

Stichting De Hoge Veluwe Nationale Park

Apeldoornseweg 250
7351TA Haenderloo

Fangdieckstr. 75a, 22547 Hamburg

Tel: +49 (0) 40 524 72 36-600
Fax: +49 (0) 40 524 72 36-610
Mail: info@forensik-hh.de
URL: <http://www.forensik-hh.de>

Hamburg, den 22.05.2024

Betreff: Molekulargenetische Analyse (SU0076-24A)

Bezug:	Speziesidentifikation 52 Haarproben
Beschluss/Auftrag vom:	Privat
Eingang des Auftrags an unserem Institut:	26.01.2024
Eingang des Spurenmaterials an unserem Institut:	26.01.2024

Gemäß schriftlicher Anforderung soll ein

forensisch-genetisches Spurengutachten

erstellt werden.

1. Frage- bzw. Aufgabenstellung

- I. Bitte um molekulargenetische Analyse und - wenn möglich - Spezieszuordnung.
- II. Befindet sich an den Spurenrägern genetisches Material, welche für eine Untersuchung geeignet ist?
- III. Wenn ja, stammen die übersandten Proben von einem Hund oder einem anderen Vertreter der Canidae?

2. Zum Sachverhalt

3. Spuren- und Vergleichsmaterial:

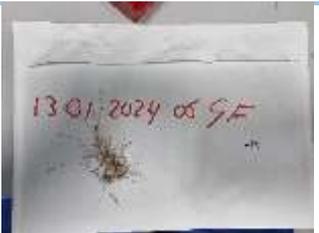
Die Untersuchungen und statistischen Berechnungen bzw. Auswertungen fanden im folgenden Zeitraum statt:

05.02.2024	bis	25.04.2023
------------	-----	------------

3.1 Spurenmaterial

Die im Folgenden beschriebenen Spureträger wurden untersucht:

Bezeichnung	lfd. Nummer	Beschreibung	Durchgeführte Methoden	Foto
Spur 1	0199-24	Abstrich mit Haarbüschel 24 01 15 TM 01 , 1-7 cm lang, teilweise Wurzeln erkennbar: die Büschel werden komplett aufgearbeitet.	Extraktion von Minimalspuren, Quantifizierung von DNA, Erstellung eines genetischen, autosomalen Merkmalsmusters, Geschlechtsbestimmung, Sequenzierung der mitochondrialen DNA	
Spur 2	0200-24	s.o. 24 01 15 TM 02	s.o.	
Spur 3	0201-24	Abstrich Forensic Swab 24-01 15 TM 03 : der Abstrich wird komplett aufgearbeitet.	s.o.	
Spur 4	0202-24	s.o. 24 01 15 TM 04	s.o.	
Spur 5	0203-24	s.o. 24 01 15 TM 05	s.o.	
Spur 6	0204-24	s. 0201-24 24 01 15 TM 06	s.o.	
Spur 7	0205-24	s.o. 24 01 15 TM 07	s.o.	

Bezeichnung	lfd. Nummer	Beschreibung	Durchgeführte Methoden	Foto
Spur 8	0206-24	Umschlag mit Haarbüschel, 13 01 2024 06 GF, s.o.	s.o.	
Spur 9	0207-24	s.o. 13-01-2024 05 GF	s.o.	
Spur 10	0208-24	s.o. 13 01 2024 04 GF	s.o.	
Spur 11	0209-24	s.o. 13 01 2024 03 GF	s.o.	
Spur 12	0210-24	s.o. 13 01 2024 02 GF	s.o.	
Spur 13	0211-24	s.o. 13 01 2024 01 GF	s.o.	
Spur 14	0212-24	s.o. 20 24 0110 02 MB	s.o.	

Bezeichnung	lfd. Nummer	Beschreibung	Durchgeführte Methoden	Foto
Spur 15	0213-24	S.O. 20 24 0110 01 MB	S.O.	
Spur 16	0214-24	S.O. 2024 0110 MB	S.O.	
Spur 17	0215-24	S.O. 24 01 07 05 JK	S.O.	
Spur 18	0216-24	S.O. 23 12 31 07 JK	S.O.	
Spur 19	0217-24	S.O. 23 12 31 06 JK.	S.O.	
Spur 20	0218-24	S.O. 23 12 27. 005	S.O.	
Spur 21	0219-24	S.O. 23 12 27. 004	S.O.	

Bezeichnung	lfd. Nummer	Beschreibung	Durchgeführte Methoden	Foto
Spur 22	0220-21	S.O. 23 12 27. 003	S.O.	
Spur 23	0221-24	S.O. 23 12 27. 002	S.O.	
Spur 24	0222-24	S.O. 23 12 27. 001	S.O.	

3.2 Vergleichsmaterial (VM) bzw. –daten (VD)

Nicht untersucht.

4. Ergebnisse

4.1 Voruntersuchungen ---

4.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Es wurden 22 polymorphe, spezifische STR-Marker (teils in Doppelbestimmung) analysiert, mit denen Canide nachgewiesen werden können. Dabei kann, bei ausreichendem Profil, zwischen Fuchs, Wolf, Schakal und Hund differenziert werden. Bei Hunden können die entsprechenden Rassen bestimmt werden. Zusätzlich werden zwei – unabhängige- Geschlechtsbestimmungen durchgeführt. Ebenfalls zeigt sich, wenn die DNA von mehreren Tieren stammt.

Tab. 1: DNA-Typisierungsergebnisse des Spuren- u. Vergleichsmaterials, hundespezifische STR-Merkmale (siehe 11). Angabe der spezifischen Fragmente nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung in Rohdaten.
Multiplex I:

Lfd. Nr.	SRY	PEZ1	FC2054	FC2010	PEZ16	PEZ5	PEZ20	PEZ12	PEZ6	PEZ8	FC2079
0199-24	k.E.	107/115	179	k.E.	k.E.	96/112	161	k.E.	189/201	234	k.E.
0200-24	k.E.	107/115	163	k.E.	216	96	161/181	k.E.	k.E.	238	277
0201-24	k.E.	107/115	159/163	k.E.	232	96	161	k.E.	211	k.E.	k.E.
0202-24	k.E.	111/115	159	231	232	96/112	k.E.	268/272	189	k.E.	k.E.
0203-24	k.E.	103	159/163	k.E.	288	96	161/181	272/280	k.E.	k.E.	k.E.
0204-24	k.E.	107/115	159	k.E.	k.E.	96/112	161/181	k.E.	k.E.	k.E.	273
0205-24	+	103/107/111/115	k.E.	k.E.	k.E.	96/112	161	k.E.	189	234	277/281/285
0206-24	+	107	k.E.	k.E.	k.E.	96/112	k.E.	268/272	k.E.	k.E.	k.E.
0207-24	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0208-24	k.E.	103	k.E.	217	226/260	96/112	161	258/272	k.E.	258	273

Lfd. Nr.	SRV	PEZ1	FC2054	FC2010	PEZ16	PEZ5	PEZ20	PEZ12	PEZ6	PEZ8	FC2079
0209-24	k.E.	107/115	k.E.	k.E.	k.E.	96/112		k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0210-24	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0211-24	k.E.	107/115/119	163	k.E.	k.E.	96/112/116	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0212-24	k.E.	k.E.	k.E.	235	k.E.	96	k.E.	272/280/292	k.E.	k.E.	k.E.
0213-24	+	107/115	147	239	290	96/112	k.E.	272	k.E.	k.E.	273
0214-24	k.E.	103/107/111/115	167	227/239	k.E.	96/112	k.E.	272	k.E.	k.E.	k.E.
0215-24	k.E.	k.E.	k.E.	231	k.E.	96/112	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	273
0216-24	k.E.	k.E.	155/163	231/235	k.E.	96	k.E.	272/292	193/201	230	273
0217-24	k.E.	107/115	167	231	k.E.	96/112	k.E.	268/272	k.E.	k.E.	k.E.
0218-24	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	290	96	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0219-24	k.E.	103/107/111/115	135/147	227	290	96/112	k.E.	268/272	183	234	k.E.
0220-21	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0221-24	k.E.	103/107/111/115	147	k.E.	k.E.	112	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0222-24	k.E.	103/107/111/115	k.E.	k.E.	k.E.	112	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.

Multiplex II/III:

Lfd. Nr.	FC2087	FC2137	AMG	PEZ03	PEZ15	FC2508	FC2361	WTF	FC2613	FC2611	FC3241	vWFX	FC2132	Assoziations-analyse
0199-24	k.E.	k.E.	X	129/141	200	102	152	182/186	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Wolf, lettische Population (60 %) Wolfsalle in PEZ05.
0200-24	k.E.	178	Y	121	204/208	110	140/152	182/186	k.E.	195	243	158	k.E.	Wolf, lettische Population (65 %) Wolfsalle in PEZ05.
0201-24	123	178	Y	135	204/208	110/114	140/152	182	k.E.	k.E.	k.E.	162	k.E.	Wolf, lettische Population (62 %) Wolfsalle in PEZ05.
0202-24	119/123	160	X	123	204/208	102/112	140/152	168/178	k.E.	193	k.E.	162/184	k.E.	Wolf, lettische Population (52 %) Wolfsalle in PEZ05.
0203-24	k.E.	178	k.E.	131	204/208	114	140	182/188	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Wolf, lettische Population (52 %) Wolfsalle in PEZ05.
0204-24	k.E.	178	XY	145	k.E.	114	140/152	k.E.	k.E.	215	k.E.	k.E.	k.E.	Wolf, lettische Population (60 %) Wolfsalle in PEZ05.
0205-24	119	178	XY	131	k.E.	102/114	152	182	k.E.	k.E.	249	k.E.	k.E.	Nicht möglich Mischspur Wolfsalle in PEZ05.
0206-24	119/123	k.E.	XY	k.E.	200	k.E.	140/152	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Wolfsalle in PEZ05.
0207-24	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Kein Ergebnis
0208-24	135/139	k.E.	XY	145	k.E.	102/114	140/152	182	k.E.	199	255/259	k.E.	k.E.	Wolf, lettische Population (60 %) Wolfsalle in PEZ05.
0209-24	k.E.	178	XY	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Wolfsalle in PEZ05.
0210-24	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Kein Ergebnis
0211-24	k.E.	k.E.	k.E.	146	k.E.	110	152	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Nicht möglich Mischspur

Lfd. Nr.	FC2087	FC2137	AMG	PEZ03	PEZ15	FC2508	FC2361	WTF	FC2613	FC2611	FC3241	vWFX	FC2132	Assoziationsanalyse
														Wolfsallel in PEZ05.
0212-24	115/119/123	178	XY	k.E.	k.E.	110	140/152	176	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.
0213-24	115/119	160/178	XY	120/136	204/208	110	140	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	137	k.E.	Wolf, lettische Population (60%) Wolfsallel in PEZ05.
0214-24	k.E.	168	XY	130/146	204/208	102/110	140	182	k.E.	193	251	145	k.E.	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.
0215-24	115/119	160/178	k.E.	k.E.	200	110/114	140	176	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Wolfsallel in PEZ05.
0216-24	119/123	156/178	X	k.E.	204/208	110	136/140	176/186	k.E.	193/201	259	137/157	k.E.	Wolfsallel in PEZ05.
0217-24	119	160	Y	k.E.	k.E.	k.E.	140/152	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Wolf, lettische Population (63%) Wolfsallel in PEZ05.
0218-24	123	k.E.	X	k.E.	k.E.	k.E.	140/152	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Wolfsallel in PEZ05.
0219-24	123	160	x	136	k.E.	110	k.E.	168	k.E.	k.E.	k.E.	133/161	k.E.	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.
0220-21	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Nicht möglich
0221-24	k.E.	k.E.	Y	k.E.	k.E.	k.E.	152	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Nicht möglich Mischspur
0222-24	k.E.	k.E.	X	k.E.	k.E.	102/110	140	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Nicht möglich Mischspur

*: Angabe der spezifischen Merkmale in Basenpaareinheiten (Rohdaten) nach Auftrennung in einem ABI3130 Genetic Analyzer; ()=Merkmale, die eine geringe Amplitude aufweisen oder nicht reproduzierbar bestimmt werden konnten. Diese werden in die Assoziationsanalyse nicht einbezogen. Signale in Klammern: Signalstärke sehr gering, SRY: Geschlechtsmarker, Y-Chromosom

Zusätzlich wurden zwei Fragmente aus dem **hypervariablen Bereich der mitochondrialen DNA**. Mit diesen kann, bei erfolgreicher Analyse, zwischen Wolf und Hund unterschieden und eine Haplotypzuordnung durchgeführt werden.

lfd. Nummer	Sequenzierungserfolg*		Hits (1-3)	Haplotyp (lt. Thai et.al. 2017)
	740 bp	319 bp		
0199-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0200-24	k.E.	C1, C3-Teilsequenz	HIT1: Canis lupus M45 HIT2: Canis lupus DM1124 HIT3: Canis lupus x Canis lupus familiaris	Nicht möglich
0201-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0202-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0203-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0204-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0205-24	k.E.	C2, C3 Teilsequenz	HIT1: Canis lupus familiaris DC06 HIT2: Canis lupus familiaris DB10 HIT3: Canis lupus SpanishWolf2	Nicht möglich
0206-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich

Ifd. Nummer	Sequenzierungserfolg*		Hits (1-3)	Haplotyp (lt. Thai et.al. 2017)
	740 bp	319 bp		
0207-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0208-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0209-24	k.E.	C2, C3 Teilsequenz	HIT1: Canis lupus familiaris DC06 HIT2: Canis lupus familiaris DB10 HIT3: Canis lupus SpanishWolf2	Nicht möglich
0210-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0211-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0212-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0213-24	k.E.	C2, C3-Teilsequenz	HIT1: Canis lupus HIT2: Canis lupus w1 HIT3: Canis lupus 4927	Nicht möglich
0214-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0215-24	Komplette Sequenz	Komplette Sequenz	HIT1: Canis lupus M45 HIT2: Canis lupus DM1124 HIT3: Canis lupus x Canis lupus familiaris	D1 (Leehoei et.al., 2020)
0216-24	Komplette Sequenz	Komplette Sequenz	HIT1: Canis lupus 4927 HIT2: Canis lupus 3087 HIT3: Canis lupus 3090	E1 (Savolainen et.al., 2002)
0217-24	k.E.	C1, C2 Teilsequenz	HIT1: Canis lupus familiaris DC06 HIT2: Canis lupus familiaris DB10 HIT3: Canis lupus SpanishWolf2	Nicht möglich
0218-24	k.E.	C1, C2, C3 Teilsequenz	HIT1: Canis lupus familiaris DC06 HIT2: Canis lupus familiaris DB10 HIT3: Canis lupus SpanishWolf2	Nicht möglich
0219-24	Komplette Sequenz	Komplette Sequenz	HIT1: Canis lupus familiaris DC06 HIT2: Canis lupus familiaris DB10 HIT3: Canis lupus SpanishWolf2	A92 (Pang et.al., 2009)
0220-21	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0221-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0222-24	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich

(A) 0200-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate M45 mitochondrial partial genome	Canis lupus	1114	1114	0.0	96.04%	16727	GH743398.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate DM1124 mitochondrial complete genome	Canis lupus	1114	1114	0.0	96.04%	16690	MT922509.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus x Canis lupus familiaris isolate slyfi cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete genome	Canis lupus x Canis lupus familiaris	1114	1114	0.0	96.04%	1393	JN182126.1

(B) 0205-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DC06 D-loop partial sequence mitochondrial	Canis lupus familiaris	448	448	6e-121	99.19%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate D010 D-loop partial sequence mitochondrial	Canis lupus familiaris	448	448	6e-121	99.19%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate SpanishWolf2 mitochondrial complete genome	Canis lupus	448	448	6e-121	99.19%	16580	KJ544670.1

(C) 0209-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DC06 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	448	448	6e-121	99.19%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DR10 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	448	448	6e-121	99.19%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate SpanishWolf2 mitochondrial, complete genome	Canis lupus	448	448	6e-121	99.19%	16580	KJ644670.1

(D) 0213-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus mitochondrial control region 1 D-loop sequence	Canis lupus	340	340	9e-89	91.39%	257	AF05391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus lupus_haikovsky_w1_control_region, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	339	339	3e-88	91.39%	257	MF440671.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus lupus isolate 4927 DNA IRNA-Pro gene and D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	339	339	3e-88	91.39%	392	OQ535683.1

(E) 0215-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate M45 mitochondrial, partial sequence	Canis lupus	1199	1199	0.0	98.51%	16727	QM743385.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate DM1124 mitochondrial, complete genome	Canis lupus	1199	1199	0.0	98.51%	16690	MT922599.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus x Canis lupus familiaris isolate ehv5_cytochrome b gene, partial cds, IRNA-Thr and IRNA-Pro genes, complete cds	Canis lupus x Ca...	1199	1199	0.0	98.51%	1393	JH182126.1

(F) 0216-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus lupus isolate 4927 DNA IRNA-Pro gene and D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	494	494	2e-134	98.21%	392	OQ535683.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus lupus isolate 2087 IRNA-Pro gene and D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	494	494	2e-134	98.21%	392	OQ535681.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus lupus isolate 2090 IRNA-Pro gene and D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	494	494	2e-134	98.21%	392	OQ535682.1

(G) 0217-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DC06 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	387	387	1e-102	95.32%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DR10 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	387	387	1e-102	95.32%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate SpanishWolf2 mitochondrial, complete genome	Canis lupus	387	387	1e-102	95.32%	16580	KJ644670.1

(H) 0218-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DC06 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	446	446	4e-120	98.79%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DR10 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	446	446	4e-120	98.79%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate SpanishWolf2 mitochondrial, complete genome	Canis lupus	446	446	4e-120	98.79%	16580	KJ644670.1

(I) 0219-24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DC06 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	462	627	4e-125	99.22%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus familiaris isolate DR10 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	462	633	4e-125	99.22%	672	MG818368.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate SpanishWolf2 mitochondrial, complete genome	Canis lupus	462	662	4e-125	99.22%	16580	KJ644670.1

Abb. 1: Ergebnis der Blastanalyse für die Probe jeweils genannte Probe.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Begutachtung der vorgegebenen Beweisfragen

Tab. 2. Zusammenfassung der Ergebnisse in tabellarischer Form. Es werden jeweils die Ergebnisse der einzelnen Analysen sowie ein Fazit angegeben

Lfd. Nr.	STR Analyse	Assoziationsanalyse	mtDNA Sequenzierung	Ergebnis
0199-24	Teilprofil weiblich	Wolf, lettische Population (60 %) Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Canidae 1, weiblich Wolf
0200-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (65 %) Wolfsallel in PEZ05.	C1, C3-Teilsequenz	Canidae 2, männlich Wolf Teilsequenz mtDNA vmtl. D1
0201-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (62 %) Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Männlich, Wolf , kann identisch mit 200-24 sein
0202-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (52 %) Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Canidae 3, Wolf
0203-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (52 %) Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Canidae 4, keine Geschlechtsbestimmbar
0204-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (60 %) Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Männlich, Wolf
0205-24	Teilprofil	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.	C2, C3 Teilsequenz	Mischspur, Wolf, mindestens ein männliches Tier Teilsequenz mtDNA vmtl. D1
0206-24	Teilprofil	Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Männlich, Wolf
0207-24	Teilprofil	k.E.	k.E.	kein Ergebnis
0208-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (60 %) Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Canidae 5, männlich, Wolf
0209-24	Teilprofil	Wolfsallel in PEZ05.	C2, C3 Teilsequenz	Männlich, Wolf, Teilsequenz mtDNA vmtl. D1
0210-24	Teilprofil	k.E.	k.E.	Kein Ergebnis
0211-24	Teilprofil	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Mischspur, Wolf
0212-24	Teilprofil	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Mischspur, Wolf
0213-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (60 %) Wolfsallel in PEZ05.	C2, C3-Teilsequenz	Männlich, Wolf Teilsequenz mtDNA vmtl. D1
0214-24	Teilprofil	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Mischspur, Wolf, mindestens ein männliches Tier
0215-24	Teilprofil	Wolfsallel in PEZ05.	Komplette Sequenz	Wolf, maternale Seite sicher Wolf D1 Haplotyp
0216-24	Teilprofil	Wolfsallel in PEZ05.	Komplette Sequenz	Canidae 6, ev. weiblich, maternale Seite sicher Wolf E1 Haplotyp
0217-24	Teilprofil	Wolf, lettische Population (63 %) Wolfsallel in PEZ05.	C1, C2 Teilsequenz	Canidae (ev. 3), männlich, Teilsequenz mtDNA vmtl. D1
0218-24	Teilprofil	Wolfsallel in PEZ05.	C1, C2, C3 Teilsequenz	Canidae, Teilsequenz mtDNA vmtl. D1
0219-24	Teilprofil	Wolfsallel in PEZ05.	Komplette Sequenz	Canidae, Mischprofil, maternal Hund A92 Haplotyp, wolfstypisches Allel
0220-21	k.E.	Nicht möglich	k.E.	k.E.
0221-24	Teilprofil	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Canidae, Mischspur
0222-24	Teilprofil	Nicht möglich Mischspur Wolfsallel in PEZ05.	k.E.	Canidae, Mischspur

Insgesamt wurden **25 Proben** untersucht. Die DNA-Ausbeute war dabei sehr unterschiedlich, teilweise zeigten sich Hinweise auf DNA von mehreren Tieren, so dass keine Assoziationsanalyse möglich war.

Generell zeigt sich eine große Ähnlichkeit zwischen den Merkmalsmuster, so dass von nur wenigen Tieren, bzw. sehr eng verwandten Tieren auszugehen ist.

Die Ausprägung der STR-Merkmale weist auf mindestens **6 verschiedene Wölfe** hin, wobei mehrere Proben sehr gut von nur einem Tier stammen können, bzw. mehrere der gemischten Proben den einzelnen zuzuordnen wären.

Die Assoziationsanalyse weist durchgängig auf eine ähnliche Art hin, was die enge Verwandtschaft stützt. Hier zeigen sich durchgängig die höchsten genetischen Ähnlichkeiten zu den lettischen Wölfen in unserer Datenbank. Zusätzlich zeigen sich Ähnlichkeiten im STR-Muster zu Hütehunden, was auf Mischlinge hindeuten kann. Oder aber es handelt sich um (reine) Wölfe, die nicht in unserer Datenbank abgebildet sind.

In neun Fällen konnten **zusätzlich auswertbare Sequenzen der mitochondrialen DNA** dargestellt werden. Diese zeigten, wenn soweit bestimmbar, den identischen, wolfstypischen Haplotypen D1 (oder Teile davon) bzw. einmal den Haplotypen E1, sowie einmal den eher hundetypischen Haplotypen A92. Auch dies weist auf eine enge Verwandtschaft mit einem identischen Ursprung hin.

Abschließend muss bemerkt werden, dass die hier untersuchte DNA aufgrund der Umstände (Stichwort: Minimalspur, Untergrund/Herkunft) in schlechter Qualität und Quantität vorliegt, was zu Veränderungen (Degradierung) führen kann. Daher könnten sowohl Allelverluste als auch –gewinne auftreten, die (geringen) Einfluss auf die oben angegebene Beurteilung haben könnten.



6. Methoden und Technisches

6.1 Methoden und Hintergrund

Die folgenden Methoden wurden vom Labor für die Spurenuntersuchung eingesetzt. Alle Methoden und Verfahren sind dabei verifiziert und validiert, in einem laufenden Qualitätsmanagementsystem eingebettet und aktuell akkreditiert (wenn nicht anders beschrieben):

(7) DNA-Extraktion (SAA_009v002):

Die DNA-Isolierung erfolgt durch Aufschluss der kernhaltigen Zellen in mehreren Inkubations- und Waschschritten und der Zugabe sogenannter Magnetic beads. Diese binden die DNA-Moleküle, die dann erneut durch verschiedene Schritte gewaschen und eluiert werden können. Die Aufarbeitung wird dabei mit einem Extraktionsgerät von ThermoFisher durchgeführt.

(8) Generelles zur DNA-Analyse, Darstellung, Auswertung:

Die DNA oder DNS (Desoxyribonukleinsäure) ist der Träger der Erbsubstanz, die in den Zellkernen auf langen Molekülfäden spiralförmig angeordnet ist. Sie besteht aus Einzelbausteinen, die 4 Basen enthalten (Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin). Die Anordnung entspricht dem genetischen Code.

An bestimmten Orten im Genom befinden sich sogenannte short tandem repeats (STRs), Bereiche der DNA, die sich durch spezifische Abfolgen von 2 bis 4 Basenpaaren Länge auszeichnen, die in Wiederholungen von 10 bis 40 vorkommen. Diese Wiederholungsanzahl ist individuell unterschiedlich und wird als Merkmal für jeden Genort kodominant vererbt. Bei Mischerbigkeit sind zwei unterschiedliche Fragmente (=Allele) nachweisbar. Bei Reinerbigkeit liegen zwei identische Fragmente (Allele) vor. Diese short tandem repeats sind sämtlich in den sogenannten nicht-kodierenden Bereichen der DNA lokalisiert, so dass mit keinem Genort Rückschlüsse auf eventuelle Erkrankungen oder Fehlbildungen geschlossen werden können. Dabei werden 16 bis 23 dieser STR-Merkmale analysiert (SAA_12v001 und 13v001). Immer ein Merkmal wird von der Mutter, eines vom Vater vererbt, so dass über den Nachweis der STRs und mit Wissen der Frequenz der einzelnen genetischen Merkmale Abstammungsgutachten durchgeführt werden können (SAA_015v001). Zusätzlich ist auch eine Identitätsüberprüfung möglich. Da die verschiedenen Merkmale unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten aufweisen (d.h. unterschiedlich häufig in der Bevölkerung vorkommen), kann berechnet werden, wie wahrscheinlich es ist, dass z.B. eine bestimmte biologische Spur von einer bestimmten Person stammt (SAA_016v001), wenn all deren Merkmale mit denen der Spur übereinstimmen. Im Fall sogenannter Mischspuren, die von mehr als einer Person verursacht wurden, können ebenfalls über weitere Rechenwege nach Schneider et al, 2006 biostatistische Aussagen zur Entstehung bzw. Zugehörigkeit einer Mischspur erstellt werden (SAA_17_v001).

(10) Fragmentanalyse (SAA_014v001):

Durch den Einsatz spezifischer, fluoreszenzmarkierter Primer können diese relativ kurzen DNA-Fragmente in einem Polymerase-Ketten-Verfahren (PCR) vervielfältigt und in einer automatischen Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese und Laserdetektion in z.B. einem AbiPrism3130 (Fa. Applied Biosystems) bestimmt werden.

(11) Hundespezifische Analysen (SAA_019v001, nicht aktuell akkreditiert):

In drei verschiedenen kommerziell erhältlichen bzw. durch die CaDNAP (Canine DNA Profiling in forensic casework) Gruppe der ISFG (International Society for Forensic Genetics) empfohlenen Multiplex-Kits können STR-Merkmale amplifiziert werden, die spezifisch für die Familie der Canidae sind. In diesem Gutachten werden diese zusätzlich zu dem Stockmarks Canine for Dogs Kit von Thermo Fisher eingesetzt, sodass insgesamt 22 autosomale und 2 gonosomale Marker nachgewiesen werden können. Auch diese Merkmale kommen in unterschiedlichen Häufigkeiten vor, so dass ebenfalls einfache Identitätsuntersuchungen und Abstammungsanalysen durchgeführt werden können. Die benötigten Frequenzdaten hierzu sind einer naturwissenschaftlichen Doktorarbeit (Modrow, 2014, Kiel) entnommen und werden laufend aufgestockt. Ähnlich wie beim Menschen, gibt es auch bei Hunden spezifische Häufigkeitsverteilungen, die hier für die verschiedenen Rassen spezifisch sind. Daher kann über eine Assoziationsanalyse mit den erhaltenen Daten eine Zuordnung zu einer bestimmten Hunderasse durchgeführt werden. Hierzu müssen Daten für die entsprechende Rasse in der Datenbank vorliegen. Rassen, die hier nicht untersucht wurden, können durch diese Analyse nicht bestimmt bzw. zugeordnet werden. Zusätzlich wird eine PCR-gestützte Geschlechtsbestimmung durchgeführt.

(15) Hinweise zur forensisch-genetischen Rissanalyse (nicht akkreditiert):

Unsere Gesamtbeurteilung bzgl. der genetischen Übereinstimmung mit dem Wolf richtet sich nach dem Washingtoner Artenschutzabkommen Artikel II und den Mendel'schen Vererbungsregeln wie folgt:

>75 %	es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen „reinrassigen“ Wolf.
<75 % und >25 %:	es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Wolf-Hund-Hybriden der F1, F2, F3 oder F4 Generation bzw. deren Rückkreuzungen (B1-B4) oder einem der Hunderassen mit hoher Wolfsähnlichkeit (Sallus Wolfshund und Wolfs-/Großspitz) bzw. eines Mischlings desselben bei den niedrigeren Werten.
<25 %:	es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um einen direkten Wolfsabkömmling, sondern um einen Hund der zusätzlich angegebenen Rassen.

Gerechnet wird ab dem Nachweis von Merkmalen in 6 Genorten. Bei einem Nachweis von Merkmalen in 6 bis 7 Genorten wird ein Korrekturfaktor von 15 % einberechnet, der das eigentliche Ergebnis korrigiert; bei einem Nachweis von Merkmalen in 8 bis 9 Genorten beträgt er 10 %. Dies dient dem Vermeiden falsch-positiver bzw. negativer Spezieszuordnungen. Angegeben wird der Mittelwert.

- Die Interpretation bezüglich einer möglichen Zugehörigkeit zum Wolf bezieht sich dabei auf die Untersuchung von mehr als 6000 Hunden aus über 170 Rassen, bei denen in keinem Fall mehr als 35 % genetische Ähnlichkeit zum Wolf festgestellt werden konnte. Dabei werden die spezifischen Merkmalsmuster der Hunde mit denen der Wölfe im Rahmen einer Assoziationsstudie verglichen. Die Merkmalsmuster entstammen eigenen Untersuchungen und Literaturangaben (n=2100, Broad Institute. 2014. Broad Institute, broadinstitute.com: <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>, Ganco, L., et al. Genetic diversity analysis of 10 STR's loci used for forensic identification in canine hair samples. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2. 2009, S. 288-289.)
- Zusätzlich beinhaltet die Analyse den Abgleich mit Merkmalen, die für den Fuchs typisch sind. Auch hierzu wurden eigene Daten erstellt und zusätzlich auf die aus der Literatur zurückgegriffen (n=68, A Multiplex PCR assay to differentiate between dog and red fox: Forensic Sci Int Genet 2011 Nov 29;5(5):411-4. Epub 2010 Dec 29, M Weissenberger, W Reichert, R Mattern/A marker set for construction of a genetic map of the silver fox (Vulpes vulpes): J Hered 2004 May-Jun;95(3):185-94, A V Kukekova, L N Trut, I N Oskina, A V Kharlamova, S G Shikhevich, E F Kirkness, G D Aguirre, G M Acland /Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family: Mamm Genome 1995 Jan;6(1):11-8 M Fredholm, A K Winterø).

Alle von uns untersuchten Proben werden in eine von ForGen entwickelte und geführte Datenbank eingespeist. Alle Rissproben werden als Gruppe „Risse“ geführt; alle Wolfsproben als Gruppe „Wölfe“. Letztere wird weiter unterteilt in „Baltische“ und „russische“ und „lettische“ Population. Im Rahmen einer Identitätsüberprüfung und Assoziationsanalyse werden neue Daten mit den in der Datenbank vorhandenen Merkmalsmustern abgeglichen und Ähnlichkeitswerte bestimmt. Dies ermöglicht eine Zuordnung zu den Gruppen Riss, Wolf (mit Untergruppen), Hund (mit Untergruppen) bzw. eine Zuordnung zu einer einzelnen Probe („Match“) bei einer vollständigen Übereinstimmung. Im letzteren Fall wäre auch über die Bestimmung der Genotyphäufigkeit eine statistische Würdigung einer Probenzugehörigkeit möglich. Stimmt ein Teilmuster mit einem Tier überein, kann auch dieses biostatistisch berechnet werden. Da allerdings die Verwandtschaftsgrade insbesondere bei den Wolfsgruppen nicht bestimmbar sind, können derartige Analysen nur als Annäherungswerte angesehen werden.

(16) Analyse der mitochondrialen DNA (mtDNA, nicht akkreditiert):

Die mitochondriale DNA (mtDNA) wird bei Hunden als Ergänzung zur Assoziationsanalyse (nDNA), wenn z.B. nicht genügend (intakte) nukleäre DNA für die Erstellung eines genetischen, autosomalen Merkmalsmusters vorliegt. D.h., wenn DNA-Qualität und -Quantität nicht für eine Analyse der nukleären DNA ausreichen. Aufgrund der maternalen Vererbung der mitochondrialen DNA (mtDNA) lässt sich diese Methodik nur eingeschränkt nutzen und wird daher von uns ergänzend zur Analyse der nukleären DNA eingesetzt. Bei der Analyse der mtDNA werden ein 319 bp und-wenn möglich- ein 740 bp großes Fragment aus dem hypervariablen Bereich des mtDNA Genoms sequenziert (anlehnend an Gundry, et al. 2007, Schneider, Seo und Rittner 1999). Das resultierende Sequenzmuster wird im letzten Schritt mittels Alignment-Algorithmen analysiert und u.a. mit der NCBI Datenbank abgeglichen. Dieses Verfahren ist durch die Wahl der Primer spezifisch für die Familie der Canidae und ermöglicht durch einen Abgleich die Erstellung eines mtDNA Haplotyps und die maternale Zuordnung z.B. zu Hund oder Wolf. Bei der Haplotypzuordnung wird sich an der Arbeit von Thai et al, 2016 orientiert.

Die mitochondriale DNA (mtDNA) wird außerdem als zusätzliche Analyse zur Speziesidentifizierung eingesetzt. Bestimmte Bereiche dieser DNA sind bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich, so dass über die Sequenzierung dieser Bereiche und dem anschließenden Abgleich der Sequenz mit Proben in einer internationalen Datenbank („Blast“, NCBI) überprüft werden kann, zu welcher Spezies die untersuchte Probe gehört. Hierbei wird ein ca. 148 bp großes Fragment im Bereich des Cytochrom B der mitochondrialen DNA sequenziert und mit der obengenannten Datenbank abgeglichen (siehe Lopez-Oceja et al.(2016)). So ist die genetische Unterscheidung verschiedener Säugetiere, Amphibien, Reptilien und Insekten bzgl. ihrer Art und z.T. auch Unterart möglich.

6.2 Verbleib

Die für die vorliegende Untersuchung benutzten Spurenlösungen werden gem. Verfahrensanweisung FG_VA_008v001 Probengewahrsam wie folgt aufbewahrt:

Material	Aufbewahrung Entsorgung
Originäre Spuren (z.B. Sektionsasservate)	1 Jahr nach erfolgter Analyse und Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus obigen Spuren	s.o.
Mundschleimhautabstriche/Blut als VM	Sofortige Vernichtung nach Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus VM	s.o.
Spurenlösungen (Gegenstände) als VM in Identifizierungsfällen	4 Wochen nach Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus obigen Fällen	5 Jahre
Weitere Spurenlösungen/Abstriche diverse ohne spezielle Vereinbarung	2 Jahre
Extrahierte DNA aus obigen Spuren	5 Jahre

Diese Fristen gelten nicht, wenn seitens des Auftraggebers Einspruch eingelegt wird, bestimmte Abmachungen vorliegen oder, wenn es sich um Analysen im Rahmen eines Tötungsdeliktes oder anderer Kapitaldelikte handelt. Diese Proben werden langfristig asserviert.