



Wolfsforschung im Molekularlabor

Senckenberg ist nationales Referenzzentrum für Wolfsgenetik

von Verena Harms, Katharina Steyer, Christiane Frosch & Carsten Nowak

Seit mehr als zehn Jahren gibt es wieder Wölfe in Deutschland. Diese Wiederbesiedlung Mitteleuropas wurde noch bis vor Kurzem von vielen für unmöglich gehalten. Um mehr über diese faszinierenden Tiere zu erfahren, werden bei Senckenberg moderne molekulargenetische Verfahren etabliert und weiterentwickelt. Die Forschungsergebnisse sind ein wichtiger Baustein für ein wissenschaftlich fundiertes Wildtiermanagement.

Um mehr über diese faszinierenden Tiere und ihre bis vor Kurzem für unmöglich gehaltene Wiederbesiedlung Mitteleuropas zu erfahren, werden bei Senckenberg moderne molekulargenetische Verfahren etabliert, mit denen bereits wichtige und teils überraschende Erkenntnisse gewonnen werden konnten. Der Beitrag stellt die wildtiergenetische Forschung bei Senckenberg am Beispiel des Wolfes vor und zeigt die faszinierenden Möglichkeiten, die durch neue Technologien in der Natur- und Wildtierforschung eröffnet werden.

Referenzzentrum für Wolfsgenetik gesucht

Wildkatze, Luchs und Wolf erobern auf leisen Sohlen verloren gegangenes Terrain zurück. Sie treffen dabei auf Menschen, die seit Generationen keine Übung mehr haben im Umgang mit größeren Beutegreifern. Spätestens mit der Rückkehr der Wölfe in die Lausitz wurde den Verantwortlichen klar, dass in Deutschland ein effektives Wildtiermanagement nötig ist, um ein harmonisches Miteinander von Mensch und Tier zu ermöglichen. Molekulargenetische



Abb. 1
Sterile Tupfer eignen sich zur genetischen Probennahme.
Foto: Katharina Steyer.

Untersuchungen sind ein wichtiger Bestandteil der notwendigen Erhebungen. Das Bundesamt für Naturschutz (BfN) untersuchte aus diesem Grund, wie man ein nationales Referenzzentrum für genetische Untersuchungen von Großraubtieren einrichten könnte.

Erfolg für Senckenberg

Im Rahmen des Vorhabens „Grundlagen für Managementkonzepte für die Rückkehr von Großraubtieren – Rahmenplan Wolf“ (Kaczynsky et al. 2009), wurden deshalb mehrere geeignet erscheinende Institute aufgefordert, sich um die Empfehlung als Referenzzentrum zu bewerben. Im Oktober 2009 folgte die Länderarbeitsgemeinschaft Naturschutz (LANA) dann der Empfehlung des BfN und beschloss, das Senckenberg Forschungsinstitut als „Nationales Referenzzentrum für genetische Untersuchungen bei Luchs und Wolf“ zu nutzen.

Wer war es? – Analysen bringen Klarheit

Kurz nach Bekanntgabe des Beschlusses wurden auch schon die ersten Proben in das Labor nach Gelnhausen eingekommen. Im Januar 2010 war im Landkreis Höxter (Nordrhein-Westfalen) ein Schaf gerissen worden. In der Nähe fand man Haare des mutmaßlichen Beutegreifers. Sie enthielten genug genetisches Material für eine Untersuchung der so genannten mitochondrialen DNA (mtDNA). Dabei wird nicht die Erbsubstanz (DNA) der Zellkerne untersucht, sondern die der Mitochondrien – jener Organellen, in denen die Zellatmung stattfindet. Mitochondrien haben eine eigene DNA, die in Gewebeproben in mehr Kopien vorhanden ist als die DNA der Zellkerne.

Bei der mitochondrialen Sequenzanalyse wird die Abfolge der Basen (A, T, G, C) eines Abschnitts der DNA aus dem Mitochondrium mit denen anderer Tiere verglichen. Man

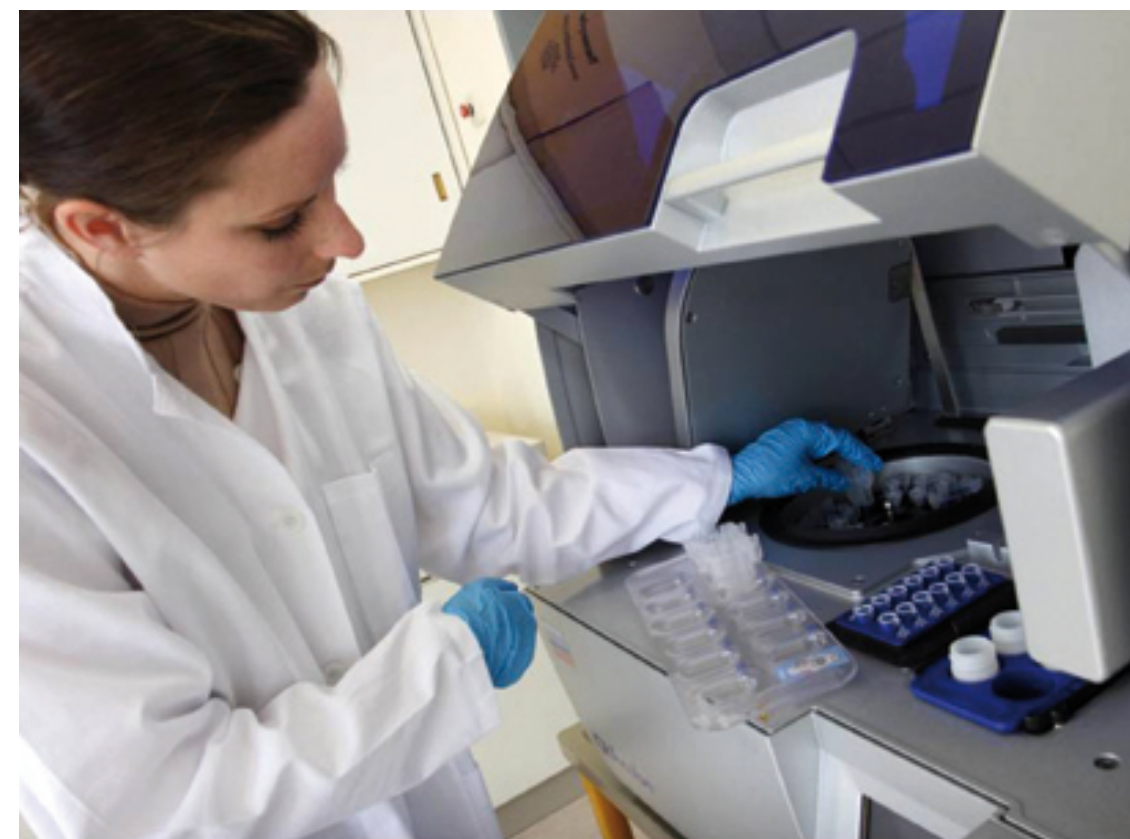


Abb. 2
Die Bearbeitung der DNA-Proben erfolgt in einem speziell eingerichteten Labor.
Foto: Natalie Becker.

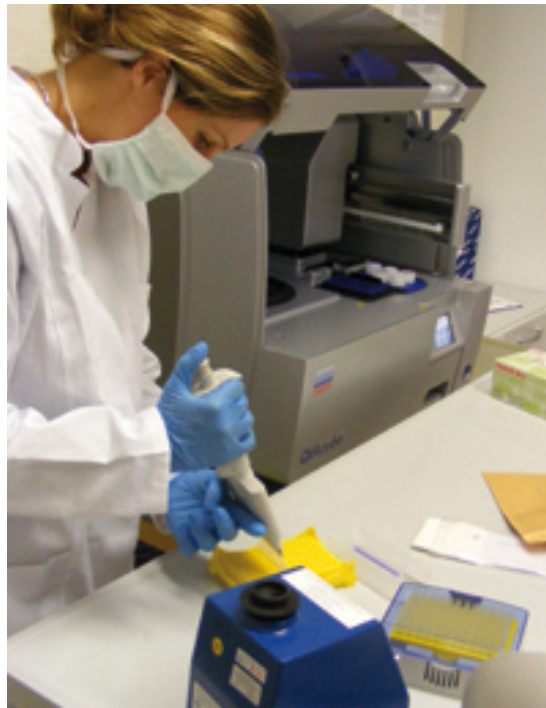


Abb. 3–6
Oben: Wildtiergenetiker kommen nur selten so nah mit ihren Studienobjekten in Kontakt wie hier, beim Entnehmen einer Speichelprobe in einem Wildpark (li.). Foto: Susanne Carl.

Kotproben von Wölfen werden im Gelände gesammelt (re.). Foto: Carina Wagner.

Unten: Im Wolfskot enthaltene Zellen aus der Darmwand ermöglichen die genetische Analyse im Labor (re.). Foto: Natalie Becker.

Das Tragen der Schutzkleidung verringert Kontaminationsrisiken bei der Bearbeitung der DNA-Proben (li.). Foto: Katharina Steyer.

hat dadurch sozusagen ein „genetisches Trittsiegel“ an dem man erkennen kann, zu welcher Art das Individuum gehört. Im Falle des Risses von Höxter lautete die Frage: War es ein Hund oder ein Wolf? Die DNA-Analyse brachte Klarheit: Das Schaf war in der Tat einem Wolf zum Opfer gefallen.

Woher kommt der Wolf?

Natürlich warf diese Erkenntnis sofort die Frage auf, aus welcher Population der Wolf wohl stamme. Um das zu klären, musste eine detailliertere Methode angewendet werden. Man suchte sozusagen nach dem genetischen Fingerabdruck, um ein einzelnes Individuum, nicht nur die Art, sicher bestimmen zu können. Dazu führte man mit den gefundenen Wolfshaaren eine so genannte Mikrosatellitenanalyse durch.

Mikrosatelliten sind kurze, hochvariable DNA-Abschnitte, in denen ein kurzes Sequenzmuster mehrfach hintereinander wiederholt ist (Abb. 9). Bei unterschiedlichen Individuen schwankt die Anzahl der Wiederholungen für jeden Gen-

ort (Locus) sehr deutlich. Betrachtet man mehrere Genabschnitte, so kann man selbst nah verwandte Individuen zuverlässig unterscheiden. Bekannt sind derartige DNA-Profile durch die routinemäßige Anwendung in der Kriminalistik oder bei Vaterschaftstests (Abb. 11).

Mikrosatelliten für den genetischen Fingerabdruck

Für die Analyse der Wolfshaare wurden 15 hochvariable Mikrosatellitenmarker verwendet, um den genetischen Fingerabdruck zu erstellen. Es stellte sich heraus, dass der Wolf aus der sächsisch-polnischen Populationslinie stammt (Abb. 16).

Zudem war das Tier nicht unbekannt. Drei Kotproben der Jahre 2008 und 2009 aus dem einige Kilometer entfernten Reinhardswald hatten das gleiche genetische Profil (Abb. 10). Bei dem in Nordrhein-Westfalen aufgetauchten Räuber handelte es sich also eindeutig um den „Reinhardswolf“, der bereits vor einigen Jahren nach Hessen eingewandert war.



Abb. 7
Potenzielle Wanderrouten der beiden in Hessen nachgewiesenen Wölfe.

Kürzlich entdeckte Überreste eines wolfsähnlichen Tieres in dieser Gegend lassen leider vermuten, dass dieser Wolf Anfang des Jahres verendet sein könnte. Die genetische Bestätigung steht derzeit noch aus; Senckenberg liegen jedoch Proben vor, deren Bearbeitung Klarheit bringen wird.

Noch ein Wolf in Hessen?

In Mittelhessen sorgte Anfang des Jahres die Aussage einer Autofahrerin aus Pohlheim bei Gießen für Aufsehen. Sie war sich sicher, einen Wolf angefahren zu haben. Am Kühlergrill des beschädigten PKW der jungen Frau fand die Polizei dann auch wirklich drei kleine Haarfragmente. Diese wurden zur genetischen Analyse in das Molekularlabor nach Gelnhausen eingeschickt. Nach wenigen Tagen stand das Ergebnis fest: In Hessen hielten sich nun zwei Wölfe auf. Die Auswertung der mitochondrialen DNA brachte ein weiteres überraschendes Ergebnis. Der angefahrene Wolf gehörte genetisch zur italienischen Linie, die sich seit den 1990er Jahren langsam im westlichen Alpenraum aus-

breitet. Diese über längere Zeit isolierte Linie trägt eine genetisch eindeutige Signatur, die bisher nie bei Hunden oder Wölfen anderer Regionen festgestellt wurde. Da der Reinhardswolf dagegen aus der polnisch-westdeutschen Population stammt, ist Hessen die erste Region Europas, wo diese beiden unterschiedlichen Linien wieder aufeinander treffen könnten (Abb. 7).

Es sind zwar meist die Rüden, die auf der Suche nach Partnern über weite Strecken in neue Gebiete einwandern. Doch die Ergebnisse belegen, dass diese voneinander isolierten Linien wieder in genetischen Austausch treten können. Der Aktionsradius der Wölfe ist dafür groß genug.

Proben sammeln ohne zu stören

Es ist nur eine Frage der Zeit, bis diese faszinierenden Tiere auch den Westen Deutschlands wieder erobert haben (Ansorge et al. 2011). Will man wissen, wohin sich die Wölfe demnächst ausbreiten könnten und wie sich die Bestände entwickeln,

muss man die Tiere systematisch beobachten. Ein gezieltes genetisches Monitoring der Wölfe erfordert mehr als den zufälligen Nachweis einzelner Tiere. Wölfe sind scheue Tiere. In der Regel wird man ihnen nicht ohne weiteres für Untersuchungen habhaft. Allerdings hinterlassen sie vielerlei Spuren und Markierungen in ihrem Revier, die auch für molekulargenetische Analysen genutzt werden können. Es handelt sich dabei um Losungen, Haare, Urinspuren im Schnee und Speichelreste an

Rissen. Diese „Hinterlassenschaften“ können gesammelt werden, ohne die Tiere zu stören. Deshalb bezeichnet man solche als nicht-invasiv gewonnene Proben (Abb. 5).

In Gelnhausen werden derzeit über 600 solcher nicht-invasiv gesammelten Proben analysiert. Als Referenzen wurden über 100 Proben von Hunden und Gehegewölfen gesammelt und bearbeitet. Woche für Woche kommen weitere Pro-

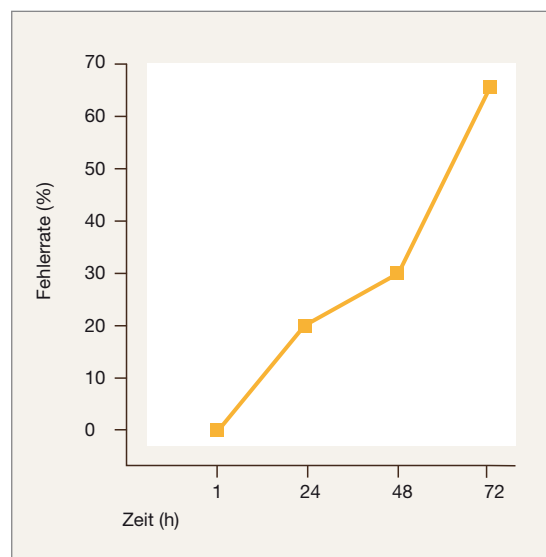
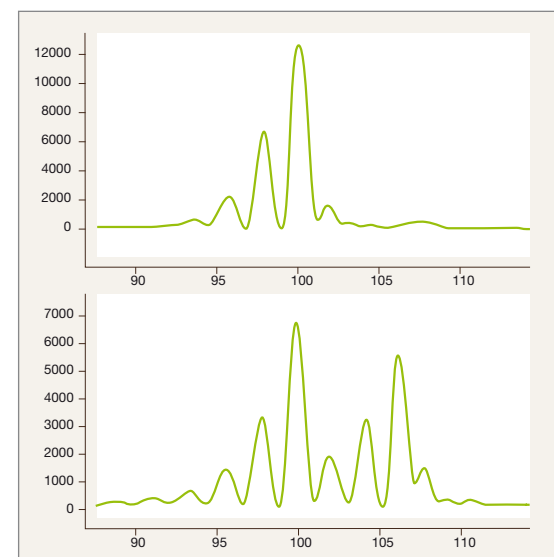


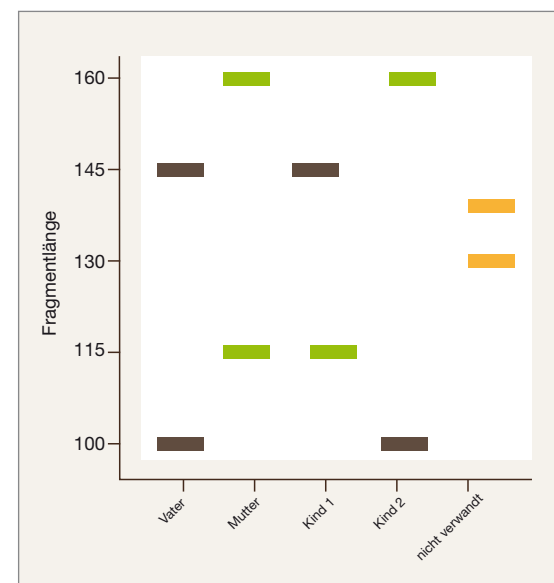
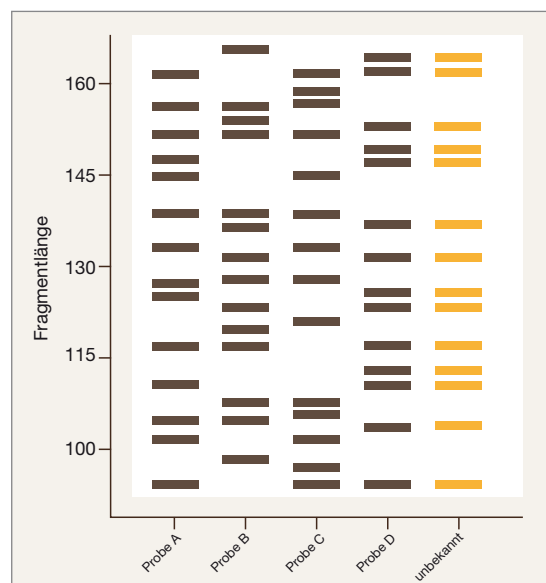
Abb. 8–11
Oben links: Ergebnisse der Fehlerratenanalyse: Nach 48 Stunden ist die Fehlerrate bereits sehr hoch, nach 72 Stunden ist eine Auswertung nicht mehr möglich.



Oben rechts: Elektropherogramm von Mikrosatellitenanalysen. Anhand der Ausschläge können die Forscher den Genotypen einer Probe bestimmen.

Unten links: Genetisches Profil von vier unterschiedlichen Individuen. Die unbekannte Probe weist denselben Genotypen wie Probe D auf und ist somit vom selben Individuum.

Unten rechts: Mikrosatellitenanalyse ermöglicht Verwandtschaftstest. Ein Nachkomme muss je ein Allel der Mutter (grün) sowie des Vaters (schwarz) tragen.



Exkurs: Weitere Arten im Fokus der Wildtiergenetik

Der Eurasische Luchs

In dem wildtiergenetischen Labor in Gelnhausen werden neben dem Wolf noch weitere Beutegreifer erforscht, die sich gegenwärtig wieder in Mitteleuropa ausbreiten. Durch strenge Schutzmaßnahmen und Wiederansiedlungsprojekte, wie in Tschechien, der Schweiz und Deutschland (Harz, Bayerischer Wald) konnte auch der Luchs (*Lynx lynx*) in einigen Waldgebieten wieder heimisch werden. Leider ist die Beschaffung genetischen Probenmaterials bei Luchsen im Gegensatz zum Wolf ungleich schwieriger, da Luchse neben ihrer extrem heimlichen Lebensweise ihre Losung verscharren.



Die Europäische Wildkatze

Die Wildkatze (*Felis s. silvestris*) gilt als Leitart für die Artengemeinschaft unzerschnittener, strukturreicher Laub- und Mischwälder. Im Gegensatz zum Wolf konnte die Wildkatze in einigen Teilen Deutschlands trotz der intensiven Bejagung überleben und gilt heute durch die fortschreitende Lebensraumzerschneidung als stark gefährdet. Seit 2006 erforschen Wissenschaftler des Senckenberg-Instituts in Gelnhausen anhand von Haarproben in Kombination mit genetischen Methoden die aktuelle Verbreitung der deutschen Wildkatzenbestände (Nowak und Steyer 2009). So konnten mittlerweile in zahlreichen Regionen, zum Beispiel in der Rhön, dem Vogtland und dem Nationalpark Kellerwald wieder Wildkatzen nachgewiesen werden (Nowak et al. 2009).



Der Braunbär

Seit 2009 arbeitet Senckenberg zusammen mit der Zoologischen Gesellschaft Frankfurt an einem Projekt über Braunbären (*Ursus arctos*) in Bulgarien. Auch bei dieser Studie werden nicht-invasive Proben wie Haare und Kot im Freiland von Mitarbeitern der bulgarischen Umweltorganisation Balkani Wildlife gesammelt. Über molekulargenetische Analysen können wichtige Basisdaten zu Bestandsgrößen, der Lage von Wanderkorridoren und dem Grad an genetischer Isolation einzelner Populationen gewonnen werden (Frosch et al. 2011a, 2011b).



Abb. 12–14
Neben dem Wolf die Hauptuntersuchungsobjekte: Luchs, Wildkatze (Fotos: Katharina Steyer) und Braunbär (Foto: Christiane Frosch).

Abb. 15
Die DNA-Konzentration kann bei der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.
Foto: Natalie Becker.



ben hinzu. Der Großteil von ihnen sind Kotproben aus den bekannten Wolfsterritorien. Diese werden seit dem Jahr 2002 regelmäßig von Wolfsexperten und Ehrenamtlichen gesammelt.

Komplette Wiederbesiedlung wird rekonstruiert

Die Koordination dieses gezielten Sammelns übernimmt das Wildbiologische Büro LUPUS unter der Leitung der Biologinnen Gesa Kluth und Ilka Reinhardt. Mit den Untersuchungen sollen zum einen die einzelnen Individuen bestimmt werden, man will aber auch erfahren, wie viele Wölfe es tatsächlich in Deutschland gibt. Durch die Verwandtschaftsanalysen können die Wissenschaftler Rudelstrukturen sowie die Verwandtschaft zwischen den Rudeln analysieren. Außerdem können sie Wanderungsbewegungen, Inzucht und Ausbreitungsmuster erforschen.

Qualitätssicherung – Zauberwort bei der Wolfsgenetik

Nicht-invasive Analysemethoden sind besonders dann bedeutsam, wenn es sich – wie beim Wolf – um ein in Europa streng geschütztes Tier handelt. Die vom Tier in der Umwelt zurückgelassenen Proben enthalten jedoch nur eine geringe Menge an genetischem Material. Die DNA ist zudem durch äußere Einflüsse wie Temperaturschwankungen, Regen und

UV-Strahlung meist beschädigt oder degradiert. Zudem können diese Proben sehr leicht mit Fremd-DNA verunreinigt werden und erfordern eine spezielle Lagerung und Handhabung. So kann es bei ihrer Analyse leicht zu Fehlern bei der Genotypisierung führen (Taberlet & Luikart 1999).

Um trotzdem gesicherte Daten zu erhalten, muss ein Labor, in dem solches Probenmaterial bearbeitet wird, besondere Anforderungen erfüllen. In Gelnhausen wurde daher ein Labor speziell für diese Zwecke eingerichtet, zu dem nur geschulte Mitarbeiter Zutritt haben. Es gibt strenge Vorschriften der Arbeitsdurchführung und Handhabung der sensiblen Proben, sowie weitere Sicherheitsvorkehrungen, wie der klare räumliche Ausschluss von Materialien, die größere Mengen an DNA enthalten. Dadurch wird verhindert, dass die sehr sensiblen Proben mit anderem genetischen Material kontaminiert werden können. Außerdem wird jede genetische Analyse mehrfach repliziert, um die Gefahr von Fehlern weiter zu minimieren (Taberlet et al. 1996).

Molekulare Rissanalytik: DNA aus Speichelresten

Deutschlands Wölfe fressen in der Regel Rehe. Haustierte stehen bei ihnen sehr selten auf dem Speiseplan (Ansorge et al. 2011). Trotzdem sorgen Risse von Nutztieren für Schlagzeilen und gerade bei betroffenen Landwirten für

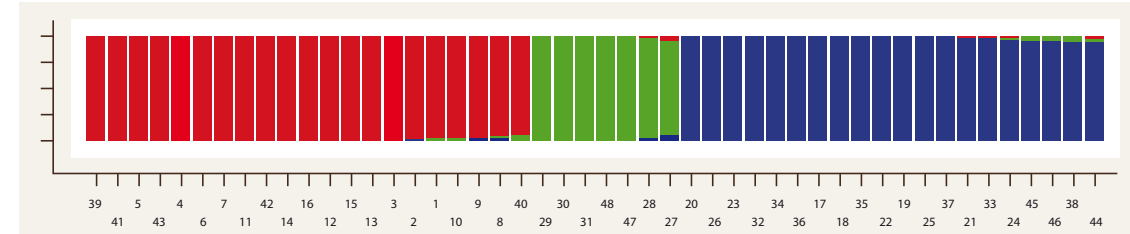


Abb. 16
Die Grafik zeigt die genetische Auftrennung von Hunden (rot), Gehegewölfen (grün) und Wölfen der deutsch-polnischen Population anhand von 15 Mikrosatelliten.

Unmut. Handelt es sich um einen vom Wolf verursachten Schaden, kann dem Halter von den jeweiligen Ländern ein finanzieller Ausgleich gewährt werden.

Die gerissenen Tiere werden dazu noch vor Ort von Fachleuten begutachtet, um zu klären, ob tatsächlich ein Wolf am Werke war oder etwa ein wilder Hund. In der Vergangenheit konnten die Gutachter das aber nicht immer zweifelsfrei feststellen. In diesen Fällen kann eine DNA-Analyse weiterhelfen. Die Speichelreste des Beutegreifers, die am Opfer zurückgeblieben sind, verraten, wer es war. Ein Beispiel: Im Januar 2010 wurde in Thüringen ein Mufflon gerissen und man vermutete, dass ein Wolf dafür verantwortlich sei. Die Analyse aus Gelnhausen zeigte aber, dass hier ein Hund der Täter gewesen war.

Schnell ins Labor – es geht um Stunden

Um in solchen Fällen gesicherte Ergebnisse zu erlangen, muss die Beprobung eines Risses sehr schnell erfolgen, da die DNA auf der verwesenden Oberfläche schnell degradiert. Anhand eines Versuches, bei dem Hunde für kurze Zeit auf Fellstücke beißen konnten, wurde getestet, wie lange nach erfolgter Kontamination des Fleisches mit Speichel eine Mikrosatellitenanalyse noch möglich ist. Dabei stellte sich heraus, dass nach 48 Stunden die Fehlerraten bereits sehr hoch lagen und nach 72 Stunden beinahe kein genetisches Signal mehr zu erkennen war. Ein späterer Versuch mit Wölfen und Luchsen bestätigte die Ergebnisse (Abb. 8).

Schriften

Ansorge H. & Nowak, C. (2011): Die Rückkehr der Wölfe – Senckenberg forscht für Wolf und Mensch. *Senckenberg – Natur, Forschung, Museum*, **141**: 36–37. [📄](#) Ansorge H., Endel, J., Hertweck, K., Holzapfel, M., Kluth, G., Körner, S., Reinhardt, I. & Wagner, C. (2011): Sie sind wieder da! Seit 10 Jahren gibt es wieder Wölfe in Deutschland. – *Senckenberg – Natur, Forschung, Museum* – **141**: (5/6): 162–175. [📄](#) Frosch, C., Dutsow, A., Georgiev, G. & Nowak, C. (2011a): Case report of a fatal bear attack documented by forensic wildlife genetics. *Forensic Science International: Genetics*, doi:10.1016/j.fsigen.2011.01.009. [📄](#) Frosch, C. & Nowak, C. (2011b): Genetische Erfassung des Braunbären in Bulgarien. – *ZGF Gorilla* 2/2011, 16–19. [📄](#) Kaczynski, P., Kluth, G., Knauer, F., Rauer, G., Reinhardt, I. & Wotschikowsky, U. (2009): Monitoring von Großraubtieren in Deutschland. *BfN – Skripten* 251. [📄](#) Nowak, C., Sauer, J. & Haase, P. (2009): Genetische Haaranalysen zur Erfassung der Wildkatze in Deutschland – Chancen und Grenzen der Lockstockmethode. In: Fremuth, W., Jedicke, E., Kaphegyi, T., Wachendörfer, V. & Weinzierl, H. (Hrsg.): *Zukunft der Wildkatze in Deutschland – Ergebnisse des internationalen Wildkatzensymposiums 2008 in Wiesenfelden*. Erich Schmidt Verlag, Berlin. [📄](#) Nowak, C. & Steyer, K. (2009): Eine haarige Spurensuche – Molekulargenetische Untersuchungsmethoden im Dienste des Wildkatzenschutzes. – *ZGF Gorilla* 4/2009, 15–16. [📄](#) Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P. & Bouvet, J. (1996): Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. – *Oxford University Press, Nucleic Acids Research*, 1996, **24**: No. (16): 3189–3194. [📄](#) Taberlet, P. & Luikart, G. (1999): Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**: 41–55.

SNPs: Senckenberg entwickelt neue Methoden

Mikrosatelliten sind seit vielen Jahren das meistgenutzte Markersystem für genetische Wildtieranalysen. Allerdings haben sie auch Schwächen: So hängen die Ergebnisse in einem gewissen Maße von den benutzten Geräten und dem jeweiligen Bearbeiter ab, was Vergleiche von Ergebnissen zwischen Laboratorien erschwert. Gerade Wölfe, Luchse oder Braunbären wandern jedoch oft über weite Distanzen. Eine genetische Datenbank darf daher nicht an Landesgrenzen enden; um transeuropäische Wanderungen zu erfassen, benötigt man vergleichbare Datensätze. In einem gerade beginnenden Projekt entwickeln wir daher gemeinsam mit Projektpartnern der TU München und dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung neuartige Markersysteme, die auf der Sichtbarmachung sogenannter SNPs (sprich „snips“) beruhen. SNP ist die Abkürzung für „single nucleotide polymorphisms“. Bei einem SNP ist eine einzelne Base der DNA-Sequenz gegen eine andere ausgetauscht. SNPs sind einfach und in großen Mengen nachzuweisen – so kann man größere Teile des Erbguts abdecken, als dies bei den Mikrosatelliten der Fall ist.

Die große Herausforderung ist hierbei, die neuen Markersysteme auch an nicht-invasiv gesammeltes Probenmaterial anzupassen. So werden molekulare Daten in Zukunft hoffentlich besser miteinander vergleichbar sein. Damit kann sich der Fokus des genetischen Wildtiermonitorings stärker von dem regionalen auf einen grenzüberschreitenden, europaweiten Maßstab ausdehnen.

Verfasser

Verena Harms,
Katharina Steyer,
Christiane Frosch,
Dr. Carsten Nowak
Senckenberg Forschungsinstitut
Fachgebiet Naturschutzforschung
Clamecystr. 12
D-63571 Gelnhausen