
TA pH 5 – 7 (Fluka)
TA pH 6 – 8 (Pharmacia)
TA pH 7 – 9 (Pharmacia)
TA pH 8 – 9.5 (Fluka)

Verbrauchsmaterial:

Zelluloseacetatfolie (CAF) 50 x 260 mm, (Biotech-Fischer)
DNA-Extraktions-Kit (Quiagen)
Electrode Strip (Amersham Pharmacia Biotech)
Gelfix for PAG 50 x 125 mm, (Serva)
Gelfix for Agarose 125 x 258 mm (Serva)
Gelbond-PAG-Film (FMC BioProducts)
IEF-sample application piece (Amersham-Pharmacia-Biotech)
Nylon transfer membrane (Hybond™-N⁺)
Whatman 3 – Papier

Enzyme:

Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* 820 U/mg Protein,
(Serva)
Proteinase-Lösung (Quiagen)
RNase (10mg/ml [Boehringer Ingelheim])
Taq-Polymerase (MWG-Biotech)

Oligonucleotidproben und Primer:

Die verwendeten Primerpaare wurden für die Untersuchung von Microsatellitenloci anderer Vogelarten beschrieben: *Parus caeruleus* (PK 12), *Parus atricapillus* (Pat 14, Pat 43), *Phylloscopus occipitalis* (Pocc 8).

Die Sequenzen der einzelnen Primer finden sich in Tabelle 26.

Tabelle 26: *Verwendete Oligonukleotidprimer für die PCR-Amplifikation der gleichnamigen Mikrosatelliten. Die Primer werden in hochgereinigtem Zustand geliefert und variieren in ihrer Länge zwischen 20 und 22 Basen.*

Oligos	Sequenz	Länge	Hersteller
PK12 direkt	5'-CCT CCT GCA GTT GCC TCC CG-3'	20	MWG-Biotech AG
PK12 revers	5'-CGT GGC CAT GTT TAT AGC CTG G-3'	22	MWG-Biotech AG
Pat14 direkt	5'-GAA CAG ATA AAG CCA AAT TAC-3'	21	MWG-Biotech AG
Pat14 revers	5'-TAG TGA ATG CTT GAT TTC TTT G-3'	22	MWG-Biotech AG
Pocc8 direkt	5'-GCA TGT CTC TTC AGA CAT CTG C-3'	22	MWG-Biotech AG
Pocc8 revers	5'-ATG TAG AGC TCC CAT GGT GG-3'	20	MWG-Biotech AG
Pat43 direkt	5'-ACA GGT AGT CAG AAA TGG AAA G-3'	22	MWG-Biotech AG
Pat43 revers	5'-GTA TCC AGA GTC TTT GCT GAT G-3'	22	MWG-Biotech AG

Danksagung

Ein grosser Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jost Kömpf, zum einen für die Überlassung des Themas, zum anderen aber für all die interessanten Gespräche, seine vielen guten Ratschläge und besonders dafür, dass er jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Ein weiteres grosses Dankeschön gebührt Herrn Prof. Dr. Jürgen Tomiuk, der mich streckenweise betreut hat und mir insbesondere bei allgemein statistischen Fragen wie auch bei speziell populationsgenetischen Fragestellungen gerne Antwort gab. Auch bei der Gliederung dieser Arbeit gab er hilfreiche Ratschläge.

Aus der Abteilung Allgemeine Humangenetik möchte ich mich außerdem noch bei Frau Annette Rebmann für die Einarbeitung in meine Labortätigkeiten bedanken und bei Hakan Esmer für die Hilfe beim Zusammentragen der letzten Rezepturen.

Ich möchte mich auch herzlich bei meinen Eltern Prof. Dr. Albert und Ingeborg Driesel bedanken, deren langjährige - und längst nicht bloss finanzielle - Unterstützung mir das Studium ermöglicht hat.

Schliesslich danke ich Frau Silke Bruntner, die die vorliegende Arbeit Korrektur gelesen hat und immer für mich da ist.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgesellschaft (Nr.: DFG To 151/2-1) unterstützt.

Curriculum vitae

- Name: Simon Peter Driesel
- Geburtsdatum/ Ort: 22. Juni 1978, Neuss am Rhein
- Schulbildung: 1984 - 1988 Viktoria-Grundschule in Kronberg
1988 - 1997 Bischof-Neumann-Gymnasium in Königstein,
Abitur im Juni 1997
- Wehrdienst: September 1997 – August 1998 im Sanitätsdienst der Bundeswehr
- Studium: Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
WS 98/99 bis SS 01
Ärztliche Vorprüfung am 28.08.2000
1. Staatsexamen am 28.08.2001
- Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
WS 01/02
- Auslandssemester: Humanmedizin, 3. Medizinische Fakultät der Karls-Universität Prag,
Tschechien
SS 02
- Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
WS 02/03 bis WS 04/05
2. Staatsexamen am 10.09.2003
3. Staatsexamen am 16.11.2004
- Publikationen:
- 1) Driesel, S., Bachmann, L., Stauss, M., Segelbacher, G., Flach, D., Tomiuk, J. und Kömpf, J.
High Genetic Variability of Esterase Loci in Natural Populations of *Parus major*, *P. caeruleus* and *P. ater*.
Biochem. Genet. (zur Publikation angenommen)
 - 2) Stauss, M., Tomiuk, J., Segelbacher, G., Driesel, S., Fietz, J., Bachmann, L. und Kömpf, J.:
Sex-specific recombination rates in *Parus major* and *P. caeruleus*, an exception from Huxley's rule.
Hereditas (zur Publikation angenommen)