

Aus der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
im Zentrum Frauenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen
und aus der Abteilung Reproduktionsbiologie
(Prof. Dr. K. Hodges)
des Deutschen Primatenzentrums Göttingen

**Untersuchung des CFL-Phänotyps („*congenital fused labia*“)
in dem Neuweltaffen Common Marmoset (*Callithrix jacchus*)
unter demographischen, physiologischen und zytogenetischen
Gesichtspunkten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
zu Göttingen

vorgelegt von

Edris Wedi

aus Siegburg

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. sc. agr. H. W. Michelmann

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. I. Bartels

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der <i>Callithrix-jacchus</i> -Affe (Der Weißbüschelaffe)	1
1.2 Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane beim <i>Callithrix-jacchus</i> -Affen	4
1.3 Grundlagen der Reproduktion beim <i>Callithrix-jacchus</i> -Weibchen	5
1.4 Der CFL-Phänotyp	6
1.5 Ziele der Arbeit	10
2. Materialien und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.2 Methoden	16
2.2.1 Tiere	16
2.2.2 Tierärztliche Bestandsbetreuung	17
2.2.3 Identifizierung der CFL-Tiere	17
2.2.4 Erstellung eines einheitlichen Messsystems für die äußeren Geschlechtsorgane der <i>Callithrix-jacchus</i> -Weibchen	17
2.2.5 Entwicklungsbiologische Aspekte der äußeren weiblichen Genitalien bei <i>C. jacchus</i> -Affen	20
2.2.6 Erstellung der Stammbäume der CFL-Tiere	21
2.2.7 Ahnenherkunft der DPZ-Tiere	21
2.3 Zellmaterialien	22
2.3.1 Blutentnahme und Lagerung der Proben	22
2.3.2 Zellkultur der Blutlymphozyten	23
2.3.3 Aufarbeiten der Lymphozytenkultur	23
2.3.4 Vorbehandlung der Objektträger	24
2.4 Etablierung von Färbemethoden	25
2.4.1 Giemsa-Färbung	26
2.4.2 DAPI-Färbung	26
2.4.3 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	28
2.4.3.1 Vorbereitung der Präparate	29
2.4.3.2 Denaturierungen der DNA-Sonden und der Präparate	29
2.4.3.3 Hybridisierung- <i>in-situ</i>	29
2.4.3.4 Waschen und Antikörper-Detektion	30
2.5 Mikroskopie	31
2.6 Hormonmessungen	32
2.6.1 Östrogenmessung	32
2.6.2 Androstendionmessung	32

2.7 Statistische Auswertungen	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Einteilung und Definition der CFL-Phänotypen	34
3.2 Demographische Untersuchungen zum CFL-Phänotyp	36
3.2.1 Die Verteilung des CFL-Phänotyps in der DPZ-Kolonie	36
3.2.2 Stammbaumanalysen und mögliche Vererbungsmechanismen des CFL-Phänotyps	36
3.2.3 Vergleich und Evaluierung von CFL- und Nicht-CFL-Stammbäumen	37
3.2.4 Haben bestimmte externe Kolonien überproportional mehr CFL-Tiere zu den Familienlinien beigesteuert?	40
3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Faktoren Alter, Gewicht und Hormonhaushalt auf den CFL-Phänotyp	42
3.3.1 Zusammenhang zwischen CFL-Phänotyp und Alter der Weibchen	42
3.3.2 Der Einfluss der Zeit auf den individuellen Öffnungsprozess eines CFL-Phänotyps	43
3.3.3 CFL-Phänotyp und Gewicht	43
3.3.4 Gewicht und Hormonspiegel bei CFL- und Nicht-CFL-Weibchen	44
3.3.5 Von welchem Hormon wird der CFL-Phänotyp beeinflusst?	46
3.3.6 Der maternale Einfluss auf den CFL-Phänotyp	48
3.3.7 Wurfgröße und Gewichtsniveau der Mutter	49
3.3.8 Beeinflusst die Geburtswurfskonstellation (Geschlechterzahl und Geschlechterbalance) den hormonellen Maskulinisierungsprozess beim CFL-Phänotyp?	51
3.3.9 Androstendionspiegel und Wurfskonstellation	52
3.3.10 Östrogenspiegel und Wurfskonstellation	53
3.3.11 Einfluss der Wurfskonstellation (Geschwisteranzahl sowie Geschlechterbalance) und Wurfgröße auf den CFL-Phänotyp	53
3.4 Natürlich vorkommender Cross-sex-Chimärismus und CFL-Phänotyp bei <i>Callithrix-jacchus</i> -Weibchen	54
3.4.1 Cross-sex-Chimärismus und Gewicht	55
3.4.2 Androstendionspiegel und Cross-sex-Chimärismus	56
3.4.3 Cross-sex-Chimärismus und Gewicht der Mutter	56
3.4.4 Wurfskonstellation und Cross-sex-Chimärismus	57
3.5 Ergänzende Untersuchungen zu Genitalmerkmalen und Maskulinisierungszeichen	59
3.5.1 CFL-Grad und Kopulationsfähigkeit	59

3.5.2	Genitale Charakteristika und morphologische Besonderheiten von Genitalien in Form der „pudendal pads“	60
3.6	Weitere Maskulinisierungsmerkmale der Genitalien	62
3.6.1	Abhängigkeit der Genitalmorphologie vom Alter	62
3.6.2	Abhängigkeit der Genitalmorphologie vom Gewicht adulter Weibchen	63
3.6.3	Einfluss der Wurfkonstellation auf die horizontale Genitalbreite bei adulten Weibchen	63
4.	Diskussion	68
4.1	CFL-Phänotyp und genitaler Polymorphismus: Ätiologie und Variationen beim adulten <i>C. jacchus</i> -Weibchen in Gefangenschaft	68
4.2	Vererbung und Umwelteinflüsse	69
4.3	Demographische Einflüsse auf den CFL-Phänotyp	71
4.4	Gewicht der Weibchen und CFL-Phänotyp	72
4.5	Die Mutter als Kontrollinstanz für den Reproduktionsstatus der Töchter	72
4.6	Hormone und CFL-Phänotyp	73
4.7	Cross-sex-Chimärismus, Androgenisierung und CFL-Phänotyp	75
5.	Zusammenfassung	78
6.	Literaturverzeichnis	80
7.	Abkürzungsverzeichnis	86
8.	Abbildungsverzeichnis	88
9.	Tabellenverzeichnis	94
10.	Anhang: Tab. 4, Tab. 5 und Stammbaum der CFL-Weibchen	95

1. Einleitung

Fehlfunktionen der weiblichen Reproduktion können sowohl im inneren als auch äußeren Genitale auftreten. Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit dem Phänotyp der verschlossenen Vulva (CFL-Phänotyp = congenital fused labia phenotype) in jungen und erwachsenen *Callithrix-jacchus* – Weibchen (Weißbüschelaffe; engl.: marmoset). Dieser Phänotyp tritt in einer hohen Frequenz bei Tieren in Gefangenschaft, auch im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) Göttingen, auf. Die erste Publikation, die sich mit diesem Phänomen bei Weißbüschelaffen beschäftigte, wurde von Isachenko *et al.* (2002) veröffentlicht. Über die genauen Ursachen dieses CFL-Phänotyps ist bisher nichts bekannt. So ist es unklar, ob es ein vererbtes Merkmal ist, wie es Isachenko *et al.* (2002) vermutet haben oder ein pathologischer Zustand, der mit einer Maskulinisierung weiblicher Tiere einhergeht, wie dies Sanchez-Morgado *et al.* (2003) und Goldschmidt *et al.* (2005) behauptet haben. Es könnte sich aber auch um eine Verzögerung der natürlichen Genitalentwicklung beim *C. jacchus*-Weibchen handeln, die durch die Bedingungen in Gefangenschaft verursacht wird. Von wilden *C. jacchus*-Tieren ist nicht bekannt, ob es bei ihnen überhaupt solch ein Phänomen gibt.

Bei Nicht-Primaten kommt der CFL-Phänotyp ebenfalls vor, ist aber üblicherweise mit Fehlfunktionen des inneren Reproduktionstrakts verbunden und tritt oft in Verbindung mit einer Maskulinisierung der Geschlechtsorgane auf. So berichteten Balasubramanian *et al.* (1991) über eine „congenitally fused labiae vulva“ bei einer jungen Färse (weibliches Hausrind) und Wilkens *et al.* (2006) beschrieben eine „congenital vulvar deformity“ bei 6 Alpakas. Die Alpakas wiesen diese anatomische Besonderheit in verschiedenen Schweregraden auf. Die Tiere waren zum Teil komplett geschlossen, dadurch unfähig zu urinieren und somit nicht überlebensfähig. Bei Rindern ist der CFL-Phänotyp primär assoziiert mit einem männlichen Co-Zwilling. Hier spricht man vom Freemartin-Syndrom, das zu weiblicher Unfruchtbarkeit führt (Padula 2005).

Wie oben erwähnt, ist bisher nicht geklärt, durch welche Faktoren der CFL-Phänotyp bei *C. jacchus*-Affen in Gefangenschaft hervorgerufen wird. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Faktoren in der *C. jacchus*-Kolonie des DPZ herauszufinden.

1.1 Der *Callithrix-jacchus*-Affe (Der Weißbüschelaffe)

Höhere Primaten werden in die beiden Gruppen Neuweltaffen (*Platyrrhini*) und Altweltaffen (*Catarrhini*) unterteilt. Entwicklungsgeschichtlich stellen die Neuweltaffen das Schwestertaxon der Altweltaffen dar (Abb. 1).

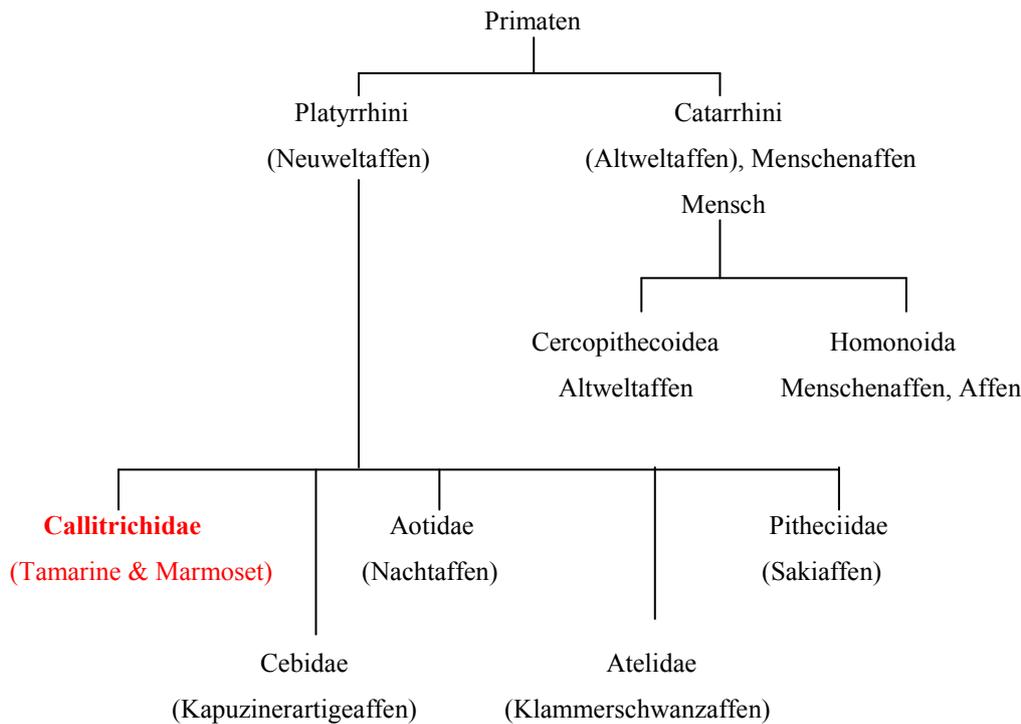


Abb. 1: Systematische Stellung der Neuweltaffen innerhalb der Primaten (Simons 1972, Seite 287-288).

Die Altweltaffen, auch Schmalnasenaffen genannt, besitzen eine Nasenscheidewand mit parallel nach vorn zeigenden Nasenlöchern. Des Weiteren weisen sie einen knöchernen Gehörgang und nur noch zwei Prämolaren auf. Altweltaffen sind normalerweise größer und schwerer als die Neuweltaffen. Im Unterschied zu den Altweltaffen haben Neuweltaffen meist seitwärts gerichtete Nasenlöcher. Aus diesem Grund werden sie auch Breitnasenaffen genannt. Sie unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer Größe. Diese kann zwischen 100 g bei Zwergseidenäffchen und bis zu 10 kg bei Brüllaffen und Spinnenaffen variieren. Die Neuweltaffen spalteten sich von der Linie der Altweltaffen vor ca. 35 Millionen Jahren ab. Die *Callithrix*-Affen trennten sich vor ca. 8,8 – 11,3 Millionen Jahren von den anderen Neuweltaffen, wobei der Zeitpunkt bei den unterschiedlichen Autoren variiert (Schrägo 2007).

Die Weißbüschelaffen (*Callithrix-jacchus*-Affen) sind Neuweltaffen. Sie gehören zu der Familie der Krallenaffen (*Callitrichidae*) und werden der Gattung *Callithrix* zugeordnet. Die Familie der Krallenaffen umfasst insgesamt 4 Gattungen. Hierzu gehören die Gattungen *Cebuella*, *Callithrix*, *Saguinus* und *Leontopithecus*. Durch Unterschiede in der Zahnmorphologie werden die *Callitrichidae* in Marmosette (*Callithrix*) und Tamarine (*Saguinus* und *Leontopithecus*) unterteilt (Geissmann 2003). Bei den Marmosetten sind die Schneidezähne des Unterkiefers genau so lang wie die Eckzähne. Dagegen sind bei den Tamarinen die unteren Eckzähne deutlich länger als die Schneidezähne (Nowak 1999). Das spezialisierte Frontgebiss wird von den *Callithrix*-Affen dazu verwendet, kleine Löcher in die Baumrinde zu nageln, um an Säfte und Harze zu gelangen, die einen wichtigen

Nahrungsbestandteil der Tiere bilden. Diese evolutionäre, dentale Spezialisierung ermöglicht es ihnen, flexibler als andere *Callitrichidae* in der Nahrungssuche und der Auswahl des Biotops zu sein, während andere *Callitrichidae* sich sehr opportunistisch von Baumexsudaten ernähren und unflexibel bezüglich des Biotops sind (Geissmann 2003). Aus diesem Grund sind die *Callithrix*-Affen auch in der Lage, in trockenen Gebieten zu leben, wo es manchmal keine Früchte gibt. Diese Tiere zeichnen sich weiterhin dadurch aus, dass sie an Fingern und Zehen, mit Ausnahme des Hallux, krallenförmig verlängerte Nägel (*tigulae*) ausgebildet haben. An der Großzehe tragen sie einen Plattnagel (*ungulae*), der auch bei anderen Primaten vorkommt. Diese Konstellation der Nägel erlaubt es ihnen, sich schnell zwischen den Bäumen fort zu bewegen (Abb. 2).



Abb. 2: Adulter *Callithrix-jacchus*-Affe in der Wildnis (links), in Gefangenschaft (rechts oben) und Neugeborene in Gefangenschaft (rechts unten).

Der Weißbüschelaffe ist ursprünglich an der Nordostküste Brasiliens beheimatet. Er hat nur eine geringe Körpergröße. Die Kopf-Rumpf-Länge beträgt zwischen 15 und 20 cm. In der Wildnis wiegen Weibchen bis 256 g und Männchen bis 236 g (Primate Info Net 2005; Araújo *et al.* 2000). Bei Tieren in brasilianischer Gefangenschaft (Natal Colony, Brasilien) liegt das Gewicht weiblicher Tieren im Durchschnitt bei 360 g. Männliche Tiere erreichen 348 g (Araújo *et al.* 2000). Die in dieser Studie untersuchten Tiere aus dem Deutschen Primatenzentrum Göttingen hatten ein Durchschnittsgewicht von 411 g (Alter >1 Jahr). Die Gewichtsentwicklung bei Tieren in Gefangenschaft hat einen erheblichen Einfluss auf ihren Hormonhaushalt. Dies zeigt sich deutlich in der Größe der Würfe. Im

Vergleich zu Wildtieren mit vorwiegend Zwillingschwangerschaften haben Weibchen im DPZ zu 70 % Drillingsgeburten. Die hohen Mehrlingsraten in Gefangenschaft werden durch variable Ovulationsraten hervorgerufen. Wildtiere haben eine Lebensdauer bis zu ca. 12 Jahren (Noel 1996). Das Durchschnittsalter bei Tieren in Gefangenschaft liegt bei 5-7 Jahren, die Lebensspanne kann aber auch 16-17 Jahren erreichen (Tardif *et al.* 2008). In der Wildnis ernähren sich Marmosets vorwiegend von Baumexsudaten, Früchten, Knospen, Insekten und kleinen Wirbeltieren.

Die geringe Körpergröße von *C. jacchus*-Tieren ist ein Vorteil sowohl für Untersuchungen und Blutentnahmen als auch in der Nutzung von Platzressourcen. So werden diese Tiere als geeignete biomedizinische Alternativen zum Menschen genutzt. Tierexperimentelle Versuche können an einer größeren Anzahl von Tieren durchgeführt werden als das bei anderen Primaten, z.B. Makaken, möglich wäre.

1.2 Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane beim *Callithrix-jacchus*-Affen

Durch eine hohe Fortpflanzungsrate (frühe Geschlechtsreife nach 12 bis 18 Monaten), einer variablen Ovulationsrate und einem Wurfgebnis von 4-6 Nachkommen pro Jahr in Gefangenschaft ist diese Spezies besonders für die Reproduktionsbiologie interessant. Das weibliche Reproduktionssystem ist bei *C. jacchus*-Affen ähnlich wie beim Menschen aufgebaut. Man unterteilt es in äußere und innere Geschlechtsorgane. Die äußeren Geschlechtsorgane von geschlechtsreifen Weibchen wurden in den Publikationen von Stein (1978) und Isachenko *et al.* (2002) beschrieben (Abb. 3).

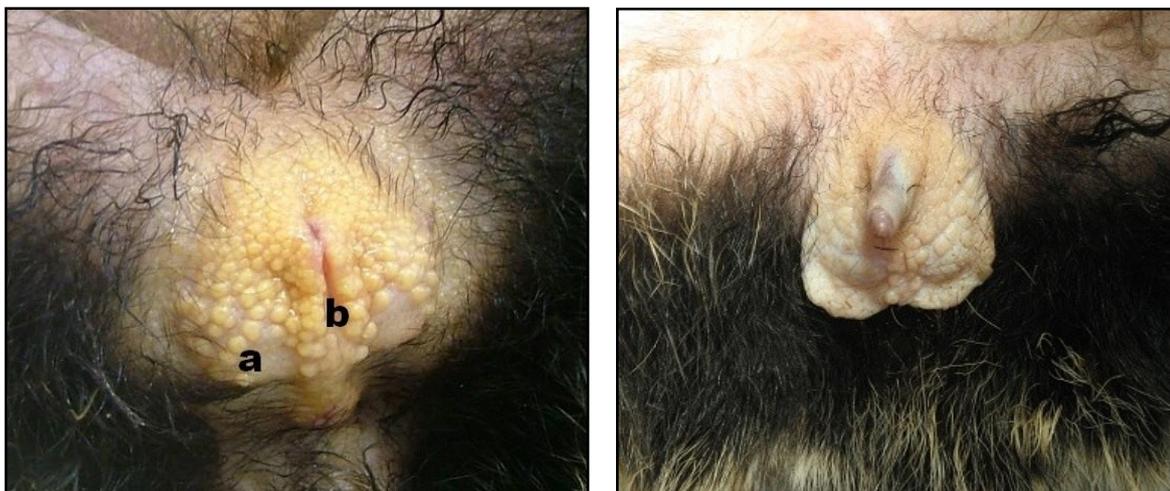


Abb. 3: Äußere Geschlechtsorgane beim weiblichen *Callithrix-jacchus*-Affen (links). a) „pudendal pad“, b) Vulva. Männliche Genitalorgane (rechts).

Stein (1978) beschrieb an den äußeren Genitalien des geschlechtsreifen Weibchens den sog. „pudendal pad“, den er wegen seiner sackförmigen Form mit dem Skrotum des männlichen Tieres verglich. Die Vulvaöffnung bezeichnete er als „opening of vaginal vestibule“. In der Studie von Isachenko *et al.* (2002) wurde eine Durchschnittslänge der Vulvaöffnung zwischen 8 und 10 mm gemessen. *Callithrix-jacchus*-Weibchen weisen im äußeren Genitalbereich „gelbe Pünktchen“ auf. Diese

Pünktchen können in verschiedenen Farbvariationen auftreten. Im Vergleich zu Altweltaffen haben die Tiere keine rötliche Färbung des Genitalbereichs. Dies mag damit zusammenhängen, dass *C. jacchus*-Männchen nur dichromatisch und nicht trichromatisch sehen können (Pessoa *et al.* 2005). Solche „gelben Pünktchen“ treten beim Männchen nicht auf. Die inneren Geschlechtsorgane von *C. jacchus*-Affen wurden von Cui und Matthews (1994) beschrieben (Abb. 4). Der obere Teil der Vagina hat eine Länge von ca. 17 mm, die Gesamtlänge beträgt ca. 34 mm lang. Die Gebärmutter ist 11 mm lang.

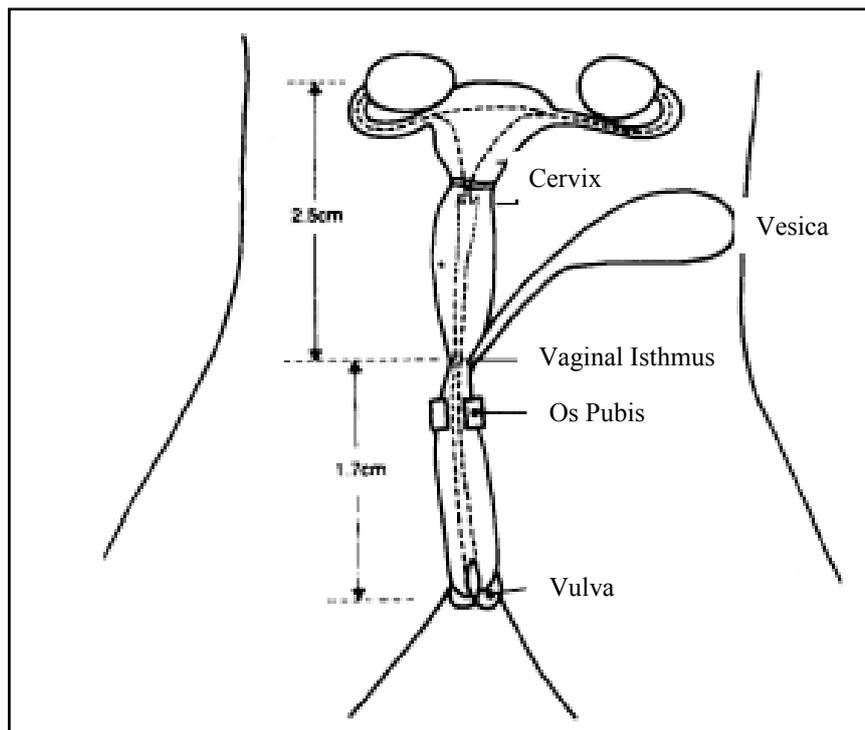


Abb. 4: Schematische Darstellung der inneren Geschlechtsorgane bei *C. jacchus*-Affen (Cui und Matthews 1994, Seite 482).

Verglichen mit dem Menschen oder dem Rhesus-Affen, ist die Vagina bei *C. jacchus*-Affen proportional länger. Auch der Uterus ist proportional breiter und kürzer als beim Menschen (Cui und Matthews 1994).

1.3 Grundlagen der Reproduktion beim *Callithrix-jacchus*-Weibchen

Weißbüschelaffen leben in der freien Natur in Familienverbänden, welche jeweils aus einem monogamen Elternpaar und ihren Nachkommen bestehen. Es gibt in der Gruppe meistens ein dominantes Weibchen, welche die Ovulation der anderen Weibchen unterdrückt. So kann sich nur das dominante Weibchen reproduzieren (Abbott und Hearn 1978). In einigen Ausnahmefällen entstehen polygame Konstellationen. Die Größe einer Familiengruppe kann zwischen 3 bis 15 Individuen

variieren. In der Wildnis sind üblicherweise zwei Neugeborene pro Wurf die Regel. Geburten finden meistens zweimal im Jahr statt, bei eingeschränkter Nahrungszufuhr auch nur einmal. In Gefangenschaft werden die Tiere entweder als Paare oder in größeren Familienverbänden zusammen mit dem Nachwuchs gehalten. Adulte Nachkommen bleiben in der Wildnis häufig mehrere Jahre in der Geburtsfamilie und beteiligen sich an der Jungtieraufzucht.

Der Zyklus bei *C. jacchus*-Affen dauert in Gefangenschaft in der Regel $28,6 \pm 1,1$ Tage (Harding *et al.* 1982; Harlow *et al.* 1983), obwohl auch Abweichungen in der Zykluslänge auftreten können. Noch nicht publizierte Daten aus dem DPZ zeigen, dass sich reproduzierende Weibchen einen regulären Zyklus aufweisen. Dabei dauert die Follikelphase $8,2 \pm 0,3$ und die Lutealphase $19,2 \pm 0,6$ Tage. Bisher gibt es noch keine Möglichkeiten, an Veränderungen äußerer Merkmale Zeichen der Ovulation zu erkennen (Hearn *et al.* 1975). Die Tiere weisen keine Blutungen oder Veränderungen der Genitalien auf (Hearn und Lunn 1975). Nur durch Messungen der Progesteronspiegel (Harding *et al.* 1982; Harlow *et al.* 1983) oder aber durch die Bestimmung von Estradiol oder Estronesulfat (Pryce *et al.* 1995) kann der Zyklus bei den *Callithrix*-Affen überwacht werden.

Eine Implantation der Embryonen erfolgt ca. 12 Tage nach der Ovulation (Moore *et al.* 1985), die fetale Geschlechtsentwicklung erst relativ spät am 80. Tag (Moore *et al.* 1985). Danach läuft die weitere Entwicklung wesentlich schneller und kürzer ab als bei anderen Spezies. So dauert beim Marmoset die fetale Entwicklung 64 Tage. Im Vergleich dazu ist die fetale Entwicklung beim Rhesus-Affen 118 Tage, beim Baboon 133 Tage und beim Menschen 222 Tage lang. Die durchschnittliche Schwangerschaftsdauer beträgt beim Marmoset 144 ± 2 Tage (Chambers und Hearn 1979). Der Rhesus-Affe benötigt 165 Tage, der Baboon 180 Tage und der Mensch 280 Tage. In Gefangenschaft resultieren die meisten Schwangerschaften bei *C. jacchus*-Affen in dizygotischen oder trizygotischen Feten, deren Kreisläufe durch die Fusion der placentären Blutzirkulation miteinander anastomosieren (Wislocki 1939). Die Anastomosen führen zu einem Austausch von somatischen Zellen zwischen den einzelnen Feten, der zum Blutchimärismus führt (Benirschke *et al.* 1962). Es ist bisher nicht bekannt, welchen Effekt eine höhere Anzahl geschwisterlicher Zellen auf das Immunsystem und die körperliche Entwicklung der prä- und postnatalen Tiere hat.

1.4 Der CFL-Phänotyp

Wortwörtlich würde man den Begriff CFL (congenital fused labia) als „angeboren verschlossene Labien“ übersetzen. Es herrscht aber in der Literatur Uneinigkeit über die genaue Begriffsbestimmung. Sanchez-Morgado *et al.* (2003) beschreiben den Phänotyp als „atypical external genitalia“ und Goldschmidt *et al.* (2005) als „constriction of the vulvar opening“.

Der CFL-Phänotyp kommt in verschiedenen Ausprägungen vor, so dass eine genaue Evaluierung und Verifizierung des Phänotyps schwierig ist. Er stellt sich als einen mehr oder weniger ausgeprägten

Verschluss der beiden *Labia majora* durch ein bindegewebiges Häutchen dar (Abb. 5). In einem erwachsenen Weibchen mit einem normalen Zyklus verhindert dieses Häutchen eine erfolgreiche Fortpflanzung. So ist das Tier funktionell infertil, obwohl die inneren Reproduktionsorgane intakt sind. Es wird angenommen, dass dieses bindegewebige Häutchen sich bei den einzelnen Tieren zu unterschiedlichen Zeiten löst und so zu einer Öffnung der Vulva führt. Bisher gibt es keine Daten darüber, wodurch dieser Öffnungsprozess bedingt wird. Es ist ein Ziel dieser Arbeit, den CFL-Phänotyp auf Grund der anatomischen Daten betroffener Tiere aus dem DPZ genau zu definieren.

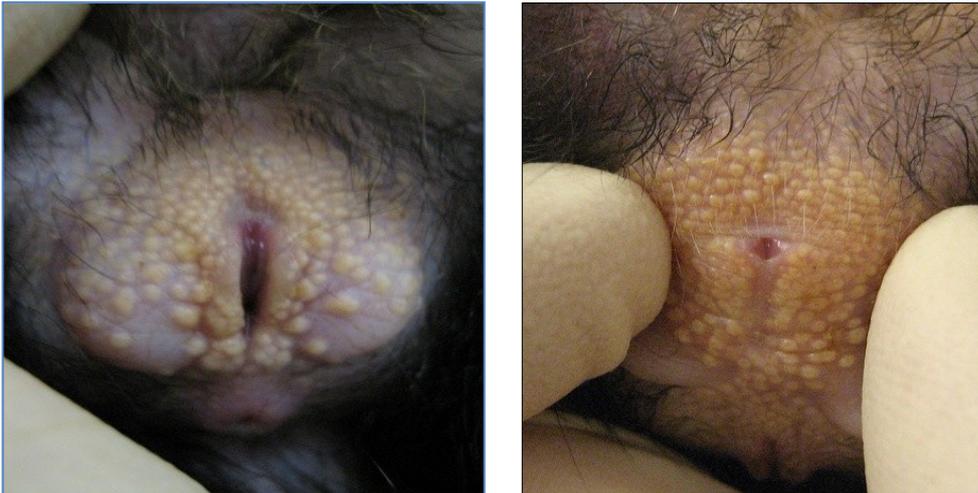


Abb. 5: Vaginalöffnung im „normalen“ Zustand (links) und als CFL-Phänotyp (rechts).

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag darin, herauszufinden, welche Faktoren zu einem CFL-Phänotyp führen und ob dieser Phänotyp eine pathologische oder normale physiologische Veränderung der Genitalien bei weiblichen *C. jacchus*-Affen in Gefangenschaft ist.

Bis zu dem Zeitpunkt dieser Studie wurden entweder nur Einzelfälle oder kleine Untersuchungsgruppen adulter CFL-Tiere in Gefangenschaft beschrieben (Isachenko *et al.* 2002; Sanchez-Morgado *et al.* 2003; Goldschmidt *et al.* 2005). Isachenko *et al.* (2002) stellten die Hypothese auf, dass dem CFL-Phänotyp wahrscheinlich eine genetische Ursache zugrunde liegt und auf Grund einer hohen Inzuchtrate in den Affenkolonien durch ein bestimmtes Gen rezessiv weiter vererbt wird. In den *C. jacchus*-Kolonien Europas ist die Gefahr der Inzucht in den letzten Jahrzehnten deutlich gestiegen, da seit 1974 keine Weißbüschelaffen mehr aus Brasilien nach Europa exportiert wurden. Die Vermeidung von Inzucht wird zwar durch Austausch von Zuchttieren zwischen den einzelnen Kolonien in Europa angestrebt, jedoch hat sich der Gesamtgenpool in Europa seit fast 50 Jahren nicht mehr verändert. Die Anzahl der Tiere, die zur Gründung aller europäischen Kolonien eingesetzt wurden, ist nicht bekannt. Sie könnte aber relativ klein gewesen sein und so zu einem hohen Verwandtschaftsgrad innerhalb der heutigen Kolonien geführt haben. Dies könnte in einer Anhäufung von Fehlbildungen und Krankheitsbilder resultieren, die so in der Wildnis nicht anzutreffen sind.

Genauere Daten diesbezüglich sind nicht bekannt. Der Inzuchtfaktor wurde in der Vergangenheit auch dadurch begünstigt, dass einige CFL-Tiere durch einen chirurgischen Eingriff geöffnet und so für Zuchtzwecke benutzt wurden. Isachenko *et al.* (2002) gehen davon aus, dass mit steigendem Inzuchtfaktor auch die Frequenz von CFL-Tieren zunimmt. Ausdrücklich wird von ihnen verneint, dass es sich bei den betroffenen Tieren um eine Androgenisierung und somit um eine Intersexualität handelt, da die inneren Geschlechtsorgane komplett intakt waren und die Weibchen einen regelmäßigen Zyklus aufwiesen.

Sanchez-Morgado *et al.* (2003) führten bei einem betroffenen *C. jacchus*-Weibchen eine Hormonanalyse (Östrogen und Testosteron) durch und untersuchten die beiden Y-Chromosomen-spezifischen Gene ZFY (zinc finger protein gene) und SRY (sex determining region Y gene). Das sind Gene, die bei der männlichen Geschlechtsentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Sinclair *et al.* 1990). Ihre Hypothese war, dass es zu einer Mutation oder Deletion in den Genen SRY und ZFY bei den CFL-Tieren gekommen ist und dass dies die Ursache für die Fehlbildung sein könnte. Dies wurde aber bei zusätzlich untersuchten Tieren nicht bestätigt. Außerdem fehlte in ihrer Arbeit die Untersuchung von Kontrolltieren. Goldschmidt *et al.* (2005) berichteten in einer Fallstudie bei *Leontopithecus chrysomelas* (Golden Lion Tamarin) über einen CFL-ähnlichen Phänotyp mit vergrößerter Klitoris und einer „constriction of the vulvar opening“. Sie stellten die Hypothese auf, dass es durch einen Chimärismus und den dadurch erhöhten Testosteronspiegel zu einer Vermännlichung des Tieres gekommen war.

Als Chimären bezeichnet man in der Biologie Organismen, die genetisch unterschiedliche Zellen bzw. Gewebe verschiedener, mindestens zweier, Individuen beinhalten. Chimärismus kommt bei Wirbeltieren und Säugetieren sehr selten vor. Natürlich auftretender Chimärismus wurde bei Katzen, Rindern, *Callithrichidae* (Marmosets und Tamarinen) und Menschen beschrieben (McLaren 1976; Pausch *et al.* 1979; Hanson *et al.* 1984; Williams *et al.* 2004; Halder 2005).

Der Cross-sex-Chimärismus bei Rindern, Schafen, Ziegen, Rothirschen, Schweinen, Pferden und Kamelen wird in der Literatur als Freemartin-Syndrom oder Freemartinismus beschrieben und bezeichnet eine angeborene Fehlbildung bei weiblichen Tieren, eine Form der Intersexualität, die mit Unfruchtbarkeit einhergeht (Padula 2005). Es kommt zu einer Vermännlichung der Geschlechtsorgane in verschiedenen Ausbildungsformen. Durch fetale Anastomosen werden nicht nur hämatopoetische Zellen, sondern auch Hormone zwischen den Geschwistern ausgetauscht. Vor allem das Testosteron führt bei weiblichen Feten zu einer Unterentwicklung der Geschlechtsorgane (Padula 2005). Die männlichen Geschwister zeigen meistens keine phänotypischen Veränderungen, doch kann es in seltenen Fällen zu einer Reduktion des Hodenvolumens kommen.

Das Freemartin-Syndrom tritt bei *C. jacchus*-Affen nicht auf. Durch welche Mechanismen das *C. jacchus*-Weibchen bei verschiedengeschlechtlichen Geschwistern vor dem Freemartin-Syndrom „geschützt“ wird, ist nicht bekannt (Abbott 1984).

Im Vergleich zu allen anderen Lebewesen ist der Chimärismus bei Neuweltaffen weit verbreitet. Vor allem im hämatopoetischen Gewebe ist er häufig beschrieben worden. Zwischen dem 19. und 29. Tag der Embryonalentwicklung bilden sich Anastomosen, die einen Zell- und Hormonaustausch zwischen den einzelnen Wurfgeschwistern ermöglichen (Wislocki 1939) (Abb. 6).

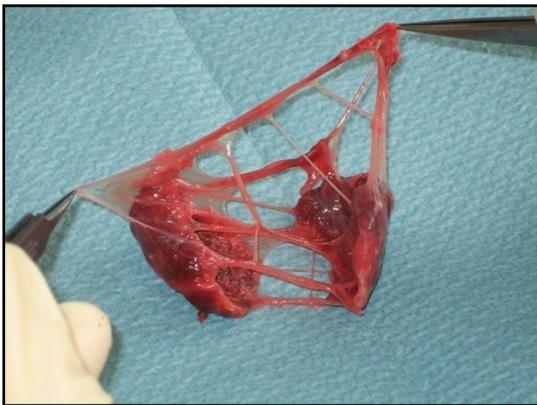


Abb. 6: Plazentäres Anastomosengeflecht in einer Drillingsgeburt bei *C. jacchus*-Affen.

Abbildung 6 zeigt die Plazenta bei einer Drillingsgeburt. Hier erkennt man das komplexe Geflecht an Anastomosen, das zu einem Cross-sex-Chimärismus auf Grund einer Durchmischung von Blutzellen und wahrscheinlich auch von Stammzellen führt. Es gibt Berichte über ein Vorkommen gonadaler Stammzellen des anderen Geschlechts (Benirschke und Brownhill 1963; Ross *et al.* 2007). Eine Theorie besagt, dass es auf Grund der besonderen Situation der Familienstruktur bei den Marmosets durch den Chimärismus zu einer engeren Bindung zwischen den Kindern und den Eltern kommt (Ross *et al.* 2007). Wie sich der Chimärismus aber auf die Reproduktionsmechanismen auswirkt, ist nicht bekannt. Auch ist nicht bekannt, ob dieser Cross-sex-Chimärismus bei Weibchen eine Maskulinisierung bzw. einen CFL-Phänotyp verursachen kann.

Ein mit dem CFL-Phänotyp vergleichbares Krankheitsbild findet man bei jungen Mädchen zwischen dem 1. und 6. Lebensjahr. Man spricht hier von Labiänsynechien. Dabei kommt es zu einer partiellen oder kompletten Adhäsion der *Labia minora*. Von einigen Autoren wird sie als Vaginalaplasie oder -atresie bezeichnet. Allgemein sind die Patienten asymptomatisch und haben keine weiteren Veränderungen an den Reproduktionsorganen. Die Diagnose stellt meistens einen Zufallsbefund dar. Dieses Phänomen tritt selten auf. Verantwortlich sind ein Östrogenmangel und eine mangelnde Genitalhygiene (Huber 1970; Golombowski *et al.* 1998). Einige weitere Ursachen, die in der Literatur erwähnt werden, sind Entzündungen in Form einer Vulvitis oder Vulvovaginitis, sexueller Missbrauch oder Lazeration der Labien. Golombowski *et al.* (1998, Seite 558) beschreiben das klinische Bild der Labiänsynechie folgendermaßen: „Typischerweise findet sich, suburethral das Vestibulum vaginae

bedeckend, eine flache häutige Verbindung, die in der Mitte eine feine, weißliche Trennlinie zeigt. Manchmal bleibt nur eine kleine punktförmige Öffnung, durch die der Urin abfließen kann.“ Diese Beschreibung ähnelt sehr dem CFL-Phänotyp bei *C. jacchus*-Affen, außer dass hier andere Labien beteiligt sind. Als Therapie der Wahl wird beim Menschen die lokale Behandlung mit einer Östrogensalbe über einige Tage eingesetzt. Dies führt zur Separierung der kleinen Labien. Eine chirurgische Trennung wird auf Grund der Gefahr von Narben, Strikturen und Stenosen beim Menschen nicht empfohlen (Golombowski *et al.* 1998).

1.5 Ziele der Arbeit

Da es über die Ursachen des CFL-Phänotyps bis zum Zeitpunkt dieser Studie keine verlässlichen Daten gab, wurden die Untersuchungen auf verschiedenen Ebenen durchgeführt, um diejenigen Faktoren zu finden, die den CFL-Phänotyp verursachen oder begünstigen. Dazu wurden die geplanten Untersuchungen in folgende vier Abschnitte eingeteilt:

1. Zur Definition des CFL-Phänotyps war es notwendig, alle charakteristischen Genitalmerkmale von Tieren des DPZ, die diese pathologischen Veränderungen aufwiesen, zu erfassen und den Grad des Vulvaverschlusses festzuhalten. Es sollte die Frage geklärt werden, ob es einen Unterschied des CFL-Phänotyps zwischen jungen und erwachsenen Weibchen gibt und welche weiteren Genitalmerkmale auftreten.
2. Die Evaluation der genetischen und stammesgeschichtlichen Ursachen des CFL-Phänotyps erfolgte durch eine Analyse der Populationsentwicklung in Gefangenschaft mit Hilfe von Stammbaumanalysen.
3. Zu den Einflüssen demographischer und physiologischer Faktoren auf den CFL-Phänotyp könnte eine veränderte Balance an Steroidhormonen gehören. Deshalb wurden die Androstendion- und Östrogenspiegel der CFL-Tiere mit denen der „offenen“ Weibchen verglichen.
4. Die Bedeutung des Cross-sex-Chimärismus für die Maskulinisierung der weiblichen Genitalien wurde mit Hilfe gängiger zytogenetischer Methoden (Giemsa- und DAPI-Färbung) und der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht. Vor allen Dingen interessierte die Frage, warum dieser Chimärismus bei *C. jacchus*-Weibchen nicht zu einer massiven Vermännlichung der Geschlechtsorgane führt oder ob der CFL-Phänotyp bereits eine Form der Maskulinisierung darstellt.

Abbildung 7 zeigt, welche Faktoren und welche Prozesse in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit einbezogen wurden.

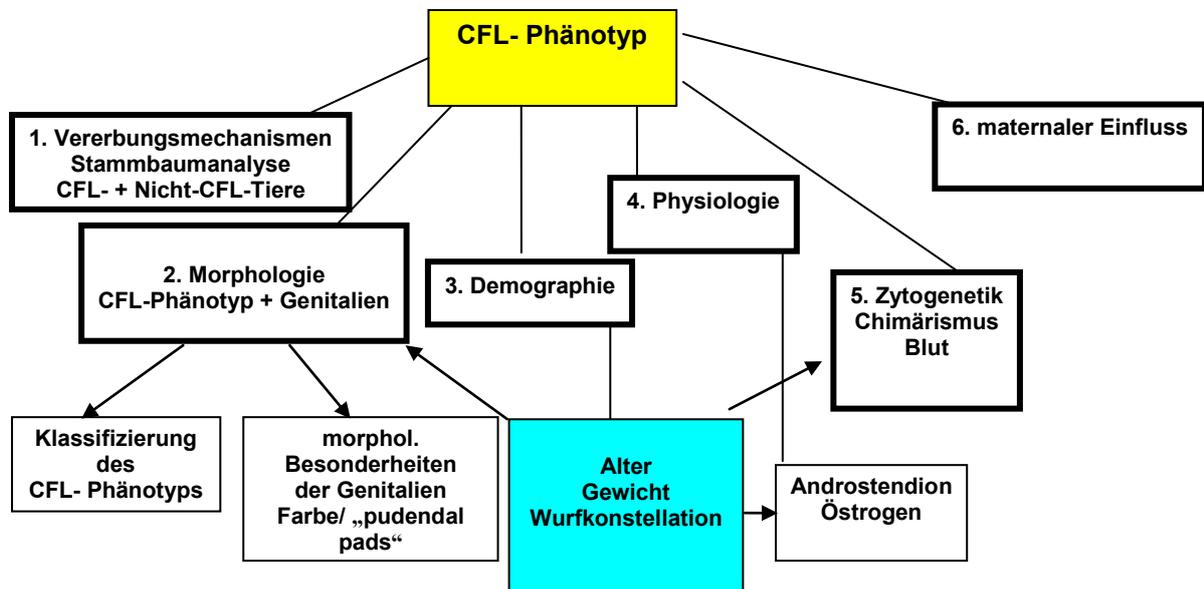


Abb. 7: Schematische Darstellung der untersuchten Faktoren bezüglich des CFL-Phänotyps.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Erhebung des Genitalstatus

Material	Firma/ Bezeichnung/ Ref. Nr.
Messschieber	Nonius Messschieber 150 mm Artikelnr. 6010
Kamera Photodokumentation	Canon Ixus 6.0

Blutentnahme

Material	Firma/ Bezeichnung/ Ref. Nr.
Spritze	ERSTA Ref. Nr. 62. 1402 1 ml Luer Tuberculin
Nadel	Terumo Neolus Ref. NN-2613R
Heparin-Natrium 5000 I.E. / 0,2 ml	Ratiopharm

Kulturmaterialeien

Material	Firma/Bezeichnung/Ref. Nr.
Nährmedium RPMI 1640	Biochrom Best. Nr. FG1215
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom/ Seromed Best. Nr. S0113
Penicillin/ Streptomycin 10000 I.E./ 10000 µg/ml	Biochrom Nr. A2210
Phytohemagglutinin (PHA-E)	Biochrom M 5040
Kulturflaschen 50 ml, PE-Belüftungskappe mit 0,2 µm hydrophober Filtermembran	Sarstedt 83.1810.002
Colcemid (Demecolcine) 10 µg/ml in PBS	Biochrom
Hypotone Lösung Kaliumchlorid (KCl) 0,5591 in 100 ml aqua dest. 0,075 molare KCl-Lösung	Biochrom L 6413
Methanol	Roth P717.1
Eisessig	Roth 37.38.1
Objektträger	Menzel-Gläser Menzel GmbH + Co KG
Deckgläser	Roth Nr. 0657.1

Geräte

Material	Firma/Bezeichnung/Ref. Nr.
Zentrifuge	Hettich, Universal 30 RF
Brutschrank	Heraeus Typ BB 6220 02

Färbungen

Material	Firma/Bezeichnung/Ref. Nr.
Giemsa-Lösung	Merck 1.09204.0500
Phosphatpuffer	Dulbecco's Biochrom Nr. L182-50
Filterpapier	Whatman Nr.1213-270
DAPI-Färbung ,4',6-Diamidino-2-phenylindol	Roth 6335.1
Vectaschield Mounting Medium	Vector Nr. VEC-H-1000

FISH

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Ansatz
Pepsin-Lösung Sigma P6887	10 % Pepsin in H ₂ O-Stamm- lösung 0,01 M HCl	50 µl Pepsin-Stamml.+1 ml 1N HCl + 99 ml H ₂ O
PBS pH 7,4 Dulbecco w/o Ca+Mg Biochrom KG Nr. L 182-50		9,55 g in 1 Liter H ₂ O lösen, pH 7,4
70 % Formamide/ 2xSSC pH 7,0 Sigma F9037	20xSSC 1:10 H ₂ O	<u>1 ml:</u> 30 µl 20xSSC+270 µl H ₂ O+ 700 µl d. Formamid
20xSSC Fa. Abbott Molecular Inc. Nr. 32-80485002J10-32	Lösen in H ₂ O, pH 7	
4xSSC/ 0,2 % Tween (SSCT) Roth 9127.1	4x SSC Tween 20	<u>1 l:</u> 100 ml 20xSSC+400 ml H ₂ O 4xSSC+1 ml Tween
Blocking Solution 3 % BSA/ 4xSSCT	4xSSCT (+Tween) BSA Sigma A-7888	<u>5 ml:</u> 0,15 g BSA in 5 ml 4xSSCT
Antikörper Rabbit anti Dinitrophenol (DNP)		DNP 1:200 verdünnt in 1 % BSA/4xSSCT
Antikörperverdünnung Streptavidin-Cy3-Alexa-488 1:200 in 1 % BSA/4xSSCT	4xSSCT 3 % BSA AK	<u>300µl:</u> 100 µl 3 % BSA+198,5 µl 4xSSCT + 1,5 µl AK
DAPI-Färbelösung (0,2 µg/ml) Roth 6335.1	DAPI-Stammlösung 1 mg/ml	<u>75 ml:</u> 75 ml 4xSSC/T + 15 µl DAPI- Lösung

Mikroskopie

Zeiss-Axiophot Photomikroskop

Zeiss-Axioskop Lichtmikroskop

Östrogenbestimmung

Puffer/Lösung/Antiserum	Zusammensetzung	Ansatz/ Herkunft
PBS Waschpuffer pH 7,2	0,136 M NaCl 2,7 M KCl 8,1 M Na ₂ HPO ₄ 1,5 M KH ₂ PO ₄	
BSA-Assay-Puffer pH 7,2	0,04 M Na ₂ HPO ₄ 0,15 M NaCl 0,1 % BSA	
H ₂ SO ₄ -Stopplösung	2 M H ₂ SO ₄	
Östrogen Enzymlabel		17β-Estradiol-17-HS-HRP von Weihenstephan
Östrogen Antikörper		E2/3 von Meyer (Meyer <i>et al.</i> 1990)
Substratfärbelösung pH 3,9	0,25 M Zitronensäure 0,27 M Na ₂ HPO ₄ 0,02 M Harnstoffperoxid	
TMB-Lösung	1 % Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid gelöst → 2,5 mg TMB in 250 µl DMSO	

Androstendionbestimmung

Puffer/Lösung/Kits	Zusammensetzung
DSL-10-3800 Active® Kit	
Serumproben	1:40 verdünnt in PBS (je 25 µl) und 100 µl Androstendion-Antiserum (in BSA)
TMB-Chromogen-Lösung	Tetramethylbenzidin in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid
BSA-Assay-Puffer pH 7,2	0,04 M Na ₂ HPO ₄ 0,15 M NaCl 0,1 % BSA
Stopplösung	0,2 M H ₂ SO ₄
Testplatte	beschichtet mit goat anti rabbit IgG's
Androstendion Antiserum	mit Kaninchen-Androstendion Serum in BSA-Puffer

Androstendion-Enzymkonjugat	mit an das Enzym Meerrettichperoxidase konjugiertem Androstendion
-----------------------------	--

Geräte für Hormonbestimmung

Gerät	Firma/ Best. Nr.
Plattenwascher	EI x 405 Fa. Bio-TEK
Plattenreader	EI x 808 Fa. Bio-TEK
Platten Castar 9018 96well	No. 11608015
Progesteron mit rabbit anti sheep IgG	Sigma S 1265
Östrogen mit goat anti rabbit IgG	Quartett 3AG394

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Die Weißbüschelaffenkolonie des DPZ besteht zurzeit aus ca. 550 Tieren und ist zum größten Teil in den seit 2003 neu gebauten Einheiten untergebracht. Die Tiere werden sowohl für Zuchtzwecke als auch für wissenschaftliche Untersuchungen und Studien verwendet.

Die Tiere werden in einem Indoor-Haltungssystem gehalten. Es gibt drei Einheiten, in denen die Tiere untergebracht sind. Pro Einheit gibt es 8 Räume. Die Struktur der Räume ist dem Haltungszweck angepasst. In den Zuchteinheiten sind pro Raum bis zu 10 begehbare Käfige (1 m lang x 1 m breit x 2,5 m hoch) untergebracht. In den Räumen der Versuchstierkolonie leben die Tiere in nicht begehbaren Käfigen (70 cm lang, 50 cm breit und 100 cm hoch). Jeder Käfig ist mit Ästen und Baumstämmen ausgestattet, die als Klettervorrichtung dienen. In der Zucht schlafen die Tiere in Holzboxen, in den Versuchstiereinheiten in Metall- und Holzboxen. Zwischen 6:30 und 19:00 Uhr sind die Räume künstlich beleuchtet. Die Raumtemperatur liegt im Durchschnitt bei 25°C, die Luftfeuchtigkeit bei 60 %. In jeder Einheit gibt es einen Extraraum für tierärztliche Zwecke und einen Raum zur Zubereitung der Nahrung.

In den Zuchteinheiten befinden sich die Tiere entweder im Familienverbund oder zu zweit als Zuchtpaar in den Käfigen. In der Reproduktionsbiologie werden die Tiere als Paare gehalten, wobei jeweils ein Partner zeugungsunfähig ist. Wenn ein Überschuss eines Geschlechts vorherrscht, werden auch gleichgeschlechtliche Paare zusammengesetzt.

Die im Zeitraum zwischen Dezember 2005 und Dezember 2008 untersuchten weiblichen *Callithrix jacchus*-Affen (n = 146) stammten alle aus der Weißbüschelaffen-Kolonie des DPZ. Die Tiere kamen aus den zwei genannten Einheiten. In der Zuchteinheit befanden sich 106, in der Abteilung für Reproduktionsbiologie 40 Weibchen. Es wurden die Phänotypen der äußeren Genitalien der Weibchen im Alter zwischen 1 Monat und 10 Jahren morphologisch evaluiert, um eine Übersicht der verschiedenen anatomischen Variationen und Muster zu erstellen. Von besonderem Interesse waren die Altersklassen zwischen 1 Monat und 3 Jahren, da sich in diesem Zeitraum die weiblichen Geschlechtsorgane entwickeln und die Weibchen ins reproduktionsfähige Alter kommen.

Es wurde angestrebt, eine zufällige Auswahl von Tieren zur Untersuchung ihres Genitalstatus zu treffen. Da aber die Tiere im DPZ zueinander über mehrere Generationen einen Verwandtschaftsgrad aufwiesen, war es schwierig, nicht genetisch verwandte Tiere zu finden. Mit dieser Vorgehensweise sollte geklärt werden, ob der CFL-Phänotyp ein familienspezifisches Phänomen ist und vererbt wird oder im Entwicklungsprozess der Weibchen einzuordnen ist. Es war nicht möglich, eine Kontrollgruppe zu den CFL-Tieren in der DPZ-Kolonie aufzustellen, da die

Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Tiere sehr eng sind (s. Stammbaum im Anhang). Am besten geeignet für solch eine Kontrollgruppe wären *C. jacchus*-Weibchen, die in freier Natur leben. Nach unserem Wissen gibt es bis jetzt keine Studien, die den CFL-Phänotyp bei frei lebenden *C. jacchus*-Weibchen untersucht haben.

Tabelle 4 im Anhang gibt einen Überblick über die untersuchten Tiere, ihr Geschlecht und die Proben, die von den Tieren entnommen wurden. Insgesamt wurden 146 weibliche Tiere in die Studie integriert. Blut wurde 74 Tieren entnommen und entweder zur zytogenetischen Untersuchung oder zur Hormonbestimmung benutzt. Bei 146 weiblichen Tieren wurde der Vaginalstatus erhoben.

2.2.2 Tierärztliche Bestandsbetreuung

Die gesamte Primatenhaltung wird von speziell ausgebildeten Tierärzten und Tierärztinnen betreut. Für die Betreuung der Weißbüschelaffenkolonie sind im DPZ Frau Dr. Tamara Becker und Frau Dr. Cristina Schlumbohm zuständig. Zu ihren Aufgaben gehören regelmäßige Gesundheitskontrollen der Tiere, die in erster Linie die Analyse von Blut und Kot sowie die Kontrolle von Gewichtsverläufen beinhalten. Zu den weiteren Aufgabenbereichen gehören die Routinebehandlungen der Neuweltaffen, wie Chippen, Impfen, Ultraschalluntersuchungen, Geburtenkontrolle, Endoskopien, Kastrationen, Amputationen, operative Probengewinnung und Euthanasien. Bei den Versuchstieren der Reproduktionsbiologie spielen vor allem Ultraschalluntersuchungen und Kastrationen eine wichtige Rolle.

2.2.3 Identifizierung der CFL-Tiere

In früheren Untersuchungen aus dem DPZ ist der CFL-Phänotyp bereits beschrieben worden. So hatten Isachenko *et al.* (2002) von 12 Weibchen mit einem CFL-Phänotyp berichtet (Tab. 5, Anhang). Da diese Tiere nicht mehr lebten, konnten keine Nachuntersuchungen an ihnen stattfinden. Trotzdem spielten diese Tiere eine wichtige Rolle bei der Erstellung von Familienlinien innerhalb der Versuchsgruppe, um den Zusammenhang von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen CFL- und Nicht-CFL-Weibchen herauszufinden. Für die Untersuchung der Vererbungstheorie wurden gezielt Tiere auf Verwandtschaftsbeziehungen zu den Isachenko-Tieren hin untersucht (Tab. 5, Anhang).

2.2.4 Erstellung eines einheitlichen Messsystems für die äußeren Geschlechtsorgane der *Callithrix-jacchus*-Weibchen

Isachenko *et al.* (2002) gaben, um das Ausmaß des CFL-Phänotyps aufzuzeigen, nur die Länge der Scheidenöffnung mit offenem und geschlossenem Anteil angegeben an. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine genauere Bestimmung des Genitalstatus von weiblichen *C. jacchus*-Tieren vorzunehmen. Dies wurde durch Bestimmung von vier Messgrößen gewährleistet, die einen Vergleich der Genitalien untereinander ermöglichten (Abb. 8 – 11). Um die Messdaten so genau wie möglich zu

erhalten, wurde mit einem Messschieber gemessen (Abb. 12). Es wurde jeweils die Ausdehnung der äußeren Labien in der horizontalen und vertikalen Richtung erfasst. Die horizontale Messung reichte vom Übergang zwischen Bauchhaut und Labienanfang. Die vertikale Messung erfolgte von der Klitoris bis zum Übergang der Vaginalschleimhaut in die Hautregion zwischen Vagina und Anus. Die Länge der Vulva wurde von dem Punkt unter der Klitoris bis zum letzten Punkt der Vulva-Öffnung gemessen. Dann wurden der Anteil der Vulva, der offen und der Anteil der noch geschlossen war, gemessen. So war es später möglich, diese Faktoren miteinander in ein Verhältnis zu setzen und den Vulvastatus jedes Tieres mit dem anderer zu vergleichen. Zwei weitere Faktoren, die parallel zu den Messungen dokumentiert wurden, waren das Gewicht und das Alter der Tiere. Aus der Gruppe der ausgesuchten Weibchen (n = 146) erfolgte bei 55 Weibchen eine dreimalige Messung der Genitalien, der Rest der Weibchen wurde einmalig vermessen.

Weiterhin wurde bei jedem Tier der Vulvastatus zum Zeitpunkt der Messung bildlich dokumentiert. Diese Dokumentation erfolgte mit einer Canon Ixus 60 Kamera. So war gewährleistet, dass später nicht nur die Messdaten miteinander verglichen werden konnten, sondern dass auch jede Änderung des Vulvastatus optisch dokumentiert war.

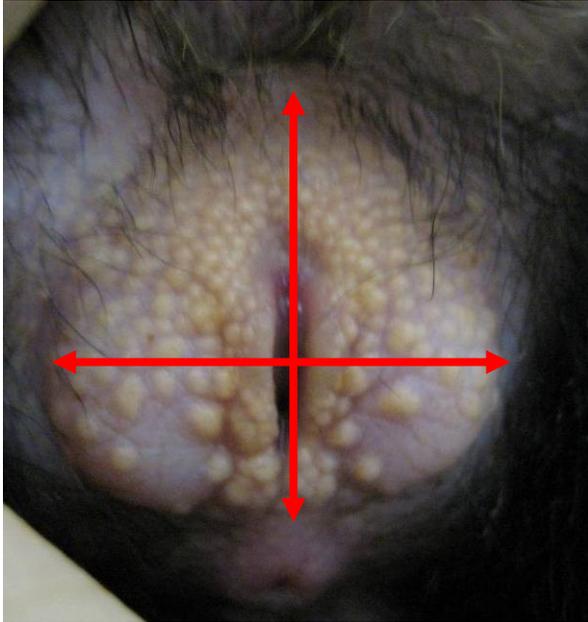


Abb. 8: Horizontale und vertikale Messung.

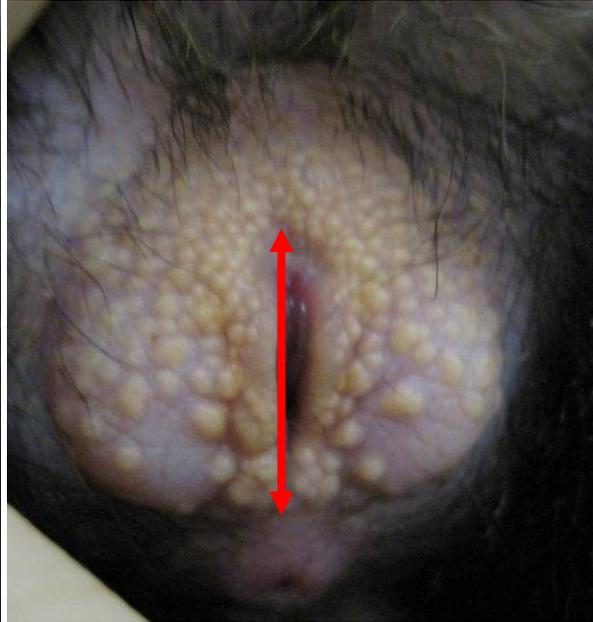


Abb. 9: Messung der Vulva.

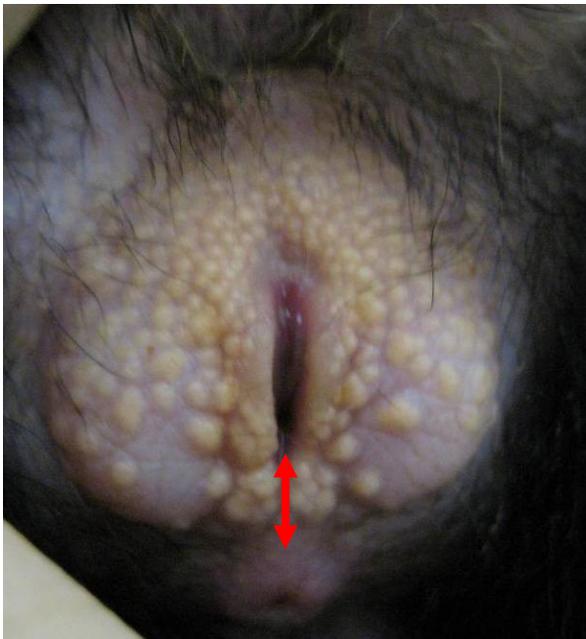


Abb. 10: Anteil der geschlossenen Vulva.

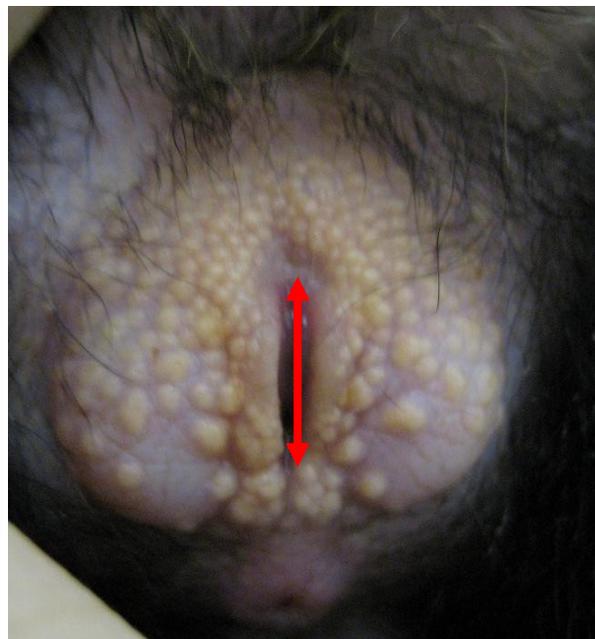


Abb. 11: Anteil der offenen Vulva.



Abb. 12: Genitalmessungen mit einem Messschieber bei *Callithrix-jacchus*-Weibchen. **A.** Messung der vertikalen Genitallänge. **B.** Messung der horizontalen Genitalbreite.

2.2.5 Entwicklungsbiologische Aspekte der äußeren weiblichen Genitalien bei *C. jacchus*-Affen

Eine Arbeitshypothese war, dass sich der CFL-Phänotyp durch das CFL-Häutchen bildet und nur eine Teilphase in der natürlichen Genitaleentwicklung darstellt. Bis zur Geschlechtsreife der Weibchen würde sich dieses Häutchen auflösen und sich die Vulva öffnen. Die Bedingungen in Gefangenschaft würden den Lebensstil der Weibchen so ändern, dass es zu einer Verzögerung dieses Prozesses durch Störungen der Entwicklungsphysiologie kommt. Die in Abb. 13 gezeigten Bilder stellen verschiedene Entwicklungsphasen der Genitalregion in den Altersklassen 2 Wochen, 3 Monate und 6 Monate dar.

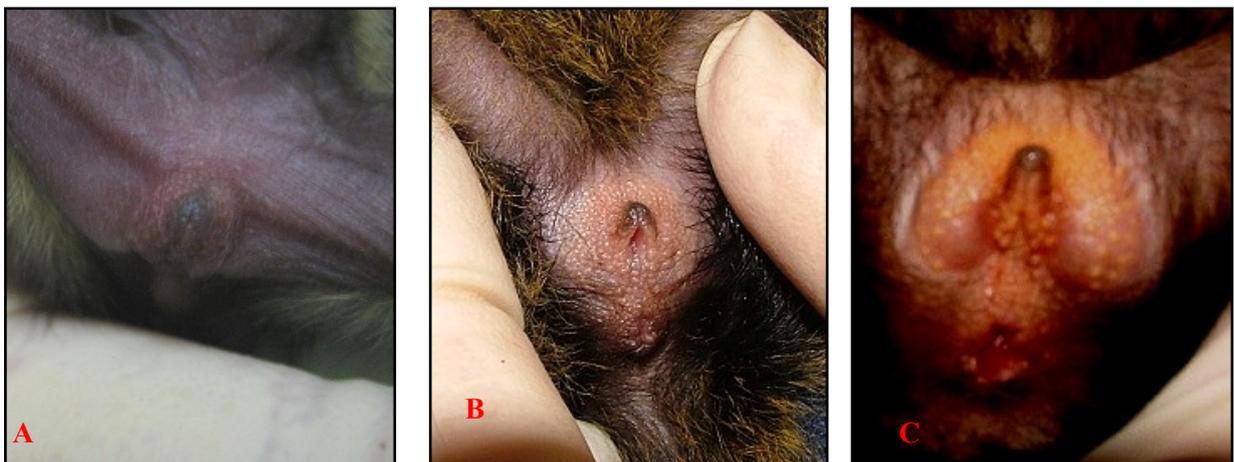


Abb. 13: Das typische Genitalerscheinungsbild bei juvenilen Weibchen. **A.** 2 Wochen alt, **B.** 3 Monate alt, **C.** 6 Monate alt. Die Vulvaöffnung ist in dieser Altersklasse so klein, dass ein Geschlechtsakt nicht möglich ist.

In den ersten 4 bis 6 Wochen nach der Geburt ist es sehr schwierig, das Geschlecht (♂ oder ♀) bei den Marmosets äußerlich zu erkennen, da die äußeren Geschlechtsorgane nicht komplett ausgebildet sind. Die Vulvaöffnung ist in diesem Zeitraum praktisch nicht vorhanden. Es existiert nur eine kleine

Öffnung zum Urinieren. Bei der Untersuchung der äußeren Genitalien traten die ersten geöffneten Weibchen in einem Alter von 1,5 Monaten auf.

2.2.6 Erstellung der Stammbäume der CFL-Tiere

Zur Erstellung der Stammbäume für die CFL- und Nicht-CFL-Tiere wurde das Computerprogramm Visual FoxPro in der Version 7.0 und später in der Version 9.0 zur Hilfe genommen. Mit diesem Programm werden im DPZ die *Callithrix-jacchus*-Kolonie, die *Saguinus-Oedipus*-Kolonie und die Rhesus- Kolonie dokumentiert und verwaltet. Das Programm bietet verschiedene Möglichkeiten der Erfassung einer Affenkolonie. Wichtige Funktionen sind die Darstellung von aktuellen Gewichtsverläufen, Hormonverläufen wie z.B. Progesteron- und Östrogenwerten, Erfassung von Geburten und die Zuchtplanung. Für die Zukunft ist geplant, ein Tool einzufügen, das es ermöglicht, tierärztliche Eintragungen und Krankheitsverläufe zu dokumentieren. So soll ein breit gefächerter Zugriff auf Informationen über die verschiedenen Affenkolonien sichergestellt werden.

Leider konnte das Programm zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Stammbäume erstellen. Da es aber die Daten der Herkunft und der Vorfahren jedes Tieres enthielt, war es möglich, einzelne Familienlinien bis zum Anfang der Kolonie zu verfolgen. Hierbei gab es jedoch große Unterschiede. Manche Familien lebten bereits seit mehreren Generationen im DPZ, andere wurden erst vor kurzer Zeit von anderen Institutionen hinzugekauft. Bei diesen Tieren war es schwierig, Daten über ihre Vorfahren zu bekommen, da nicht alle Institutionen ein dem DPZ ähnliches Registrierungssystem für ihre Tiere führen. So war bei einigen Tieren eine Erfassung ihrer Ahnen nicht möglich. Sie wurden aus diesem Grund in den Stammbäumen besonders gekennzeichnet.

2.2.7 Ahnenherkunft der DPZ-Tiere

Eine der Arbeitshypothesen war, dass in den verschiedenen Familienlinien der CFL-Phänotyp in unterschiedlicher Häufigkeit auftritt. Isachenko *et al.* (2002) haben die These aufgestellt, dass der CFL-Phänotyp genetisch bedingt sein kann und die Gene dafür von außerhalb in die DPZ Kolonie gelangt sind. Diese These wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Da aber die Daten lückenhaft waren und deshalb nicht die Tiere aller Generationen erfasst werden konnten, wurde versucht, gewisse Tendenzen aufzuzeigen.

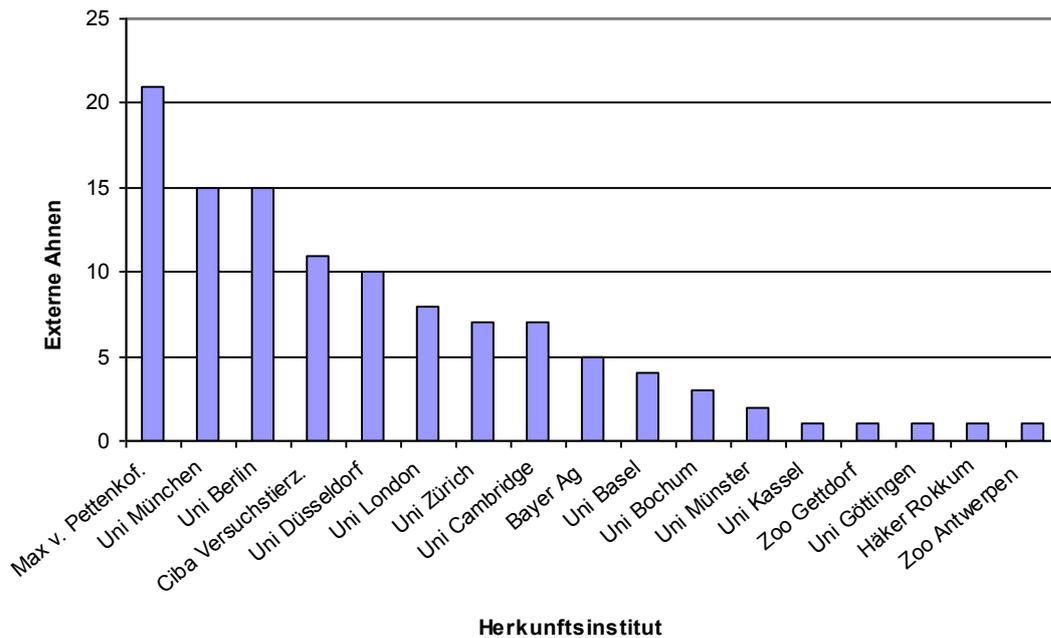


Abb. 14: Herkunft von Vorfahren der Familien mit CFL-Tieren. Insgesamt waren es 113 Weißbüschelaffen aus 17 Kolonien.

Abbildung 14 gibt eine Gesamtübersicht über die Zahl und Herkunft der Tiere, die von anderen Kolonien ins Deutsche Primatenzentrum eingeführt und zur Zucht verwendet wurden. Aus 17 Kolonien wurden 113 Tiere zum DPZ-Bestand hinzugefügt. Die fünf wichtigsten waren das Max von Pettenkofer Institut (München), die Uni München, die Uni Berlin, die Ciba Versuchstierzucht und die Uni Düsseldorf. Ausgehend von der Hypothese, dass der CFL-Phänotyp von außen ins DPZ hinein getragen wurde, war die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass das betreffende Gen oder die betreffenden Gene aus einer oder allen dieser fünf Kolonien stammen mussten.

2.3 Zellmaterialien

Das verwendete Zellmaterial (Blutproben) der Weißbüschelaffen wurde mit Hilfe der Tierpfleger und Frau Dr. T. Becker entnommen. Die Zellen für die Chromosomenpräparate wurden aus frischem, heparinisiertem Vollblut gewonnen und zytogenetisch untersucht.

2.3.1 Blutentnahme und Lagerung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte bei den Weißbüschelaffen entweder aus der *Vena femoralis* oder aus der *Arteria femoralis* (Abb. 15). Anatomisch liegen diese beiden Gefäße relativ nah beieinander, so dass man beide gut erreichen kann. Es wurde eine 1 ml Spritze (Ersta) benutzt. Eine Gerinnung des Blutes konnte durch Verwendung von 50 µl Natrium-Heparin (50 I.E./ml) verhindert werden.

Grundsätzlich wurde am Tag der Blutentnahme die Lymphozytenkultur angesetzt, da eine Lagerung der Proben im Kühlschrank über ein bis zwei Tagen zu einer deutlichen Verringerung der Metaphase-

Zellen führte. Um beim Weißbüschelaffen eine möglichst hohe Ausbeute solcher Zellen zu erreichen, ist es wichtig, die Lymphozyten vor der Kultur so wenig wie möglich gewissen Stressfaktoren auszusetzen (z.B. Erschütterungen, Temperaturschwankungen etc.).

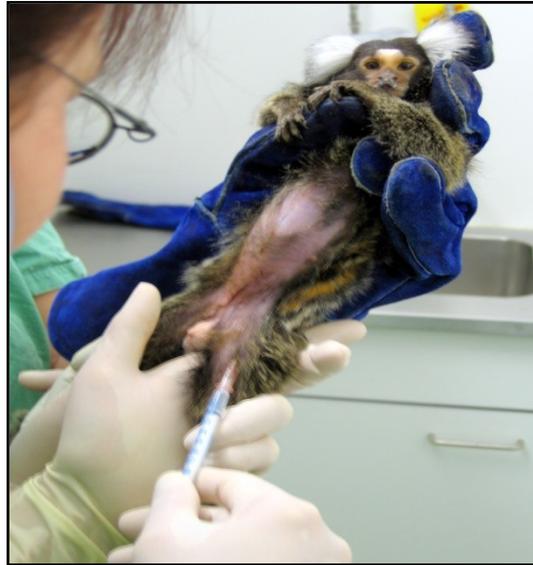


Abb. 15: Blutentnahme aus der V. femoralis beim *Callithrix-jacchus*-Affen.

2.3.2 Zellkultur der Blutlymphozyten

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Kulturen unter einer Sterilbank angesetzt. Heparinisiertes Vollblut (0,6 ml) wurde mit 9 ml Medium (RPMI 1640), 1 ml FKS (15%), 200 µl Penicillin/Streptomycin und 150 µl Phytohämagglutinin (PHA-E) bei 37°C in 5 % CO₂ und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit in 50 ml Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Metaphasenpräparation erfolgte nach 72stündiger Inkubation. Zur Erzielung einer möglichst großen Anzahl an Metaphasen musste in Vorversuchen die optimale Mitogenkonzentration ermittelt werden. Da es keine Standardprotokolle für die Lymphozytenkultur bei Krallenaffen gibt, wurde ein Standardprotokoll für den Menschen (Humangenetisches Institut der Universität Göttingen; Herrn PD Dr. Burfeind) so modifiziert, dass es für die Chromosomendarstellung bei *C. jacchus*-Affen eingesetzt werden konnte.

2.3.3 Aufarbeiten der Lymphozytenkultur

40 bis 60 Min. vor dem Ende der Kultivierungsdauer wurde den Kulturen 10 µg/ml Colcemid zugegeben. Colcemid ist ein Zellgift und bewirkt eine Depolymerisierung des Spindelapparates, so dass die Segregation der einzelnen Chromatiden in der Mitose nicht ablaufen kann. Erfahrungswerte haben gezeigt, dass die Zeit der Colcemideinwirkung auf die Kultur über die Länge der Chromosomen in der Metaphase entscheidet. Je kürzer die Colcemidwirkung auf die Kultur war, desto länger waren die Chromosomen. Bei einer zu kurzen Colcemidwirkung (<40 Min.) war die Anzahl der gewonnenen

Metaphasen sehr gering, während eine Einwirkungszeit von >55 Min. zu einer hohen Anzahl an Metaphasen führte.

Da für diese Studie das Y-Chromosom bei der *C. jacchus*-Spezies von besonderer Bedeutung war, dieses aber im Vergleich zu den anderen Chromosomen sehr klein ist, war es wichtig, dass eine optimale Länge des Y-Chromosoms durch die Kultur erreicht wurde. Deshalb betrug die Einwirkungszeit des Colcemids zwischen 40 bis 55 Min. bevor die Kultur beendet wurde. Nach Ende der Kultur wurde die Zellsuspension 10 Min. bei 1000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit ca. 10 ml, 37°C warmer hypotoner Lösung (0,75 M KCl) überschichtet und für 20 Min. bei 37°C kultiviert. Auf Grund des osmotischen Gefälles schwellen die Zellen an, was eine bessere Ausbreitung der Chromosomen auf dem Objektträger bewirkt. Nach erneuter Zentrifugation und dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit dem restlichen Überstand vermischt, in eine Pasteurpipette aufgezogen und gleichzeitig mit 10 ml eiskaltem Fixativ (Methanol / Eisessig 3:1) tropfenweise zusammengebracht. Das Zusammenfließen der Zellsuspension mit dem Fixativ hat sich als bessere Methode herausgestellt als das Überschichten mit Fixativ. Nach erneuter Zentrifugation (10 Min.) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 10 ml eiskaltem Fixativ resuspendiert. Das Fixativ-Zell-Gemisch blieb dann für 10 Min. bei Raumtemperatur stehen. Danach wurden die Zellen mit Fixativ noch einmal durchmischt und dann jeweils zwei Tropfen auf eiskalte, entfettete Objektträger gegeben. Eine gute Chromosomenspreitung ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit, wobei der letztgenannte Faktor den stärksten Einfluss hat. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Raumtemperatur von 24°C und bei hoher Luftfeuchtigkeit erreicht. Die übrig gebliebene Zellsuspension aus den Blutkulturen konnte danach bei -20°C für längere Zeit gelagert werden und bei Bedarf ohne Qualitätsverlust der Metaphasen wieder verwendet werden.

2.3.4 Vorbehandlung der Objektträger

Für die Präparation von Metaphasenchromosomen wurden die Objektträger zum Entfetten mindestens über Nacht, besser jedoch über mehrere Tage, in 70 % Ethanol im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Vier bis fünf Stunden vor der Chromosomenpräparation wurden sie zuerst mit Aqua bidest. gewaschen, dann wieder in Aqua bidest. gelegt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Eine über Tage dauernde Aufbewahrung der Objektträger in Aqua bidest. im Kühlschrank ist nicht ratsam, weil sich ubiquitär vorkommende Keime vermehren können und dadurch die Qualität der Chromosomendarstellung beeinflusst wird.

2.4 Etablierung von Färbemethoden

Für die Bestimmung des Cross-sex-Chimärismus wurden 2 Strategien verfolgt. Zuerst wurde mit den chromosomenmorphologischen Basismethoden Giemsa- und DAPI-Färbung der Chimärismus untersucht und des Weiteren wurden mit geschlechtsspezifischen Chromosomenmarkern mit der FISH-Färbung der Chimärismus evaluiert. Das Y-Chromosom beim *C. jacchus*-Affen hat eine sehr charakteristische Form und Größe und unterscheidet sich von den anderen Chromosomen deutlich, und man kann es in gut gespreizten und gefärbten Metaphasen leicht von den anderen Chromosomen unterscheiden.

Zunächst wurde die Quinacrinfärbung zur Bestimmung des Cross-sex-Chimärismus angewandt, mit dem Ziel, eine direkte Y-Chromosom Färbung zu erreichen (Methode nach Borgaonkar *et al.* 1971). Beim *Callithrix-jacchus*-Affen wurde diese Färbetechnik bisher noch nicht beschrieben. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Quinacrinfärbung keine zuverlässige Methode zur Identifizierung des Y-Chromosoms darstellt. Daraufhin wurde entschieden, mit der Giemsa- und DAPI-Färbung weiter zu arbeiten, bei denen das Y-Chromosom nach morphologischen Gesichtspunkten gesucht und von den anderen Chromosomen unterschieden wird. Bei *C. jacchus*-Affen war die Y-Chromosom Identifizierung mit der DAPI-Färbung leichter als mit der Giemsa-Färbung. Grund dafür ist ein stärkerer Kontrast zwischen DAPI-gefärbten Chromosomen und dem Hintergrund, so dass die Konturen der Chromosomen deutlicher zu erkennen waren. Bei dem Ergebnis der beiden Färbemethoden gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied, so dass die Ergebnisse dieser beiden Methoden in den nachfolgenden Untersuchungen gepoolt werden konnten.

Es war wichtig, das Ergebnis der morphologischen Identifizierung der X- und Y-Chromosomen mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zu bestätigen, da die bisherigen zytogenetischen Untersuchungen an Marmosets immer nur mit klassischen Methoden durchgeführt wurden. Dafür war es notwendig, neue geschlechtsspezifische Chromosomenmarker für *C. jacchus*-Affen zu entwickeln, da die bisher vorhandenen FISH-Sondensets für Menschen bei dieser Spezies nicht funktionierten. Es wurden deshalb von Herrn PD Dr. Stefan Müller aus München XY-Chromosomen-spezifische Sonden für Marmosets entwickelt (Kapitel 2.4.3).

Bei 26 Tieren wurde der Cross-sex-Chimärismus mit Hilfe der Giemsa- und DAPI-Färbung sowie der FISH-Technik bestimmt. Dabei wurden Metaphasen von 17 Weibchen auf das Vorhandensein des Y-Chromosoms untersucht. Bei 9 Weibchen kam die FISH-Technik zum Einsatz. Insgesamt wurden 1927 Metaphasen und 1387 Interphasen untersucht. Bei der Untersuchung der Metaphasen variierte die Anzahl zwischen 25 und 100 pro Tier. Bei den Interphasen waren es stets 100 untersuchte Zellen pro Weibchen. Mit der FISH-Technik wurden Interphasen aus Blutlymphozyten analysiert.

2.4.1 Giemsa-Färbung

Zur einfachen Karyotypisierung wurde die Giemsa-Färbung herangezogen. Es wurde 2 ml Giemsa-Lösung durch ein Faltenfilter filtriert und mit einem Phosphatpuffer (di-Natriumhydrogenphosphat/Kaliumdihydrogenphosphat, pH 6,88) gemischt. Die Oxidationsschicht auf der Oberfläche wurde mit Filterpapier abgezogen, die trockenen Präparate für 5 Min. in die Färbelösung gestellt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Nach dem Trocknen konnten die Präparate sofort unter dem Mikroskop durchgemustert werden. Durch die morphologischen Besonderheiten des Y-Chromosoms konnte es auch nach dieser relativ einfach durchzuführenden Färbung problemlos analysiert werden (Abb. 16).

2.4.2 DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch an DNA bindet und so DNA-DAPI-Komplexe entstehen lässt. Der DNA-DAPI-Komplex leuchtet bei Anregung mit ultraviolettem Licht in blauer Farbe (Abb. 16). Im Komplex mit DNA hat DAPI ein Absorptionsmaximum von 358 nm und ein Emissionsmaximum von 461 nm.

Es wurde eine DAPI-Stammlösung mit 25 mg gelöstem DAPI-Pulver in 25 ml dest. H₂O (1 mg/ml) angesetzt. Diese wurde bei -20°C im Dunkeln gelagert und blieb 1 Jahr lang stabil. Für die Gebrauchslösung wurde eine Konzentration von 0,2 µg/ml benötigt. Die Stammlösung wurde dafür 1:5000 mit sterilem H₂O verdünnt. 15 µl der Gebrauchslösung wurden in 75 ml Pufferlösung gelöst und in eine Küvette gegeben, die durch Aluminiumpapier vor Licht geschützt wurde. Die betroffenen Objektträger wurden für 10 bis 15 Min. in der Küvette inkubiert und dann mit dest. H₂O gründlich abgespült. Danach wurden die Objektträger mit Vectaschild Mounting Medium eingedeckt und unter dem Mikroskop analysiert.

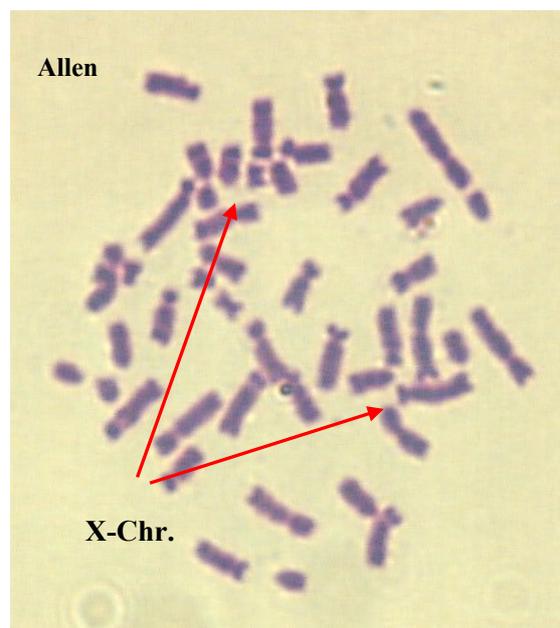
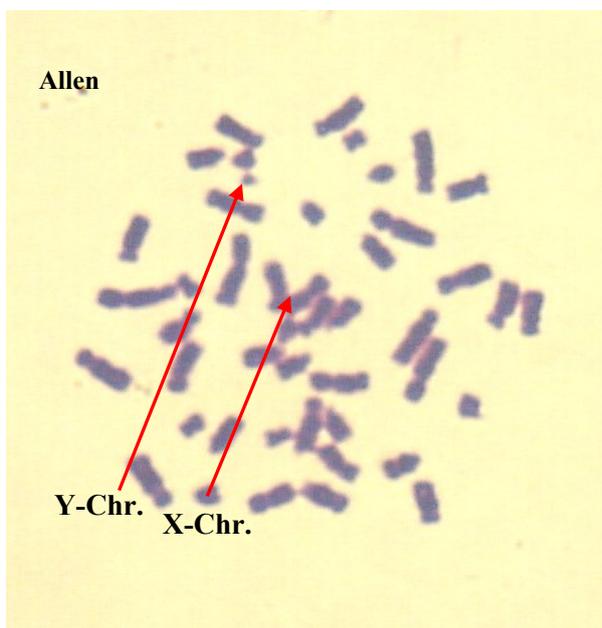
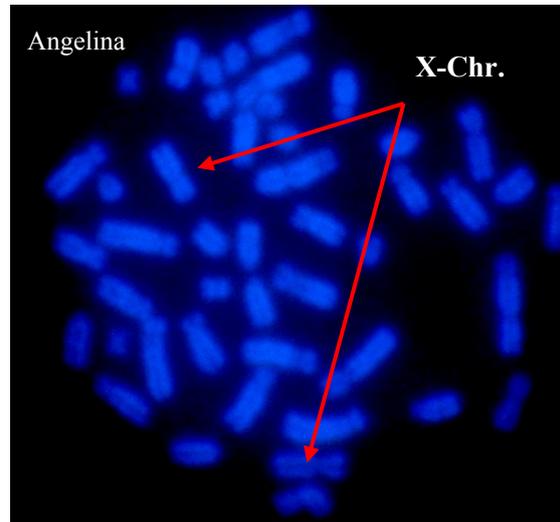
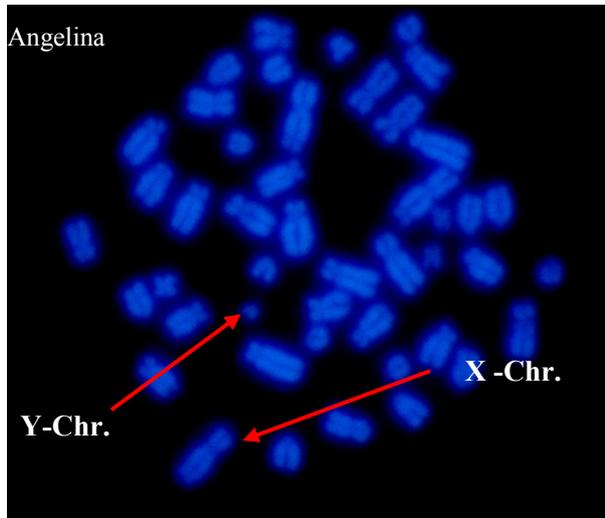


Abb. 16: Metaphasenchromosomen von 2 *Callithrix-jacchus*-Weibchen (Angelina ♀ + Allen ♀) mit Cross-sex-Chimärismus nach DAPI- (obere Bildreihe) und Giemsa-Färbung (untere Bildreihe). Metaphasen mit XY- (linke Bilder) und XX-Chromosomen (rechte Bilder).

Als Geschlechtschromosomen besitzt der *Callithrix-jacchus*-Affe ein submetazentrisches X-Chromosom und ein akrozentrisches Y-Chromosom, so dass beide in der Metaphase durch ihre individuelle Form von den anderen Chromosomen gut zu unterscheiden sind (Abb. 17).

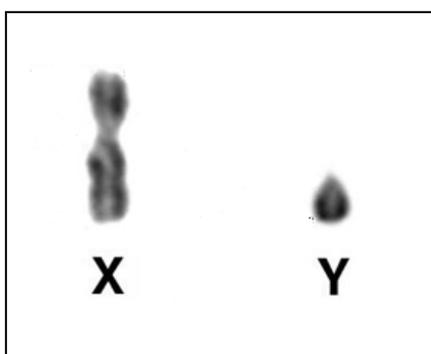


Abb. 17: Einzeldarstellung der beiden Geschlechtschromosomen (Neusser 2004, Seite 146).

2.4.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist es möglich, mit DNA spezifischen, nicht radioaktiven Sonden ganze Chromosomen (Pinkel *et al.* 1988; Lichter *et al.* 1988; Cremer *et al.* 1988) oder Subregionen (Cremer *et al.* 1986; Landegent *et al.* 1985; Lengauer *et al.* 1991) in der Interphase oder in der Metaphase nachzuweisen. Das Prinzip der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung beruht auf der molekularen Verknüpfung von zueinander hochgradig komplementärer DNA- oder RNA-Sequenzen zu einem Doppelstrangmolekül. Die direkte Zuweisung dieser Sequenzen kann an morphologisch differenzierbaren Strukturen wie Chromosomen, Zellen oder Zellkernen erfolgen. Die Methode wurde unabhängig voneinander von mehreren Wissenschaftlern entwickelt (John *et al.* 1969; Pardue und Gall 1970). Grundsätzlich kann durch die Art, wie die als Sonde verwendete DNA markiert wird, eine radioaktive von der nicht radioaktiven *in-situ*-Hybridisierung unterschieden werden. Während bei der erst genannten Methode die Sonden-DNA über radioaktive Isotope (z.B. ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P oder ^3H) markiert wird, erfolgt bei der letzteren Methode der Nachweis über Fluoreszenzfarbstoffe (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung: FISH), die z.B. an Biotin- oder Antikörper markierte Sonden-DNA ankoppeln. Bei der nichtradioaktiven *in-situ*-Hybridisierung unterscheidet man wiederum eine direkte von der indirekten Methode. Bei der direkten Methode werden Nukleotide direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Sonden-DNA kann so nach der Hybridisierung nachgewiesen werden. Die indirekte Methode beruht auf der Bindung von Antikörpern an Reportermolekülen, welche in die DNA eingebaut werden. Als Reportermoleküle für die Sonden können z.B. Digoxigenin, Biotin oder Dinitrophenol dienen. Eine Detektion kann dann nach der Hybridisierung durch den Einsatz von Enzymen (z.B. Peroxidase) oder über Antikörper gebundene Fluorochrome erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die indirekte Methode mit den Reportermolekülen Biotin und Dinitrophenol und den beiden Antikörper gebundenen Fluorochromen Alexa 488 (grün, markiert X-Chromosom) und Cy3 (rot, markiert Y-Chromosom) benutzt.

Das Ziel der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung in der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der eine einfache und schnelle Bestimmung des Chimärismus in der Interphase möglich ist. Die konventionellen zytogenetischen Methoden mit Giemsa- und DAPI-Färbung der Metaphasen sind sehr zeitaufwendig und benötigen viel Erfahrung in der Suche und Analyse von Metaphasen. Es kommt immer wieder vor, dass nach einer Zellkultur nicht genug auswertbare Metaphasen für eine Analyse zur Verfügung stehen. So müssen Lymphozytenkulturen wiederholt werden, um für die Auswertung genug Metaphasen zu gewinnen. Auch sollten durch die FISH-Versuche die Giemsa- und DAPI-Ergebnisse bei einem Teil der Versuchstiere kontrolliert und verifiziert werden.

Obwohl mittlerweile FISH-Sonden für einige Primatenarten erhältlich sind, waren zum Zeitpunkt der Studie für die Geschlechtschromosomen von *C. jacchus*-Affen keine Sonden bekannt. Im Rahmen eines Kooperationsprojekts wurden deshalb solche Sonden an der Ludwig-Maximilians-Universität in München von Herrn PD Dr. Stefan Müller und Frau Dr. Michaela Neusser sowie von Herrn Prof. Dr. Peter Vogt vom Universitäts-Klinikum Heidelberg eigens für diese Arbeit hergestellt. Es wurde die Y-Chromosom-spezifische Sonde cos 2 (Y-specific cosmid clone 50 Kbp insert) in Heidelberg entwickelt (noch nicht veröffentlicht). Für das X-Chromosom wurde die spezifische Sonde BAC 257 (Bacterial artificial chromosome clone 150 Kbp insert, ENCODE region 324 X: 122,8 Mbp) (Encyclopedia of DNA elements) von der Arbeitsgruppe aus München hergestellt (noch nicht veröffentlicht). Das FISH-Protokoll für diese Arbeit wurde von Herrn PD Dr. Stefan Müller entwickelt und für die Fragestellung modifiziert.

2.4.3.1 Vorbereitung der Präparate

In einem ersten Schritt wurden die Methanol-Eisessig-fixierten Zellen mittig auf einen mit Alkohol gesäuberten Objektträger getropft. Es wurden jeweils zwei Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Nachdem diese luftgetrocknet waren, wurden die Objektträger für 10 Min. in vorgewärmter Pepsinlösung (50 µl Pepsin-Stock + 1 ml 1N HCl + 99 ml H₂O) bei 37°C in einer Glasküvette inkubiert. Die Behandlung mit der Pepsinlösung führte dazu, dass die Präparate von zurückgebliebenen Zytoplasmaresten befreit wurden. Danach wurden die Objektträger in PBS 3 x 5 Min. bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 % je 3 Min. bei RT) dehydriert. Die Objektträger wurden danach entweder 1 Stunde bei 60°C in einem Trockenofen getrocknet oder über Nacht bei 37°C in einem Trockenschrank inkubiert. Danach konnten die OT für die FISH benutzt werden.

2.4.3.2 Denaturierungen der DNA-Sonden und der Präparate

In einem zweiten Schritt wurden die X- und Y-Chromosom spezifischen DNA-Sonden 7 Min. lang bei 72°C denaturiert und danach für 30-60 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Ziel dieser Prozedere war es, repetitive DNA-Sequenzen zu reassoziieren.

Des Weiteren wurden die Interphasenpräparate bei 70°C für 90 Sec. in 70 %iger Formamide/2xSSC und einem pH-Wert von 7 inkubiert. Daraufhin wurden die Objektträger für je 3 Min. in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 % je 3 Min. bei RT) dehydriert.

2.4.3.3 Hybridisierung-*in-situ*

Nach Trocknung der Präparate wurde je OT 5 µl spezifische DNA-Sonde (X-Chromosom: BAC 257, Y-Chromosom: cos 2) auf ein ausgewähltes Areal, in dem sich eine große Menge an Interphasen Zellen befand, aufgetropft, dann mit Deckgläsern (15 x 15 mm) abgedeckt und mit Fixogum

versiegelt. Die Hybridisierung fand bei 37°C in dunkler feuchter Kammer über einen Zeitraum von ca. 45 Stunden statt.

2.4.3.4 Waschen und Antikörper-Detektion

Nach der Hybridisierung wurden die OT 3 x 5 Min. in 0,1xSSC bei 60°C gewaschen, dann für 2 Min. in 4xSSCT inkubiert. Danach gab man auf jeden OT 1 ml „blocking solution“ (3 % BSA/ 4xSSCT), und für die Blockierung unspezifischer Bindungen stellte man die Präparate erneut 15 Min. bei 37°C in einen Brutschrank. Anschließend erfolgte eine weitere Spülung in 4xSSCT bei RT über 1 Min. Nachfolgend überschichtete man das Präparat mit ca. 800 µl einer vorgewärmten 3 %igen BSA/4xSSCT-Lösung, deckte es mit einem Deckglas ab und inkubierte es dann für 15 Min. bei 37°C. Hinterher wurden die OT in 4xSSCT bei RT für 2 Min. gespült.

Die Detektion der gebundenen DNA-Sonden cos 2 und BAC 257 erfolgte mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Zur Detektion der X-Chromosom-spezifischen Sonde BAC 257 wurde der Goat-anti-Rabbit-Antikörper benutzt, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (grün) markiert war. Die Y-Chromosom-spezifische Sonde cos 2 wurde mit dem Antikörper Streptavidin detektiert, welcher mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy3 (rot) markiert war.

Der erste Antikörper anti Rabbit anti Dinitrophenol (DNP) wurde 1:200 mit 1 %iger BSA/4xSSCT-Lösung verdünnt. Davon wurden 150-200 µl auf das ausgewählte Areal des Objektträgers gegeben und mit einem Deckglas (24 x 50 mm) abgedeckt und in einer dunklen Feuchtkammer für 45 Min. bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Objektträger 3 x 5 Min. in 4xSSCT bei 42°C gewaschen.

Beim zweiten Detektionsschritt wurden die beiden Antikörper Goat anti Rabbit Alexa 488 und Streptavidin Cy3 in einem Eppendorf Tube in 1 %iger BSA/4xSSCT gemischt und in einem Verhältnis 1:200 verdünnt. 150-200 µl von den verdünnten Antikörpern wurden auf den Objektträger gegeben, mit einem Deckglas (24 x 50 mm) abgedeckt und 45 Min. bei 37°C inkubiert. Hinterher wurden die Objektträger wieder 3 x 5 Min. in 4xSSCT bei 42°C gewaschen.

Nach der Detektion wurden die Präparate mit dem Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (0,2 µg/ml) gegengefärbt. Dazu wurden 15 µl Stammlösung (1 mg/ml) in 75 ml 4xSSCT verdünnt und auf 37°C vorgewärmt. Danach wurden die Objektträger für 10-15 Min. im Dunkeln bei 37°C gefärbt, mit 4xSSCT kurz gespült und mit Vectashield Mounting Media eingedeckt. Interphasepräparate wurden mit 1-2 Tropfen von Vectashield Mounting Media überschichtet und mit einem Deckglas (24 x 50 mm) versehen. Dieses Medium verhindert das Ausbleichen der Präparate und macht sie bei einer Lagerung von 4°C über mehrere Monate haltbar. Nachfolgend sind Lymphozyteninterphasen mit der FISH-Färbung dargestellt (Abb. 18).

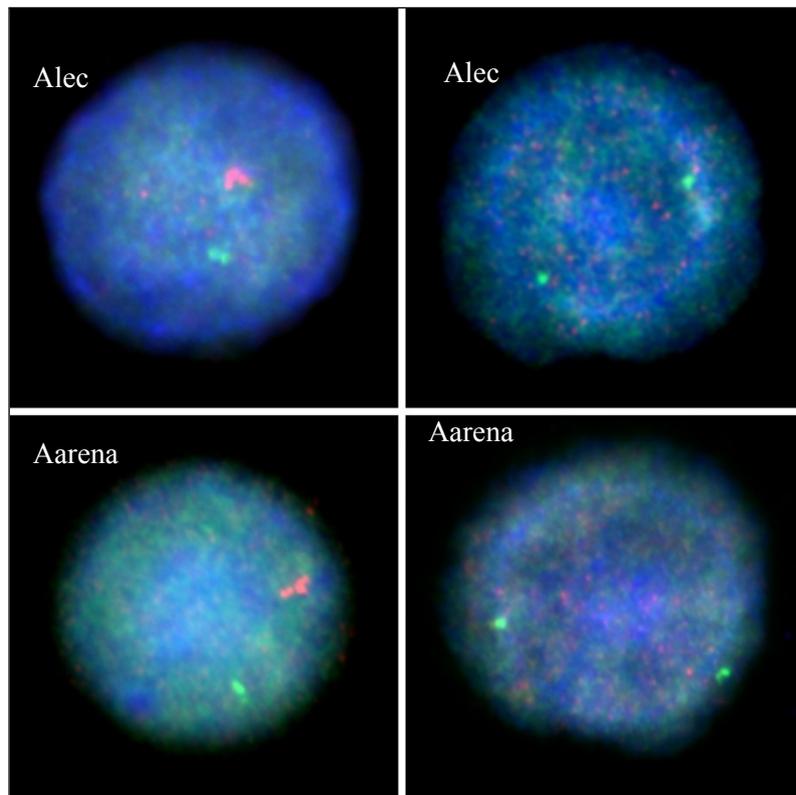


Abb. 18: Darstellung des Cross-sex-Chimärismus mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung in Lymphozyteninterphasen bei einem Männchen (Alec ♂) und einem Weibchen (Aarena ♀). Das **Y-Chromosom** erzeugt ein rotes und das **X-Chromosom** ein grünes Signal.

2.5 Mikroskopie

Die mikroskopische Analyse der Metaphasen- und Interphasenpräparate erfolgte mit einem Zeiss-Axiophot Photomikroskop und einem Zeiss-Axioskop Lichtmikroskop. Letzteres war mit einer HBO 50 Quecksilberlampe mit entsprechender Fassung und Kollektor, das Zeiss-Axiophot mit einer Halogen-Glühlampe von 12V und 100W ausgestattet. Das Suchen der Metaphasen nach Giemsa-Färbung erfolgte mit dem Zeiss-Axioskop und einem Objektiv mit 20facher Vergrößerung. Für die digitale Speicherung (Canon Ixus 60 Kamera) wurde eine 63 oder 100fache Vergrößerung gewählt.

Die Metaphasen und Interphasen, die mit der DAPI- und der FISH-Färbung gefärbt waren, wurden mit dem Zeiss-Axiophot Photomikroskop gesucht und analysiert. Die Chromosomenfärbungen und Gegenfärbungen mit DAPI und die Hybridisierungssignale durch Cy3 und Alexa 488 wurden mit verschiedenen Filtern, die sich aus Anregungsfilter, Strahlenteiler und Emissionsteiler zusammenfügten und sich auf das benötigte Emissionsspektrum der Fluoreszenzen ausrichteten, analysiert (Tab. 1).

Tab. 1: Eigenschaften der verwendeten Filter für die benutzten Fluoreszenz-Farbstoffe.

Filter für	Anregung (nm)	Farbteiler (nm)	Emissionsfilter (nm)
Quinacrin	417	460	480
DAPI	365	395	420
Cy3	550	580	570
Alex 488	495	510	519

2.6 Hormonmessungen

Es wurden die beiden Steroidhormone Androstendion und Östrogen bei den *C. jacchus*-Weibchen bestimmt. Bei 43 Weibchen wurden Androstendionwerte und bei 52 Östrogenwerte gemessen. Alle Hormonanalysen wurden im DPZ in der Abteilung Evolutionäre Endokrinologie bei Herrn Dr. M. Heistermann unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Hodges durchgeführt. Die Hormonanalysen sollten die Frage einer Hormonabhängigkeit im Zusammenhang mit dem CFL-Phänotyp klären.

2.6.1 Östrogenmessung

Das immunoreaktive Gesamtöstrogen wurde ermittelt, indem es mit einem Antiserum gegen 1,3,5(10)-3,17 β -Diol-17HS-BSA (Meyer *et al.* 1990) und Östradiol-17 β gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (HRP) als Enzymkonjugat versetzt wurde, das in Kaninchen erzeugt wurde. Die Serumproben wurden 1:5 in Puffer (0,04 M PBS, pH 7,2) verdünnt und zu je 50 μ l in Doppelbestimmung eingesetzt. Die zu messenden Proben und die Estradiol-17 β Standardproben (50 μ l, 190-250 pg pro Vertiefung) wurden zusammen mit Estradiol-HRP-Enzymkonjugat (50 μ l, 1:5000) und Antiserum (50 μ l, 1:60000) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation und dem Waschen der Platten wurde jede Vertiefung mit 150 μ l HRP-Substratlösung (3125 mg Tetramethylbenzidin in 250 μ l Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)), gelöst in 17 ml Substratpuffer (0,05 M Zitronensäure mit 0,055 M Na₂HPO₄ und 0,005 M Hydrogen-Peroxid-Harnsäure), bestückt und anschließend die Platten im Dunkeln bei RT für 60-90 Min. auf einem Schüttler inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 2M H₂SO₄ in jede Vertiefung gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm auf einem Plattenleser gemessen. Die Sensivität der Probendurchführung bei 90 %iger Bindung lag bei 1,9 pg.

2.6.2 Androstendionmessung

Androstendion im Serum wurde durch den Enzymimmunassay DSL-10-3800 Active® Kit ermittelt. In mit Ziegen-Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Serum beschichteten Mikrotiterplatten wurden die Blutseren 1:40 in BSA Assaypuffer verdünnt (je 25 μ l) und 100 μ l Androstendion-Enzymkonjugat (in Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Androstendion in BSA) sowie 100 μ l Androstendion-Antiserum

(in BSA) eingebracht. Anschließend wurden die Platten für 1h bei RT auf einem Schüttler inkubiert und dann fünf Mal mit Mikrotiterplattenwaschlösung gewaschen. In jede Vertiefung wurden 100 µl TMB-Chromogen-Lösung (Tetramethylbenzidin in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid) gegeben und weitere 15 Min. auf einem Schüttler inkubiert. 100 µl Stopplösung (0,2 M H₂SO₄) wurde zugegeben und die Absorption bei 450 nm auf einem Plattenleser gemessen. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und anhand der Androstendion-Standards und Androstendion-Kontrollen wurden parallele Messkurven erstellt.

2.7 Statistische Auswertungen

Für die statistische und graphische Auswertung der Daten wurden die beiden Programme Sigmastat 3.0 und Sigmaplot 8.0 benutzt. Die benutzten Tests werden in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Einteilung und Definition der CFL-Phänotypen

Die Einteilung der CFL-Phänotypen geschah nach einheitlichen Messmethoden und richtete sich nach dem Alter der Tiere und deren Reproduktionsstatus. Die wichtigsten Phänotypen sind in Abb. 19 dargestellt worden. Bild A zeigt eine komplett offene Vulva, welche den „Normalzustand“ beim adulten Weibchen darstellt. Im Gegensatz dazu zeigt Bild F einen komplett geschlossenen Zustand, der nur bei 3 % der Tiere im Untersuchungskollektiv zu beobachten war. Lediglich eine ca. 1 mm große Öffnung erlaubt es den Tieren zu urinieren. Die Bilder B bis E stellen die verschiedenen CFL-Kategorien dar, bei denen 1- 25 %, 25- 50 %, 50- 75 % oder 75- 100 % der Vulvaöffnung verschlossen sind. Auf den Bildern B und E und der Abb. 20 ist sehr gut erkennbar, dass eine bindegewebige Struktur die Labien zusammenhält. Dieses bindegewebige Häutchen wurde für die Kategorisierung des CFL-Phänotyps zu Hilfe genommen. Da es bei den komplett offenen, also den Nicht-CFL-Tieren, nicht vorhanden war, diente es als Erkennungsmerkmal und Messgröße für den CFL-Phänotyp. Ein CFL-Phänotyp lag immer dann vor, wenn mindestens 1 % der Vulvaöffnung geschlossen war. Als Nicht-CFL-Phänotypen galten dementsprechend die Weibchen, die komplett geöffnet waren und kein bindegewebiges Häutchen aufwiesen.

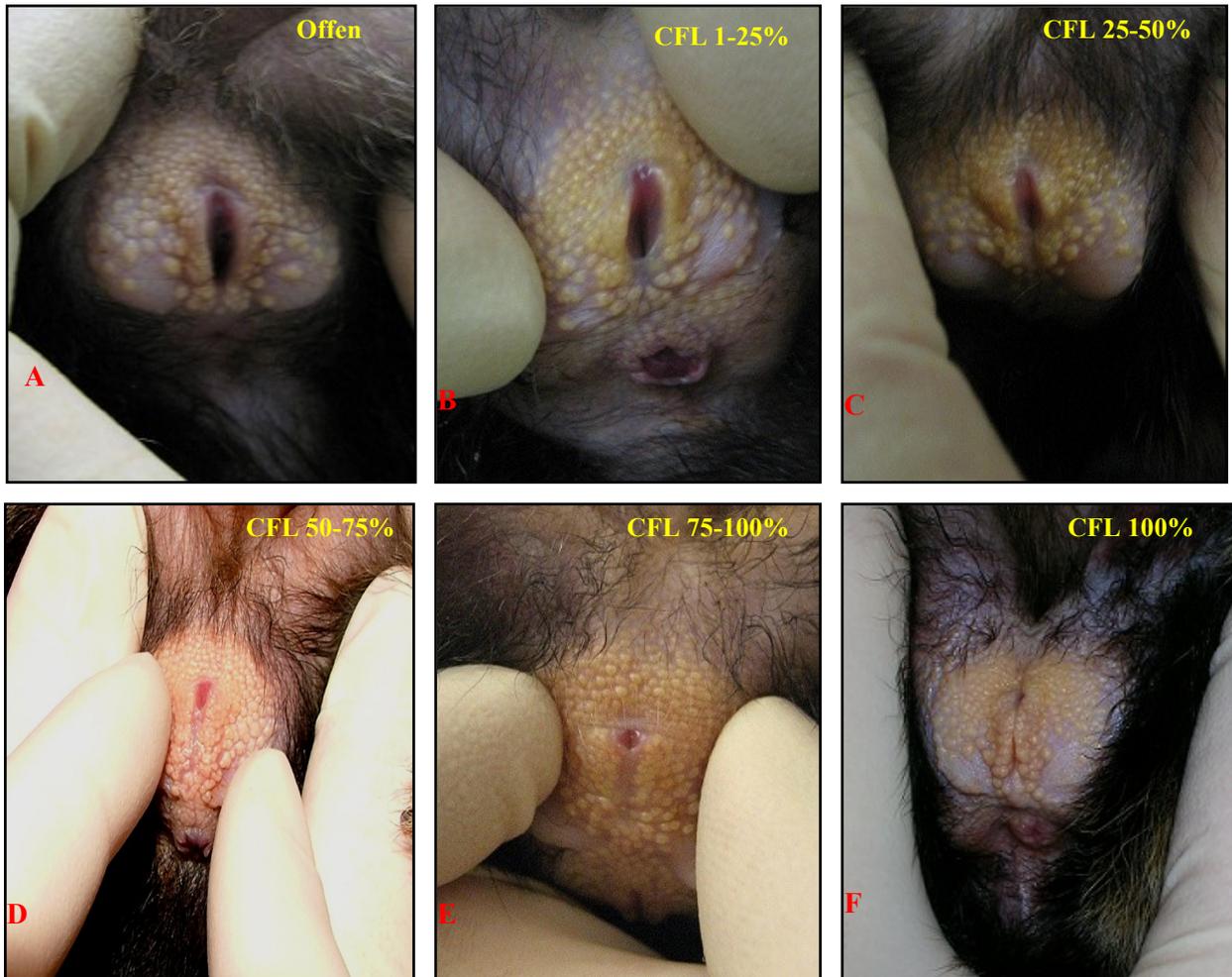


Abb. 19: Darstellung und Einteilung der CFL-Phänotypen bei adulten Weibchen. **A.** Kompletter offener Vulvastatus, **B.** 1- 25 % CFL, **C.** 25- 50 % CFL, **D.** 50- 75 % CFL, **E.** 75- 100 % CFL, **F:** 100 % CFL.

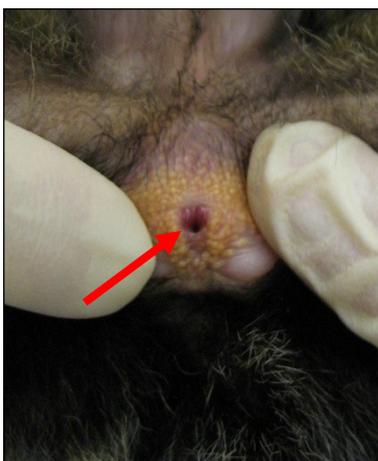


Abb. 20: Darstellung des bindegewebigen Häutchens zwischen den Labien beim *C. jacchus*-Weibchen (roter Pfeil). Bei diesem Phänotyp handelt es sich um einen CFL-Grad von 25 bis 50 %.

3.2 Demographische Untersuchungen zum CFL-Phänotyp

3.2.1 Die Verteilung des CFL-Phänotyps in der DPZ-Kolonie

Abbildung 21 zeigt einen Überblick über die Verteilung von CFL- und Nicht-CFL-Tieren und des CFL-Grades im Untersuchungskollektiv (n = 127).

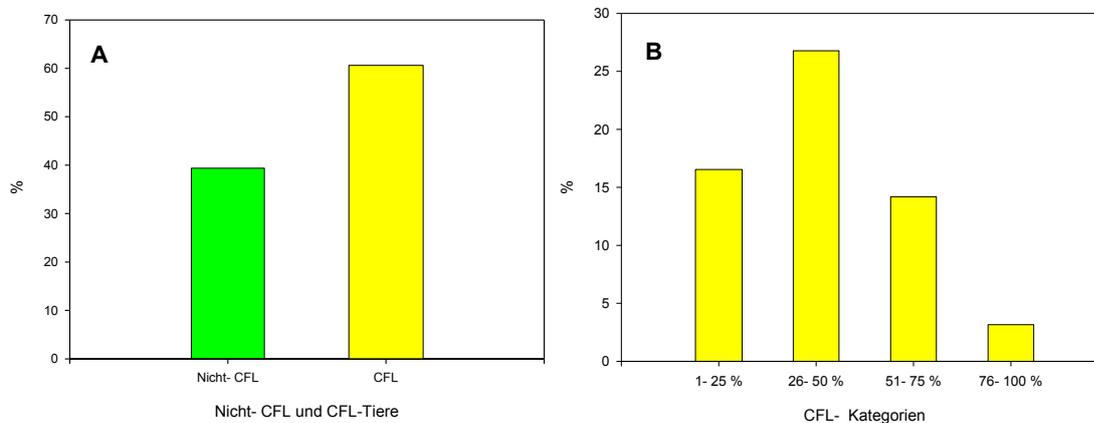


Abb. 21: **A.** Häufigkeit von Nicht-CFL- und CFL-Tieren, **B.** Häufigkeit der vier CFL-Grade im Untersuchungskollektiv. Altersklassen: 1 bis 36 Monate.

Während 39 % der Tiere komplett offen waren, wiesen 61 % der Tiere unterschiedliche Verschlussgrade auf. Am häufigsten (26 %) war der CFL-Grad 26- 50 %, gefolgt von den CFL-Graden 1- 25 % und 51- 75 %, die bei jeweils etwa 15 % der Tiere anzutreffen waren. Ein CFL-Grad von 76- 100 % trat mit 3 % nur selten auf.

3.2.2 Stammbaumanalysen und mögliche Vererbungsmechanismen des CFL- Phänotyps

Um Vererbungsmuster und –mechanismen zu erkennen, wurde eine Stammbaumanalyse der CFL- und Nicht-CFL-Tiere durchgeführt. Dabei wurden die Familienlinien bis zu den ersten Zuchtpaaren am Anfang einer Linie im DPZ zurück verfolgt. Die Stammbäume (s. Faltblatt im Anhang) machen die komplexen Verwandtschaftsbeziehungen in der DPZ Kolonie deutlich.

Die verschiedenen Tiergruppen wurden farblich unterschieden. Tiere in den gräulich unterlegten Kästen (n = 113) sind von außen in die DPZ-Kolonie integriert worden. Anfang der 1990er Jahre wurde die Marmoset-Kolonie mit Tieren aus anderen Kolonien massiv erweitert, um die Inzuchtrate niedrig zu halten. Es wurden aber bisher weder Populationsevaluierungen durchgeführt, noch ist der genetische Ursprung der Tiere bekannt. Der Anfangsbestand an *C. jacchus*-Affens beinhaltete 20 Tiere. Sie kamen Ende 1984 ins DPZ und stammten von der Firma Intersimian (England) und von der Bayer AG Wuppertal (Deutschland). In den folgenden Jahren wurde die Kolonie dann auf über 500 Marmosets aufgestockt.

Die gelb unterlegten Kästen stellen diejenigen CFL-Tiere dar, deren Familienstammbäume verfolgt werden konnten (n = 34). Dazu gehören auch die Tiere (n = 12), die in die Studie von Isachenko *et al.* (2002) eingeflossen sind (hellgrün umrandet). Stammbäume wurden nur von den Familien derjenigen 22 Weibchen aufgestellt, die die prägnantesten CFL-Phänotypen aufwiesen. Weiterhin wurden 341 Tiere aus den folgenden Generationen aufgeführt (farblose Kästen). Von diesen Weibchen lag der Genitalstatus nicht vor, weil er in den entsprechenden Zeiträumen nicht dokumentiert wurde. Da sich diese Tiere aber reproduzieren konnten, ist davon auszugehen, dass sie geöffnet waren. Diese Öffnung konnte aber auch chirurgisch durch Tierärzte des DPZ erfolgt sein. Solche Operationen, die heute nicht mehr praktiziert werden, wurden angewandt, um weibliche CFL-Tiere als Zuchttiere zu benutzen.

Die Namen der Nachkommen von einem *C. jacchus*-Paar fangen immer mit dem Anfangsbuchstaben des Namens der Mutter an. Dadurch wird die Zuordnung der Tiere in den Familienlinien erleichtert. Einige Ausnahmen davon gibt es nur aus dem Anfangsbestand der Kolonie, wo dieses System der Namensgebung noch nicht eingeführt war. Zusätzlich hat jedes Tier eine eigene Erkennungsnummer, die im Stammbaum unter dem Namen des Tieres erscheint. Am Anfang wurden den Tieren fortlaufende, vierstellige Nummern gegeben. Mittlerweile ist die Nummernzuteilung im fünfstelligen Bereich. So ist es möglich, anhand der Größe dieser Nummer indirekt das Alter der Tiere abschätzen und es einer bestimmten Generation im DPZ zuzuordnen.

3.2.3 Vergleich und Evaluierung von CFL- und Nicht-CFL-Stammbäumen

Um genauere Erkenntnisse über Vererbungsmuster und genetische Einflüsse im Hinblick auf den CFL-Phänotyp zu erlangen, wurden die Stammbäume von zwei Marmoset-Gruppen miteinander verglichen. Dazu wurden 12 CFL- (Gruppe A) und 12 Nicht-CFL-Tiere (Gruppe B) zufällig ausgewählt. Tiere der Gruppe A mussten mindestens einen CFL-Grad von 50 % aufweisen. Über diese Vorgehensweise sollten eventuell vorhandene, genetische Unterschiede in den Vererbungsmustern für den CFL-Phänotyp (Gruppe A) im Vergleich zu Nicht-CFL-Tieren (Gruppe B) aufgedeckt werden. In Abb. 22 wurde den Tieren in beiden Gruppen die Anzahl ihrer jeweiligen externen Vorfahren graphisch zugeordnet.

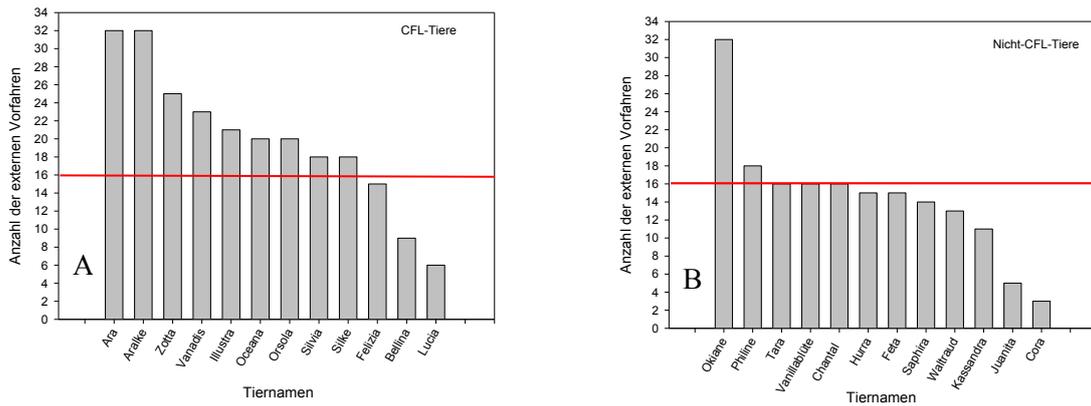


Abb. 22: Anzahl externer Vorfahren in einer Gruppe von CFL- (A) und Nicht-CFL-Tieren (B) (jeweils 12 Weibchen). Diese Abbildung verdeutlicht den signifikanten Unterschied der Häufigkeit von externen Vorfahren bei CFL- und Nicht-CFL-Tieren. CFL-Tiere haben deutlich mehr externe Vorfahren als Nicht-CFL-Tiere. Die rote Linie in den beiden Graphen stellt eine willkürlich festgelegte Grenze der Menge an externen Vorfahren dar, ab der es zu einer Anhäufung von CFL-Phänotypen kommt.

Auf den X-Achsen sind die 24 randomisiert ausgewählten Tiere dargestellt, während die Y-Achsen die Anzahl der Vorfahren aus externen Kolonien zeigen, die die Familie eines bestimmten Tieres enthält. Die Kontingenz beim Chi-square Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Datenreihen mit $p = 0,014$. Aus der Menge der Vorfahren lässt sich etwas über das Alter der Familienlinie im DPZ sagen. Je höher die Anzahl der externen Vorfahren, umso älter ist bzw. länger besteht diese Linie schon im DPZ. Die höchste Anzahl an externen Vorfahren in Gruppe A haben Ara und Aralke mit jeweils 32. Den niedrigsten Wert hat Lucia mit 6 Vorfahren. Der Durchschnittswert für die 12 CFL-Tiere liegt bei 19,9 externen Vorfahren. Bei den Nicht-CFL-Tieren hat Okiane 32 externe Vorfahren, während es bei Cora nur 3 sind. Der durchschnittliche Wert für die Anzahl externer Vorfahren beträgt in dieser Gruppe 14,5. So haben im Durchschnitt Tiere der Gruppe B (Nicht-CFL-Tiere) 5,4 externe Vorfahren weniger als Tiere der Gruppe A (CFL-Tiere).

In Abb. 23 wird dieser Aspekt differenzierter dargestellt. Dazu wurden für jedes einzelne Weibchen aus den beiden Gruppen die Anzahl externer Kolonien und die Anzahl externer Vorfahren in Verbindung gebracht. Die Anzahl der externen Kolonien stellt die Gesamtsumme aller Kolonien dar, aus denen Tiere von extern in diese Linie eingeflossen sind. (Fallbeispiel: Bellina; externe Kolonien in dieser Linie: Uni Zürich, Ciba Versuchstierzucht, Max v. Pettenkofer Institut, Uni Basel, Uni München und Bayer AG, Gesamtsumme = 6).

In der Menge der externen Vorfahren ist die Summe aller externen Tiere enthalten, die in diese Familienlinie hineingekommen sind. Auch wenn zwei Tiere aus der gleichen Kolonie kamen, wurde dies doppelt gezählt (Fallbeispiel: Bellina; 2 x Max v. Pettenkofer, 2 x Uni München, 2 x Bayer AG, 1 x Uni Zürich und 1 x Ciba Versuchstierzucht. Insgesamt 8 Vorfahren). Es wird in der Abbildung deutlich, dass die CFL-Tiere im Vergleich zu den Nicht-CFL-Tieren signifikant mehr externe Vorfahren haben.

Es wurden jeweils 12 CFL-Tiere und 12 Nicht-CFL-Tiere untersucht. Bei den CFL-Tieren zeigte sich ein Durchschnittswert für die Summe der externen Kolonien von 7,3 und ein Durchschnittswert für die Summe der externen Vorfahren von 18,6. In der Gruppe der Nicht-CFL-Tiere betrug der Durchschnittswert für die Summe der externen Kolonien 6,2 und für die Summe der Vorfahren 14,5. Somit haben CFL-Tiere im Schnitt 4,1 Vorfahren und 1,1 Kolonien mehr in der Familienlinie, als Nicht-CFL-Tiere.

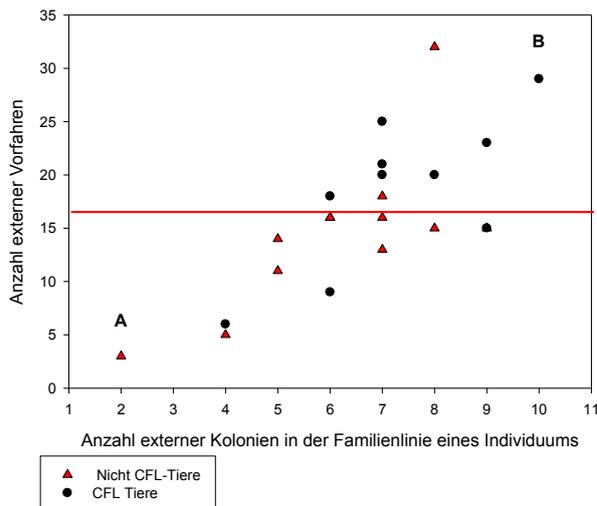


Abb. 23: Vergleich von CFL- und Nicht-CFL-Tieren und deren genetischer Input aus externen Kolonien. Auf der X-Achse ist die Summe der externen Kolonien (Uni München + Uni Basel etc.) und auf der Y-Achse die Summe der Vorfahren aufgeführt, die in die DPZ-Familienlinie von extern hinzugekommen waren. Die rote Linie stellt eine willkürlich festgelegte Grenze der Menge an externen Vorfahren dar, ab der es zu einer Anhäufung von CFL-Phänotypen kommt.

Bei den CFL-Weibchen ergab sich beim Linear Regression Test bei $n = 12$ ein Korrelationskoeffizient von $R = 0,737$, bei den Nicht-CFL-Tieren $R = 0,718$. Hier wird in beiden Gruppen eine positive, signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der externen Kolonien und der Anzahl der externen Ahnen deutlich. Je mehr externe Ahnen in der Familienlinie eines Individuums vorhanden sind, desto länger besteht schon die Familie im DPZ. Zur Verdeutlichung wurden als Beispiel 2 Weibchen (A und B) in Abb. 23 markiert. Bei dem Weibchen A handelt es sich um Cora, bei der die ersten externen Vorfahren 2002 in die DPZ-Kolonie importiert wurden. Das Weibchen B ist Ara, deren externe Vorfahren bereits 1990 in die Kolonie kamen. Mit Hilfe der Abb. 23 kann man die Anzahl der externen Vorfahren eines Tieres als Index für das Alter der Zuchtlinie im DPZ nutzen (siehe Stammbäume im Anhang). Je älter die Zuchtlinie, desto höher ist die Verflechtung von verschiedenen Zuchtlinien in diesem Tier. Die nachfolgenden Graphiken zeigen die Korrelation zwischen der Menge der externen Vorfahren und dem Generationsalter der Familienlinie und beantworten die Frage, ob CFL ein Generationsphänomen ist (Abb. 24).

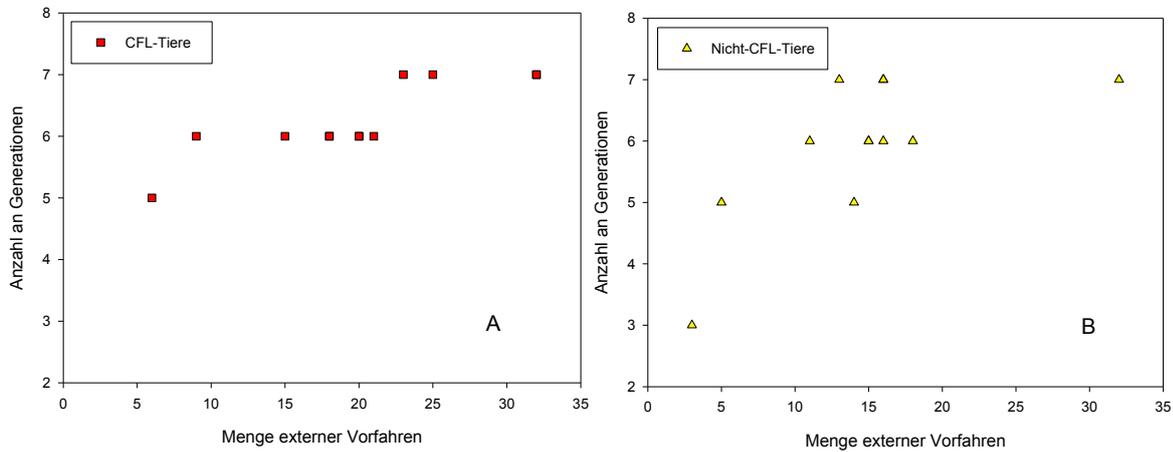


Abb. 24: Korrelation zwischen der Summe externer Vorfahren und der Anzahl an Generationen von CFL- (A) und Nicht-CFL-Tieren (B) in der DPZ-Kolonie. CFL-Tiere: n = 9; Nicht-CFL-Tiere: n = 10.

Sowohl bei CFL- als auch bei Nicht-CFL-Tieren steigt mit zunehmender Menge der externen Vorfahren die Anzahl der Generationen im DPZ. CFL-Tiere weisen im Durchschnitt 6,3, Nicht-CFL-Tiere 6,0 Generationen in ihrer DPZ-Linie auf. Im Umkehrschluss wird aus der Anzahl externer Kolonien deutlich, wie intensiv in der Vergangenheit versucht wurde, einen höheren Inzuchtgrad zu verhindern, indem möglichst viele Tiere aus unterschiedlichen Kolonien für die Zucht ausgewählt wurden. Zusammenfassend ist die Häufigkeit des CFL-Phänotyps abhängig von der Menge der externen Vorfahren in der Familienlinie, nicht aber von der Anzahl an Generationen im DPZ.

3.2.4 Haben bestimmte externe Kolonien überproportional mehr CFL-Tiere zu den Familienlinien beigesteuert?

Um zu klären, ob die Häufigkeit des Vorkommens von CFL-Linien von externen Vorfahren abhängig ist, wurden aus den 8 wichtigsten externen Kolonien 43 Zuchtpaarlinien und deren Nachkommen auf die Häufigkeit des CFL-Phänotyps hin untersucht. Dazu wurden die Nachkommen von jedem Zuchtpaar verfolgt und die Häufigkeit des Auftretens des CFL-Phänotyps erfasst. Das Untersuchungsziel war, Kolonien auszumachen, aus denen möglicherweise Merkmalsträger für den CFL-Phänotyp ins DPZ importiert worden waren. Wenn es sich um ein genetisch verursachtes Phänomen handeln sollte, so könnte die Identifikation der Herkunft solcher Zuchtpaare, bei denen der CFL-Phänotyp in den Nachkommen häufiger vorkam als in anderen Familien, helfen, potentielle Merkmalsträger in der Kolonie auszumachen.

In Tab. 2 sind die 8 wichtigsten Kolonien und die Anzahl der Zuchtpaare aus diesen Kolonien aufgelistet, bei denen Nachkommen untersucht wurden. Es konnten nicht immer alle Weibchen aus der Familienlinie eines Zuchtpaares untersucht werden, da sie an andere Kolonien weitergegeben oder nicht mehr am Leben waren. Die Entscheidung des Primatenzentrums, bestimmte Tiere zu kaufen oder zu verkaufen, basierte nicht auf deren CFL-Status. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass es sich beim Untersuchungskollektiv um eine Zufallsauswahl handelt.

Tab. 2: Häufigkeit von CFL- und Nicht-CFL-Tieren in Familienlinien aus den 8 wichtigsten externen Zuchtkolonien bei 43 Zuchtpaaren aus dem DPZ. Insgesamt wurden 95 CFL-Tiere und 59 Nicht-CFL-Tiere untersucht.

Herkunftskolonie	DPZ Zuchtpaare	Nachkommen	CFL-Tiere	Nicht-CFL-Tiere
1. Max von Pettenkofer	8	45	26 (58 %)	19 (42 %)
2. Ciba	8	23	14 (61 %)	9 (39 %)
3. Uni München	7	25	18 (72 %)	7 (28 %)
4. Uni Düsseldorf	6	18	10 (56 %)	8 (44 %)
5. Uni Berlin	5	12	8 (67 %)	4 (33 %)
6. Uni London	3	13	7 (46 %)	6 (54 %)
7. Bayer AG	3	7	5 (72 %)	2 (28 %)
8. Uni Zürich	3	11	7 (64%)	4 (36 %)

Diese 8 externen Kolonien stellen das Fundament der DPZ-Kolonie dar (s. Stammbaum im Anhang). Ein Großteil des heutigen Tierbestandes weist Verwandtschaften mit den aus diesen Kolonien bezogenen Tieren auf. Vererbte Krankheiten könnten ihren Ursprung in diesen externen Kolonien haben und in das DPZ hineingetragen worden sein. Die CFL-Häufigkeit bei Tieren aus den 8 Kolonien liegt zwischen 46 und 72 %. Die Nicht-CFL-Tiere kommen in einer Häufigkeit von 28-54 % vor. Die Frage, ob vermehrt CFL-Tiere aus anderen Kolonien ins DPZ integriert wurden, kann nicht eindeutig beantwortet werden, da die Nachkommen aus allen Herkunftskolonien zu einem großen Prozentsatz das CFL-Phänomen aufweisen. Außerdem wurde durch die Tierpfleger bei der Auswahl der Zuchttiere eine gewisse Auslese nach Herkunft, Gesundheit, Alter, Verwandtschaftsgrad mit der Population und Fitness getroffen. Diese Auslese erlaubt nur einen eingeschränkten Blick auf die Vererbungswege der CFL-Phänotypen.

So kann zusammenfassend festgehalten werden, dass sich keine CFL-Vererbungsmuster in den Stammbäumen nachweisen ließen. Es konnte kein signifikantes Auftreten des CFL-Phänotyps aus einer bestimmten Kolonie gezeigt werden. Auffällig war jedoch, dass CFL-Weibchen signifikant mehr externe Vorfahren in ihrer Familienlinie aufwiesen, als die Nicht-CFL-Tiere. Das lässt die Vermutung zu, dass das Alter einer Familienlinie in Gefangenschaft eventuell die Anhäufung der CFL-Phänotypen begünstigt. Es wäre dann weniger eine vererbte Anomalie, sondern würde durch solche umweltbedingte Einflüsse ausgelöst werden, die mit der Gefangenschaft unmittelbar zusammenhängen.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Faktoren Alter, Gewicht und Hormonhaushalt auf den CFL-Phänotyp

Im Folgenden wird der Einfluss der Faktoren Alter, Gewicht und Hormonstatus auf den CFL-Phänotyp untersucht. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Frage, durch welche Mechanismen das Gewicht und darüber der Hormonhaushalt bei den Weißbüschelaffen in Gefangenschaft verändert werden.

3.3.1 Zusammenhang zwischen CFL-Phänotyp und Alter der Weibchen

Die Häufigkeit des CFL-Phänotyps ist altersabhängig. Abbildung 25 zeigt einen Überblick über die Häufigkeit des CFL-Phänotyps in verschiedenen Altersklassen in der Untersuchungsgruppe.

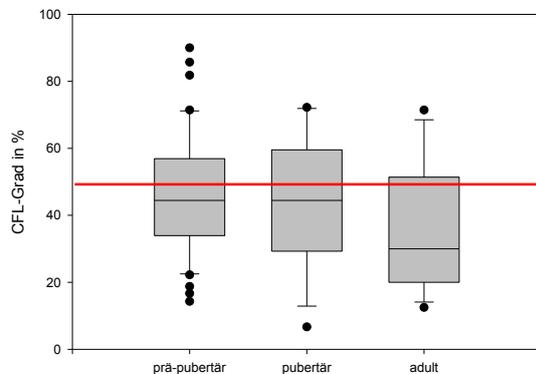


Abb. 25: Häufigkeit des CFL-Phänotyps in unterschiedlichen Altersklassen (n = 107). Die rote Linie stellt den CFL-Grad „funktionell offen“ bei 50 % dar.

Tabelle 3 stellt detailliert die 4 CFL-Grade in 3 Altersgruppen dar.

Tab. 3: Häufigkeit der 4 CFL-Grade in 3 Altersgruppen (prä-pubertäre, pubertäre und adulte Weibchen).

	prä-pubertär (1-9 Monate) n = 40	pubertär (9-18 Monate) n = 29	adult (18-36 Monate) n = 38
CFL 1-25 %	10 (25 %)	14 (48 %)	27 (71 %)
CFL 25-50 %	16 (40 %)	7 (24 %)	8 (21 %)
CFL 50-75 %	11 (28 %)	8 (28 %)	3 (8 %)
CFL 75-100 %	3 (8 %)	0	0

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Altersklassen in Bezug auf den CFL-Grad. In der prä-pubertären (1–9 Monate) und pubertären Phase (9–18 Monate) tritt ein höherer Grad an CFL-Phänotypen auf als bei reifen adulten Weibchen, die ab einem Alter von ca. 18 Monaten ihr Reproduktionsalter erreichen. Die adulten Weibchen waren ab einem Alter von 18 Monaten zu 71 % geöffnet. Die Unterschiede in den drei Altersklassen bestärken die Annahme, dass die Ausprägung des CFL-Phänotyps ein entwicklungsphysiologisches Phänomen ist und vom Reproduktionsstatus der Weibchen abhängt.

3.3.2 Der Einfluss der Zeit auf den individuellen Öffnungsprozess eines CFL-Phänotyps

Die bisherigen Ergebnisse bestärken die Annahme, dass es sich beim CFL-Phänotyp um einen dynamischen Entwicklungsprozess handelt, der stark vom Alter beeinflusst wird, aber individuell variabel ist. Im vorherigen Kapitel konnte die signifikant erhöhte Häufigkeit von geöffneten Weibchen im adulten Alter gezeigt werden. In einer weiteren Messreihe wurde eine Gruppe von 25 Weibchen über eine Zeitdauer von 1,5 Jahren insgesamt jeweils dreimal gemessen. Durch Mehrfachmessungen derselben Weibchen ab dem 3. Lebensmonat konnte die entwicklungsphysiologische These bestätigt werden. Es kristallisierten sich 3 Entwicklungsprozesse heraus. Eine Gruppe von Tieren öffnete in dem Messzeitraum komplett, in einer weiteren Gruppe öffneten die Weibchen nur partiell und in der 3. Gruppe veränderte sich der Vulvastatus überhaupt nicht. Es fiel vor allem auf, dass der Hauptöffnungsprozess bei den sich komplett öffnenden Tieren in dem Lebensabschnitt 3 bis 9 Monaten stattfand. Auch in der 2. Gruppe öffnete sich die Vulva in diesem Zeitraum partiell, aber nicht so komplett wie in der 1. Gruppe. Insgesamt öffneten sich 12 Tiere im Verlauf von 17 Monaten komplett und 8 Tiere teilweise. Nur 5 Weibchen zeigten keine Veränderungen ihres Genitalstatus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ca. 20- 25 % der Tiere im Alter von etwa 9 Monaten immer noch funktionell über 50 % geschlossen sind und sich von diesen nur 10- 15 % in der Pubertät befinden. Die anderen Weibchen öffnen ihre Vulva individuell zu früheren Zeiten. Über die Ursachen dieser Individualität gibt es bisher keine Daten.

3.3.3 CFL-Phänotyp und Gewicht

Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich der CFL-Phänotyp im Alterungsprozess der Weibchen verändert. Ein weiterer Faktor, welcher sich mit dem Alter bei *C. jacchus*-Affen verändert, ist das Gewicht. Deshalb wurde bei 72 Weibchen die Beziehung zwischen CFL-Phänotyp und Gewicht untersucht. Da die Tiere in Gefangenschaft im Vergleich zu Tieren in der Wildnis höhere und variabelere Gewichte aufweisen, wurde die These überprüft, ob Übergewicht einen negativen Einfluss auf den Hormonhaushalt und damit auf die Reproduktionsfähigkeit hat und so das Öffnen der Labien hinausgezögert wird.

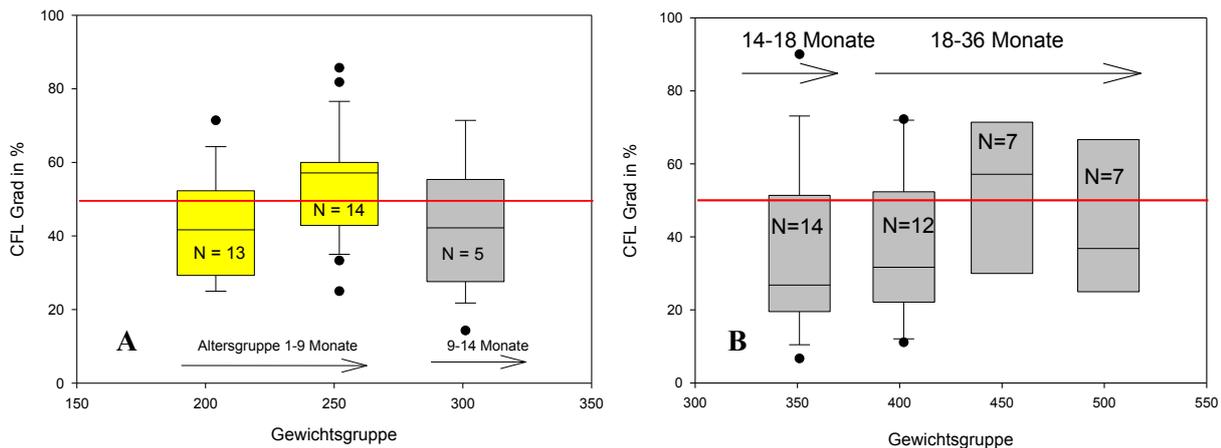


Abb. 26: Unterteilung der CFL-Tiere ($n = 72$) in 2 Gewichtsgruppen. **A.** Weibchen in dem Gewichtsniveau 200-300 g ($n = 32$) in der prä-pubertären (1-9 Monate) und Anfang der pubertären (9-14 Monate) Altersklasse. **B.** Weibchen der Gewichtsgruppe 350-500 g ($n = 40$) in der pubertären (14-18 Monate) und adulten (18-36 Monate) Altersklasse. Die beiden gelben Boxplots stellen eine Altersklasse (1-9 Monate) in 2 Gewichtsgruppen dar. Die rote Linie stellt die 50 % CFL-Grenze dar.

Abbildung 26A stellt den prä-pubertären Status dar, während Abbildung 26B den pubertären und adulten Status zeigt. In Graph A sind die beiden Gewichtsgruppen 200 g und 250 g im gleichen Alter (1-9 Monaten). Die übergewichtigen Tiere weisen einen höheren CFL-Grad auf als die normgewichtigen. In dem Gewichtsniveau zwischen 300 und 400 g (pubertär und adult) ist der CFL-Grad im Durchschnitt zwischen 20-30 %, also in einem niedrigen Niveau, so dass diese Tiere funktionell reproduktionsfähig sind. Ein erhöhter CFL-Grad tritt erneut bei übergewichtigen adulten Weibchen ab einem Gewichtsniveau von >450 g auf (B). Diese beiden Graphen verdeutlichen, dass Übergewicht, sowohl bei juvenilen, als auch adulten Tieren einen signifikant höheren CFL-Grad >50 % hervorruft und das „nicht Öffnen“ der Labien nicht nur vom Alter, sondern vor allem durch das Übergewicht der Weibchen hervorgerufen wird.

3.3.4 Gewicht und Hormonspiegel bei CFL- und Nicht-CFL-Weibchen

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, spielt das Gewicht eine wichtige Rolle bei einem CFL-Phänotyp. Es wurde nun untersucht, ob das Gewicht auch einen Einfluss auf den Hormonhaushalt bei CFL- und Nicht-CFL-Weibchen hat. Deshalb wurden Androstendion- und Östrogenspiegel bei CFL- und Nicht-CFL-Weibchen gemessen und in Korrelation zum Gewicht gestellt. Die Androstendionwerte von 31 adulten Weibchen wurden bestimmt. Diese lagen durchschnittlich zwischen 4,9 ng/ml und 26 ng/ml. Aus Abb. 27 geht hervor, dass eine signifikante Korrelation zwischen Gewicht und Androstendionspiegel in CFL-Tieren besteht.

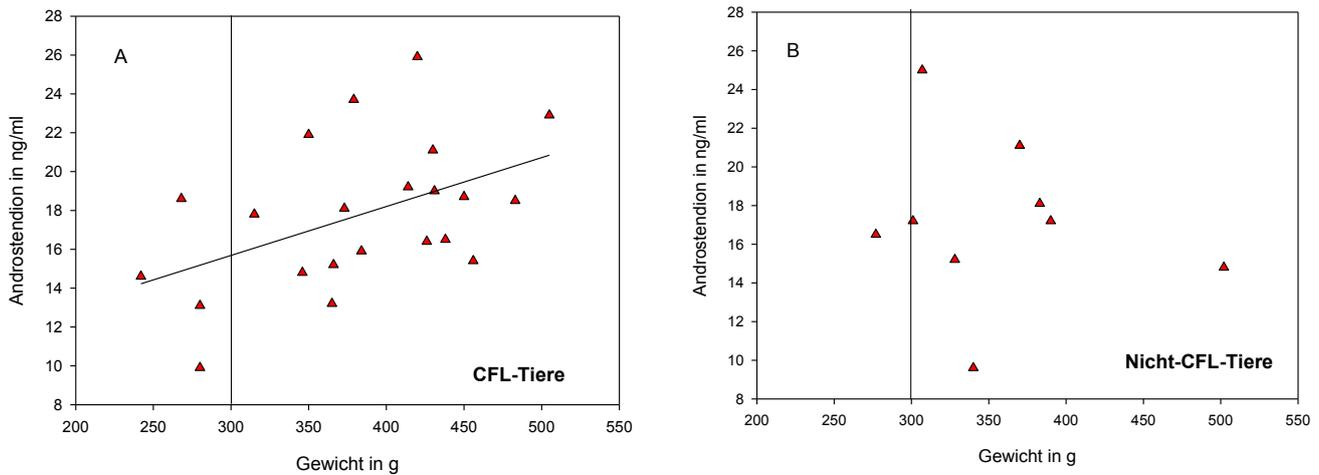


Abb. 27: Höhe des Androstendionspiegels in *Callithrix-jacchus*-Weibchen mit unterschiedlichen Gewichten (n = 31). **A.** Androstendionspiegel in CFL-Tieren (n = 22), **B.** Androstendionspiegel in Nicht-CFL-Tieren (n = 9). Alter der Weibchen: 12 bis 36 Monate. Die senkrechte Linie unterteilt die Gruppe in normal- (<300 g) und übergewichtige (>300 g) Tiere.

Der Linear Regression Test ergab bei n = 31 ein $R = 0,544$ bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,001$. Die Höhe der Androstendionspiegel in CFL-Tieren ist signifikant vom Gewicht abhängig. Bei Nicht-CFL-Tiere konnte keine Korrelation nachgewiesen werden, wohl aber eine mögliche negative Tendenz mit steigendem Gewicht, wobei es in dieser Gruppe weniger Tiere über der 400 g Grenze gab.

Die Messung der Östrogenwerte von 35 Weibchen zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen Gewicht und Östrogenwerten bei CFL-Tieren ($R = 0,449$ und $p < 0,001$) (Abb. 28). Je höher das Gewicht der Tiere, umso höher waren ihre Östrogenwerte. Nicht-CFL-Tiere wiesen tendenziell mit zunehmendem Gewicht niedrigere Östrogenspiegel auf, verglichen mit der CFL-Gruppe. Hier bestand jedoch keine signifikante Korrelation.

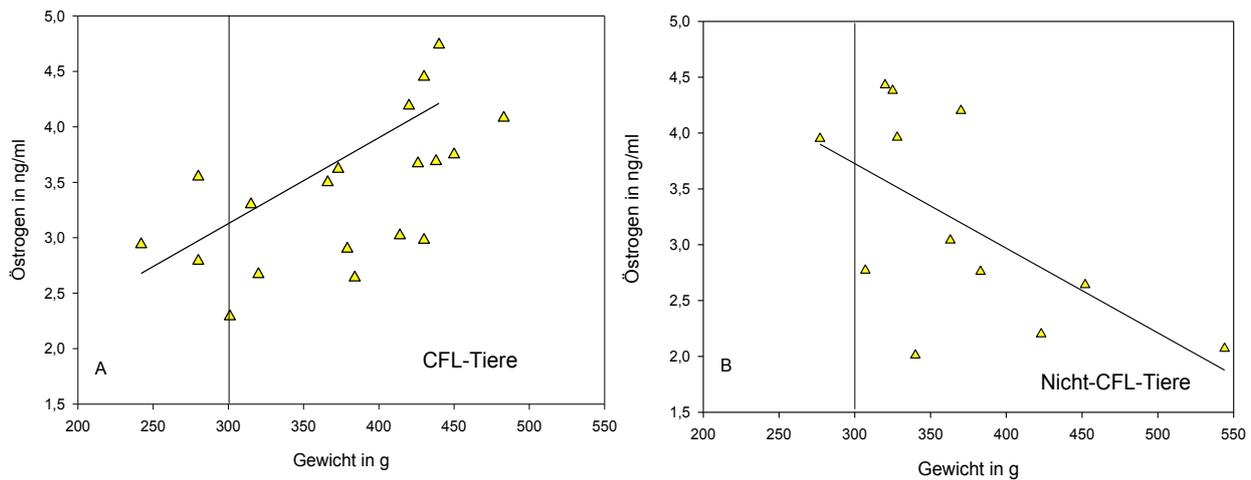


Abb. 28: Höhe des Östrogenspiegels in *Callithrix-jacchus*-Weibchen mit unterschiedlichen Gewichten (n = 35). **A.** Östrogenspiegel in CFL-Tieren (n = 23), **B.** Östrogenspiegel in Nicht-CFL-Tieren (n = 12). Alter der Weibchen: 12 bis 36 Monate. Die senkrechte Linie unterteilt die Gruppe in normal- (<300 g) und übergewichtige (>300 g) Tiere.

Zusammenfassend verdeutlicht dieses Ergebnis, dass mit zunehmendem Gewichtsniveau die CFL-Tiere erhöhte Androstendion- und Östrogenspiegel aufweisen. Bei den Nicht-CFL-Tieren ist keine entsprechende Tendenz zu erkennen, da diese auch vom Gewicht her weniger wiegen als CFL-Tiere.

3.3.5 Von welchem Hormon wird der CFL-Phänotyp beeinflusst?

Bei juvenilen und adulten übergewichtigen Weibchen tritt der CFL-Phänotyp verglichen zu normalgewichtigen Tieren signifikant häufiger auf. Weiterhin weisen diese Tiere auch erhöhte Androstendion- und Östrogenspiegel auf, so dass sich die Frage stellte, ob überhaupt und wenn ja, welches der beiden Hormone den CFL-Phänotyp beeinflusst. Hierfür wurden zuerst bei 22 adulten CFL-Weibchen in 3 Gewichtsklassen die Androstendionwerte bestimmt und der CFL-Grad gemessen (Abb. 29). Das gleiche Prozedere wurde bei 9 Nicht-CFL-Tieren (Kontrollgruppe) durchgeführt und anschließend beide Gruppen verglichen.

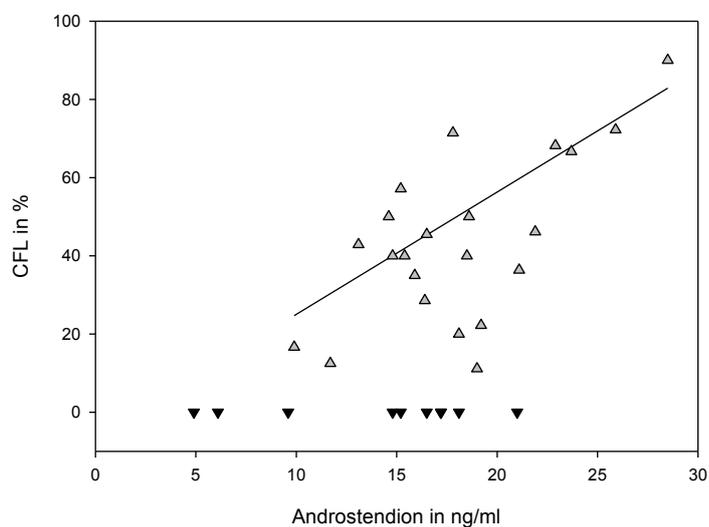


Abb. 29: Androstendionwerte und CFL-Grad von CFL-Weibchen ▲ (n = 22) und Nicht-CFL-Weibchen ▼ (n = 9) (Kontrollgruppe).

Dabei konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Androstendionspiegel und dem CFL-Grad nachgewiesen werden. Bei $n = 22$ war der Korrelations-Koeffizient $R = 0,547$ und $p < 0,001$. Der Vergleich der CFL- und Nicht-CFL-Weibchen zeigt, dass die Androstendionwerte bei offenen und bei bis zu 50 % geschlossenen Weibchen nahezu im gleichen Bereich liegen (Androstendion zwischen 5-20 ng/ml). Ab einem CFL-Grad von $>50\%$ liegen die Androstendionwerte deutlich über der 20 ng/ml Grenze. Es handelt sich dabei aber nur um eine kleine Zahl von Tieren. Die Androstendionwerte aller CFL-Tiere bestätigen die These, dass sie einen umso höheren CFL-Grad aufweisen, je höher ihr Androstendionwert ist.

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss des Östrogenspiegels auf den CFL-Phänotyp bestimmt. Es wurden die Östrogenspiegel von 35 CFL- und Nicht-CFL-Weibchen gemessen und in Bezug zum CFL-Grad gesetzt.

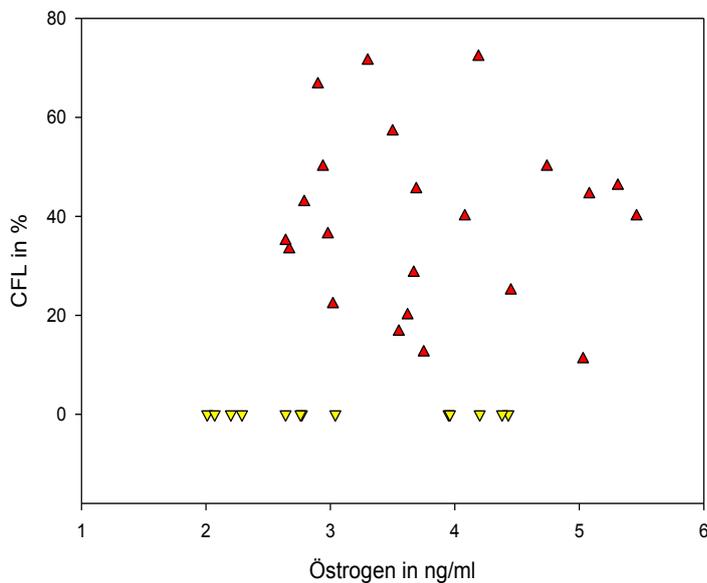


Abb. 30: Östrogenspiegel bei CFL- ▲ ($n = 22$) und Nicht-CFL-Tieren ▼ ($n = 13$).

Abbildung 30 zeigt, dass der Östrogenspiegel, im Gegensatz zum Androstendionspiegel, keinen direkten Einfluss auf den CFL-Grad der Tiere hat. Beide Hormone sind aber signifikant vom Gewicht abhängig (Abb. 27 und Abb. 28). Zwischen CFL- und Nicht-CFL-Weibchen besteht kein Unterschied in den Östrogenspiegeln. Dieses Ergebnis bestätigt die These, dass es sich beim CFL-Phänotyp um eine hormonelle Maskulinisierung handelt.

3.3.6 Der maternale Einfluss auf den CFL-Phänotyp

Die bisherigen Ergebnisse haben ergeben, dass der CFL-Phänotyp bei übergewichtigen Weibchen häufiger vorkommt als bei normalgewichtigen. Diese CFL-Tiere weisen erhöhte Androstendion- und Östrogenspiegel auf, wobei aber nur das Androstendion einen signifikanten Einfluss auf den CFL-Phänotyp hat. Es stellte sich nun die Frage, von welchen Faktoren das Gewicht und der Hormonhaushalt dieser Tiere beeinflusst werden. Dazu wurde der maternale Einfluss auf diese beiden Faktoren hin untersucht, da er ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der Nachkommen ist. Schon im Mutterleib stehen Kind und Mutter in einem engen Austauschverhältnis zueinander, indem sich ihre Stoffwechselprozesse gegenseitig regulieren. Welches Gewichtsniveau die Tiere im adulten Alter erreichen, wird schon im Mutterleib bestimmt. Abbildung 31 macht deutlich, dass eine signifikante Erhöhung des Tochtergewichts bei übergewichtigen Müttern stattfindet. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen CFL- und Nicht-CFL-Weibchen, da beide den gleichen Trend aufweisen. Auffällig ist auch, dass bei Müttern im mittleren Gewichtsniveau (380 bis 460 g) eine hohe Variation in dem Gewicht der Töchter auftritt.

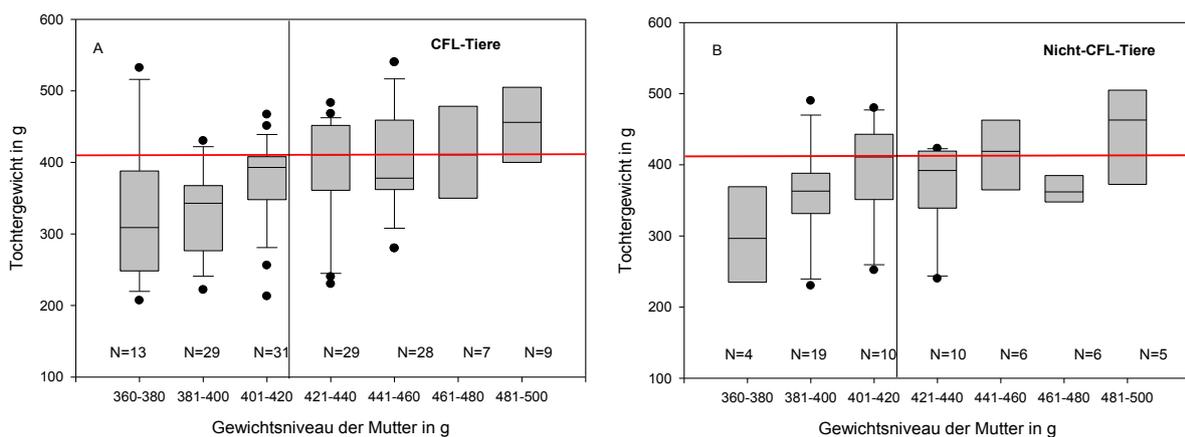


Abb. 31: Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Mutter und dem der Töchter **A.** CFL-Weibchen (n = 146), **B.** Nicht-CFL-Weibchen (n = 60). Das Tochtergewicht wurde im Alter von 10 bis 36 Monaten bestimmt. Die rote Linie stellt das Durchschnittsgewicht des Untersuchungskollektivs (411 g) dar. Die schwarze Linie zeigt die Grenze zwischen normal- und übergewichtigen Weibchen. Bei den Untersuchungen wurde der CFL-Grad außer Acht gelassen.

Es passiert, dass Mütter sowohl CFL- als auch Nicht-CFL-Töchter in einem Wurf gebären, so dass von einigen Müttern in beiden Graphen (A+B) Nachkommen enthalten sind. Dies führte zu der Frage, ob das Gewicht der Mutter den CFL-Grad ihrer Töchter beeinflusst und inwieweit die Androstendionspiegel der Töchter von dem Gewicht der Mutter abhängen.

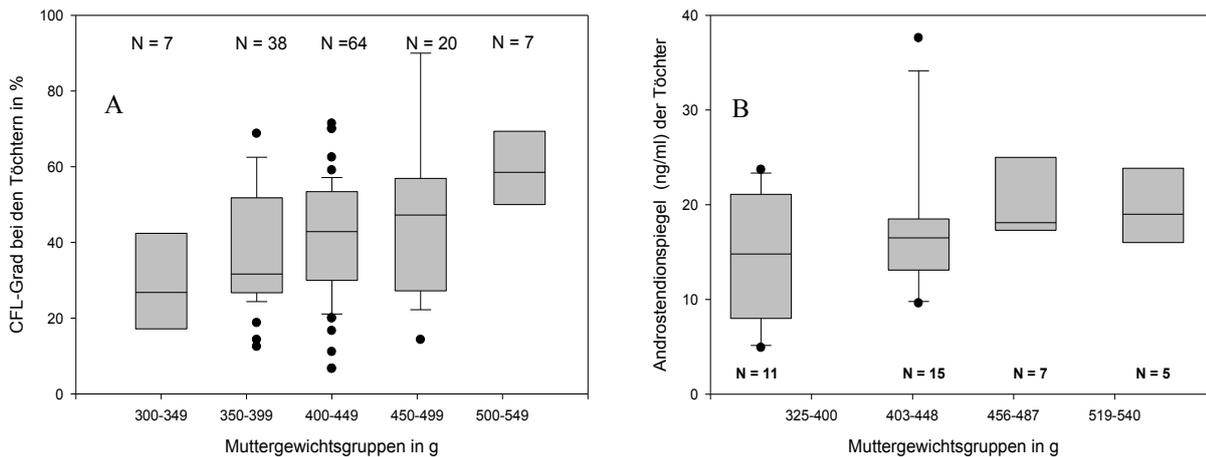


Abb. 32: **A.** Abhängigkeit des individuellen CFL-Grades der Töchter vom Gewichtsniveau der Mutter (n = 136), **B.** Androstendionspiegel der Töchter in Abhängigkeit vom Gewichtsniveau der Mutter (n = 38).

Abbildung 32 zeigt einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Muttergewicht und erhöhten CFL-Graden bei den Töchtern (A) sowie die Tendenz, dass Töchter mit einer übergewichtigen Mutter erhöhte Androstendionspiegel aufweisen (B). Hier schließt sich der physiologische Kreis. Die Mutter ist aufgrund ihrer Stoffwechselkonstellation und ihres Gewichtshabitus für das erhöhte Gewicht der Nachkommen verantwortlich. Aufgrund des höheren Gewichts bei den Töchtern kommt es bei ihnen zu erhöhten Androstendionspiegel und folglich zu einer Verzögerung der Vaginalöffnung. Damit wird indirekt die Reproduktionsfähigkeit dieser Tiere beeinflusst (s. Kapitel 3.3.4).

3.3.7 Wurfgröße und Gewichtsniveau der Mutter

Es konnte gezeigt werden, dass Gewicht und Androstendion in adulten Weibchen positiv miteinander korrelieren. Weiterhin gibt es eine positive Korrelation zwischen Gewicht und CFL-Grad. Außer einer Verbindung zwischen erhöhtem Gewicht und Maskulinisierung konnte auch eine Korrelation zwischen dem Gewicht der Mutter und einer erhöhten Wurfgröße festgestellt werden (Abb. 33).

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um die Frage zu beantworten, von welchen weiteren Faktoren, außer Gewicht, die Hormonspiegel beeinflusst werden können.

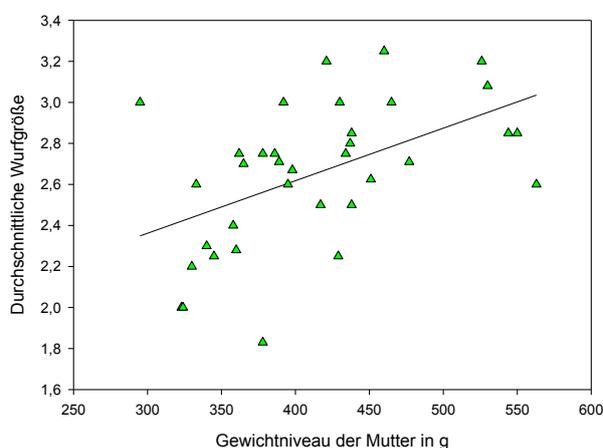


Abb. 33: Abhängigkeit der Wurfgröße vom Muttergewichtsniveau (n = 34).

Mit zunehmendem Muttergewicht nimmt die Wurfgröße ebenso zu. Im Linear Regression Test lag der Korrelations-Koeffizient bei $R = 0,557$ und $p < 0,001$. Das bedeutet, dass die Wurfgröße statistisch signifikant von dem Muttergewicht beeinflusst wird. Aber nicht nur das Gewicht der Nachkommen hängt von dem Gewichtsniveau der Mutter ab, sondern auch, ob sie als Zwillinge, Drillinge oder Vierlinge zur Welt kommen. In der DPZ Kolonie ist die Drillingsrate zunehmend gestiegen und hat 2007 fast 70 % erreicht.

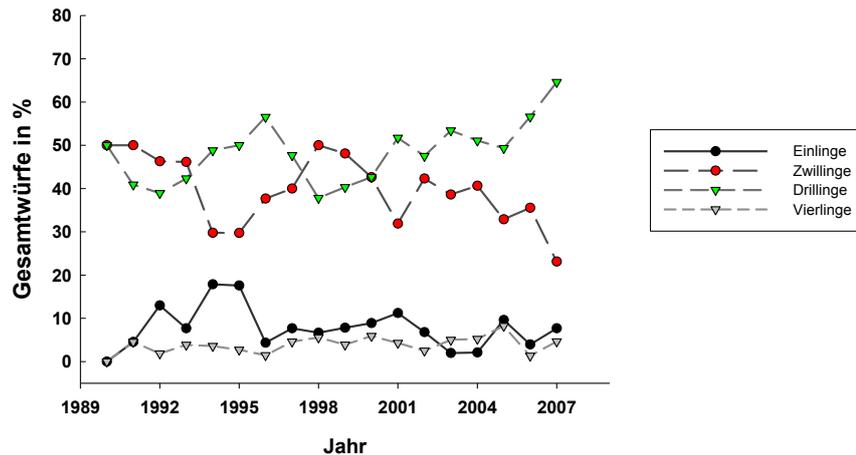


Abb. 34: Veränderungen der Wurfkonstellationen von 1990 bis 2007 im Deutschen Primatenzentrum Göttingen (DPZ).

Abbildung 34 zeigt eine Zunahme der Drillingsgeburten mit Phasen der Fluktuation seit Anfang der 90er Jahre von damals 50 % auf fast 70 %, wobei eine kontinuierlich steigende Tendenz ab 1998 zu verzeichnen ist. Gegenüber den Drillingen nehmen die Zwillingsgeburten ab, so dass 2007 die Zwillingsrate nur noch bei 20 % lag. Das Muttergewicht stellt in diesem Zusammenhang den wichtigsten Faktor für die zunehmenden Drillingsgeburten dar. Um die Frage zu beantworten, ob es dadurch auch zu einer Änderung des Geschlechterverhältnisses in den Würfen zugunsten eines Geschlechts kommt, wurde der Zusammenhang des Muttergewichts auf die Häufigkeit von männlichen und weiblichen Nachkommen untersucht. Dabei konnte aber kein signifikanter Unterschied in dem Auftreten eines Geschlechts nachgewiesen werden.

3.3.8 Beeinflusst die Geburtswurfskonstellation (Geschlechteranzahl und Geschlechterbalance) den hormonellen Maskulinisierungsprozess beim CFL-Phänotyp?

Das Gewichtsniveau der Mutter führt zu einer signifikanten Veränderung des Tochtergewichtsniveaus (Kapitel 3.3.6) und folglich zu einem hormonell basierten Maskulinisierungsprozess der Weibchen in Form des CFL-Phänotyps. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mütter mit einem erhöhten Gewicht signifikant größere Würfe zur Welt bringen. Ein weiterer Faktor, welcher den Maskulinisierungseffekt verstärken könnte, ist der männliche Geschwisterpart in dem Geburtswurf und somit die Geschlechterkonstellation in utero.

Um die Frage zu beantworten, inwiefern die spätere Entwicklung (Gewichtsniveau, CFL-Phänotyp, Androgenisierung) einzelner Tiere bereits schon im Mutterleib von der Zusammensetzung der Geschlechteranzahl und Geschlechterbalance beeinflusst wird und wie die Existenz männlicher Geschwister die weitere weibliche Entwicklung steuert, wurden 114 Weibchen untersucht (Abb. 35).

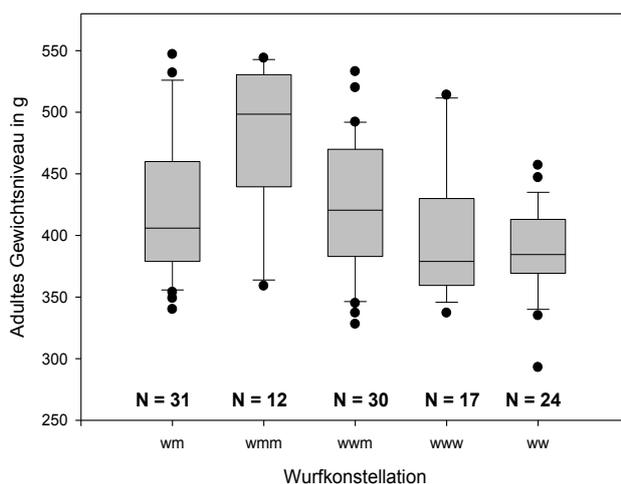


Abb. 35: Einfluss der Geburtswurfskonstellation auf das adulte Gewichtsniveau (Alter: 12 bis 36 Monate) beim weiblichen *Callithrix-jacchus*-Affens ($n = 114$). Analyse der 5 häufigsten Konstellationen (w = Weibchen; m = Männchen).

Im t-Test zeigte ein Vergleich der beiden Gruppen ww und wmm eine signifikante Differenz in den Mittelwerten des Gewichtsniveaus von $p < 0,001$. Der Vergleich der Gruppen wm und wmm zeigte eine statistisch signifikante Differenz von $p = 0,015$, die beiden Konstellationen wwm und wmm von $p = 0,008$. Bei der Wurfskonstellation wmm liegt das Gewichtsniveau der weiblichen Geschwister signifikant höher als in den Konstellationen wm, wwm, www und ww. Somit tritt ein erhöhtes Gewichtsniveau nicht nur auf, wenn die Mütter der Tiere ein erhöhtes Gewicht aufweisen, sondern auch wenn Drillingsgeburten mit zwei männlichen Geschwistern vorhanden sind. So ist davon auszugehen, dass in utero eine Androgenisierung der Töchter nicht nur durch ein erhöhtes Muttergewicht, sondern auch durch das Vorhandensein von zwei Brüdern hervorgerufen wird.

3.3.9 Androstendionspiegel und Wurfkonstellation

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Muttergewichte erhöhte Androstendionspiegel bei ihren Töchtern zur Folge haben und dass bei mehrfacher männlicher Wurfbeteiligung das Gewichtsniveau der weiblichen Geschwister deutlich höher liegt als bei z.B. rein weiblichen Würfen. Es stellte sich nun die Frage, ob Männchen im Wurf auch zu erhöhten Androstendionspiegeln bei den weiblichen Geschwistern und zu deren Androgenisierung führten. Deshalb wurden die Androstendionwerte der Wurfgeschwister aus verschiedenen Wurfkonstellationen analysiert. Die Arbeitshypothese war, dass Weibchen mit einem oder mehreren männlichen Zwillingen, verglichen mit Tieren aus gleichgeschlechtlichen Würfen, einen tendenziell erhöhten Androstendionwert haben. Es wurden 16 Tiere aus Zwillingsgeburten (Abb. 36A) und 27 Tiere aus Drillingsgeburten (Abb. 36B) untersucht.

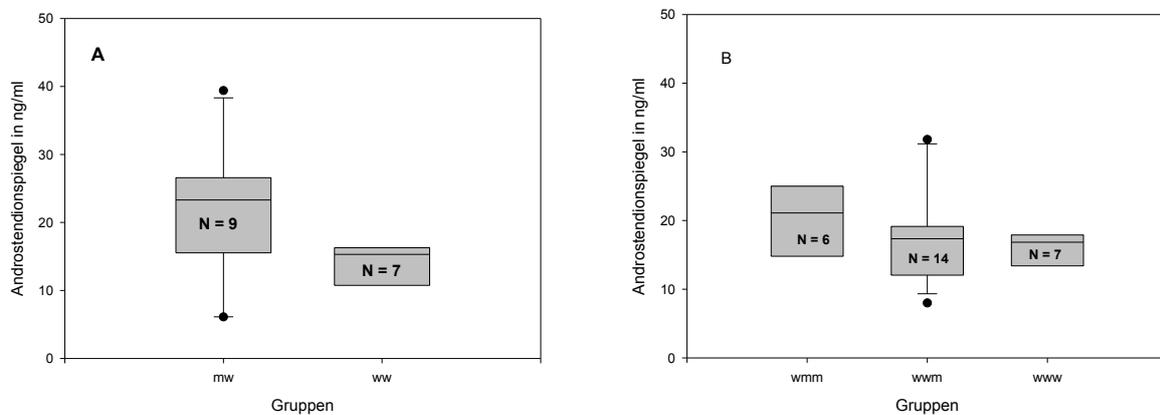


Abb. 36: Einfluss der Wurfkonstellation auf den Androstendionspiegel der Weißbüschelweibchen (m = männlich; w = weiblich), **A.** Zwillingsgeburten (n = 16) und **B.** Drillingsgeburten (n = 27).

Sowohl bei Zwillings- als auch bei Drillingsgeburten ist ein Einfluss der Wurfkonstellation auf die Androstendionwerte weiblicher Geschwister zumindest im Trend zu erkennen. Eine Signifikanzanalyse konnte aufgrund der niedrigen Weibchenzahl nicht erfolgen. Die Präsenz männlicher Wurfgeschwister ist assoziiert mit einem erhöhten Androstendionspiegel bei den weiblichen Geschwistern. Dies trifft aber nur zu, wenn das Geschlechterverhältnis in einem Wurf ausgeglichen ist oder das männliche Geschlecht überwiegt (wm oder wmm). Dann liegen die durchschnittlichen Androstendionwerte bei Zwillings- und Drillingsgeburten über 20 ng/ml. Wenn das weibliche Geschlecht überwiegt (wwm), befindet sich der durchschnittliche Androstendionwert unter 20 ng/ml. Um die Frage zu beantworten, ob der männliche Geschwisterpart in einem Wurf auch einen erhöhten CFL-Grad verursacht, wurden die Androstendionspiegel in Weibchen mit unterschiedlichen CFL-Graden und Nicht-CFL-Weibchen in den verschiedenen Würfen separat untersucht. In der Wurfkonstellation wm und wwm trat mit zunehmendem Androstendionspiegel ein erhöhter CFL-Grad auf. In den Würfen ww, www und wmm konnte kein Zusammenhang gezeigt werden. Es konnte

deshalb nicht bestätigt werden, dass mit zunehmender männlicher Beteiligung in einem Wurf auf Grund des Androstendionspiegels erhöhte CFL-Grade auftreten.

3.3.10 Östrogenspiegel und Wurfkonstellation

In Kapitel 3.3.5 wurde ein Zusammenhang des Östrogenspiegels mit dem CFL-Status der Weibchen ausgeschlossen. Des Weiteren wurde im Kapitel 3.3.9 ein Zusammenhang zwischen dem Androstendionspiegel und der Wurfkonstellation bei Mehrlingsschwangerschaften nachgewiesen. Ob ein Zusammenhang auch zum Östrogenserumspiegel besteht, wurde ebenfalls überprüft (Abb. 37).

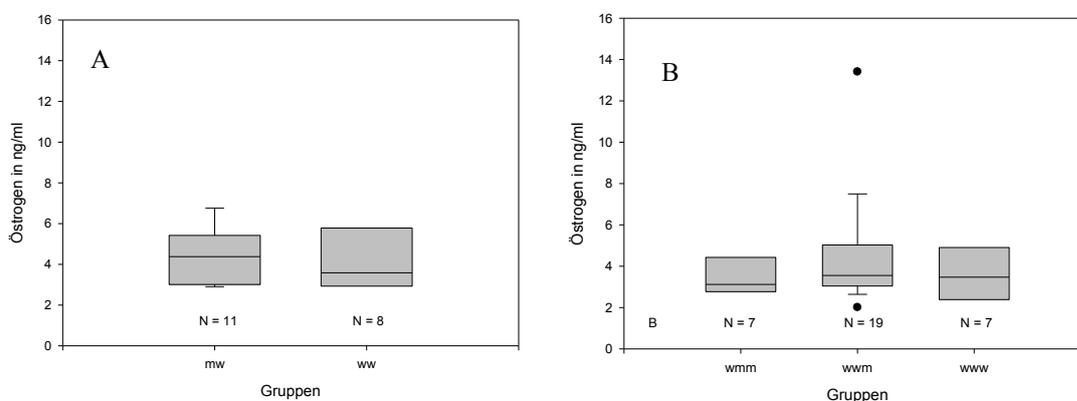


Abb. 37: Einfluss der Wurfkonstellation (Geschlechterzahl und -verhältnis) auf die Östrogenwerte (m = männlich; w = weiblich), **A.** Zwillingsgeburten (n = 19) und **B.** Drillingsgeburten (n = 33).

Im Gegensatz zum Androstendion konnte kein Zusammenhang zwischen der Wurfkonstellation und den Östrogenspiegeln weder bei Zwillingen (A) noch bei Drillingen (B) gezeigt werden. Bei allen untersuchten Weibchen lagen, im Vergleich zum Androstendionspiegel, die Östrogenwerte auf einem sehr niedrigen Niveau. Das Vorhandensein männlicher Wurfgeschwister hatte keinen Einfluss auf den Östrogenspiegel der Weibchen.

3.3.11 Einfluss von Wurfkonstellation (Geschwisteranzahl sowie Geschlechterbalance) und Wurfgröße auf den CFL-Phänotyp

Bisher haben die Untersuchungen ergeben, dass der CFL-Phänotyp bei Tieren mit einem höheren Gewicht häufiger vorkommt und ein oder zwei Männchen in der Wurfkonstellation einen kumulativen Einfluss auf das Gewicht der Weibchen haben. Es stellte sich nun die Frage, inwiefern die männliche Präsenz in einem Wurf einen Maskulinisierungseffekt begünstigt.

Abbildung 38 zeigt den Zusammenhang zwischen der Wurfkonstellation und dem CFL-Grad in juvenilen und adulten CFL-Tieren. Abbildung 38A zeigt alle Tiere mit einem CFL-Grad von <50 % während in Abbildung 38B die Tiere mit einem CFL-Grad von >50 % aufgeführt wurden. Auf der X-Achse sind die 5 häufigsten Wurfkonstellationen dargestellt.

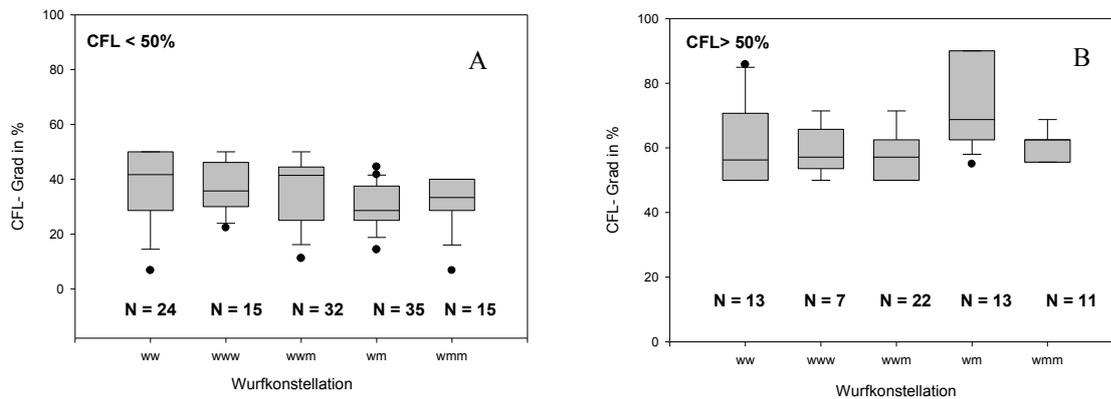


Abb. 38: CFL-Grad (%) in Abhängigkeit von der Wurfkonstellation (w = Weibchen; m = Männchen). **A.** Weibchen mit einem CFL-Grad <50 % (n = 107). **B.** Weibchen mit einem CFL-Grad >50 % (n = 66).

Beide Graphen zeigen, dass der CFL-Grad in den 5 Wurfkonstellationen nahezu gleich ist. In der Konstellation wm bei einem CFL-Grad >50 % ist eine diskrete, aber nicht signifikante Erhöhung im Auftreten eines erhöhten CFL-Grades zu erkennen. Zwischen den anderen Gruppen gibt es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede und damit auch keinen Zusammenhang zwischen dem CFL-Phänotyp und der Geschlechterzahl bzw. der Geschlechterbalance bei Mehrlingsschwangerschaften.

3.4 Natürlich vorkommender Cross-sex-Chimärismus und CFL-Phänotyp bei *Callithrix-jacchus*-Weibchen

Eine Hypothese der vorliegenden Dissertation lautete, dass bei Weibchen mit einem erhöhten Grad an Cross-sex-Chimärismus ein CFL-Phänotyp signifikant häufiger auftritt als bei Tieren mit einem niedrigen Anteil an XY-Zellen. Zur Klärung dieser Hypothese wurde der CFL-Grad von 26 Weibchen mit ihrem Cross-sex-Chimärismus verglichen (Abb. 39).

Dabei wurde der Cross-sex-Chimärismus mit Hilfe von morphologischen (Giemsa-/DAPI-Färbung) und chromosomenspezifischen Methoden (FISH) dargestellt.

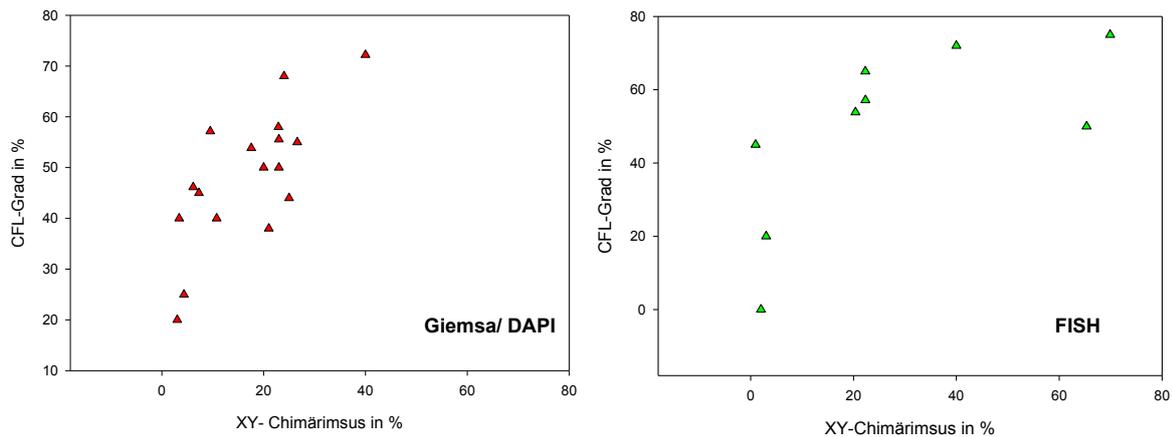


Abb. 39: Beziehung zwischen dem Cross-sex-Chimärismus und dem CFL-Grad. Ein Vergleich mit Hilfe der Giemsa-/ DAPI- und der FISH-Färbung bei weiblichen *C. jacchus*-Affen (n = 26).

Die Untersuchung zeigt, dass mit zunehmenden Cross-sex-Chimärismus auch tendenziell erhöhte CFL-Grade auftreten. Das Ergebnis der FISH-Färbung stellt diesen Zusammenhang deutlicher dar, wobei in dieser Gruppe eine kleinere Anzahl an Weibchen untersucht wurde.

Ab einem Cross-sex-Chimärismus von 20 % steigt der CFL-Grad deutlich an. Aufgrund der niedrigeren Untersuchungsanzahl konnte keine Signifikanzanalyse durchgeführt werden.

3.4.1 Cross-sex-Chimärismus und Gewicht

In Kapitel 3.3.3 wurde bereits ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von erhöhten CFL-Graden und einem erhöhten Gewicht beschrieben. Es stellte sich nun die Frage, ob das Gewicht auch vom Chimärismus beeinflusst wird.

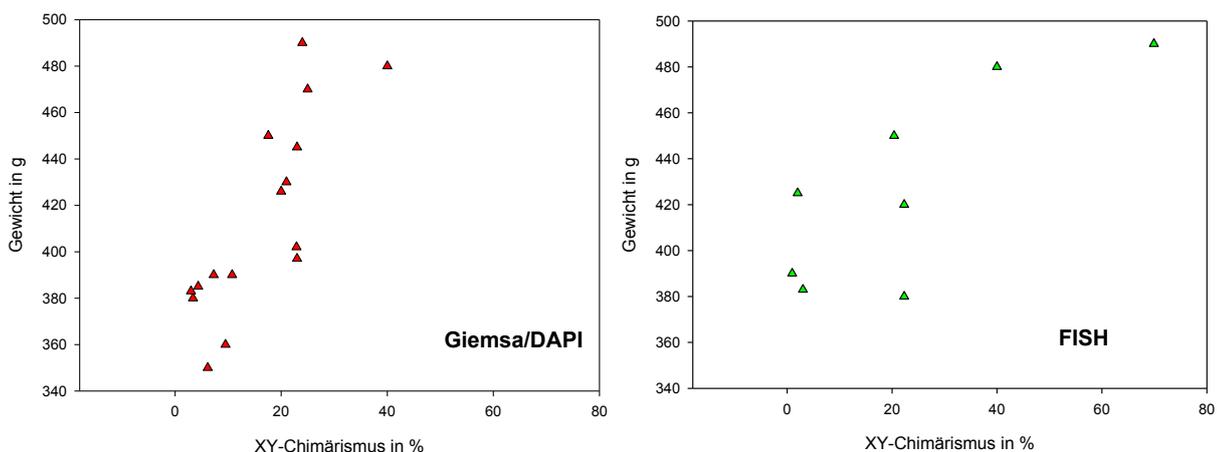


Abb. 40: Beziehung zwischen dem Cross-sex-Chimärismus und dem Gewicht der Weibchen. Ein Vergleich mit Hilfe der Giemsa-/DAPI- und der FISH-Färbung bei weiblichen *C. jacchus*-Affen (n = 26).

Abbildung 40 zeigt, dass mit zunehmendem Cross-sex-Chimärismus tendenziell die Weibchen ein höheres Gewichtsniveau erreichen. Mit der FISH-Färbung ist dieser Zusammenhang deutlicher zu

erkennen, wobei die Anzahl der untersuchten Tiere auch hier sehr niedrig ist. Man kann deshalb nur von einer Tendenz sprechen, da eine Signifikanz nicht besteht.

3.4.2 Androstendionspiegel und Cross-sex-Chimärismus

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass mit zunehmendem Gewicht die Weibchen auch einen erhöhten Chimärismusgrad aufweisen. Da dieser bereits zum Zeitpunkt der plazentären Fusion festgelegt wird, bei dem auf die Weibchen die männlichen Zellen übertragen werden, könnte angenommen werden, dass mit einem höheren Chimärismusgrad auch erhöhte Androstendionspiegel auftreten. Um dies zu verifizieren, wurden die Androstendionspiegel in Relation zum Chimärismusgrad untersucht (Abb. 41).

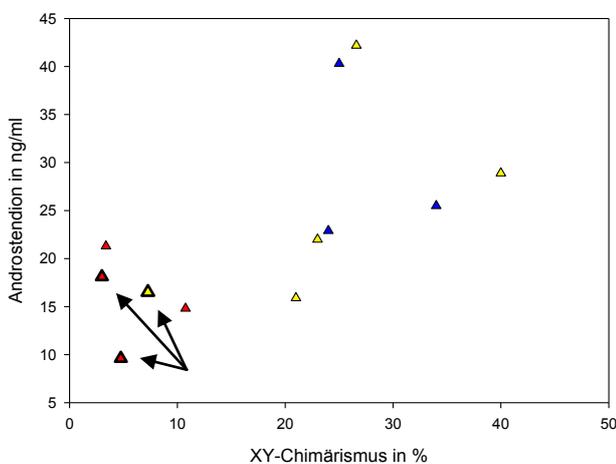


Abb. 41: Androstendionspiegel und Cross-sex-Chimärismus (Giemsa-/DAPI-Färbung) in 3 Gewichtsklassen (n = 12). ▲ = 330-370 g, ▲ = 370-450 g, ▲ = 450-500 g. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Weibchen aus rein weiblichen Würfen (ww und www). Die anderen Tiere sind aus Würfen mit männlicher Beteiligung.

Weibchen mit einem höheren Cross-sex-Chimärismus, weisen höhere Androstendionspiegel auf. Die Tiere mit einem niedrigen Gewichtsniveau (330-370 g) weisen tendenziell niedrigere Chimärismusraten und Androstendionspiegel auf. Ab einem Gewichtsniveau von >370 g sind höhere Chimärismusraten und erhöhte Hormonspiegel zu verzeichnen. Die Weibchen aus den Würfen mit nur weiblicher Beteiligung weisen die niedrigsten Androstendionspiegel auf.

3.4.3 Cross-sex-Chimärismus und Gewicht der Mutter

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Gewicht der Mutter einen bedeutenden Einfluss auf das Gewicht, die Androstendionspiegel und den CFL-Grad der weiblichen Nachkommen hat. Nachfolgend wurde überprüft, ob auch der Cross-sex-Chimärismus durch das Gewicht der Mutter beeinflusst wird. Dabei wurde zwischen den Wurfkonstellationen wm, wmm und wwm unterschieden.

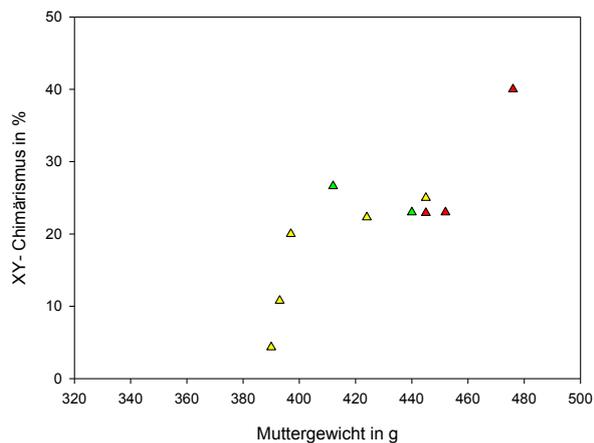


Abb. 42: Einfluss des Muttergewichts auf den Cross-sex-Chimärismus (Giemsa-/DAPI-Färbung) in 3 Wurfgruppen (n = 10). ▲ = wm, ▲ = wmm und ▲ = wwm.

In den Wurfkonstellationen wm und wwm trat mit zunehmendem Muttergewicht ein höherer Cross-sex-Chimärismus in den Töchtern auf. In der Gruppe wmm sind zu wenig Tiere untersucht worden, um eine Aussage über eine Tendenz zu machen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es sich beim CFL-Phänotyp um eine Vermännlichung der äußeren Genitalien handeln könnte, die nicht nur von physiologischen Veränderungen und Umweltbedingungen, sondern auch von dem natürlich vorkommenden Cross-sex-Chimärismus beeinflusst werden könnte. Das Gewichtsniveau der Mutter fungiert in diesem Fall erneut als Faktor für eine erhöhte Chimärismusrate in den Wurfkonstellationen wm und wwm.

3.4.4 Wurfkonstellation und Cross-sex-Chimärismus

Wie bereits beschrieben, entsteht der Chimärismus durch placentäre Anastomosen. Deshalb müsste der individuelle Chimärismusgrad sehr stark von der Geschlechterkonstellation in einem Wurf abhängen. Ob dies tatsächlich so ist, wurde an 18 Weibchen aus unterschiedlichen Wurfkonstellationen untersucht.

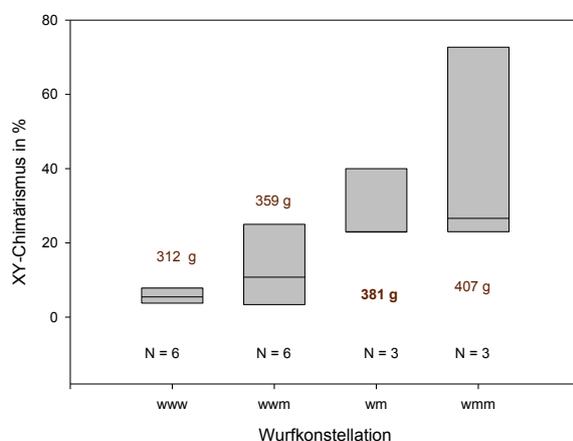


Abb. 43: Vergleich des Cross-sex-Chimärismus in Weibchen aus den Wurfkonstellationen www, wwm, wm und wmm, n = 18 (Giemsa-/DAPI-Färbung). w = Weibchen; m = Männchen. Über und unter den Boxplots sind die Durchschnittsgewichte der jeweiligen Gruppe angegeben. Der Median der Gruppe wm liegt auf der unteren Boxplot-Begrenzung.

Aus Abb. 43 wird deutlich, dass es tendenziell Unterschiede im Chimärismusgrad bezogen auf die Wurfkonstellation gibt. Tiere aus einem reinen Weibchenwurf (n = 6) wiesen mit durchschnittlich 5,8

% den niedrigsten Chimärismusgrad auf. Der Chimärismus stammt bei diesen Weibchen am ehesten von der Mutter oder von einem in utero verstorbenen Männchen im gleichen Wurf. In der Gruppe mit einem Männchen und zwei Weibchen ($n = 6$) lag der Durchschnittswert für den XY-Chimärismus bei 19 %, um in Zwillingsgeburten mit jeweils einem Weibchen und einem Männchen ($n = 3$) 28,3 % zu erreichen. In dem Wurf mit zwei Männchen und einem Weibchen ($n = 3$) lag der Wert bei 40,7 %. Je höher das Verhältnis Männchen zu Weibchen in einem Wurf ausfiel, desto höher war der Cross-sex-Chimärismusgrad bei den Weibchen im Wurf. So kann festgehalten werden, dass die plazentäre Verteilung von Blutzellen in *C. jacchus*-Weibchen von der Wurfkonstellation abhängig ist. Drillingschwangerschaften gehen mit einer höheren Cross-sex-Chimärismusrate zugunsten des dominierenden Geschlechts (wmm oder wmm) einher.

3.5 Ergänzende Untersuchungen zu Genitalmerkmalen und Maskulinisierungszeichen

3.5.1 CFL-Grad und Kopulationsfähigkeit

Es stellte sich die Frage, ab welchem CFL-Grad die Weibchen kopulationsfähig sind. Dazu wurden Tiere mit einem CFL-Phänotyp je nach Öffnungsgrad in „funktionell offen“ oder „funktionell geschlossen“ eingeteilt. In Abb. 44 werden die Längen der Vulvaöffnungen von Nicht-CFL- und CFL-Tieren in Bezug auf das Alter der Tiere verglichen. Die Länge der Vulvaöffnung beträgt bei Nicht-CFL-Tieren durchschnittlich 7,3 mm (\bar{x} Alter 2,1 Jahre) und bei CFL-Tieren 4,9 mm (\bar{x} Alter 1,9 Jahre). Die Gesamtvulvalänge war aber in beiden Gruppen gleich lang. Da es bisher bezüglich der Kopulationsfähigkeit und dem Vulvaöffnungsstatus keine Daten gibt, wurde in dieser Studie die Kopulationsvulvalänge auf 5 mm (rote Linie in Abb. 44) festgelegt. Ab dieser Länge ist die Vulva „funktionell offen“ und der Geschlechtsakt kann stattfinden. Unter dieser Grenze ist es dem Männchen nicht möglich, in die Vulva einzudringen. Die Kopulationsvulvalänge entspricht einem CFL-Grad von weniger als 50 %. Ist der CFL-Grad höher, besteht eine funktionelle Schranke, mit der zunächst keine Reproduktion möglich ist.

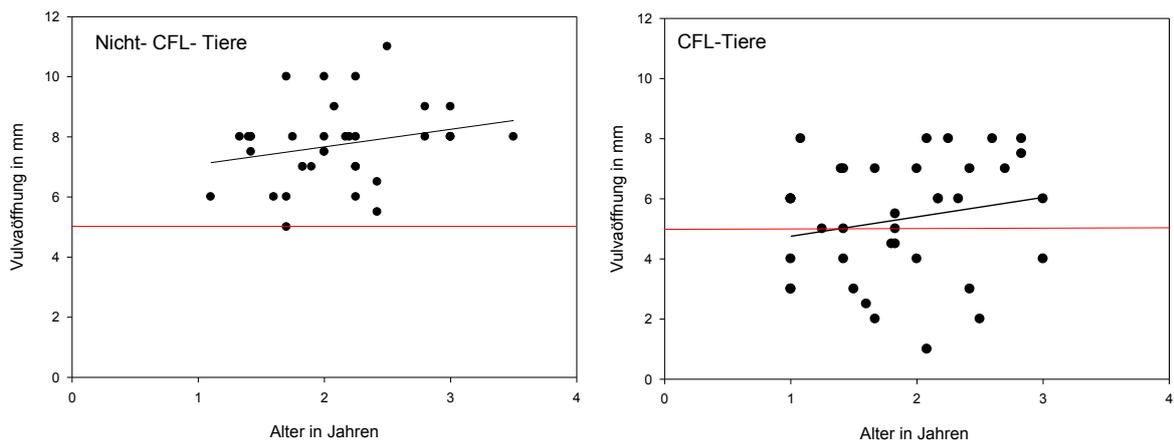


Abb. 44: Länge der Vulvaöffnung bei Nicht-CFL- (n = 44) und CFL-Tieren (n = 37). Die rote Linie stellt die Grenze zwischen einer „funktionell offenen“ und „funktionell geschlossenen“ Vulva dar. Altersklasse: 9 bis 36 Monate.

3.5.2 Genitale Charakteristika und morphologische Besonderheiten der Genitalien in Form von „pudendal pads“

Bei den Untersuchungen fiel eine morphologische Besonderheit der äußeren Genitalien auf, die sog. „pudendal pads“ (Abb. 46). Sie stellen einen Teil der Genitalien dar, die eine sackförmige Gestalt, ähnlich des Hodensacks, annehmen. Diese Säcke sind mit Flüssigkeit gefüllt und kommen in unterschiedlicher Form und Größe vor. Das Auftreten der Säcke korreliert mit einem erhöhten Gewicht der Tiere.

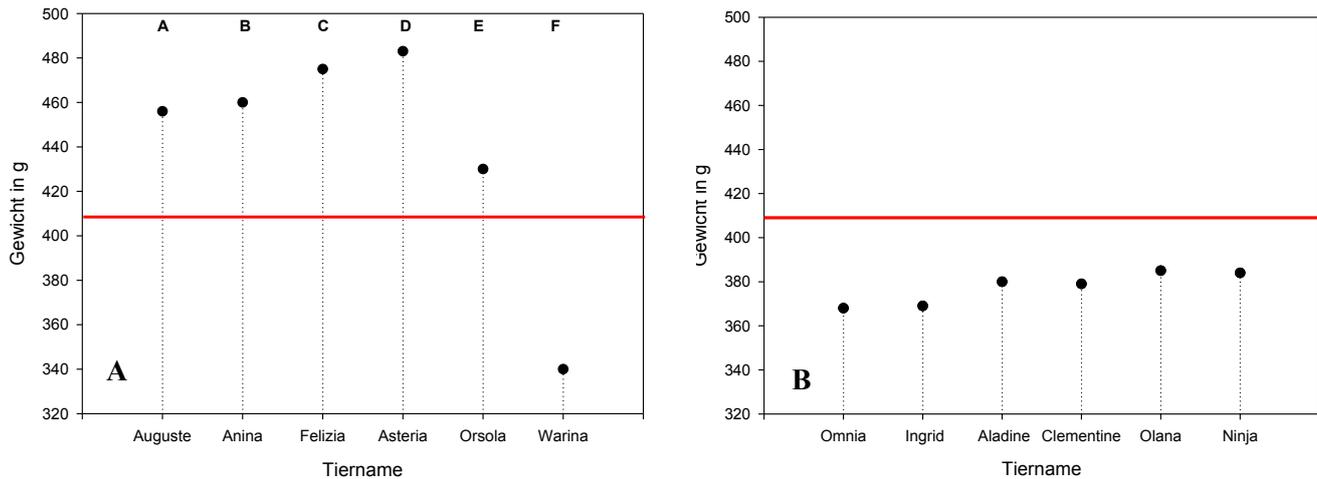


Abb. 45: A. Das Gewichtsniveau bei adulten Weibchen mit „pudendal pads“ sortiert von links nach rechts nach Größe der Säcke. Weibchen Auguste wies die größten Säcke auf, Weibchen Warina die kleinsten. Die rote Linie stellt das Durchschnittsgewicht (411 g) des Untersuchungskollektivs (n = 127) dar. Die Buchstaben beziehen sich auf die in Abb. 46 gezeigten Bilder. **B.** Gewichtsniveau der Tiere ohne „pudendal pads“.

Das Gewicht der Weibchen mit „pudendal pads“ lag bei durchschnittlich 441 g und damit deutlich über dem Niveau des Untersuchungskollektivs (n = 127, Ø 411 g). Die Tiere ohne „pudendal pads“ waren mit ihrem Gewicht deutlich unter dem Durchschnittsgewicht (Abb. 45). Es gab keinen Zusammenhang zwischen dem CFL-Phänotyp und den „pudendal pads“, wohl aber zwischen dem Gewicht der Weibchen und den „pudendal pads“ sowie dem CFL-Phänotyp (Kapitel 3.3.3). In Abb. 47 sind die Weibchen zum Vergleich ohne „pudendal pads“ dargestellt.



Abb. 46: Verschiedene Größen von „pudendal pads“ (roter Pfeil) bei sechs adulten Weibchen (Alter >12 Monate). **A.** Auguste 468 g, **B.** Anina 480 g, **C.** Felizia 384 g, **D.** Asteria 460 g, **E.** Orsola 362 g, **F.** Warina 341g.



Abb. 47: Weibchen ohne „pudendal pads“ (Alter >12 Monate). **A.** Omnia 369 g, **B.** Clementine 379 g, **C.** Ninja 381 g.

3.6 Weitere Maskulinisierungsmerkmale der Genitalien

Als beschreibende Parameter der Genitalmorphologie von *C. jacchus*-Weibchen wurden die beiden Genitalgrößen 'horizontale Breite' und 'vertikale Länge' (Kapitel 3.6.1) analysiert. Besonders die horizontale Breite könnte als Parameter einer möglichen Maskulinisierung in Frage kommen. Deshalb wurden Alter, Gewicht, Wurfkonstellation und Hormonspiegel in Korrelation zu diesen beiden Parametern untersucht.

3.6.1 Abhängigkeit der Genitalmorphologie vom Alter

Bei einigen Primaten-Arten zeigt die Größe der Genitalien ihre Reproduktionsfähigkeit an und hat eine Signalwirkung für das andere Geschlecht. Um zu überprüfen, ob dies auch für *C. jacchus*-Affen zutrifft, wurden die beiden Genitalgrößen 'horizontale Breite' und 'vertikale Länge' in verschiedenen Altersklassen untersucht.

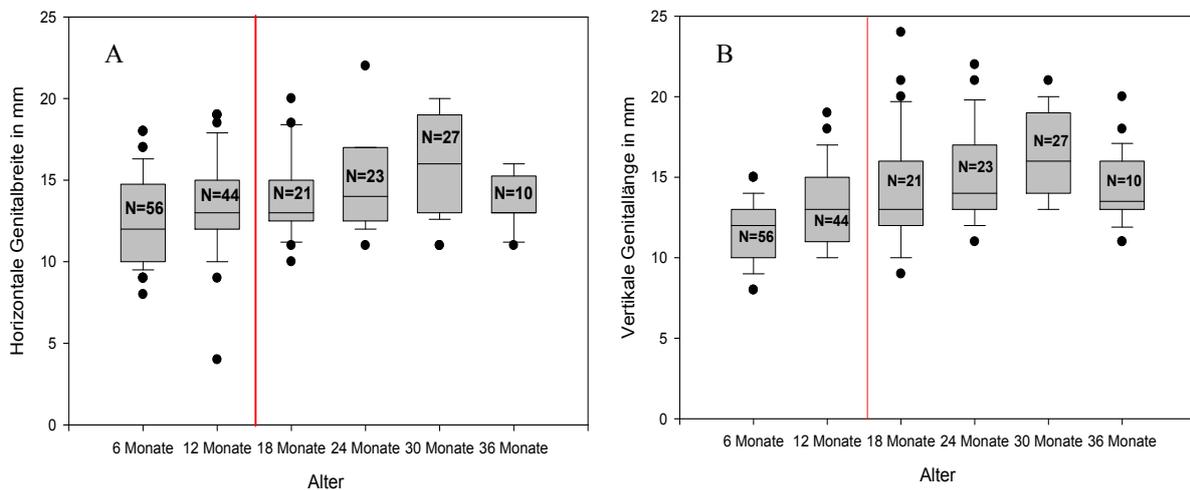


Abb. 48: A. Horizontale Breite der Genitalien in 6 Altersklassen (n = 181). B. Vertikale Genitallänge bei Tieren aus 6 Altersklassen (n = 181). Die rote Linie trennt die juvenilen (links) von den pubertären und adulten Weibchen (rechts).

Nicht nur zwischen dem Alter der Tiere und der Vaginalöffnung besteht ein Zusammenhang, sondern auch zwischen der horizontalen Genitalbreite und dem Alter. In der prä-pubertären Altersgruppe bleibt diese Genitalgröße unverändert. Erst im pubertären und adulten Alter findet eine Größenzunahme der horizontalen Genitalbreite und vertikalen Genitallänge statt (Abb. 48). Ab dem 36. Lebensmonat kommt es zu einer Rückentwicklung sowohl in der Breite als auch in der Länge. Zwischen dem 24. und 30. Lebensmonat findet in der post-pubertären Phase am äußeren Genitale die stärkste Entwicklung statt.

3.6.2 Abhängigkeit der Genitalmorphologie vom Gewicht adulter Weibchen

Um den auslösenden Faktor für die progrediente Genitalentwicklung herauszufinden, wurde die horizontale und vertikale Genitalentwicklung in Relation zum Gewichtsniveau gesetzt (Abb. 49). Es wurden nur Tiere ab einem Alter von 12 Monaten untersucht. Keines dieser Tiere wog weniger als 300 g.

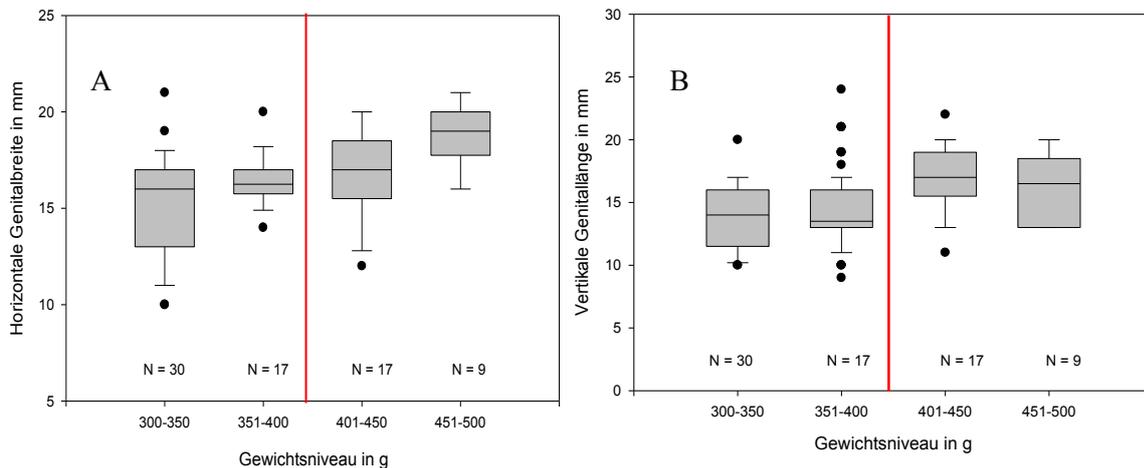


Abb. 49: Beziehung zwischen Gewicht und horizontaler Genitalbreite (A) und vertikaler Genitallänge (B) bei adulten Weißbüschelweibchen. Die Tiere wurden in 4 Gewichtsklassen eingeteilt (n = 73). Die rote Linie stellt die Trennung zwischen normalgewichtigen (links) und übergewichtigen (rechts) Tieren dar.

Sowohl bei der horizontalen Genitalbreite als auch bei der vertikalen Genitallänge findet eine gewichtsabhängige Entwicklung statt. Bei der vertikalen Genitallänge findet zwischen den Gewichtsklassen 350-400 g und 401-450 g ein Entwicklungssprung statt. Die durchschnittliche Längenzunahme beträgt 4 mm. Die horizontale Entwicklung nimmt kontinuierlich mit steigendem Gewicht zu. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass post-pubertär sowohl die horizontale als auch die vertikale Genitalentwicklung gewichts- und altersabhängig abläuft.

3.6.3 Einfluss der Wurfkonstellation auf die horizontale Genitalbreite bei adulten Weibchen

Da bei einem Teil der Weibchen die bereits erwähnten, Hodensack ähnlichen, „pudendal pads“ beobachtet wurden (Kapitel 3.5.2) und deren Größe in der Messung der horizontalen Genitalbreite enthalten war, stellte sich die Frage, ob es sich hierbei auch um ein Maskulinisierungsphänomen handelt. Um dies zu quantifizieren, wurde der Einfluss der Anzahl Männchen in einem Wurf und die Höhe des Androstendionspiegels in den weiblichen Geschwistern auf die horizontale Genitalbreite bei Weibchen in der Altersklasse >12 Monate untersucht (Abb. 50).

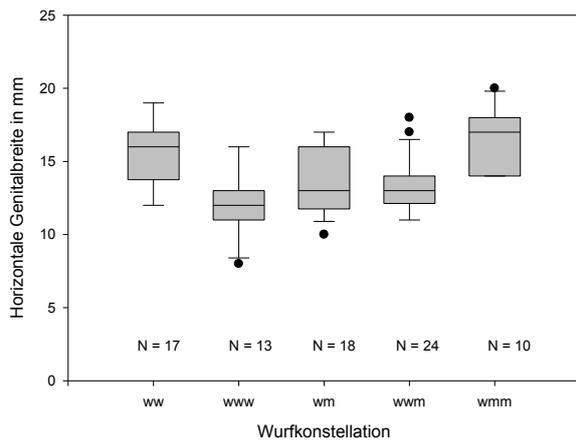


Abb. 50: Einfluss der Wurfkonstellation auf die horizontale Genitalbreite bei adulten Weibchen n = 82 (w = Weibchen; m = Männchen).

Die Durchschnittswerte für die horizontale Genitalbreite in den fünf Wurfkonstellationen bewegten sich zwischen 12,5 und 20 mm. Den höchsten Wert zeigte die Gruppe mit dem größten Anteil an Männchen (wmm) mit 20 mm, gefolgt von der Konstellation ww mit 19 mm. Den niedrigsten Wert wies die Konstellation www mit 12,5 mm auf. Somit hat die Wurfkonstellation keinen Einfluss auf die horizontale Genitalbreite.

Um die Frage zu klären, ob die Genitalbreite hormonell beeinflusst wird und als Vermännlichungszeichen zu sehen ist, wurde der Einfluss des Androstendionspiegels auf die Genitalbreite bei 34 Weibchen untersucht (Abb. 51). Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Androstendionwerten und der horizontalen Genitalbreite, so dass man bei verbreiterten Genitalien nicht von einer Virilisierung durch das Steroidhormon Androstendion sprechen kann.

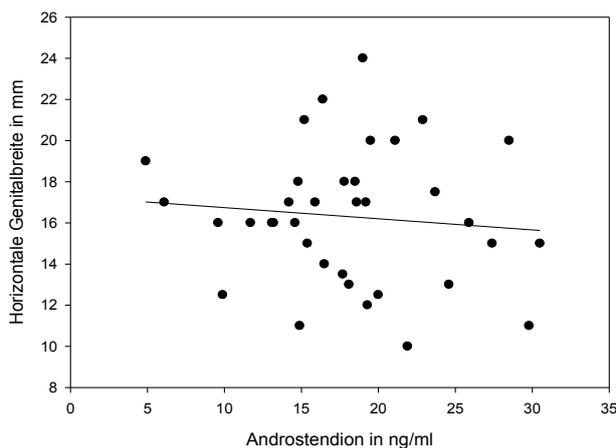


Abb. 51: Einfluss des Androstendionspiegels auf die horizontale Genitalbreite (n = 34).

Ergänzend wurde auch der Einfluss der Östrogene auf die Genitalbreite untersucht. Auch hier gab es keinen Zusammenhang zwischen der horizontalen Genitalbreite und dem Hormon. Die am Anfang gestellte These, dass es sich bei der horizontalen Genitalbreite um ein Vermännlichungszeichen handeln könnte, konnte nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen alle aufgeführten Ergebnisse, dass der CFL-Grad vom Androstendionspiegel der Weibchen abhängt. Weibchen mit einem höheren CFL-Grad weisen auch erhöhte Androstendionspiegel auf. Der Androstendionwert wiederum hängt signifikant vom Gewichtsniveau der Weibchen ab. Als übergeordnete Instanz scheint der maternale Habitus das Gewicht der Töchter zu verändern. Höher gewichtige Mütter zeugen höher gewichtige Töchter, in denen der CFL-Phänotyp signifikant häufiger anzutreffen ist. Auch die Drillingsrate ist höher bei übergewichtigen Müttern. Zusätzlich wird der Androstendionspiegel der Töchter auch von der Geburtswurfskonstellation beeinflusst. Weibchen mit einer höheren männlichen Beteiligung im Geburtswurf haben auch höhere Androstendionspiegel. Dies führte zu der Frage, ob auch auf zellulärer Ebene in Form des Cross-sex-Chimärismus der CFL-Phänotyp beeinflusst wird. Es bestätigte sich, dass tendenziell mit erhöhten Chimärismusraten auch ein erhöhter CFL-Grad auftritt. Diese Ergebnisse stützen die These, dass es sich beim CFL-Phänotyp um eine Art zelluläre und hormonelle Vermännlichung handelt, die besonders bei übergewichtigen Weibchen zu finden ist und durch den maternalen Habitus getriggert wird, der wiederum eine langfristige Folge der Bedingungen in Gefangenschaft ist. Die Abbildungen 52 und 53 stellen die Ergebnisse dieser Studie im Überblick dar.

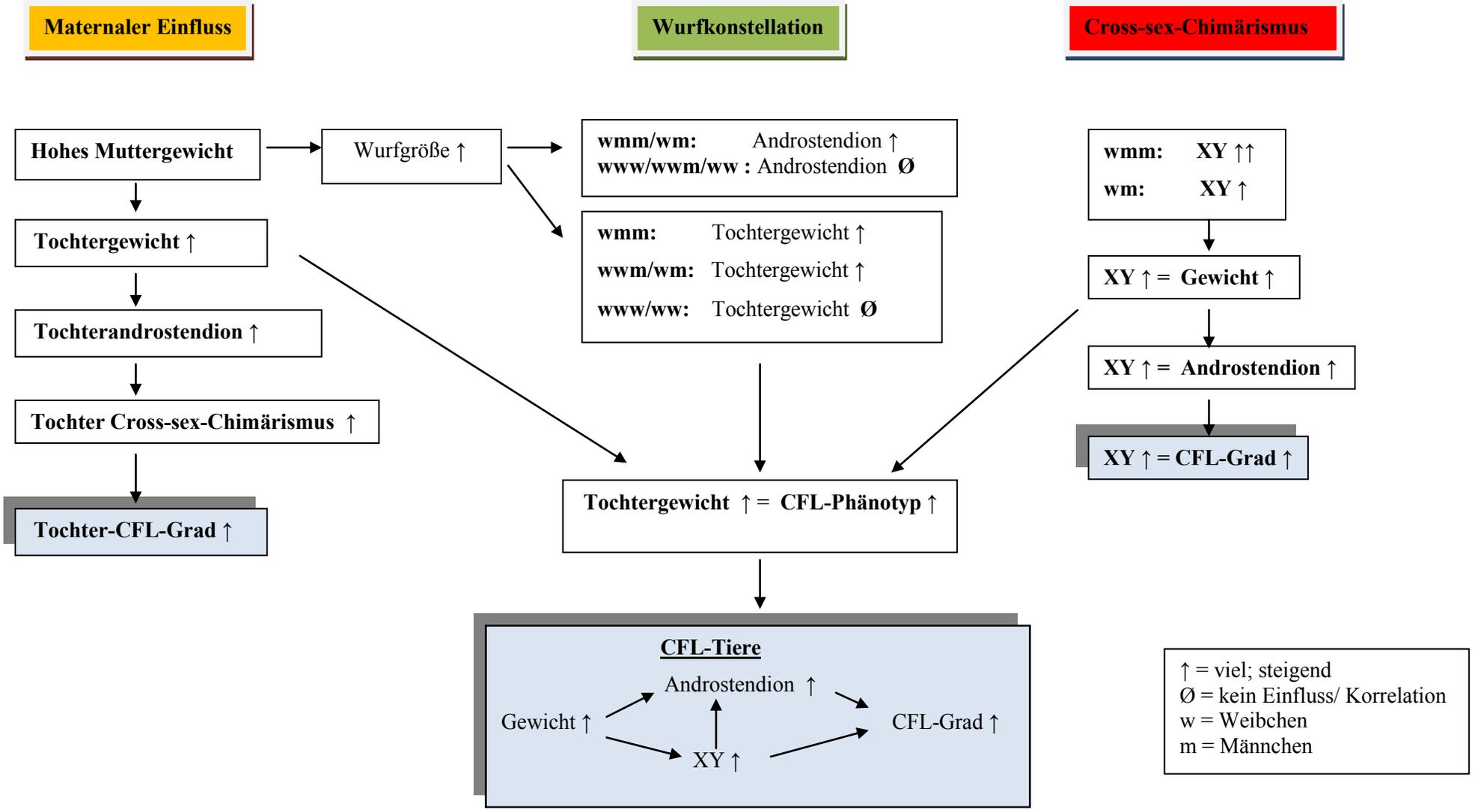


Abb. 52 Einflussfaktoren auf den CFL-Phänotyp

CFL-Phänotyp

CFL-Grad:

präpubertär + pubertär = CFL-Grad ↑
adulte Weibchen = CFL-Grad ↓

Öffnungszeitpunkt:

individuell variabel, beeinflusst durch Muttergewicht

Kumulativer Einfluss der Bedingungen in Gefangenschaft:

externe Vorfahren in Familienlinie ↑ = CFL-Phänotyp ↑

- Ø genetische Ursache
- Ø von extern ins DPZ importiert
- Ø Östrogeneinfluss

Genitalien

Gewicht ↑ = „pudendal pads“ ↑

Alter ↑
Gewicht ↑

Horizontale Genitallänge ↑
Vertikale Genitallänge ↑

↓ = wenig; abnehmend
↑ = viel; steigend
Ø = kein Einfluss/ Korrelation

Abb. 53 Allgemeine Informationen zum CFL-Phänotyp

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird erstmalig über die Ätiologie des CFL-Phänotyps (congenital fused labia) und die Morphologie der äußeren Genitalien beim *Callithrix-jacchus*-Weibchen berichtet. Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um eine quantitative Beschreibung des CFL-Phänotyps und assoziierte morphologische und physiologische Charakteristika des äußeren Genitals sowie eine systematische Analyse möglicher Mechanismen der Entstehung des CFL-Phänotyps in gefangenen Weißbüschelaffen zu erstellen. Die beiden Abbildungen 52 und 53 geben einen Überblick der gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse über den CFL-Phänotyp. Die wichtigsten Punkte werden nachfolgend diskutiert.

4.1 CFL-Phänotyp und genitaler Polymorphismus: Ätiologie und Variationen beim adulten *C. jacchus*-Weibchen in Gefangenschaft

Bei der Geburt sind die Labien verschlossen und die weiblichen Genitalien noch nicht entwickelt. Das macht es schwierig, das Geschlecht von Neugeborenen innerhalb der ersten 2-3 Lebenswochen zu identifizieren. Obwohl die Erfassung der Entwicklungsstadien der Genitalien von Neugeborenen nicht zur vorliegenden Studie gehörte, haben die Untersuchungen gezeigt, dass sich in der Entwöhnungszeit (etwa 2 ½ Monate nach Geburt) die Labien anfangen zu öffnen. Dies deutet drauf hin, dass die Muttermilch wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung einer verschlossenen Vulva spielt. Untersuchungen über dieses Phänomen sind nicht bekannt. Auch wurde der Ablauf der Genitalentwicklung bei Marmosets bisher noch nicht publiziert.

Die eigenen Daten belegen, dass es eine individuelle, variable Dynamik in der Entwicklung gibt. Einige Tiere öffneten die Labien langsamer als andere. Mit der Pubertät waren jedoch die meisten Weibchen „funktionell“ offen. Es gab aber eine größere Anzahl an Weibchen, die sich auch nach der Pubertät nicht weiter öffneten. Diese, sich erst nach der Pubertät langsam öffnenden Weibchen, stellten das Hauptklientel für die vorliegende Studie dar. Ob es dieses Phänomen der hinausgezögerten Vulvaöffnung auch bei wilden Marmosets gibt, ist nicht bekannt. So ist es nicht möglich zu sagen, was bei der Entwicklung der äußeren Genitalien normal und was nicht normal ist. Nach den vorliegenden Daten lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die verzögerte Öffnung der Labien von hormonellen Einflüssen gesteuert wird, die auf Übergewicht und die dadurch bedingten metabolischen Veränderungen in Gefangenschaft zurückzuführen sind.

Bei der Analyse der äußeren Genitalien fiel weiterhin auf, dass weibliche Weißbüschelaffen eine starke Varianz in Größe und Form der „pudendal pads“ zeigten, die der äußeren Genitalregion ein maskulines Erscheinungsbild geben. Es ist bisher nicht bekannt, ob dies mit dem CFL-Phänotyp in Verbindung steht, ob die Größe der Säcke einen Hinweis auf den Zyklusstatus der Weibchen gibt und ob dieses Phänomen nur auf gefangene Tiere beschränkt ist. Bei einigen Weibchen zeigte sich die

Tendenz, dass mit einem erhöhten Gewichtsniveau auch größere „pudendal pads“ auftraten. Ob dies auch als eine Folgeerscheinung des Übergewichts und einer Umstellung des Hormonhaushalts anzusehen ist, kann nicht beantwortet werden, weil dazu eine Untersuchung sowohl an Weibchen in Gefangenschaft als auch in der Wildnis erforderlich wäre. Die Schwellung der weiblichen Genitalregion stellt bei vielen Primaten eine Signalfunktion für das männliche Geschlecht dar und ist normalerweise mit erhöhten Östrogenwerten assoziiert. Bei einigen Altweltprimaten tritt dies bei ovulierenden Weibchen als ein Phänomen der „falschen“ Ovulation. Bei Neuweltaffen ist so ein Phänomen noch nicht beschrieben worden (Cheyne und Chivers 2006).

In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Erscheinungsbild der „pudendal pads“ und den Östrogen- bzw. Androstendionwerten gefunden werden. Die einzige, auch signifikante Beziehung bestand bei prä-pubertären und adulten Tieren zum Körpergewicht. Dies ist höchstwahrscheinlich auf vermehrtes subkutanes Fettgewebe oder vermehrte Flüssigkeitsansammlungen aufgrund der Käfighaltung zurückzuführen.

4.2 Vererbung und Umwelteinflüsse

Eine der wichtigsten Fragestellungen in dieser Arbeit war, ob der CFL-Phänotyp eine vererbte Anomalie darstellt oder ob es sich um eine durch Umwelteinflüsse ausgelöste oder epigenetisch verursachte Alteration im normalen Entwicklungsprozess handelt. Bis zum Zeitpunkt dieser Studie existierte nur eine Publikation, welche den Vererbungsmechanismus des CFL-Phänotyps beim gefangenen *C. jacchus*-Affen beschrieb (Isachenko *et al.* 2002). Zusätzlich gab es eine weitere Fallstudie über die „Maskulinisierung“ der Genitalien bei *C. jacchus*-Weibchen. In dieser wurde mit der Polymerase Chain Reaction ein Y-Chromosom-Marker beim Weibchen nachgewiesen. Die Autoren interpretierten dies als Fall einer abnormen Geschlechtsentwicklung in einem weiblichen Marmoset, suchten aber nicht nach weiteren Ursachen für deren Entstehung, wie z.B. dem Chimärismus (Sanchez-Morgado *et al.* 2003).

Isachenko *et al.* (2002) vermuteten, dass es sich beim CFL-Phänotyp um eine rezessiv vererbte genetische Besonderheit handelt. Sie identifizierten bestimmte externe Kolonien, aus denen ihre untersuchten Zuchttiere kamen und in deren Familienlinien eine erhöhte Anzahl dieses CFL-Phänotyps anzutreffen war. Daraufhin stellten sie die Hypothese auf, dass dieser Phänotyp von extern in die DPZ Kolonie hineingetragen worden war. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer deutlich höheren Anzahl an Weibchen nachgeprüft.

Eine eventuelle Vererbung des CFL-Phänotyps durch eine Analyse der Familienstammbäume zu dokumentieren, stellte sich als problematisch heraus, da bei den meisten Weibchen der Kolonie vorher in ihren Familienlinien der CFL-Status nicht untersucht wurde und viele Tiere aus den analysierten

Familienlinien sich zum Zeitpunkt der Studie bereits nicht mehr in der DPZ-Kolonie befanden. Hinzu kam, dass der CFL-Phänotyp bei *C. jacchus*-Affen zwar bekannt war, dass betroffene Tiere jedoch trotzdem häufig für die Zucht benutzt wurden, indem man ihnen die Labien chirurgisch öffnete. Aus diesem Grund wurde eine alternative Strategie gewählt, mit der eine evidenzbasierte Datenerhebung möglich war. Nachdem das DPZ 1977 nach der brasilianischen Exportsperre für Primaten gegründet worden war, wurde die Marmoset-Kolonie aus Tieren anderer Kolonien aufgebaut, bestand danach aber bis in die Jahre 1989-1990 nur aus wenigen Tieren. Erst nach 1990 wurde die Kolonie mit Tieren aus anderen europäischen Kolonien signifikant erweitert. Bis heute ist es üblich, jedes Jahr eine kleine Anzahl an Tieren aus anderen Kolonien zu importieren, um den „out bred character“ der Kolonie zu erhalten.

Die Familienanalyse der CFL-Tiere ermöglichte die Identifikation der wichtigsten externen Zuchttierkolonien, die bei einer genetischen Ätiologie für den CFL-Phänotyp eine Rolle gespielt haben konnten. Die Stammbaumanalyse ergab, dass bei der Zusammensetzung der Vorfahren des Untersuchungskollektivs, die Kolonien aus dem Max von Pettenkofer Institut, den Universitäten München, Berlin und Düsseldorf sowie der Ciba Versuchstierzucht wichtig waren. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Herkunftsorten von CFL- und Nicht-CFL-Tieren festgestellt werden. Die Kolonien des Max von Pettenkofer Instituts und der Ciba Versuchstierzucht waren, was die Anzahl importierter Tiere angeht, sowohl in dieser Studie, als auch bei Isachenko *et al.* (2002), die dominierenden Kolonien, aus denen die untersuchten Familienlinien stammten, so dass sich der Einfluss dieser externen Kolonien in den Folgegenerationen nach 2002 fortgesetzt hat. Die Vermutung war, dass, vorausgesetzt es liegt eine genetische Disposition vor, auch für die Verbreitung des CFL-Phänotyps diese beiden Kolonien eine wichtige Rolle gespielt haben konnten. Die Zuchttiere aus diesen beiden Kolonien gehören zu den ältesten Zuchtpaargenerationen, die bereits zu Beginn der Weißbüschelaffenpopulation des DPZs importiert wurden und so die größte Anzahl an Nachkommen aufweisen. Aus diesem Grund ist ihr genetischer Einfluss in mehr DPZ-Familienlinien zu finden als der von anderen Zuchtpaaren, die erst später in die Population kamen.

In diesem Zusammenhang konnte in zwei ausgewählten CFL- und Nicht-CFL-Gruppen nachgewiesen werden, dass CFL-Tiere signifikant mehr externe Vorfahren hatten als Nicht-CFL-Tiere, auch wenn beide Gruppen über eine gleiche Generationenanzahl in der DPZ-Kolonie verfügten. Dies lässt schlussfolgern, dass Weibchen aus Familienlinien mit einer höheren Beteiligung von externen Vorfahren unter Bedingungen der Gefangenschaft eher den CFL-Phänotyp entwickeln. Ob dieses eine Folge einer erhöhten Inzuchtrate in Gefangenschaft ist, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Die Familienanalyse gab keinen signifikanten Hinweis darauf, dass der CFL-Phänotyp aus einer bestimmten Kolonie ins DPZ importiert wurde. Da auch alle anderen europäischen Kolonien Tiere importieren, muss davon ausgegangen werden, dass alle Marmosets Teil eines gemeinsamen, europäischen Genpools sind, obwohl die europäischen Marmoset-Kolonien versuchen, durch das Austauschen von Tieren untereinander die genetische Vielfalt in den Kolonien zu erhalten und Inzucht zu vermeiden. Es gibt jedoch kein zentrales Register für *C. jacchus*-Affen und keine Daten über Stammbäume, um den Verwandtschaftsgrad der Tiere zu verfolgen. Obwohl das Marmoset-Genom-Programm Daten sammelt, werden diese Daten nicht für das Management von gefangenen Marmosets zur Verfügung gestellt. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

Die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen, dass je länger eine Tierfamilie im DPZ war, desto häufiger der CFL-Phänotyp bei ihr auftrat. Sie liefern aber keinen Hinweis darauf, dass es sich beim CFL-Phänotyp um ein vererbbares Phänomen handelt. Die mehr favorisierte Möglichkeit basiert auf der Tatsache, dass die Bedingungen der Käfighaltung im DPZ für eine Akkumulation der CFL-Phänotypen verantwortlich sind. Je länger eine Familie im DPZ lebt, desto häufiger tritt dieses Phänomen in Erscheinung. Es ist bekannt, dass gefangene *C. jacchus*-Affen sich in Größe und Gewicht von Wildtieren unterscheiden und häufig ein Übergewicht aufweisen (Araújo *et al.* 2000; Tardif *et al.* 2009). Dies kann einen weit reichenden Einfluss auf die metabolische und hormonelle Balance haben. Physiologische Veränderungen in der Mutter könnten so eine langfristige Auswirkung auf das post-fetale Leben der Nachkommen haben. Ob diese Hypothese zutrifft, wird im Folgenden besprochen.

4.3 Demographische Einflüsse auf den CFL- Phänotyp

Obleich allgemeine demographische Daten für eine Vielzahl von *Callithrichidae* in der Literatur vorhanden sind, gibt es bisher noch keine detaillierten Untersuchungen zu den demographischen Einflüssen auf die weibliche Genitalregion. Dabei sind gerade für das Verständnis der reproduktionsphysiologischen Abläufe, z.B. für die Verpaarungsprozesse zwischen Männchen und Weibchen, Kenntnisse über die morphologischen Veränderungen der Genitalien und die sie steuernden Einflussfaktoren wichtig. Diese Veränderungen könnten auch wichtige Indikatoren für die physiologischen Veränderungen in Gefangenschaft sein. Die beiden bisher einzigen Studien, die die Genitalregion oder den CFL-Phänotyp bei *C. jacchus*-Affen beschreiben, stammen von Stein (1978) und Isachenko *et al.* (2002).

Die vorliegende Studie zeigt einen signifikanten Unterschied der Häufigkeit von CFL-Phänotypen zwischen prä-pubertären, pubertären und adulten Weibchen. Dieses Ergebnis stützt die These, dass es sich bei diesem Phänotyp um eine „funktionelle Schranke“ in juvenilen Tieren handelt und diese Schranke sich erst im Laufe des Reifeprozesses zum adulten Weibchen auflöst. Da es jedoch keinen

Vergleich zu Tieren in der Wildnis gibt, ist nicht bekannt, wann das „normale“ Alter für den Öffnungsprozess ist und ob die individuelle Stellung in der Gruppenhierarchie eventuell eine Rolle für den Öffnungszeitpunkt spielt.

4.4 Gewicht der Weibchen und CFL-Phänotyp

Eine wichtige demographische Größe beim Auftreten des CFL-Phänotyps ist das Gewicht der Weibchen. Das wurde durch den Zusammenhang zwischen den Gewichtsklassen und dem CFL-Grad in den einzelnen Tiergruppen deutlich. Die Hypothese, dass Übergewicht die Öffnung der Vagina verzögert, konnte bestätigt werden. Sowohl bei übergewichtigen juvenilen als auch adulten Weibchen konnte eine signifikante Erhöhung des CFL-Grads nachgewiesen werden. In beiden Gruppen scheint es sich um ein pathologisches Geschehen zu handeln, das durch die Bedingungen in Gefangenschaft begünstigt wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass viele Marmosets in Gefangenschaft übergewichtig sind und multiple Symptome zeigen, die mit dem metabolischen Syndrom, wie z.B. Diabetes mellitus, in Verbindung gebracht werden können (Schlumbohm 2008; Tardif *et al.* 2009). Dieses beinhaltet Fettleibigkeit sowie vielfältige Störungen des Stoffwechsels mit assoziierten Veränderungen in der Blutchemie und in den Organen. Die Ursachen hierfür liegen vor allem in der Ernährung der Tiere und den eingeschränkten Bewegungsmöglichkeiten in der Käfighaltung.

Die Frage stellte sich, ob auch der CFL-Phänotyp durch diese Faktoren beeinflusst wird. Denkbar wäre auch eine Assoziation mit dem Hormonhaushalt. Die signifikante Erhöhung der Zahl von Töchtern mit CFL-Phänotyp bei übergewichtigen Müttern ist die Folge der Auswirkungen des metabolischen Syndroms und den dadurch erhöhten Androstendionspiegeln. Bei den untersuchten Tieren bestand eine positive Korrelation zwischen Gewicht der Mutter, Gewicht der Töchter und dem Androstendionspiegel der Töchter. Das Auftreten des CFL-Phänotyps bei den Töchtern korrelierte mit einem erhöhten Androstendionspiegel der Töchter, nicht jedoch mit ihrem Östrogenspiegel. Dieses Ergebnis deutet drauf hin, dass der CFL-Phänotyp primär ein Maskulinisierungsprozess ist, der stark durch die maternale Umwelt beeinflusst wird. Dies wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert. Da in Zwillings- und Drillingsgeburten die Präsenz eines männlichen Co-Geschwisters keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit von CFL-Geschwistern ausmachte, kann der ausschlaggebende Faktor nur das Muttergewicht sein.

4.5 Die Mutter als Kontrollinstanz für den Reproduktionsstatus der Töchter

Im Gegensatz zu Tardif *et al.* (2004) konnten Schlumbohm (2008) sowie die eigenen Daten zeigen, dass das Gewicht der Töchter signifikant von dem Gewichtsniveau der Mutter in der DPZ Population abhängt. Je höher das maternale Gewicht war, desto höher war auch das Gewichtsniveau der jungen und adulten Töchter. Nach Tardif *et al.* (2004) hängt das Gewicht der Töchter mehr von dem Alter der Mutter als von ihrem Gewicht ab. Dies konnten die eigenen Untersuchungen nicht bestätigen. Sie

zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Mutter und dem Tochtergewicht und folglich einen erhöhten Androstendionspiegel. Daraus folgte ein erhöhter CFL-Grad in den Töchtern. So wird das erhöhte Gewicht der Mutter als die Hauptursache für eine verspätete Öffnung der Labien ihrer Töchter gesehen. Da der CFL-Phänotyp aber auch bei niedriggewichtigen adulten Töchtern auftrat, muss es weitere Faktoren geben, die zu einer Verzögerung der Vaginalöffnung führen können. Eine Rolle könnte die Stellung der Weibchen in der Gruppe spielen, da sich im Gruppgefüge der *C. jacchus*-Affen nur das Alphaweibchen reproduziert und die anderen Weibchen von ihr hormonell unterdrückt werden (Abbott *et al.* 1988; Puffer *et al.* 2004; Ziegler und Sousa 2002). In Gefangenschaft werden die Weibchen zunächst in ihrem Familienverband geboren, meistens aber nach der Pubertät aus diesem Verband entfernt, so dass familiäre Hierarchien und Rollenverteilungen, auch die reproduktive Rollenverteilung, durch den Menschen aufgehoben werden. Es wird vermutet, dass dieser Sachverhalt eine wichtige Rolle bei der Genitalentwicklung der Weibchen spielt. Dies konnte bisher aber noch nicht wissenschaftlich belegt werden.

Im eigenen Untersuchungskollektiv konnte beobachtet werden, dass das maternale Gewichtsniveau mit der Drillingsrate korrelierte. Dies gibt der fetalen Umgebung eine zunehmende Komplexität. Nur in Drillingsgeburten können Männchen in der Überzahl auftreten. Trägt dieses nun zum Maskulinisierungsprozess bei oder ist der mütterliche Androstendionspiegel der entscheidende Faktor? Die eigenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass der mütterliche Einfluss stärker ist als ein oder zwei männliche Geschwister in einem Wurf.

Ausgehend von der Theorie, dass der CFL-Phänotyp ein physiologischer Zustand ist, der vom physiologischen Habitus der Mutter in Form einer fetalen Hormonregulierung (Androstendion) kontrolliert wird, kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse postuliert werden, dass dieser Kontrollmechanismus bei gefangenen Weibchen durch Hormonregulierungsstörungen auf Grund des metabolischen Syndroms nicht mehr vollständig funktioniert. Das Gewicht der Töchter und somit indirekt ihre Androstendionspiegel und ihr CFL-Grad hängen signifikant vom Gewicht der Mütter ab. Dieser epigenetische Effekt wurde durch eine kontinuierliche Selektion übergewichtiger Zuchttiere über die Generationen verstärkt. Es konnte gezeigt werden, dass übergewichtige Mütter mit zunehmendem Gewicht im Laufe der letzten 10 Jahre zunehmend Drillinge gebären.

4.6 Hormone und CFL- Phänotyp

Um weitere Erkenntnisse über den physiologischen Hintergrund des CFL-Phänotyps zu gewinnen, wurde der Einfluss der Hormone Androstendion und Östrogen auf den CFL-Phänotyp untersucht. Hormonelle Einflüsse auf die Ausbildung der Genitalien von *C. jacchus*-Weibchen wurden bisher noch nicht beschrieben.

Bei der Frau stammt das Androstendion aus der Nebennierenrinde und den Eierstöcken. Es hat beim Menschen eine vermännlichende Wirkung, da es im Körper zu Testosteron umgebaut wird und auch zu erhöhten Östrogenwerten beiträgt. Testosteron kann in das Östrogen Östradiol umgewandelt werden (Löffler 2000). Beim Menschen bestimmt man den Androstendionspiegel wenn Androgenisierungszeichen (z.B. polyzystisches Ovar, Störungen der Eierstockfunktion, Zyklusstörungen etc.) vorliegen. Zu hohe Androstendionspiegel treten bei Fettleibigkeit, adrenogenitalem Syndrom und selten bei bestimmten Tumoren auf. Ähnliche Symptome sind auch beim Marmoset gefunden worden (Bernhard 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Bestimmung des Androstendionspiegels bei *C. jacchus*-Weibchen überprüft werden, ob es sich beim CFL-Phänotyp auch um eine Form der hormonellen Vermännlichung handelt. Es konnte gezeigt werden, dass Androstendion tatsächlich einen signifikanten Einfluss auf den CFL-Phänotyp hat. Je höher die Androstendionspiegel und das Körpergewicht der Weibchen waren, umso ausgeprägter war der CFL-Grad. Zwar waren auch die Östrogene in übergewichtigen Tieren erhöht, aber es konnte keine Korrelation mit dem CFL-Phänotyp gezeigt werden. Bemerkenswert ist, dass Tiere trotz erhöhtem Androstendionspiegel und CFL-Phänotyp fruchtbar waren (Isachenko *et al.* 2002). Die sehr gute Fruchtbarkeit manifestierte sich in der immer höheren Rate an Drillingsgeburten. Untersuchungen der Ovarien lassen jedoch annehmen, dass bei solchen Tieren die reproduktive Lebensspanne verkürzt sein kann (Bernhard 2009).

Weibchen aus Würfen mit Männchen (wm, wwm und wmm) hatten tendenziell höhere Androstendionspiegel und ein höheres Gewichtsniveau als Weibchen aus Würfen mit Schwestern (ww und www). Je mehr Männchen in einem Wurf vorkamen, umso höher waren die Androstendionspiegel bei den Weibchen. Dies beweist, dass der plazentäre Austausch zwischen den Geschwistern im Mutterleib nicht nur auf zellulärer, sondern auch auf hormoneller Ebene erfolgen muss. Da ein oder zwei Männchen den gleichen hormonellen Effekt ausüben, muss man annehmen, dass der Einfluss der Mutter wichtiger ist, als derjenige der Brüder in einem Wurf.

Entsprechende Daten über Marmosets in der Wildnis sind nicht vorhanden. Chambers *et al.* (1979) erfassten in den Anfangsjahren der Kolonie von Edinburgh, die damals aus Wildtieren aufgebaut wurde, die Androstendionspiegel von Tieren kurz vor einer Schwangerschaft. Diese lagen um die 5 ng/ml. In der eigenen Untersuchungsgruppe erreichte nur ein Nicht-CFL-Tier solch einen niedrigen Androstendionspiegel. Sein Gewicht betrug 340 g und es war eine Tochter von einer Mutter mit niedrigem Gewicht. Dies bestätigt die Annahme, dass der CFL-Phänotyp eine hormonelle Vermännlichung der weiblichen Genitalien darstellt, der durch erhöhte Androstendionspiegel in übergewichtigen Weibchen ausgelöst wird.

Bei den Östrogenwerten konnte keine Korrelation mit dem CFL-Phänotyp nachgewiesen werden, obwohl, wie beim Androstendion auch, ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Östrogenspiegel und dem Gewicht der Mutter nachgewiesen werden konnte. Da Androstendion eine Vorstufe in der Östrogen-Biosynthese darstellt und nach Aromatisierung, z.B. im Fettgewebe, zu den beiden wichtigsten Östrogenen, dem Östradiol und dem Östron, synthetisiert wird, besteht hier eine Verbindung zwischen dem endokrinen System und dem Gewicht.

In einem Einzelversuch konnte gezeigt werden, dass die äußerliche Behandlung eines CFL-Weibchens mit Östrogensalbe nicht zur Öffnung der *Labia majora* führte, so wie dies von Golombowski *et al.* (1998) bei jungen Mädchen beschrieben wurde. Da die Ursache der Labiencynechie bei jungen Mädchen meist ein Östrogenmangel ist, besteht die Therapie aus einer lokalen Behandlung mit östrogenhaltigen Salben. Im Gegensatz dazu war bei dem behandelten *C. jacchus*-Weibchen der CFL-Phänotyp nicht durch Östrogenmangel verursacht worden. Es war übergewichtig und hatte erhöhte Östrogenwerte. Auch dies weist darauf hin, dass der CFL-Phänotyp nicht durch Östrogenmangel verursacht wird sondern durch eine Androgenisierung auf Grund des Übergewichts der Mutter. Werden solche Tiere obduziert, finden sich hypertrophe Nebennieren und Veränderungen an den Ovarien, beides mögliche Ursachen für einen erhöhten Androstendionspiegel (Bernhard 2009). Aufgrund des Übergewichts waren die meisten der untersuchten Weibchen in unterschiedlichem Ausmaß androgenisiert.

4.7 Cross-sex-Chimärismus, Androgenisierung und CFL-Phänotyp

Ein anderer möglicher Mechanismus für die Maskulinisierung könnte das Vorhandensein von männlichen Zellen in weiblichen Wurfgeschwistern sein, die durch einen Blutaustausch aufgrund der plazentären Anastomosen auftreten. Dies wurde von Sanchez-Morgado *et al.* (2003) auf Basis einer Fallstudie vermutet, in der sie männliche Gene (ZFY und SRY) in einem weiblichen Marmoset nachweisen konnten. Dieses Tier wies alle morphologischen Eigenschaften auf, die auch bei den eigenen Untersuchungen gefunden wurden: CFL, Übergewicht, vergrößerte „pudendal pads“ etc. Das Auftreten der männlichen Gene in diesem Weibchen wurde durch einen X/Y-Chimärismus erklärt, der sich nicht nur auf Blutlymphozyten beschränkte, sondern auch in anderen Geweben nachweisbar war (Sanchez-Morgado *et al.* 2003; Ross *et al.* 2007).

Auch Goldschmidt *et al.* (2005) haben das Auftreten des CFL-Phänotyps bei Marmosets mit dem Chimärismus in Verbindung gebracht. Die erhöhte Wurfgröße (Drillinge, Vierlinge, etc.), primär verursacht durch ein erhöhtes Muttergewicht aufgrund von Bedingungen in der Gefangenschaft, beeinflusst den Zell- und Hormonaustausch und führt zum Auftreten eines verstärkten Vorkommens von männlichen Zellen in einem Weibchen. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte männliche Zellzahl in einem Weibchen generell mit einer Maskulinisierung und speziell mit einer erhöhten CFL-Rate

assoziiert ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden zur Detektion der Geschlechtschromosomen in Meta- (Giemsa- und DAPI-Färbung) und Interphasen (FISH-Färbung) in Kooperation mit Herrn PD Dr. Stefan Müller, München, entwickelt.

Es wurden Lymphozyten zytogenetisch untersucht, da sie den höchsten Anteil eines Cross-sex-Chimärismus aufweisen. Die gewonnenen Daten deuten drauf hin, dass es, ähnlich wie beim Freemartin-Syndrom (Padula 2005), einen direkten Zusammenhang zwischen dem Cross-sex-Chimärismus und dem CFL-Phänotyp bei *C. jacchus*-Affen gibt. Im Gegensatz zu der signifikanten Korrelation von Androstendion mit dem CFL-Phänotyp ist zwischen den Androstendionwerten und dem Cross-sex-Chimärismus nur eine Tendenz vorhanden.

Demographische Daten über den Chimärismus beim *C. jacchus*-Affen sind spärlich. Gengozian (1970) war einer der Ersten, der demographische Daten bei Neuweltaffen (*Saguinus nigricollis*) bezüglich des Chimärismus erhob. Unter anderem untersuchte er die Chimärismusverteilung in Zwillingspaaren, das Verhältnis der XX/XY Zellen in den einzelnen Geschlechtern und die Veränderung des Verteilungsverhältnisses im Verlauf der Zeit. Er konnte zeigen, dass der Cross-sex-Chimärismus bei gemischtgeschlechtlichen Zwillingspaaren ein gleichmäßiges Verhältnis von 50:50 aufwies. Es ist davon auszugehen, dass Anfang der 70er Jahre die Zwillingsrate in der untersuchten Kolonie noch derjenigen von in der Wildnis lebenden Tiere entsprach und sich der Chimärismus gleichmäßig zwischen den Geschlechtern verteilte. Die komplexeren Bedingungen durch Drillingsgeburten lagen nur vereinzelt vor.

Ross *et al.* (2007) waren die ersten, die grundlegende Aussagen über die Bedeutung des Chimärismus bei den Marmosetten machten. Sie konnten zeigen, dass der Chimärismusgrad bei *C. kuhlii* eine Bedeutung für die Beziehung der einzelnen Familienmitglieder zueinander hat. Elterntiere wechseln sich bei der Betreuung ihrer Nachkommen, d.h. dem Herumtragen, gegenseitig ab. Ross *et al.* (2007) konnten, bezogen auf den Chimärismusgrad der Neugeborenen, einen signifikanten Unterschied in der Zeitdauer feststellen, in der Väter oder Mütter die Neugeborenen trugen. Je höher dieser Grad war, umso länger wurden die Tiere von den Vätern betreut. Dieses Ergebnis ist der erste Hinweis darauf, dass der Chimärismus in den interfamiliären Beziehungen der *C. jacchus*-Spezies eine wichtige Rolle spielen könnte.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte nachgewiesen werden, dass mit zunehmendem Chimärismusgrad die Weibchen auch erhöhte CFL-Grade aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass der Grad des weiblichen Cross-sex-Chimärismus die Reproduktion beeinflusst und somit bereits vor der Geburt im Mutterleib das weitere Reproduktionsverhalten eines Weibchen durch die Verteilung der männlichen Zellen „vorprogrammiert“ wird. Weiterhin führt der Chimärismus auch zu

physiologischen Veränderungen, da mit einem erhöhten Cross-sex-Chimärismus ein höheres Gewichtsniveau und erhöhte Androstendionspiegel einhergehen. Die Frage, ob der Chimärismus eventuell ein Selektionsvorteil für die Tiere darstellt, kann hier nicht beantwortet werden.

Wie bereits erwähnt, kommt es in Gefangenschaft zunehmend zu Mehrlingsgeburten (Drillinge und Vierlinge). Die natürlich vorkommenden Zwillingsgeburten sind selten. Die Mehrlingsrate ist signifikant von dem Gewicht der gebärenden Mütter abhängig. Außerdem weisen Töchter mit zunehmendem Muttergewicht erhöhte Chimärismuswerte auf, so dass der Habitus der Mutter als Ursache für grundlegende Veränderungen in der physiologischen Entwicklung der Töchter wohl die wichtigste Rolle spielt.

Die eigenen Daten zeigen, dass Weibchen aus Drillingsgeburten mit 2 Brüdern (wmm) eine höhere Rate des Cross-sex-Chimärismus hatten als Weibchen aus Würfen mit zwei Schwestern (wwm). In getrennt geschlechtlichen Zwillingsgeburten wiesen sowohl Männchen als auch Weibchen eine Rate an Cross-sex-Chimärismus in der Häufigkeit von ~20-40 % auf. Individuelle Unterschiede könnten aus einer ungleichen Anastomoserverteilung in der Plazenta resultieren. Bei männlichen Nachkommen konnte keine gesicherte Aussage über das Vorhandensein und die Verteilung von XX-Zellen gemacht werden, da eine zu geringe Anzahl von solchen Männchen untersucht wurde. Tendenziell konnte aber bei gemischtgeschlechtlichen Würfen mit mehreren Schwestern (wwm) ein erhöhter XX-Chimärismus beobachtet werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit dem Phänotyp der verschlossenen Vulva (congenital fused labia; CFL-Phänotyp) in jungen und erwachsenen weiblichen Weißbüschelaffen. Beim CFL-Phänotyp handelt es um einen Verschluss der beiden *Labia majora* durch ein bindegewebiges Häutchen in verschiedenen Ausprägungen. Im Deutschen Primatenzentrum Göttingen (DPZ) tritt solch ein Phänotyp in einer hohen Frequenz auf. Bis zum Zeitpunkt dieser Studie gab es nur sehr wenige wissenschaftliche Publikationen, die sich mit den Ursachen dieses Phänomens beschäftigt haben. So wurde von einigen Autoren vermutet, dass es sich hierbei um einen pathologischen Prozess handelt, der mit einer Maskulinisierung weiblicher Tiere einhergeht. Eine weitere Hypothese war, dass es sich beim CFL-Phänotyp um eine Verzögerung der natürlichen Genitalentwicklung handeln könnte, die durch Bedingungen in Gefangenschaft verursacht wird.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Ursachen herauszufinden, die den CFL-Phänotyp hervorrufen. Dazu wurden Untersuchungen an 146 Weibchen auf anatomischer, genetischer, physiologischer, demographischer und zellulärer Ebene durchgeführt. Zunächst wurden die weiblichen Genitalien mit Hilfe eines einheitlichen Maßsystems gemessen und die charakteristischen Merkmale des CFL-Phänotyps dokumentiert, definiert und je nach Verschlusslänge der Vulva in 4 unterschiedliche Ausprägungsgrade (CFL-Grade) eingeteilt.

Zur Evaluierung der genetischen und stammesgeschichtlichen Ursachen erfolgte eine Analyse der Populationsentwicklung in Gefangenschaft mit Hilfe von Stammbaumanalysen. Dabei konnte weder eine genetische Ursache für den CFL-Phänotyp gefunden werden, noch konnte nachgewiesen werden, dass der CFL-Phänotyp von einer externen Kolonie ins Deutsche Primatenzentrum Göttingen integriert worden war.

Im Gegensatz dazu ergaben die physiologischen und demographischen Untersuchungen, dass das Körpergewicht sowohl der Mütter als auch der Töchter eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung des CFL-Phänotyps spielt. Weiterhin ergaben Hormonanalysen, dass es eine signifikante Korrelation zwischen dem Androstendionspiegel und dem CFL-Grad gibt. Der Androstendionspiegel hängt wiederum signifikant von dem Gewicht der CFL-Weibchen ab. Je höher das Gewichtsniveau bei den Tieren war, desto höher war auch der Androstendionspiegel.

Auf zellulärer Ebene wurde der natürlich vorkommende Cross-sex-Chimärismus (XX/XY) bei dieser Spezies im Hinblick auf eine mögliche Maskulinisierung und den dadurch hervorgerufenen CFL-Phänotyp untersucht. Dazu wurden sowohl klassische zytogenetische Methoden, wie die Giemsa- und DAPI-Färbung, als auch die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung für den Einsatz bei *C. jacchus*-Affen modifiziert und zur Untersuchung des Chimärismus etabliert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen

ergab, dass bei einem erhöhten XX/XY-Chimärismus Weibchen auch ein höheres Gewichtsniveau und einen erhöhten CFL-Grad aufwiesen.

Die übergeordnete Instanz für alle diese Veränderungen ist jedoch der physiologische Habitus der Mutter in Form eines metabolischen Syndroms, das die Gewichtsentwicklung und damit auch die Physiologie der Töchter beeinflusst. Auch der Cross-sex-Chimärismus in den Töchtern scheint vom Gewicht der Mutter beeinflusst zu sein.

Der CFL-Phänotyp an sich gehört zu der normalen Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane bei *C. jacchus*-Weibchen, deren Vulvae sich normalerweise in der prä-pubertären Phase öffnen. Die eigenen Ergebnisse haben gezeigt, dass durch physiologische Veränderungen in Gefangenschaft dieser Prozess verhindert oder verzögert wird und es zu individuell unterschiedlichen Öffnungszeiten kommt. Es ist der maternale Einfluss, der bereits im Uterus durch Hormone oder durch die Akkumulation von männlichen Zellen (XY-Chimärismus) eine Maskulinisierung der Töchter hervorruft. So führt wahrscheinlich eine erhöhte Androstendion-Exposition in utero und über die Muttermilch zu Stoffwechselveränderungen in den Töchtern, welche eine Verzögerung der Labienöffnung hervorrufen.

Das immer häufigere Vorkommen des metabolischen Syndroms bei Muttertieren führt zu deren Übergewicht, dadurch zu erhöhten Androstendionwerten, zu vermehrten Drillingsgeburten und dies wiederum zu einem erhöhten Cross-sex-Chimärismus. All das begünstigt den zellulären Maskulinisierungsprozess und resultiert letztendlich in immer mehr CFL-Weibchen. Dies ist der Grund dafür, dass mit zunehmender Zahl an Generationen in einer Primatenkolonie der Anteil an geschlossenen Weibchen ansteigt. Es ist ein kumulativer Effekt, da mit jeder weiteren Generation der Habitus der Mütter extremer wird.

6. Literaturverzeichnis

Abbott DH (1984): Differentiation of sexual behaviour in female marmoset monkeys: Effects of neonatal testosterone or a male co-twin. *Prog Brain Res* 61, 349-358

Abbott DH and Hearn JP (1978): Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil* 53, 155-166

Abbott DH, Mc Neilly AS, Lunn SF, Hulme MJ, Burden FJ (1981): Inhibition of ovarian function in subordinate female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus jacchus*). *J Reprod Fertil* 63, 335-345

Abbott DH, Hodges JK, George LM (1988): Social status controls LH secretion and ovulation in female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). *J Endocrinol* 117, 329- 339

Araújo A, Sousa MBC (2008): Testicular Volume and Reproductive Status of Wild *Callithrix jacchus*. *Int J Primatol* 29, 1355-1364

Araújo A, Arruda M, Alencar AI, Albuquerque F, Nascimento MC, Yamamoto ME (2000): Body weight of wild and captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Int J Primatol* 21, 317-324

Balasubramanian S, Seshagiri VN, Kathiresan D, Asokan A, Pattabiraman SR (1991): Cogenitally fused labiae vulva in a Heifer. *Vet Rec* 129, 55-56

Bernhard J : Histologische Änderungen im Ovar des *Callithrix jacchus* in Relation zum Übergewicht. *Med. Diss. Göttingen* 2009

Benirschke K, Brownhill LE (1963): Heterosexual cells in testes of chimeric marmoset monkeys. *Cytogenetics* 24, 331-40

Benirschke K, Anderson JM, Brownhill LE (1962): Marrow chimerism in marmosets. *Science* 138, 513-515

Borgaonkar DS, Hollander DH (1971): Quinacrine Fluorescence of the Human Y Chromosome. *Nature* 230, 52

Chambers PL and Hearn JP (1979): Peripheral plasma levels of progesterone, oestradiol-17 β , oestrone, testosterone, androstenedione and chorionic gonadotrophin during pregnancy in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil 56, 23-32

Chambers PL and Hearn JP (1985): Embryonic, foetal and placental development in the Common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). J Zool Lond 207, 545-561

Cheyne SM, Chivers DJ (2006): Sexual Swellings of Female Gibbons. Folia Primatol 77, 345-352

Cremer T, Landegent J, Bruckner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M (1986): Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. Hum Genet 74, 346-52

Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988): Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using Chromosome-specific library probes. Hum Genet 80, 235-46

Cui KH, Matthews CD (1994): Anatomy of adult female common marmoset (*Callithrix jacchus*) reproductive system. J Anat 185, 481-486

Gengozian N (1970): Male and female cell populations in the chimeric marmoset. Med Primatol 1970, 926-938

Geissmann T (1987): Twinning frequency in catarrhine primates. Hum Evol 2(6), 547-555

Geissmann T: Vergleichende Primatologie, Springer Verlag, Berlin 2003

Goldschmidt B, Moraes IA, Souza LM, Paulino FS, Pissinatti A, Marsico FF, Ferreira AMR, Pinho TG (2005): Occurrence of virilization signals in a female marmoset *Leontopithecus chrysomelas* (callitrichidae; primates) with 46, XX/46, XY chimerism. Isr J Vet Med 60(3), 86-88

Golombowski G, Anthuber S, Anthuber C (1998): Vulvaerkrankungen im Kindesalter. Der Gynäkologe 31, 558-565

Halder A (2005): Placental chimerism in early human pregnancy. Indian J Hum Genet 11, 84-88

Hanson HE, Niebuhr E., Lomas C. (1984): Chimeric Twins. *Hum Hered* 34, 127-130

Harding RD, Hulme MJ, Lunn SF, Henderson C, Aitken RJ (1982): Plasma progesterone levels throughout the ovarian cycle of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Med Primatol* 11, 43-51

Harlow CR, Gems S, Hodges JK, Hearn JP (1983): The Relationship between plasma progesterone and the timing of ovulation and early embryonic development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Zool London* 201, 273-282

Hearn JP, Lunn SF (1975): The reproductive biology of the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *Breeding simians for developmental biology. Lab Anim Handbooks* 9, 125-134

Hearn JP, Renfree MB (1975): Prealbumins in the vaginal flushings of the marmoset, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil* 43, 159-161

Hosoi T, Yahara S, Kunitomo K, Saji H, Ohtsuki Y (1977): Blood Chimeric Twins. An Example of Blood Cell Chimerism. *Vox Sang* 32, 339-341

Huber A. (1970): Zur Entstehung und Behandlung der Vulva-Synechien beim Kinde. *Wien Med Wochenschr* 27-29, 506-508

Isachenko EF, Nayudu PL, Isachenko VV, Michelmann HW (2002): Congenitally caused fused labia in the common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Med Primatol* 31, 350-355

John HA, Bernstein ML, Jones KW (1969): RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 582-587

Landegent JE, Jansen in de Wal N, van Ommen GJ, Baas F, de Vijlder JJ, van Duijn P, Van der Ploeg M (1985): Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. *Nature* 317, 175-7

Lengauer C, Eckelt A, Weith A, Endlich N, Ponelies N, Lichter P, Greulich KO, Cremer T (1991): Painting of defined chromosomal regions by in situ suppression hybridization of libraries from laser-microdissected chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 56, 27-30

Lichter P, Cremer T, Bordon J, Manuelidis L, Ward DC (1988): Delineation of individual human chromosomes in metaphase interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80, 224-34

Löffler G. : Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 4. Auflage. Springer Verlag Heidelberg 2000, 475-476

McLaren A: Mammalian Chimaeras. Cambridge University Press, Cambridge 1976

Meyer HH, Sauerwein H, Mutayoba BM (1990): Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 beta. *J Steroid Biochem* 35(2), 263-269

Moore HD, Gems S, Hearn JP (1985): Early implantation stages in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Am J Anat* 172 (4), 265-78

Neusser M: Karyotypeevolution, Genomorganisation und Zellkernarchitektur der Neuweltaffen. Biol. Diss. München 2004

Noel R: The Pictorial Guide to the Living Primates, Pogonias Press, East Hampton, New York 1996

Nowak RM: Primates of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, London 1999

Padula AM (2005): The freemartin syndrome: an update. *Anim Reprod Sci* 87, 93-109

Pardue ML, Gall JG (1970): Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168, 1356-1358

Pausch V, Bleier I, Dub E, Kirnbauer M, Weirather M, Würger G, Mayr WR (1979): A Further Case of Chimeric Twins: Genetic Markers of the Blood. *Vox Sang* 36, 85-92

Pessoa DMA, Tomaz C, Pessoa VF (2005): Color vision in Marmosets and Tamarins: Behavioral Evidence. *Am J Primatol* 67, 487-495

Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J (1988): Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci* 85, 9138-9142

Pryce CR, Schwarzenberger F, Döbeli M, Etter K (1995): Comparative study of oestrogen excretion in female New World Monkeys: an overview of non-invasive ovarian monitoring and a new application in evolutionary biology. *Folia Primatol* 64 (3), 107-23

Puffer AM, Fite JE, French JA, Rukstalis M, Hopkins EC, Patera KJ (2004): Influence of the Mother's Reproductive State on the Hormonal Status of Daughters in Marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Am J Primatol* 64, 29-37

Ross CN, French JA, Orti G (2007): Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Proc Natl Acad Sci* 104, 6278-6282

Rutherford JN, Tardif SD (2008): Placental Efficiency and Intrauterine Resource Allocation Strategies in the Common Marmoset Pregnancy. *Am J Phys Anthropol* 137 (1), 60-68

Sanchez-Morgado JM, Haworth R, Morris TH (2003): XY Female Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Comp Med* 53 (5), 539-544

Santos G, Sensenbrenner P, Burke P, Mullins GM, Blas WB, Tutschka PJ, Slavin RE (1972): The use of cyclophosphamide for clinical marrow transplantation. *Transplant Proc* 4, 559-64

Schlumbohm C, Deutsches Primatenzentrum Göttingen (DPZ): persönliche Mitteilung 2008

Schrager CG (2007): On the Time Scale of New World Primate Diversification. *Am J Phys Anthropol* 132, 344-354

Simons EL: Primate evolution. An introduction to man's place in nature. Macmillan, New York 1972

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346 (6281), 240-244

Sohn SH, Cho EJ, Son WJ, Lee CY (2007): Diagnosis of bovine Freemartinism by fluorescence *in situ* hybridization on interphase nuclei using bovine Y chromosome-specific DNA probe. *Theriogenology* 68, 1003-1011

Stein FJ (1978): Sex determination in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Lab Anim Sci* 28 (1), 75-80

Tardif SD, Bales KL (2004): Relations Among Birth Condition, Maternal Condition and Postnatal Growth in Captive Common Marmoset Monkeys (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol* 62, 83-94

Tardif SD, Araujo A, Arruda MF, French JA, Sousa MBC, Yamamoto EM (2008): Reproduction and Aging in Marmosets and Tamarins. *Interdiscip Top Gerontol* 236, 29-48.

Tardif SD, Power ML, Ross CN, Rutherford JN, Layne-Colon DG and Paulik MA (2009): Characterization of Obese Phenotypes in a Small Nonhuman Primate, the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity (Silver Spring)* 17 (8), 1499-1505

Wilkins PA, Southwood LL, Bedenice D (2006): Congenital vulvar deformity in 6 alpacas. *J Am Vet Med Assoc* 229, 263-265

Williams CA, Wallace MR, Drury KC, Kipersztok S, Edwards RK, Williams RS, Haller MJ, Schatz DA, Silverstein JH, Gray BA, Zori RT (2004): Blood lymphocyte chimerism associated with IVF and monozygotic dizygous twinning: Case report. *Hum Reprod* 19 (12), 2816-2821

Wislocki GB (1939): Observations on twinning in marmosets. *Am J Anat* 64, 445-483

Ziegler TE, Sousa MBC (2002): Parent-Daughter Relationships and Social Controls on Fertility in Female Common Marmosets, *Callithrix jacchus*. *Horm Behav* 42, 356-367

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bidest.	Bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CFL	congenital fused labia
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenol
DPZ	Deutsches Primatenzentrum Göttingen
<i>et al.</i>	et alii
FCS	Fötale Kälberserum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
H	Wasserstoff
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Chlorwasserstoffsäure
I	Iod
IgG	Immunglobulin G
Kbp	Kilobasenpaaren
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm (10 ⁻³ g)
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
Min.	Minuten
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
mm	Millimeter
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OT	Objektträger
P	Phosphor
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm (10 ⁻¹² g)

PHA-E	Phytohämagglutinin
Ref. Nr.	Referenz Nummer
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (Nährmedium)
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
s.	Siehe
Sek.	Sekunden
SRY	sex determining region Y gene
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (Sodium-Saline-Citrate)
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitanmonolaureat
U	Units
V.	Vena
X-Chr.	X-Chromosom
Y-Chr.	Y-Chromosom
z. B.	zum Beispiel
ZFY	zinc finger protein gene

8. Abbildungsverzeichnis

1. Systematische Stellung der Neuweltaffen innerhalb der Primaten (Simons 1972, Seite 287-288).	2
2. Adulter <i>Callithrix-jacchus</i> -Affe in der Wildnis (links), in Gefangenschaft (rechts oben) und Neugeborene in Gefangenschaft (rechts unten).	3
3. Äußere Geschlechtsorgane beim weiblichen <i>Callithrix-jacchus</i> -Affen (links). a) „pudendal pads“, b) Vulva. Männliche Genitalorgane (rechts).	4
4. Schematische Darstellung der inneren Geschlechtsorgane bei <i>C. jacchus</i> -Affen (Cui und Matthews 1994, Seite 482).	5
5. Vaginalöffnung im „normalen“ Zustand (links) und als CFL-Phänotyp (rechts).	7
6. Plazentäres Anastomosengeflecht in einer Drillingsgeburt bei <i>C. jacchus</i> -Affen.	9
7. Schematische Darstellung der untersuchten Faktoren bezüglich des CFL-Phänotyps.	11
8. Horizontale und vertikale Messung.	19
9. Messung der Vulva.	19
10. Anteil der geschlossenen Vulva.	19
11. Anteil der offenen Vulva.	19
12. Genitalmessungen mit einem Messschieber bei <i>Callithrix-jacchus</i> -Weibchen. A. Messung der vertikalen Genitallänge. B. Messung der horizontalen Genitalbreite.	20
13. Das typische Genitalerscheinungsbild bei juvenilen Weibchen. A. 2 Wochen alt, B. 3 Monate alt, C. 6 Monate alt. Die Vulvaöffnung ist in dieser Altersklasse so klein, dass ein Geschlechtsakt nicht möglich ist.	20
14. Herkunft von Vorfahren der Familien mit CFL-Tieren. Insgesamt waren es 113 Weißbüschelaffen aus 17 Kolonien.	22

15. Blutentnahme aus der V. femoralis beim *Callithrix-jacchus*-Affen. 23
16. Metaphasenchromosomen von 2 *Callithrix-jacchus*-Weibchen (Angelina ♀ + Allen ♀) mit Cross-sex-Chimärismus nach DAPI- (obere Bildreihe) und Giemsa-Färbung (untere Bildreihe). Metaphasen mit XY- (linke Bilder) und XX-Chromosomen (rechte Bilder). 27
17. Einzeldarstellung der beiden Geschlechtschromosomen (Neusser 2004, Seite 146). 27
18. Darstellung des Cross-sex-Chimärismus mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung in Lymphozyteninterphasen bei einem Männchen (Alec ♂) und einem Weibchen (Aarena ♀). Das Y-Chromosom erzeugt ein rotes und das X-Chromosom ein grünes Signal. 31
19. Darstellung und Einteilung der CFL-Phänotypen bei adulten Weibchen. **A.** Komplett offener Vulvastatus, **B.** 1- 25 % CFL, **C.** 25- 50 % CFL, **D.** 50- 75% CFL, **E.** 75- 100%CFL, **F.** 100 % CFL. 35
20. Darstellung des bindegewebigen Häutchens zwischen den Labien beim *C. jacchus*-Weibchen (roter Pfeil). Bei diesem Phänotyp handelt es sich um einen CFL-Grad von 25 bis 50 %. 35
21. **A.** Häufigkeit von Nicht-CFL- und CFL-Tieren, **B.** Häufigkeit der vier CFL-Grade im Untersuchungskollektiv. Altersklassen: 1 bis 36 Monate. 36
22. Anzahl externer Vorfahren in einer Gruppe von CFL- (**A**) und Nicht-CFL-Tieren (**B**) (jeweils 12 Weibchen). Diese Abbildung verdeutlicht den signifikanten Unterschied der Häufigkeit von externen Vorfahren bei CFL- und Nicht-CFL-Tieren. CFL-Tiere haben deutlich mehr externe Vorfahren als Nicht-CFL-Tiere. Die rote Linie in den beiden Graphen stellt eine willkürlich festgelegte Grenze der Menge an externen Vorfahren dar, ab der es zu einer Anhäufung von CFL-Phänotypen kommt. 38
23. Vergleich von CFL- und Nicht-CFL-Tieren und deren genetischer Input aus externen Kolonien. Auf der X-Achse ist die Summe der externen Kolonien (Uni München + Uni Basel etc.) und auf der Y-Achse die Summe der Vorfahren aufgeführt, die in die DPZ-Familienlinie von extern hinzugekommen waren. Die rote Linie stellt eine willkürlich festgelegte Grenze der Menge an externen Vorfahren dar, ab der es zu einer Anhäufung von CFL-Phänotypen kommt. 39

- 24.** Korrelation zwischen der Summe externer Vorfahren und der Anzahl an Generationen von CFL- (**A**) und Nicht-CFL-Tieren (**B**) in der DPZ-Kolonie.
CFL-Tiere: n = 9; Nicht-CFL-Tiere: n = 10. 40
- 25.** Häufigkeit des CFL-Phänotyps in unterschiedlichen Altersklassen (n = 107).
Die rote Linie stellt den CFL-Grad „funktionell offen“ bei 50 % dar. 42
- 26.** Unterteilung der CFL-Tiere (n = 72) in 2 Gewichtsgruppen. **A.** Weibchen in dem Gewichtsniveau 200-300 g (n = 32) in der prä-pubertären (1-9 Monate) und Anfang der pubertären (9-14 Monate) Altersklasse. **B.** Weibchen der Gewichtsgruppe 350-500 g (n = 40) in der pubertären (14-18 Monate) und adulten (18-36 Monate) Altersklasse. Die beiden gelben Boxplots stellen eine Alterklasse (1-9 Monate) in zwei Gewichtsgruppen dar. Die rote Linie stellt die 50 % CFL-Grenze dar. 44
- 27.** Höhe des Androstendionspiegels in *Callithrix-jacchus*-Weibchen mit unterschiedlichen Gewichten (n = 31). **A.** Androstendionspiegel in CFL-Tieren (n = 22), **B.** Androstendionspiegel in Nicht-CFL-Tieren (n = 9). Alter der Weibchen: 12 bis 36 Monate. Die senkrechte Linie unterteilt die Gruppen in normal- (<300 g) und übergewichtige (>300 g) Tiere. 45
- 28.** Höhe des Östrogenspiegels in *Callithrix-jacchus*-Weibchen mit unterschiedlichen Gewichten (n = 35). **A.** Östrogenspiegel in CFL-Tieren (n = 23), **B.** Östrogenspiegel in Nicht-CFL-Tieren (n = 12). Alter der Weibchen: 12 bis 36 Monate. Die senkrechte Linie unterteilt die Gruppe in normal- (<300 g) und übergewichtige (>300 g) Tiere. 46
- 29.** Androstendionwerte und CFL-Grad von CFL-Weibchen ▲ (n = 22) und Nicht-CFL-Weibchen ▼ (n = 9) (Kontrollgruppe). 46
- 30.** Östrogenspiegel bei CFL- ▲ (n = 22) und Nicht-CFL-Tieren ▼ (n = 13). 47
- 31.** Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Mutter und dem der Töchter. **A.** CFL-Weibchen (n = 146), **B.** Nicht-CFL-Weibchen (n = 60). Das Tochtergewicht wurde im Alter von 10 bis 36 Monaten bestimmt. Die rote Linie stellt das Durchschnittsgewicht des Untersuchungskollektivs (411 g) dar. Die schwarze Linie zeigt die Grenze zwischen normal- und übergewichtigen Weibchen. Bei den Untersuchungen wurde der CFL-Grad außer Acht gelassen. 48

32. A. Abhängigkeit des individuellen CFL-Grades der Töchter vom Gewichtsniveau der Mutter (n = 136), B. Androstendionspiegel der Töchter in Abhängigkeit vom Gewichtsniveau der Mutter (n = 38).	49
33. Abhängigkeit der Wurfgröße vom Muttergewichtsniveau (n = 34).	49
34. Veränderungen der Wurfkonstellationen von 1990 bis 2007 im Deutschen Primatenzentrum Göttingen (DPZ).	50
35. Einfluss der Geburtswurfkonstellation auf das adulte Gewichtsniveau (Alter: 12 bis 36 Monate) beim weiblichen <i>Callithrix-jacchus</i> -Affen (n = 114). Analyse der 5 häufigsten Konstellationen (w = Weibchen; m = Männchen).	51
36. Einfluss der Wurfkonstellation auf den Androstendionspiegel der Weißbüschelweibchen (m = männlich; w = weiblich), A. Zwillingsgeburten (n = 16) und B. Drillingsgeburten (n = 27).	52
37. Einfluss der Wurfkonstellation (Geschlechterzahl und –verhältnis) auf die Östrogenwerte (m = männlich; w = weiblich), A. Zwillingsgeburten (n = 19) und B. Drillingsgeburten (n = 33).	53
38. CFL-Grad (%) in Abhängigkeit von der Wurfkonstellation (w = Weibchen; m = Männchen). A. Weibchen mit einem CFL-Grad <50 % (n = 107). B. Weibchen mit einem CFL-grad >50% (n = 66).	54
39. Beziehung zwischen dem Cross-sex-Chimärismus und dem CFL-Grad. Ein Vergleich mit Hilfe der Giemsa-/ DAPI- und der FISH-Färbung bei weiblichen <i>C. jacchus</i> -Affen (n = 26).	55
40. Beziehung zwischen dem Cross-sex-Chimärismus und dem Gewicht der Weibchen. Ein Vergleich mit Hilfe der Giemsa-/DAPI- und der FISH-Färbung bei weiblichen <i>C. jacchus</i> -Affen (n = 26).	55
41. Androstendionspiegel und Cross-sex-Chimärismus (Giemsa-/DAPI-Färbung) in 3 Gewichtsklassen (n = 12). ▲ = 330-370 g, ▲ = 370-450 g, ▲ = 450-500 g. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Weibchen aus rein weiblichen Würfen (ww und www). Die anderen Tiere sind aus Würfen mit männlicher Beteiligung.	56

- 42.** Einfluss des Muttergewichts auf den Cross-sex-Chimärismus (Giemsa-/DAPI-Färbung) in 3 Wurfgruppen (n = 10). ▲ = wm, ▲ = wmm und ▲ = wwm. 57
- 43.** Vergleich des Cross-sex-Chimärismus in Weibchen aus den Wurfkonstellationen www, wwm, wm und wmm, n = 18 (Giemsa-/DAPI-Färbung). w = Weibchen; m = Männchen. Über und unter den Boxplots sind die Durchschnittsgewichte der jeweiligen Gruppe angegeben. Der Median der Gruppe wm liegt auf der unteren Boxplot-Begrenzung. 57
- 44.** Länge der Vulvaöffnung bei Nicht-CFL- (n = 44) und CFL-Tieren (n = 37). Die rote Linie stellt die Grenze zwischen einer „funktionell offenen“ und „funktionell geschlossenen“ Vulva dar. Altersklasse: 9 bis 36 Monate. 59
- 45. A.** Das Gewichtsniveau bei adulten Weibchen mit „pudental pads“ sortiert von links nach rechts nach Größe der Säcke. Weibchen Auguste wies die größten Säcke auf, Weibchen Warina die kleinsten. Die rote Linie stellt das Durchschnittsgewicht (411 g) des Untersuchungskollektivs (n = 127) dar. Die Buchstaben beziehen sich auf die in Abb. 46 gezeigten Bilder. **B.** Gewichtsniveau der Tiere ohne „pudental pads“. 60
- 46.** Verschiedene Größen von „pudental pads“ (roter Pfeil) bei sechs adulten Weibchen (Alter > 12 Monate). **A.** Auguste 468 g, **B.** Anina 480 g, **C.** Felizia 384 g, **D.** Asteria 460 g, **E.** Orsola 362 g, **F.** Warina 341 g. 61
- 47.** Weibchen ohne „pudental pads“ (Alter >12 Monate). **A.** Omnia 369 g, **B.** Clementine 379 g, **C.** Ninja 381 g. 61
- 48. A.** Horizontale Breite der Genitalien in 6 Altersklassen (n = 181). **B.** Vertikale Genitallänge bei Tieren aus 6 Altersklassen (n = 181). Die rote Linie trennt die juvenilen (links) von den pubertären und adulten Weibchen (rechts). 62
- 49.** Beziehung zwischen Gewicht und horizontaler Genitalbreite (**A**) und vertikaler Genitallänge (**B**) bei adulten Weißbüschelweibchen. Die Tiere wurden in 4 Gewichtgruppen eingeteilt (n = 73). Die rote Linie stellt die Trennung zwischen normalgewichtigen (links) und übergewichtigen (rechts) Tieren dar. 63
- 50.** Einfluss der Wurfkonstellation auf die horizontale Genitalbreite bei adulten Weibchen n = 82 (w = Weibchen; m = Männchen). 64
- 51.** Einfluss des Androstendionspiegels auf die horizontale Genitalbreite (n = 34). 64

52. Einflussfaktoren auf den CFL-Phänotyp	66
53. Allgemeine Informationen zum CFL-Phänotyp	67

9. Tabellenverzeichnis

1. Eigenschaften der verwendeten Filter für die benutzten Fluoreszenz-Farbstoffe.	32
2. Häufigkeit von CFL- und Nicht-CFL-Tieren in Familienlinien aus den 8 wichtigsten externen Zuchtkolonien bei 43 Zuchtpaaren aus dem DPZ. Insgesamt wurden 95 CFL-Tiere und 59 Nicht-CFL-Tiere untersucht.	41
3. Häufigkeit der 4 CFL-Grade in drei Altersgruppen (prä-pubertäre, pubertäre und adulte Weibchen).	42
4. Liste der untersuchten Tiere (n = 146).	95
5. CFL-Tiere aus der Studie von Isachenko <i>et al.</i> (2002).	97

10. Anhang

Tab. 4: Liste der untersuchten Tiere (n = 146).

Nr.	Tiername	DPZ.Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Material	Untersuchung
1	Violina	12863	W	04.10.2004	Blut	VS
2	Warina	12395	W	12.01.2004	Blut	VS
3	Aarena	13233	W	17.08.2005	Blut	VS
4	Aladine	12455	W	10.02.2004	Blut	VS
5	Alea	13362	W	26.12.2005	Blut	VS
6	Alexis	12454	W	10.02.2004	Blut	VS
7	Aline	13030	W	19.03.2005	Blut	VS
8	Almina	13232	W	17.08.2005	Blut	VS
9	Angelina	12781	W	31.07.2004	Blut	VS
10	Annabelle	12760	W	25.07.2007	Blut	VS
11	Ariberta	11713	W	09.09.2002	Blut	VS
12	Aschenputel	12385	W	17.12.2003	Blut	VS
13	Askana	12384	W	17.12.2003	Blut	VS
14	Asura	12914	W	20.10.2004	Blut	VS
15	Chantal	13263	W	06.09.2005	Blut	VS
16	Christina	13178	W	14.07.2005	Blut	VS
17	Fantasia	13189	W	09.07.2005	Blut	VS
18	Fantastika	13188	W	09.07.2005	Blut	VS
19	Felizia	13003	W	03.02.2005	Blut	VS
20	Hurra	12832	W	04.09.2004	Blut	VS
21	Jördis	13033	W	22.03.2005	Blut	VS
22	Kassandra	13266	W	07.09.2005	Blut	VS
23	Lametta	13366	W	25.12.2005	Blut	VS
24	Landazia	13204	W	27.07.2005	Blut	VS
25	Lucia	13367	W	25.12.2005	Blut	VS
26	Ocenana	12946	W	27.11.2004	Blut	VS
27	Olana	12271	W	24.09.2003	Blut	VS
28	Orila	13133	W	20.05.2005	Blut	VS
29	Orsola	13037	W	22.03.2005	Blut	VS
30	Pernia	11746	W	28.09.2002	Blut	VS
31	Philine	13042	W	26.03.2005	Blut	VS
32	Rosenrot	13295	W	18.10.2005	Blut	VS
33	Rucola	13130	W	18.05.2005	Blut	VS
34	Saphira	13106	W	13.05.2005	Blut	VS
35	Sarina	13105	W	13.05.2005	Blut	VS
36	Silke	13808	W	29.03.2007	Blut	VS
37	Umi	12835	W	18.09.2004	Blut	VS
38	Vanadis	13378	W	19.01.2006	Blut	VS
39	Vanillasoft	13805	W	28.03.2007	Blut	VS
40	Vanillatraum	13450	W	02.05.2006	Blut	VS
41	Verena	12353	W	23.11.2003	Blut	VS
42	Viabella	12941	W	18.11.2004	Blut	VS
43	Viktoria	12560	W	27.04.2004	Blut	VS
44	Vulkana	11807	W	16.11.2002	Blut	VS
45	Walburga	13216	W	11.08.2005	Blut	VS
46	Waltraud	13215	W	11.08.2005	Blut	VS
47	Zotta	13779	W	16.03.2007	Blut	VS
48	Allen	13029	W	19.03.2005	Blut	VS
49	Ankathrin	13148	W	05.06.2005	Blut	VS
50	Asteria	12985	W	02.01.2005	Blut	VS
51	Franzi	12821	W	30.04.2004	Blut	VS
52	Fritzi	12820	W	30.04.2004	Blut	VS
53	Vivil	13023	W	12.03.2005	Blut	VS
54	Auguste	13149	W	05.06.2005	Blut	VS
55	Jette	12592	W	06.05.2004	Blut	VS
56	Aethna	13279	W	28.09.2005	Blut	VS
57	Aruscha	12147	W	18.07.2003	Blut	VS
58	Bambina	13331	W	09.11.2005	Blut	VS

59	Beat	13170	W	07.06.2005	Blut	VS
60	Beatrix	13275	W	14.09.2005	Blut	VS
61	Felischa	12285	W	27.10.2003	Blut	VS
62	Feta	12519	W	26.03.2004	Blut	VS
63	Halloween	8941	W	29.10.1997	Blut	VS
64	Heredia	13108	W	14.05.2005	Blut	VS
65	Himalaya	12526	W	02.04.2004	Blut	VS
66	Honda	12527	W	02.04.2004	Blut	VS
67	Iliana	12971	W	20.12.2004	Blut	VS
68	Irmis	12514	W	19.03.2004	Blut	VS
69	Juanita	13034	W	22.03.2005	Blut	VS
70	Nicorette	13019	W	08.03.2005	Blut	VS
71	Orasnja	12598	W	09.05.2004	Blut	VS
72	Orla	12003	W	14.03.2003	Blut	VS
73	Ranunkel	13131	W	18.05.2005	Blut	VS
74	Umbrella	12828	W	02.09.2004	Blut	VS
75	Umbria	13010	W	06.02.2005		VS
76	Uriella	13228	W	16.08.2005		VS
77	Ute	13227	W	16.08.2005		VS
78	Wynona	11429	W	16.06.2004		VS
79	Zenia	13071	W	26.04.2005		VS
80	Akira	12657	W	20.05.2004		VS
81	Alaska	12999	W	25.01.2005		VS
82	Amidala	13854	W	31.05.2007		VS
83	Anina	11218	W	21.09.2001		VS
84	Annie	12470	W	28.02.2004		VS
85	Ara	13740	W	28.12.2006		VS
86	Aralke	13741	W	28.12.2006		VS
87	Arwen	13853	W	31.05.2007		VS
88	Bellina	13823	W	06.04.2007		VS
89	Cara	13795	W	20.03.2007		VS
90	Christel	12982	W	01.01.2005		VS
91	Clementine	12784	W	01.08.2004		VS
92	Cora	11548	W	20.03.2007		VS
93	Dagmar	13822	W	25.04.2007		VS
94	Doris	13820	W	25.04.2007		VS
95	Dörte	13821	W	25.04.2007		VS
96	Entchen	13775	W	09.03.2007		VS
97	Eugene	10038	W	22.10.1999		VS
98	Extra	13776	W	09.03.2007		VS
99	Eyla	12187	W	14.08.2003		VS
100	Hootchie	13845	W	07.05.2007		VS
101	Illegal	12817	W	28.08.2004		VS
102	Illustra	12818	W	28.08.2004		VS
103	Imani	13862	W	15.05.2007		VS
104	Imarissa	13861	W	15.05.2007		VS
105	Ingrid	12515	W	19.03.2004		VS
106	Inovation	13836	W	01.05.2007		VS
107	Isabella	13837	W	01.05.2007		VS
108	Itschie	10195	W	23.02.2000		VS
109	Ivanka	13272	W	11.09.2005		VS
110	Ivanola	12320	W	09.10.2003		VS
111	Jungfer	13859	W	09.05.2007		VS
112	Keelin	13180	W	14.07.2005		VS
113	Krischblüte	13174	W	27.06.2005		VS
114	Nafnaf	13742	W	31.12.2006		VS
115	Ninja	13210	W	08.08.2005		VS
116	Okiane	13737	W	27.12.2006		VS
117	Oksana	13848	W	20.05.2007		VS
118	Omnia	12597	W	09.05.2004		VS
119	Orina	12002	W	14.03.2003		VS
120	Osaka	13731	W	18.12.2006		VS

121	Penha	13725	W	03.12.2006		VS
122	Pita	13372	W	05.01.2006		VS
123	Silvia	13809	W	29.03.2007		VS
124	Tara	13218	W	13.08.2005		VS
125	Vanillablüte	13806	W	28.03.2007		VS
126	Vanillacream	13807	W	28.03.2007		VS
127	Virgina	13230	W	16.08.2005		VS
128	Atmosphäre	9081	W	31.01.1998		VS
129	Bambina	13331	W	09.11.2005		VS
130	Bille	9647	W	18.02.1999		VS
131	Landazita	13205	W	27.07.2005		VS
132	Lasta	12752	W	23.07.2004		VS
133	Laurentia	10504	W	28.08.2000		VS
134	Madalena	10606	W	06.11.2000		VS
135	Nicoletta	9742	W	27.04.1999		VS
136	Prisolda	13289	W	01.10.2005		VS
137	Renata	13428	W	29.03.2006		VS
138	Titia	11924	W	07.02.2003		VS
139	Umfine	13013	W	16.02.2005		VS
140	Uriella	13228	W	16.08.2005		VS
141	Ute	13227	W	16.08.2005		VS
142	Valeska	8939	W	31.10.1997		VS
143	Aruscha	12147	W	18.07.2003		VS
144	Wynona	12697	W	16.06.2004		VS
145	Valeska	8939	W	31.10.1997		VS
146	Titia	11924	W	07.02.2003		VS

W = Weibchen

M = Männchen

VS = Vaginalstatus erhoben

Tab. 5: CFL-Tiere aus der Studie von Isachenko *et al.* (2002).

Nr.	Name	Tier-Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Untersuchung
1	Polka	8917	W	01.10.1997	VS
2	Veilchen	8889	W	15.09.1997	VS
3	Eusebia	7835	W	16.09.1995	VS
4	Obina	7951	W	08.12.1995	VS
5	Nana	8521	W	30.06.1996	VS
6	Ilona	8429	W	01.01.1996	VS
7	Vanilla	8674	W	05.05.1997	VS
8	Minna	9490	W	05.11.1998	VS
9	Polonesia	8919	W	01.10.1997	VS
10	Lou	6921	W	03.02.1994	VS
11	Lulu	6922	W	03.02.1994	VS
12	Agathe	9088	W	20.01.1998	VS

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.W. Michelmann und Frau Dr. P. Nayudu, meiner Betreuerin im DPZ, für die Überlassung des Dissertationsthemas, für ihre Hilfestellungen, Bemühungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit und für ihre langjährige Geduld;

Herrn Prof. Dr. K. Hodges (DPZ), der es mir ermöglicht hat, in seiner Abteilung den größten Teil dieser Dissertation durchzuführen und mir dafür die notwendigen Arbeitsgeräte, Arbeitsmaterialien und Räumlichkeiten zur Verfügung stellte;

Frau Kerstin Fuhrmann, Frau Angelina Berenson und Frau Nicole Umland für ihre ständige Hilfsbereitschaft im Labor;

Rodrigo do Valle, Olena Tkachenko, Chris do Valle und Johanna Bernhard für ihre ständige Motivation und Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche;

Frau Dr. M. Neusser und Herrn PD. Dr. S. Müller, die mich in die Geheimnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eingeweiht haben;

Frau A. Heistermann und Herrn Dr. M. Heistermann für ihre Hilfe bei der Durchführung der Hormonanalysen;

allen Tierpflegern der Tiereinheit im Deutschen Primatenzentrum, vor allem Frau Dorothea Lindenberg und

Herrn PD Dr. Burfeind (Humangenetik), bei dem ich die zytogenetischen Techniken, besonders die Methode der Lymphozytenkultur, erlernen durfte.

Lebenslauf

Ich wurde am 12.11.1979 als erstes Kind von Frau Dr. med. Laila Wedi, geb. Sediqi, und Abdul Hadi Wedi in Siegburg geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Havanna (Kuba) (1980-1982), Kabul (Afghanistan) (1982-1988), Harare (Simbabwe) (1988-1990) und Hannover (Deutschland) (ab 1990). Ich wurde 1986 in Kabul in der Grundschule eingeschult, die ich in Harare 1990 beendete. Ab 1990 besuchte ich die Orientierungsstufe in Hannover. Von 1993 an bis Juli 2000 besuchte ich das Gymnasium Langenhagen, welches ich mit der allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Im April 2001 begann ich an der Georg-August-Universität in Göttingen das Studium der Humanmedizin. Im April 2003 bestand ich die ärztliche Vorprüfung (Physikum) und begann mit dem klinischen Teil des Studiums. Im Rahmen des Studiums absolvierte ich, je einen Monat dauernde, internistische Famulaturen in Dinslaken, Berlin und Köln und eine chirurgische Famulatur an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Meine wissenschaftliche Arbeit begann ich im Deutschen Primatenzentrum Göttingen im November 2004 bei Frau Dr. P. Nayudu in der Abteilung Reproduktionsbiologie in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. H.W. Michelmann, Univ. Frauenklinik Göttingen.

Das praktische Jahr absolvierte ich von September 2006 bis Juli 2007. Die ersten beiden Tertiale (Chirurgie und Urologie) verbrachte ich im Kantonsspital Luzern in der Schweiz und das dritte Tertial im evangelischen Krankenhaus Weende in Göttingen (Innere Medizin).

Im Mai 2008 schloss ich das Studium der Humanmedizin in Göttingen ab und arbeitete bis Dezember 2008 als festangestellter wissenschaftlicher Mitarbeiter im Deutschen Primatenzentrum Göttingen.

Seit Februar 2009 bin ich als Assistenzarzt im St. Bernward Krankenhaus Hildesheim in der gastroenterologischen und allgemeininternistischen Abteilung bei Herrn Prof. Dr. med. J. Hochberger tätig.

