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

Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe
Apeldoornseweg 250
7351 TA HOENDERLOO

[redacted]

ForGen - Forensische Genetik und Rechtsmedizin am Institut für Hämatopathologie GmbH

[redacted]

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 31.10.2024

Betreff: Molekulargenetische Analyse (SU0715-24)

Bezug:	**Speziesidentifikation Vmtl. Wolfsblut**
Beschluss/Auftrag vom:	24.09.2024
Eingang des Auftrags an unserem Institut:	26.09.2024
Eingang des Spurenmaterials an unserem Institut:	26.09.2024

Gemäß schriftlicher Anforderung soll ein

forensisch-genetisches Spurengutachten

erstellt werden.

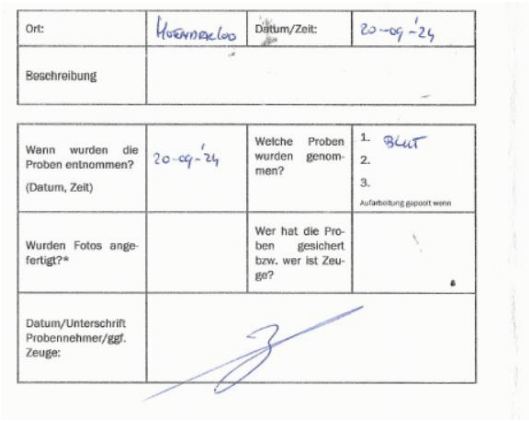
1. Frage- bzw. Aufgabenstellung

I. Bitte um molekulargenetische Analyse und - wenn möglich - Spezieszuordnung.

II. Befindet sich an den Spurenträgern 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



Ort:	Hoenderloo	Datum/Zeit:	20-09-'24
Beschreibung			
Wann wurden die Proben entnommen? (Datum, Zeit)	20-09-'24	Welche Proben wurden genommen?	1. Blut 2. 3.
Wurden Fotos angefertigt?*		Wer hat die Proben gesichert bzw. wer ist Zeuge?	
Datum/Unterschrift Probennehmer/ggf. Zeuge:			

3. Spuren- und Vergleichsmaterial:

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

30.09.2024	**bis**	24.10.2024

3.1 Spurenmaterial

Die im Folgenden beschriebenen Spurenträger wurden untersucht:

Bezeichnung	lfd. Nummer	Beschreibung	Durchgeführte Methoden	Foto
Spur 1	1653-24	2 Abstriche Forensic Swab, stark blutig: die Abstriche werden gemeinsam, komplett aufgearbeitet.	Extraktion von Minimalspuren, Quantifizierung von DNA, Erstellung eines genetischen, autosomalen Merkmalsmusters, Geschlechtsbestimmung, Sequenzierung der mitochondrialen DNA	

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
1653-24	+	111/115	147/163	217/223	289/299	96/104	166	272	175/181	230/234	273/277

Multiplex II/III:

Lfd. Nr.	FC2087	FC2137	AMG	PEZ03	PEZ15	FC2508	FC2361	WTF	FC2613	FC2611	FC3241	vWFX	FC2132	Assoziationsanalyse
1653-24	119	156/160	XY	136	199/211	110	135/149	175	137	198	258	137/163	274/310	**FCI-01 Hütehunde** (65 % , z.B. Belgischer Schäferhund) **Wolf** (60 % , lettische Population) --- zusätzlich--- **Wolf** (85 %, französische Population)

°: 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: Signalstäre 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		
1653-24 (Spur 1)	Komplette Sequenz	Komplette Sequenz	HIT1: Canis lupus w28estonia HIT2: Canis lupus w1estonia HIT3: Canis lupus w16estonia	**D1 (Leehoei et.al., 2020)**

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Acc. Len	Accession
Canis lupus isolate w28estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-lo...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1422	JN182046.1
Canis lupus isolate w1estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-loo...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1452	JN182019.1
Canis lupus isolate w16estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-lo...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1472	JN182034.1
Canis lupus isolate w3estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-loo...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1432	JN182021.1
Canis lupus isolate w12estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-lo...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1382	JN182030.1
Canis lupus isolate w27estonia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-lo...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1413	JN182045.1
Canis lupus isolate M45 mitochondrion, partial genome	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	16727	OM743395.1
Canis lupus isolate DM1124 mitochondrion, complete genome	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	16690	MT622509.1
Canis lupus isolate w5latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-loop,...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1372	JN182060.1
Canis lupus isolate w19latvia cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Thr and tRNA-Pro genes, complete sequence; and D-loop...	Canis lupus	1118	1118	100%	0.0	1342	JN182074.1

Abb. 1: Ergebnis der Blastanalyse für die Probe 1653-24.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Begutachtung der vorgegebenen Beweisfragen

Aus der Probe 1653-24 **(Spur 1)** ließen sich spezifische, autosomale und gonosomale Merkmale und eine komplette Sequenz der mitochondrialen DNA darstellen.

Die Analyse 22 polymorpher **STR-Merkmale** ergab hier für die **Spur 1, 1653-24**, Blutprobe, ein autosomales, canides Profil, welches sich für eine Assoziationsanalyse eignet. Hier zeigen sich die höchsten genetischen Übereinstimmungen mit Hunden der FCI Kategorie FCI-01 Hütehunde (65 % , z.B. Belgischer Schäferhund) sowie Wölfen der lettischen Population (60 %), Zusätzlich zeigen sich genetische Übereinstimmungen mit der französischen Wolfspopulation (85 %). Die positive Ausprägung im SRY-Genort weist auf ein männliches Tier hin, ebenso wie die Darstellung im Amelogenin-Genort xs. Weiterhin wurde das Merkmal „96“ im Markersystem PEZ05 von uns bisher nur bei **Wölfen** (n>21.000, >275 Hunderassen, Schakale, Dingos, Füchse, Marderhunde) nachgewiesen.

Die Sequenzierung der **mitochondrialen DNA** der Probe führte zu einer auswertbaren Sequenz der HV1-Region. Diese zeigt die höchste genetische Übereinstimmung mit der maternalen Linie von **Wölfen aus dem skandinavischen Raum** (Leerhoei et.al., 2020) sowie

einer bekannten osteuropäischen Hybridenlinie (Hindrickson et.al., 2011). Dies deckt sich mit dem eher für **Wölfe typischen Haplotypen D1**.

Damit kann zusammengefasst werden, dass an den übersandten Spurenträgern sicher DNA mindestens eines **Vertreters aus der Familie der Canidae** nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein männliches Individuum. Dabei weisen zwei verschiedene Methoden auf einen **Wolf** hin, wobei aus forensischer Sicht auch ein Wolf-Hund-Mischling nicht ausgeschlossen werden kann.

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 spiralig 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 berechnen 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 Socitety 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 Spurenträger/Lösungen 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.
Spurenträger (Gegenstände) als VM in Identifizierungsfällen	4 Wochen nach Gutachtenausgang
Extrahierte DNA aus obigen Fällen	5 Jahre
Weitere Spurenträger/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.