



ForGen

Forensische Genetik und Rechtsmedizin
am Institut für Hämatopathologie GmbH

ForGen – Forensische Genetik und Rechtsmedizin am Institut für
Hämatopathologie GmbH | Fangdieckstr. 75a | 22547 Hamburg

Stichting Het Nationale Park de Hoge Veluwe
Apeldooseweg 250
7351TA Hoenderloo



dgab

fachabstammungsgutachterin
geprüft durch die kfqa
prüfnr. 0280/2013 www.kfqa.de

ForGen - Forensische Genetik
und Rechtsmedizin am Institut
für Hämatopathologie GmbH



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 27.05.2023

Betreff: Molekulargenetische Analyse (SU0208-23)

Bezug:	Speziesidentifikation Haaranalyse
Beschluss/Auftrag vom:	02.05.2023
Eingang des Auftrags an unserem Institut:	08.05.2023
Eingang des Spurenmaterials an unserem Institut:	08.05.2023

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 Spurentägern 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:

09.05.2023	bis	24.05.2023
------------	-----	------------

Amtsgericht Hamburg, HRB 139130
Steuer-Nr.: 41/720/03074
Geschäftsführer:



Hamburger Sparkasse
IBAN: DE61200505501002238630
BIC: HASPDEHHXXX

3.1 Spurenmaterial

Die im Folgenden beschriebenen Spureträger wurden untersucht:

Bezeichnung	lfd. Nummer	Beschreibung	Durchgeführte Methoden	Foto
Spur 1	0590-23	Abstrich Forensic Swab mit grauen und braunen 4-5 cm langen Haarbüscheln, teilweise mit Wurzel „1 Genieweg“	Extraktion von Minimalspuren, Quantifizierung von DNA, Erstellung eines genetischen, autosomalen Merkmalsmusters, Geschlechtsbestimmung, Sequenzierung der mitochondrialen DNA	
Spur 2	0591-23	s.o., „221225 Vliegvelo 1“	s.o.	
Spur 3	0592-23	s.o., „26-11-2022 Sickensenenn RN“	s.o.	
Spur 4	0593-23	s.o., „221211 Vliegvelo 2“	s.o.	
Spur 5	0594-23	s.o., „230115 Hk Rolbaan achter Huis GD“	s.o.	
Spur 6	0595-23	s.o., „221211 Vliegvelo 3“	s.o.	
Spur 7	0596-23	s.o., „Rolbaan“	s.o.	
Spur 8	0597-23	s.o., „22-12-10 Deeleivsevelo“	s.o.	
Spur 9	0598-23	s.o., „22-12-10 Zuiden“	s.o.	
Spur 10	0599-23	s.o., „5-11-2022 /1“	s.o.	
Spur 11	0600-23	s.o., „22-10-2022 Haar“	s.o.	
Spur 12	0601-23	s.o., „5-11-2022 /3 Haar“	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
0590-23	+	114	137/146	230	297	96/112	k.E.	k.E.	176/184	233	(277)
0591-23	+	102/114	137/146	230	289/297	96/112	k.E.	k.E.	(180)	233	277
0592-23	-	k.E.	(154)	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0593-23	-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0594-23	-	102	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	(200)	k.E.	k.E.	248	k.E.
0595-23	-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	112	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0596-23	-	k.E.	154/162	230/234	289/301	k.E.	(200/228)	k.E.	k.E.	228/248	273
0597-23	-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	158	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0598-23	-	102	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
0599-23	-	102	166	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	174	k.E.	k.E.
0600-23	-	102	166	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	174/178	k.E.	k.E.
0601-23	-	102	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	172/178	k.E.	k.E.

Multiplex II/III:

Lfd. Nr.	FC2087	FC2137	AMG	PEZ03	PEZ15	FC2508	FC2361	WTF	FC2613	FC2611	FC3241	vWFX	FC2132	Assoziationsanalyse
0590-23	110/122	159/169	XY	136	203	106/110	144/164	k.E.	76	(204)	258/270	130/138	k.E.	Wolf (66±66 % lettische Population) FC01-Hütehunde (65±6,5 %, z.B. Belgischer Schäferhund) -zusätzlich- Wolf (70±7 % französische Population)
0591-23	118/122	159	Y	133/136	203/207	106/110	135/145	168/190	76	k.E.	258/270	130/162	k.E.	Wolf (66±6,6 % lettische Population) FC01-Hütehunde (60±6 %, z.B. Belgischer Schäferhund) -zusätzlich- Wolf (70±7 % französische Population)
0592-23	118/(122)	155/177	X	k.E.	k.E.	110	k.E.	176	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich
0593-23	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.	Assoziationsanalyse nicht möglich
0594-23	k.E.	k.E.	k.E.	Y	k.E.	106	k.E.	k.E.	76	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich
0595-23	k.E.	k.E.	Y	k.E.	k.E.	k.E.	(151)	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich
0596-23	118/122	155/177	X	(136)	203/211	110	135/151	176/186	k.E.	k.E.	258	138/158	k.E.	FC01-Hütehunde (50±5 %, z.B. Belgischer Schäferhund) Wolf (35±3,5 %, baltische Population) -zusätzlich- Wolf (50±5 % französische Population)
0597-23	102	167	Y	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	130	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich
0598-23	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	(130)	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich
0599-23	k.E.	(164)	X	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich

Lfd. Nr.	FC2087	FC2137	AMG	PEZ03	PEZ15	FC2508	FC2361	WTF	FC2613	FC2611	FC3241	vWFX	FC2132	Assoziationsanalyse
0600-23	k.E.	(159)	Y	k.E.	k.E.	110	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	130/138	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich
0601-23	k.E.	k.E.	XY	k.E.	k.E.	106	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	Assoziationsanalyse nicht möglich

*: 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** sequenziert. 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		
0590-23	k.E.	C1: Komplet C2: Teilsequenz	HIT1: Canis lupus CLH2 HIT2: Canis lupus DM1124 HIT3: Canis lupus x Canis lupus familiaris	D(1) (Leehoei et.al., 2020)
0591-23	komplett	komplett	HIT1: Canis lupus familiaris HV1 C16 HIT2: Canis lupus familiaris Cf_pl44 HIT3: Canis lupus familiaris Cf_Jam8	C16 (Duleba et.al., 2014)
0592-23	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0593-23	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0594-23	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0595-23	Komplett	komplett	HIT1: Canis lupus DM1124 HIT2: Canis lupus x Canis lupus familiaris HIT3: Canis lupus w19latvia	D1 (Leehoei et.al., 2020)
0596-23	k.E.	C1: Komplet	HIT1: Canis lupus W1 HIT2: Canis lupus Clu73 HIT3: Canis lupus Clu69	Nicht möglich
0597-23	k.E.	C1: Komplet C2: Teilsequenz	HIT1: Canis lupus CLH2 HIT2: Canis lupus DM1124 HIT3: Canis lupus x Canis lupus familiaris	D(1) (Leehoei et.al., 2020)
0598-23	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0599-23	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0600-23	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich
0601-23	k.E.	k.E.	Nicht möglich	Nicht möglich

(a)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate CLH2 tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and D-loop...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	394	OP503598.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate DM1124 mitochondrion, complete genome	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	16690	MT622509.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus x Canis lupus familiaris isolate ehv6 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro ge...	Canis lupus x C...	427	427	84%	5e-115	97.99%	1393	JN182126.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate w32latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	1402	JN182087.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate w19latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	1342	JN182074.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate w5latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	1372	JN182060.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate w3latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	1292	JN182058.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate w36estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	1442	JN182054.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate w28estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	1422	JN182046.1
<input checked="" type="checkbox"/> Canis lupus isolate w31estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	427	427	84%	5e-115	97.99%	1392	JN182049.1

(b)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris haplotype HV1 C16* mitochondrion, partial genome	Canis lupus fami...	1018	1018	99%	0.0	93.63%	16735	JF342818.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate Cf_pl44 mitochondrion, complete genome	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	16730	KM061535.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate Cf_jam8 mitochondrion, complete genome	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	16730	KM061488.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate eDogPT42 mitochondrion, complete genome	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	16729	MW916044.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris mitochondrion, complete genome	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	16730	KF907309.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris voucher HG25 control region, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	1269	MN900895.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris voucher HG19 control region, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	1269	MN900889.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate 236 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	672	HQ997564.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis familiaris H993 mitochondrial control region, partial sequence	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	1292	AY240092.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis familiaris H970 mitochondrial control region, partial sequence	Canis lupus fami...	1014	1014	100%	0.0	93.49%	1252	AY240082.1

(c)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate DM1124 mitochondrion, complete genome	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	16690	MT622509.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus x Canis lupus familiaris isolate ehv6 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro ge...	Canis lupus x C...	782	1069	87%	0.0	96.65%	1393	JN182126.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w19latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete seg...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1342	JN182074.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w5latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1372	JN182060.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w3latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1292	JN182058.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w36estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1442	JN182054.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w28estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1422	JN182046.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w31estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1392	JN182049.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w27estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1413	JN182045.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w10estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	782	1069	87%	0.0	96.65%	1412	JN182028.1

(d)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus lupus haplotype w1 control region, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	257	MF440671.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Clu73 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	582	KY124130.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Clu69 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	581	KX898347.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Clu67 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	582	KX898345.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate Clu26 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	581	KX898321.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus lupus haplotype W8 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	496	KY550000.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus lupus haplotype W7 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	496	KY549999.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate CLH2 tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and D-loop...	Canis lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	394	OP503598.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus voucher M496363 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	630	MZ337546.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus voucher M496364 D-loop, partial sequence, mitochondrial	Canis lupus	215	215	72%	3e-51	93.88%	630	MZ337545.1

(e)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate CLH2 tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and D-loop...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	394	OP503598.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate DM1124 mitochondrion, complete genome	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	16690	MT622509.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus x Canis lupus familiaris isolate ehv6 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro ge...	Canis lupus x C...	409	409	80%	2e-109	97.52%	1393	JN182126.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w32latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	1402	JN182087.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w19latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	1342	JN182074.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w5latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	1372	JN182060.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w3latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequ...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	1292	JN182058.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w36estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	1442	JN182054.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w28estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	1422	JN182046.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus isolate w31estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete se...	Canis lupus	409	409	80%	2e-109	97.52%	1392	JN182049.1

Abb. 1: Ergebnis der Blastanalyse für die Proben 0590-23 (a), 0591-23 (b), 0595-23 (c), 0596-23 (d), 0597-23 €

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Begutachtung der vorgegebenen Beweisfragen

Insgesamt wurden 12 Haarproben analysiert, die mindestens vier verschiedenen Canidae (davon mindestens zwei männlichen Geschlechts) zugesprochen werden können und es ergaben sich die folgenden, weiteren Ergebnisse:

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

Lfd. Nr.	STR Analyse/Geschlecht	Assoziationsanalyse	mtDNA Sequenzierung	Ergebnis
0590-23 Tier 1	Teilprofil: - männlich - Wolfsallel in PEZ05	Wolf oder Wolf-Hund-Mischling	Teilsequenz: - Wolf - Haplotyp D(1) - Ursprung: Skandinavien - Hybridenlinie	Zwei Analysen sprechen hier für einen (französischen) Wolf bzw. ist aus forensischer Sicht auch ein Wolf-Hund-Mischling möglich.
0591-23 Tier 2	Teilprofil: - männlich - Wolfsallel in PEZ05	Wolf oder Wolf-Hund-Mischling	Komplette Sequenz: - Haushund - Haplotyp C16 - Ursprung: Osteuropa	STR Analyse deutet auf einen Wolf hin, mtDNA weist auf die maternale Linie von osteuropäischen Haushunden hin. Wolf-Hund-Mischling wahrscheinlicher als reinrassiger Wolf.
0592-23	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Keine reproduzierbare Sequenz nachweisbar.	Die vorliegenden Daten reichen für eine weitere Eingrenzung nicht aus.
0593-23	Keine Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Keine reproduzierbare Sequenz nachweisbar.	Die vorliegenden Daten reichen für eine weitere Eingrenzung nicht aus.
0594-23	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Keine reproduzierbare Sequenz nachweisbar.	Die vorliegenden Daten reichen für eine weitere Eingrenzung nicht aus.
0595-23	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Komplette Sequenz: - Wolf - Haplotyp D1 - Ursprung: Skandinavien - Hybridenlinie	Die Daten der STR-Analyse reichen für eine Eingrenzung nicht aus. Die Sequenzierung der mitochondrialen DNA weist mütterlicherseits auf einen Wolf bzw. Hybrid hin.
0596-23 Tier 3	Teilprofil: - weiblich	Wolf oder Wolf-Hund-Mischling	Teilsequenz: - Wolf - Haplotypbestimmung nicht möglich - Ursprung: Skandinavien	Zwei Analysen sprechen hier für einen Wolf bzw. ist aus forensischer Sicht auch ein Wolf-Hund-Mischling möglich.
0597-23 Tier 4	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Teilsequenz: - Wolf - Haplotyp D(1) - Ursprung: Skandinavien - Hybridenlinie	Die Daten der STR-Analyse reichen für eine Eingrenzung nicht aus. Die Sequenzierung der mitochondrialen DNA weist mütterlicherseits auf einen Wolf hin.
0598-23	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Keine reproduzierbare Sequenz nachweisbar.	Die vorliegenden Daten reichen für eine weitere Eingrenzung nicht aus.
0599-23	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Keine reproduzierbare Sequenz nachweisbar.	Die vorliegenden Daten reichen für eine weitere Eingrenzung nicht aus.
0600-23	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Keine reproduzierbare Sequenz nachweisbar.	Die vorliegenden Daten reichen für eine weitere Eingrenzung nicht aus.

Lfd. Nr.	STR Analyse/Geschlecht	Assoziationsanalyse	mtDNA Sequenzierung	Ergebnis
0601-23	Nur vereinzelte Merkmale nachweisbar.	Nicht möglich	Keine reproduzierbare Sequenz nachweisbar.	Die vorliegenden Daten reichen für eine weitere Eingrenzung nicht aus.

Bei dem **Tier 1** handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen **normalen, männlichen Wolf** mit großer Ähnlichkeit zu den bisherigen, untersuchten Tieren, sowie einer Gruppe Wölfe aus Frankreich.

Tier 2 zeigt einen mitochondrialen Haplotypen, der unterschiedlich ist von Tier 1. Entsprechend sind diese beiden nicht in direkter mütterlicher Linie verwandt. Die festgestellte mitochondriale DNA passt zu normalen Haushunden, während die autosomalen STR-Merkmale durchaus wolfstypische Ähnlichkeiten zeigen. Entsprechend kann es sich hier sehr wohl um einen (männlichen) Hybriden oder aber um einen Wolfshund handeln.

Tier 3 kann ebenfalls sehr wohl ein (weiblicher) Wolf sein, eine genauere Beurteilung ist nicht möglich. Gleiches gilt für **Tier 4**.

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 Waschschrinen 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 Spurenräger/Lösungen werden gem. Verfahrensweisung 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.
Spurenräger (Gegenstände) als VM in Identifizierungsfällen	4 Wochen nach Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus obigen Fällen	5 Jahre
Weitere Spurenräger/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.