

**„*The Decade Project*: Variabilität von Mikrosatelliten-Loci
in klonalen Linien ausgewählter *Daphnia*-Taxa über die Zeit“**

Protokoll zum Einarbeiten in die wissenschaftliche Arbeitstechnik

Ökologie und Evolution der Tiere

Juni/Juli 2006

Robert Kraus

Freiherr-vom-Stein-Straße 2

61194 Niddatal



Inhalt:

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. Zusammenfassung..... | 3 |
| 2. Einleitung..... | 3 |
| 3. Material und Methoden..... | 4 |
| 3.1 Versuchstiere..... | 4 |
| 3.2 DNA-Präparation..... | 4 |
| 3.3 Mikrosatelliten-Analyse..... | 5 |
| 4. Ergebnisse..... | 7 |
| 5. Diskussion..... | 9 |
| 6. Literatur..... | 13 |

1. Zusammenfassung: In dieser Arbeit werden erstmals Mutationsraten von Mikrosatelliten von *Daphnia*-Taxa aus der Klasse der Crustaceen vorgestellt. Es wurden zwölf Loci bei 27 Individuen über einen Zeitraum von 240 Generationen getestet, von denen 267 Klon/Locus-Kombinationen informativ waren und in denen an drei solcher Kombinationen Mutation beobachtet wurde. Gemittelt über alle Taxa und Loci wurde eine Rate von $2,34 \cdot 10^{-5}$ Mutationen pro Allel und Generation gefunden. Der Vergleich mit Mutationsraten anderer Organismen zeigt, dass die gefundene Rate durchaus in deren Größenordnung liegt. Am nächsten kommen sie den Raten, die bei Schweinen und Fruchtfliegen gefunden wurden.

2. Einleitung

Mikrosatelliten sind hoch repetitive DNA-Sequenzen, die in vielen Feldern der Biologie (Genkartierung, Populationsstudien, Vaterschaftstests, Verhaltensökologie, genomische Krebsforschung und forensische Identifikation) als molekulare Marker eingesetzt werden (Goldstein und Schlötterer 1999). Auch bei Taxa der Gattung *Daphnia* (Cladocera; Crustacea), einem weit verbreiteten Modellorganismus aus Ökologie und Ökotoxikologie, werden diese Marker seit ihrer Entwicklung (Ender et al. 1996) zur genetischen Charakterisierung eingesetzt. Spätestens seit der Etablierung einzelner Loci für verschiedene Artkomplexe der Gattung *Daphnia* (Colbourne et al. 2004, Fox 2004, Brede et al. 2006) sind sie ein wichtiges Element in vielen aktuellen limnologischen, populationsbiologischen und ökologischen Untersuchungen, die sich mit Daphnien beschäftigen.

Die in dieser Studie untersuchten Taxa gehören zur Untergattung *Hyalodaphnia*, für die in Brede et al. (2006) Mikrosatelliten vorgestellt wurden, die schon in zahlreichen anderen Untersuchungen eingesetzt wurden (unter anderem in den Diplomarbeiten von N. Brede, C. Sandrock, A. Thielsch, N. Meier und K. Heubach). In welchen Raten diese Marker mutieren, wurde allerdings noch nicht untersucht. Besonders bei ökologischen Experimenten, in denen klonale Linien anhand von Mikrosatelliten-Markern charakterisiert und danach manipuliert werden, ist es wichtig zu wissen, dass genetische Variation nach dem Experiment nicht auf zufällige Mutationen in schnell mutierenden Loci zurückzuführen ist.

Relativ wenige Untersuchungen zur Evolution und Mutation in Mikrosatelliten wurden bisher durchgeführt (Weber und Wong 1993, Nikitina and Nazarenko 2004, Sainudiin et al. 2004, Mayer und Kerth 2005). Diese bezogen sich meist auf wenige Taxa. Im gesamten Unterstamm der Crustaceen wurden bisher noch keine Untersuchungen dazu durchgeführt. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Mutationsrate von Mikrosatelliten-Loci in oft verwendeten Taxa der Gattung *Daphnia* und ist damit die erste, die dieses Marker-System

direkt experimentell getestet. Außerdem werden erstmals Daten zu Mutationsraten von Mikrosatelliten eines Taxons in der gesamten Großgruppe der Crustaceen vorgestellt.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die untersuchten Tiere stammen aus den Laborkulturen der AK Streit. Sie werden bei einer Photoperiode von 16 Stunden hell / 8 Stunden dunkel und 20°C in autoklaviertem Teichwasser gehalten, mit einer Algensuspension (*Scenedesmus obliquus*) gefüttert und bei Bedarf (etwa einmal im Monat oder seltener) einige Tiere in eine neue Kultur umgesetzt. Im Juni 1996 wurden zufällig Individuen verschiedener Linien *Daphnia cucullata*, *D. galeata* und einigen Hybriden aus diesen beiden Arten in 70 % Ethanol konserviert. Andere Individuen dieser Klone wurden unter gleich bleibenden Bedingungen weiter gehalten, bis zehn Jahre später wieder Individuen der jeweiligen Linien zur Untersuchung entnommen wurden. Bei einer angenommenen mittleren Generationszeit von 14 Tagen (persönliche Mitteilung K. Schwenk) und 120 Monaten Hälterung, macht das eine Generationenzahl von 240, die zwischen den konservierten Tieren von 1996 und denen von 2006 liegt. Tabelle 1 zeigt die verwendeten Klone und deren Taxonzugehörigkeit.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Klone: C = *D. cucullata*, G = *D. galeata*, C x G = Hybrid aus *D. galeata* und *D. cucullata*. Bei den Hybriden sind zusätzlich noch die Elternlinien (m = Männchen, w = Weibchen) vermerkt.

| Klon | 33 | 100 | G44 | K5 | GCL1 | X1 | X4 | X5 | X16 |
|-------|----|-----|-----|----|--------|--------|--------|--------|--------|
| Taxon | C | G | G | G | G x C | C x G | C x G | C x G | C x G |
| | | | | | 100(w) | 33(w) | 33(w) | 33(w) | 33(w) |
| | | | | | 33(m) | 100(m) | 100(m) | 100(m) | 100(m) |

3.2 DNA-Präparation

Lebende Tiere wurden je nach Größe in 30-100 µl H3-Puffer (1x: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 0,05 M Kaliumchlorid, 0,005 % Tween-20 und 0,005 % NP-40) überführt, mit 2 µl Proteinase K (10 µg/ml; Sigma Aldrich) versetzt und mindestens 4 Stunden oder über Nacht im Wasserbad (Schüttler) bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch Erhitzen auf 95-100°C für 12 Minuten. Die Proben wurden danach bei 4°C gelagert. Die Alkohol-Tiere von 1996 wurden vor der DNA-Präparation für mindestens 4 Stunden oder

über Nacht in 1 ml 1x TE-Puffer (10x: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) gegeben, um den Alkohol zu entziehen.

3.3 Mikrosatelliten-Analyse

Als genetische Marker wurden zwölf Mikrosatelliten-Loci (Brede et al. 2006) verwendet, die in Multiplex-PCRs amplifiziert wurden: SwiD 12, SwiD 6, SwiD 18 („grün“); Dp 281NB, SwiD 14, DaB 10/14 („blau1“); DaB 17/17, Dp 196NB („blau2“); Dgm 105, Dgm 109, Dgm 112 („schwarz“). Der Locus Dp 519 wurde einzeln amplifiziert. Die Farbstoffe zur Markierung der Primer waren folgende: Alexa 647 (Invitrogen) für die *forward*-Primer der Loci Dp 281NB, SwiD 14, DaB 10/14, DaB 17/17, Dp 196NB und Dp 519; Alexa 750 (Invitrogen) für die Primer der Loci Dgm 105, Dgm 109 und Dgm 112; IRD 700 (MWG) für die *forward*-Primer der Loci SwiD 6, SwiD 12 und SwiD 18.

Die Reaktionen wurden in 10 µl-Ansätzen durchgeführt: 2 µl präparierte DNA, 1x Amplifikationspuffer, 3 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTPs, 1 U/µl Taq-Polymerase (Invitrogen), 0,2 mg/ml BSA (NEB) und 1x DMSO (Roth). Mit Ausnahme des Locus Dp 281NB (0,1 µM) betrug die Konzentration der Primer je 0,2 µM. Das Restvolumen wurde mit destilliertem, sterilem Wasser aufgefüllt. Das Grundprogramm für die PCRs war folgendes (nach Brede et al. 2006): Vordenaturierung bei 95°C für 3 min; 35 Zyklen: Denaturierung bei 95°C für 1 min; Anlagerung für 1 min; Synthese bei 72°C für 1 min; Abschließende Synthese bei 72°C für 7 min. Die Anlagerungstemperaturen variierten zwischen den verschiedenen Ansätzen wie folgt: Multiplex „blau 1“, „grün“ und „schwarz“ 55°C, „blau 2“ 53°C. Die Amplifizierung des Locus Dp 519 wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Vordenaturierung bei 95°C für 3 min; 32 Zyklen: Denaturierung bei 95°C für 45 sec; Anlagerung bei 53°C für 45 sec; Synthese bei 72°C für 45 sec; Abschließende Synthese bei 72°C für 20 min. Als PCR-Maschinen wurden dabei für die Multiplex-PCRs „grün“, „blau1“ und „blau2“ die *DNA Engine Tetrad* (MJ Research) PTC-225 verwendet, für „schwarz“ die PTC-100 (MJ Research) und für den Locus Dp 519 die Maschine T3-Thermozykler (Biometra). Der Erfolg der PCR wurde durch Vergleich mit einem 100 bp Größenstandard (100 ng/µl, Invitrogen) stichprobenartig auf einem 1,4 %-igem TBE-Agarose-Gel überprüft (~ 20 Minuten in 1x TBE-Puffer (0,89 mM Bohrsäure, 0,98 mM Tris Base, 20 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Spannung von 130 V)). Dazu wurde jeweils 1 µl PCR-Produkt, versetzt mit 2 µl 6x Ladepuffer (Sigma), aufgetragen. Nach anschließender Färbung des Gels in einer

Ethidiumbromidlösung (0,5 µl/ml) für 10 min wurde es auf einem UV-Tisch durch Licht der Wellenlänge 320 nm zur Fluoreszenz angeregt und digital fotografiert. Die amplifizierten fluoreszenzmarkierten Mikrosatelliten wurden danach verdünnt, um bei der späteren Detektierung per Laser ein gleichmäßig starkes Signal möglichst aller Fragmente zu erhalten. Als Grundlage der Verdünnung dienen dabei die Abschätzung der Menge des PCR-Produktes anhand der Stärke der Banden sowie die unterschiedlich starke Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe: blau:grün:schwarz = 4:2:1. Es ergaben sich daraus in der Regel Verdünnungen im Bereich von 10-50x für blau, 1-10x für grün und 1-5x für schwarz. Die verdünnten PCR-Produkte wurden anschließend zu zwei Poolplex-Ansätzen („Poolplex 1“ und „Poolplex 2“) zusammengefasst. „Poolplex 1“ setzte sich aus „blau 1“ und „grün“ und „Poolplex 2“ aus „blau 2“ „schwarz“ und Dp 519 zusammen. Pro Ansatz wurden 1 µl der jeweiligen Verdünnungen und 1 µl je Standard 70plus und 180plus mit deionisiertem Formamid (mindestens 99,5 %, Sigma) auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt.

Die Größenstandards 70plus (70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 140 bp und 160 bp) und 180plus (180 bp, 220 bp, 280 bp und 340 bp) bezeichnen Mischungen, die aus mehreren Fragmenten definierter Länge bestehen. Die einzelnen Fragmente wurden mit fluoreszenzmarkierten *forward*-Primern und Lambda-DNA als Vorlage amplifiziert (Symonds und Lloyd 2004). Dafür wurde folgendes Standardprotokoll verwendet: je 2 µl Lambda-DNA (0,3 µg/200 µl; MBI Fermentas), 2,4 mM MgCl₂, 1x Amplifikationspuffer, 0,25 mM dNTPs und 0,5 U/µl Taq-Polymerase (Invitrogen). Für die Fragmente 70, 80, 90, 100, 140, 160 und 180 bp wurden 0,2 µl Primer und für die Fragmente 220, 280, 340 und 380 bp 0,1 µl Primer (Fluoreszenzmarkierung IRD 800, MWG; *reverse*-Primer, Invitrogen) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit sterilem dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Das PCR-Programm für die Amplifizierung der einzelnen Fragmente entspricht dem zuvor beschriebenen Mikrosatelliten-Programm nach Brede et al. (2006) (Anlagerungstemperatur aber 60°C). Nach einer visuellen Kontrolle mittels eines 1,4 %-igem Agarose-Gels und einem 100 bp Längenstandard wurden die Fragmente aufgereinigt (Pure LinkTM PCR Purification Kit, Invitrogen) und daraufhin in gleichen Anteilen zusammen pipettiert. Dann wurden die Konzentrationen der einzelnen Fragmente nach einer Analyse mit dem Sequenzierer CEQ 2000 (Beckman&Coulter) aufeinander abgestimmt, sodass die Fragmente der Größenstandards bei der späteren Laser-Detektion gleichmäßig starke Signale zeigten.

Der Ansatz von Mikrosatellitenfragmenten, Größenstandard und Formamid wurde mit dem Sequenzierer CEQ 2000 (Beckman&Coulter) mit dem Programm Frag-3 (Denaturierung bei 90°C für 2 min; Injektion bei 2,0 kV für 30 sec; Trennung bei 6,0 kV für 35 min) aufgetrennt und die einzelnen Fragmente währenddessen mit Hilfe des Lasers detektiert. Die Rohdaten wurden mit der Analysesoftware CEQ 8000 (Beckman&Coulter) automatisch ausgewertet und die erhaltenen Fragmentlängen anschließend in ein standardisiertes Excel-Format (Microsoft Corp.) übertragen.

4. Ergebnisse

Um festzustellen, ob der Ausgangsklon für die getesteten Loci homogen ist, also keine intraklonale Diversität bezüglich der Allele besteht, wurden zunächst von den 1996er Proben jeweils drei (Klon 100, 33, G44, GCL1, K5, X16, X5) bzw. vier (Klon X1, X4) Individuen pro Klon isoliert und die Fragmentlängen der untersuchten Loci bestimmt. Dabei konnte der Klon 33 aus bisher unbekanntem technischen Gründen nicht vollständig bearbeitet werden. Wir erhielten nur Daten der Loci Dp 281NB, SwiD 18, DaB 17/17, Dp 196NB und SwiD 6. Intraklonale Diversität wurde sicher im Klon X5 gefunden (Loci SwiD 12 und Dgm 105). Da die Ergebnisse in den Klonen K5 und GCL1 an den Loci Dp 519 (nur K5) und Dgm 105 sowie Dgm 109 nicht eindeutig waren, wurden auch diese Loci für diese Klone nicht weiter berücksichtigt. In Klon GCL1 konnten bisher für den Locus DaB 17/17 nur zwei der drei untersuchten Individuen sicher als gleich für diesen Locus identifiziert werden. Vorerst wurde dieser Locus an diesem Individuum dennoch in die Auswertung mit einbezogen.

Von den 2006er Proben wurden von allen Klonen jeweils drei Individuen getestet. Zusätzlich zu den Einschränkungen, die sich schon aus den 1996er Proben ergeben (Nichtberücksichtigung bestimmter Klon/Locus-Kombinationen), konnte hier bei folgenden Klon/Locus-Kombinationen keine weitere Auswertung vorgenommen werden, da die Ergebnisse fehlten oder nicht eindeutig waren: K5, Loci Dgm 105 und Dgm 109 (Ausfall des jeweils dritten Individuums); X4, Locus Dgm 109; GCL1, Locus Dp 281NB (keine eindeutigen Ergebnisse für die jeweiligen Klon/Locus-Kombinationen); G44, Loci Dgm 105, Dgm 112, Dp 196NB, SwiD 14 (Ausfall des jeweils dritten Individuums). Eine Zusammenfassung der jeweils berücksichtigten Klon/Locus-Kombinationen gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht über die ausgewerteten Klon/Locus-Kombinationen. Für jede Kombination ist die Anzahl der ausgewerteten 2006er Individuen angegeben.

| | Dp 281NB | SwiD 18 | DaB 17/17 | SwiD 12 | Dgm 112 | Dp 196NB | SwiD 6 | Dp 519 | SwiD 14 | Dgm 105 | DaB 10/14 | Dgm 109 |
|------|------------|---------|-----------|---------|---------|----------|--------|--------|---------|-------------|-----------|---------|
| 100 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 33 | 2** | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G44 | 3 | 3 | 3* | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| GCL1 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| K5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| X1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| X16 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| X4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3*** | 3 | 0 |
| X5 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 |

0 = keine Auswertung für diese Klon/Locus-Kombination.

* = Eines der drei Individuen war homozygot für diesen Locus, obwohl die beiden anderen und der 1996er Ausgangsklon heterozygot waren.

** = Beide Individuen sind homozygot, obwohl der 1996er Ausgangsklon heterozygot war.

*** = Alle drei Individuen sind homozygot, obwohl der 1996er Ausgangsklon heterozygot war.

Es wurden an drei Klon/Locus-Kombinationen Veränderungen beobachtet (Tabelle2):

Locus DaB 17/17 bei Klon G44: Der Ausgangsklon von 1996 war an diesem Locus heterozygot für die beiden Allellängen 101 bp (Basenpaare) und 107 bp. Von den drei untersuchten Individuen aus 2006 waren zwei heterozygot für diese Allele, aber eines homozygot für das Allel 101 bp.

Locus Dp 281NB bei Klon 33: Der Ausgangsklon war an diesem Locus heterozygot für die beiden Allellängen 71 bp und 72 bp, aber von den 2006er Individuen waren beide getesteten Individuen homozygot für das Allel 72 bp.

Locus Dgm 105 bei Klon X4: Der Ausgangsklon war an diesem Locus heterozygot für die beiden Allellängen 178 bp und 195 bp, aber von den 2006er Individuen waren alle drei getesteten Individuen homozygot für das Allel 195 bp.

Insgesamt wurden also 267 Klon/Locus-Kombinationen getestet, die auf einer Geschichte von 240 Generationen beruhen. Die Locusgenerationenzahl L beträgt damit $267 * 240 = 64080$. Da Daphnien diploid sind, also immer zwei Allele pro Locus haben, ergibt sich daraus eine Allelgenerationenzahl A von $2 * 64080 = 128160$. Bei gefundenen drei Mutationen auf jeweils nur einem Allel ist die Locusmutationsrate pro Generation $m_L = 3 / 64080 = 4,68 * 10^{-5}$ und die Allelmutationsrate $m_A = 3 / 128160 = 2,34 * 10^{-5}$ (verändert nach Vazquez et al. 2000 und Yue et al. 2002).

5. Diskussion

Aufgrund der relativ kurzen Zeit und einigen Schwierigkeiten bei der praktischen Arbeit konnten nicht alle untersuchten Klon/Locus-Kombinationen ausgewertet werden. Die Daten zeigen aber durchaus interessante Ergebnisse. Bisher ist es die erste Studie zu Mikrosatelliten-Mutationsraten nicht nur bei Daphnien, sondern in dem gesamten Unterstamm der Crustaceen. Auch die Anzahl der Generationen (240) ist so hoch wie bei den wichtigsten bisher durchgeführten Studien zu diesem Thema bei Eukaryoten (*Drosophila melanogaster*: Schlötterer et al. 1998, 250 Generationen; Schug et al. 1998, 230 Generationen). Bisher untersuchte Mikrosatelliten-Mutationsraten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die in dieser Studie untersuchten Arten und Hybride der Gattung *Daphnia* (Cladocera; Crustacea) zeigen mit $2,34 * 10^{-5}$ Mutationen pro Allel und Generation eine mit anderen Organismen durchaus

Tabelle 3: Gefundene Mutationsraten bei anderen Organismen.

| Organismus | Mutationsrate | Bemerkungen | Quelle |
|-----------------------|------------------|---------------------|-------------------------------|
| <i>Daphnia sp.</i> | $2,34 * 10^{-5}$ | gemittelt über Loci | diese Studie |
| <i>Drosophila sp.</i> | $6,3 * 10^{-6}$ | gemittelt über Loci | Schug et al. 1997 |
| | $5,1 * 10^{-6}$ | gemittelt über Loci | Vazquez et al. 2000 |
| | $9,3 * 10^{-6}$ | gemittelt über Loci | Schug et al. 1998 |
| | $6,3 * 10^{-6}$ | gemittelt über Loci | Schlötterer et al. 1998 |
| <i>Apis sp.</i> | 10^{-4} | gemittelt über Loci | Moritz et al. 2003 |
| <i>Hirudo sp.</i> | $1,9 * 10^{-2}$ | gemittelt über Loci | Brohede et al. 2004 |
| <i>Mus sp.</i> | 10^{-2} | je nach Locus | |
| | 10^{-3} | je nach Locus | Dallas 1992 |
| | 10^{-4} | je nach Locus | |
| <i>Ovis sp.</i> | $1,1 * 10^{-4}$ | gemittelt über Loci | Crawford and Cuthbertson 1996 |
| <i>Sus sp.</i> | $8 * 10^{-5}$ | gemittelt über Loci | Ellegren 1995 |
| <i>Homo sp.</i> | $5 * 10^{-4}$ | gemittelt über Loci | Weber and Wong 1993 |
| <i>Triticum sp.</i> | 10^{-4} | gemittelt über Loci | Thuillet et al. 2002 |

vergleichbare Mutationsrate. Außer bei Säugetieren, Insekten und Vögeln gibt es leider keine Vergleiche. Die den Daphnien nächsten Taxa, die auf Mikrosatelliten-Mutationsraten hin untersucht wurden sind *Drosophila melanogaster* und *Apis mellifera* als Vertreter der Arthropoden (Klasse Insecta, Unterstamm Chelicerata). Sie zeigen Raten von 10^{-6} bei *Drosophila sp.* bis 10^{-4} bei *Apis sp.*. Mit einer Mutationsrate von 10^{-5} entspricht *Daphnia sp.* daher in etwa den Erwartungen, wobei in zahlreichen Studien festgestellt wurde, dass die Mutationsraten von Mikrosatelliten sich nicht nur von Art zu Art, sondern auch von Locus zu Locus (Dallas 1992, Schlötterer et al. 1998, Schug et al. 1998, Thuillet et al. 2002) und von Kolonie zu Kolonie (bei Schwalben) unterscheiden (Brohede et al. 2004). Das Ergebnis dieser Studie kann also höchstens ein Startpunkt sein, um die Rahmenbedingungen abzustecken, in der der vorliegende Datensatz erweitert werden kann. Wir konnten in nur drei von zwölf Mikrosatelliten nur jeweils eine Mutation nachweisen. In anderen Untersuchungen wurde eine Abhängigkeit der Mutationsrate von der Größe des Locus festgestellt – größere Loci mutierten schneller als kleinere (Schlötterer et al. 1998, Schug et al. 1998, Wierdl et al. 1997). Darauf gibt es in dieser Studie noch keine Hinweise. Außerdem scheint die Art des Mikrosatelliten in Bezug auf das Motiv (Mono- bis Hexanukleotide) und die Wiederholungszahl einen Einfluss auf die Mutationsrate zu haben (Ellegren 2000, Schlötterer 2000). Die Modelle zur Evolution der Mikrosatelliten sind noch nicht ausgereift, obwohl aber bekannt ist, dass durch Mechanismen wie *stepwise mutation model* oder *DNA-slippage* jeweils immer ein ganzes Motiv verloren oder hinzugewonnen wird (Sainudiin et al. 2004, Lai und Sun 2003). Dieser Umstand macht es möglich, die Art der Mutation an dem entsprechenden Locus genauer zu betrachten. Die in dieser Studie beobachteten Mutationen

fanden an den Loci Dp 281NB, DaB 17/17 und Dgm 105 statt. Diese Loci haben jeweils als Sequenzmotive T_{10} , T_9 (Mononukleotid-Wiederholung) und $(CAG)_8AG$ (Trinukleotid-Wiederholung mit einem einzelnen angehängten Dinukleotid) (Brede et al. 2006). Das bedeutet, dass bei den beiden erstgenannten jede Basenzahl von Mutationen prinzipiell möglich ist, aber bei Dgm 105 immer durch drei teilbare Mutationsschritte erwartet werden. Es wurde aber eine Verkleinerung des Locus Dgm 105 um 17 bp beobachtet. Es könnten also z.B. nur 15 oder 18 bp verloren gehen. Da aber hinter der letzten Wiederholung noch mal ein AG kommt, das zum Motiv und nicht zur Flankenregion zählt, könnte die Mutation dennoch im Sequenzmotiv des Mikrosatelliten liegen. Eine alternative Erklärung dieser Mutation, die sich nicht mit dem Sequenzmotiv deckt, ist eine zusätzliche Mutation in der Flankenregion. Dies ist zwar unwahrscheinlich, da man aus Untersuchungen von Fischen weiß, dass die Flankenregionen stark konserviert sind (Rico et al. 1996), aber nicht unmöglich. Um auch diese Umstände zu klären, ist bei der Fortführung der Studie die Sequenzierung jedes Locus nötig, an dem eine Mutation beobachtet wurde.

Eine besondere Beobachtung bei den drei Mutationen ist, dass die im Datensatz von 1996 als heterozygot klassifizierten Individuen genau auf die Länge des zweiten Allels mutiert sind. Auch hier ist die Stichprobe noch nicht ausreichend groß, um genauere Schlüsse zu ziehen, es bieten sich aber durch diese Beobachtung Alternativhypothesen an, die die beobachteten Veränderungen erklären. Der Verlust der Heterozygotie ist ein Merkmal der genetischen Drift, die in kleinen Populationen sich sexuell vermehrenden Organismen zum Verlust von Allelen führt. Unter den Kulturbedingungen im Labor vermehren sich die Daphnien asexuell. Selten kann es aber auch vorkommen, dass sich sexuelle Stadien ausbilden (A. Thielsch, persönliche Mitteilung). Dabei kann durch Meiose und Rekombination genetische Drift wirken.

Da auffällig ist, dass die Mutationen immer in Richtung des anderen Allels gingen, kommt auch unter asexuellen Bedingungen noch eine dritte Hypothese in Betracht: Genkonversion. Dabei können sich auch unter mitotischen Bedingungen die (fast) homologen Sequenzen der Allele aneinander lagern und werden dann durch DNA-Reparaturmechanismen abgeglichen (Alberts et al. 2004). Im Zusammenhang mit Mikrosatelliten wurde dieser Mechanismus bereits in Urquhart et al. (1994) sowie in Nikitina und Nazarenko (2004) diskutiert und in Minisatelliten beobachtet (Jeffreys et al. 1994).

Um die beschriebenen Unklarheiten zu lösen, muss in der Weiterführung der Studie folgendes beachtet werden: Die genetische Charakterisierung der Ausgangsklone von 1996 muss möglichst vollständig weiter ausgebaut werden, um auch die Klon/Locus-Kombinationen interpretieren zu können, die schon 1996 nicht homogen waren. Es muss von den 2006er Tieren eine deutlich größere Menge an Individuen isoliert werden, um auch Mutationen in den anderen Loci zu finden. Eine Erhöhung der Individuenzahl pro Klon von drei auf zehn würde bereits zu einer Erhöhung der Allelgenerationenzahl A von 128160 auf 518400 führen. Wie beschrieben können starke Unterschiede in den Mutationsraten zwischen den Loci bestehen, was zur Auswahl der Loci in der praktischen Anwendung in den populationsbiologischen und ökologischen Fragestellungen wichtig sein kann. Auch in den oben beschriebenen Arbeiten an anderen Taxa ist zu bemängeln, dass die statistischen Analysen Konfidenzintervalle immer in der Größenordnung von \pm einer ganzen Zehnerpotenz lagen.

Da nicht alle Arten in der Studie die gleiche Vermehrungsrate haben (A. Thielsch, persönliche Mitteilung), wurde zunächst eine Generationszeit von durchschnittlich 14 Tagen angenommen. Es sollte aber experimentell untersucht werden, wie schnell sich welche Klone unter den Laborbedingungen vermehren. Außerdem könnte getestet werden, ob sich z.B. durch Anheben der Hälterungstemperatur die Generationszeit verkürzen lässt, was für künftige Studien interessant sein kann. Nur durch das Aufschlüsseln nach Generationszeiten, Klonen und Loci können sinnvoll verwertbare Informationen bezüglich der Mutationsraten gesammelt und statistisch verwertet werden. Abhängigkeiten von Sequenzmotiven, Motivwiederholungen, Fragmentlänge und der jeweiligen Art können so einzeln analysiert werden und bieten einen großartigen Ansatz, diese schon oft eingesetzten genetischen Marker eingehend zu testen und die Ergebnisse der populationsbiologischen und ökologischen Untersuchungen der vergangenen Jahre weiter zu untermauern. Zusätzlich können mit dem bestehenden Datensatz sowie den zur Verfügung stehenden Proben Analysen zum Mutationsverhalten der Mikrosatelliten in Hybriden (Klone GCL1, X1, X4, X5 und X16) durchgeführt werden.

6. Literatur

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2004. Molekularbiologie der Zelle, 4th edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim.
- Brede, N., A. Thielsch, C. Sandrock, P. Spaak, B. Keller, B. Streit, and K. Schwenk. 2006. Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* **6**:536-539.
- Brohede, J., A. P. Moller, and H. Ellegren. 2004. Individual variation in microsatellite mutation rate in barn swallows. *Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis* **545**:73-80.
- Colbourne, J. K., B. Robison, K. Bogart, and M. Lynch. 2004. Five hundred and twenty-eight microsatellite markers for ecological genomic investigations using *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* **4**:485-490.
- Crawford, A. M., and R. P. Cuthbertson. 1996. Mutations in sheep microsatellites. *Genome Research* **6**:876-879.
- Dallas, J. F. 1992. Estimation Of Microsatellite Mutation-Rates In Recombinant Inbred Strains Of Mouse. *Mammalian Genome* **3**:452-456.
- Ellegren, H. 1995. Mutation-Rates At Porcine Microsatellite Loci. *Mammalian Genome* **6**:376-377.
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends In Genetics* **16**:551-558.
- Ender, A., K. Schwenk, T. Stadler, B. Streit, and B. Schierwater. 1996. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Molecular Ecology* **5**:437-441.
- Fox, J. A. 2004. New microsatellite primers for *Daphnia galeata mendotae*. *Molecular Ecology Notes* **4**:544-546.
- Goldstein, D. B., and C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Jeffreys, A. J., K. Tamaki, A. Macleod, D. G. Monckton, D. L. Neil, and J. A. L. Armour. 1994. Complex Gene Conversion Events In Germline Mutation At Human Minisatellites. *Nature Genetics* **6**:136-145.
- Lai, Y. L., and F. Z. Sun. 2003. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology And Evolution* **20**:2123-2131.
- Mayer, F., and G. Kerth. 2005. Microsatellite evolution in the mitochondrial genome of Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Journal Of Molecular Evolution* **61**:408-416.
- Moritz, R. F. A., H. Scharpenberg, H. M. G. Lattorff, and P. Neumann. 2003. A technical note for using microsatellite DNA analyses in haploid male DNA pools of social Hymenoptera. *Insectes Sociaux* **50**:398-400.
- Nikitina, T. V., and S. A. Nazarenko. 2004. Human microsatellites: Mutation and evolution. *Russian Journal Of Genetics* **40**:1065-1079.
- Rico, C., I. Rico, and G. Hewitt. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **263**:549-557.
- Sainudiin, R., R. T. Durrett, C. F. Aquadro, and R. Nielsen. 2004. Microsatellite mutation models: Insights from a comparison of humans and chimpanzees. *Genetics* **168**:383-395.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**:365-371.
- Schlötterer, C., R. Ritter, B. Harr, and G. Brem. 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology And Evolution* **15**:1269-1274.

- Schug, M. D., C. M. Hutter, K. A. Wetterstrand, M. S. Gaudette, T. F. C. Mackay, and C. F. Aquadro. 1998. The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology And Evolution* **15**:1751-1760.
- Schug, M. D., T. F. C. Mackay, and C. F. Aquadro. 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* **15**:99-102.
- Symonds, V. V., and A. M. Lloyd. 2004. A simple and inexpensive method for producing fluorescently labelled size standard. *Molecular Ecology Notes* **4**:768-771.
- Thuillet, A. C., D. Bru, J. David, P. Roumet, S. Santomi, P. Sourdille, and T. Bataillon. 2002. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp durum desf. *Molecular Biology And Evolution* **19**:122-125.
- Urquhart, A., C. P. Kimpton, T. J. Downes, and P. Gill. 1994. Variation In Short Tandem Repeat Sequences - A Survey Of 12 Microsatellite Loci For Use As Forensic Identification Markers. *International Journal Of Legal Medicine* **107**:13-20.
- Vazquez, J. F., T. Perez, J. Albornoz, and A. Dominguez. 2000. Estimation of microsatellite mutation rates in *Drosophila Melanogaster*. *Genetical Research* **76**:323-326.
- Weber, J. L., and C. Wong. 1993. Mutation Of Human Short Tandem Repeats. *Human Molecular Genetics* **2**:1123-1128.
- Wierdl, M., M. Dominska, and T. D. Petes. 1997. Microsatellite instability in yeast: Dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* **146**:769-779.
- Yue, G. H., P. Beeckmann, and H. Geldermann. 2002. Mutation rate at swine microsatellite loci. *Genetica* **114**:113-119.