

Entwicklung molekularbiologischer
Methoden und Aufbau einer
Datenbank zur Identitäts-,
Mischlings- und
Abstammungsanalyse ausgewählter
Tierarten

Dissertation im Bereich forensische Genetik

vorgelegt von
Jan-Hendrik Modrow

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Juli 2014

Referent:	PD Dr. rer. nat. Nicole von Wurmb-Schwark
Koreferent:	Prof. Dr. rer. nat. Manuela Dittmar
Tag der mündlichen Prüfung:	10. Oktober 2014
Zum Druck genehmigt:	13. Oktober 2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1. Einleitung	1
1.1. Forensische Genetik	1
1.1.1. DNA	2
1.1.2. Polymorphismen	4
1.2. Der genetische Fingerabdruck	6
1.3. Anwendungsspektrum molekulargenetischer Analysen.....	6
1.3.1. Abstammungsanalyse	6
1.3.2. Mischlingsanalyse	7
1.3.2.1. Mischlingsanalysen beim Hund	7
1.3.2.2. Mischlingsanalysen beim Pferd	7
1.3.2.3. Mischlingsanalysen bei der Katze	8
1.3.3. Geschlechtsbestimmung.....	8
1.3.4. Stellungsfähigkeit beim Hund	9
1.4. Untersuchung tierischer DNA in der Forensik	11
1.4.1. Der Hund	11
1.4.2. Das Pferd	11
1.4.3. Der Koi-Karpfen.....	12
1.4.4. Die Katze	13
1.4.5. Das Kaninchen.....	13
1.4.6. Das Kamel.....	14
2. Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Probenmaterial	16
3.2. Probenentnahme	18
3.3. Datenverwaltung	19
3.4. DNA Extraktion	20
3.4.1. Manuelle DNA-Extraktion	20
3.4.2. Semi-automatische DNA-Extraktion	21
3.4.2.1. Extraktion mittels InviMag® KF Blood Kit	22
3.4.2.2. Extraktion mittels Invimag® KF Plant Kit.....	23
3.5. Überprüfung von DNA-Qualität und Quantität	24

3.5.1.	Agarose - Gel - Elektrophorese	24
3.5.2.	Analyse mittels Membralyzer© Software	24
3.6.	Primerauswahl.....	26
3.7.	Nomenklatur der STR-Systeme	27
3.8.	Polymerase-Ketten-Reaktion	28
3.8.1.	Multiplex-PCR	29
3.8.1.1.	Hunde.....	30
3.8.1.2.	Pferde.....	32
3.8.1.3.	Koi-Karpfen	34
3.8.1.4.	Katzen	36
3.8.1.5.	Kaninchen	38
3.8.1.6.	Kamele	40
3.8.1.7.	Speziesidentifizierung.....	42
3.8.2.	Geschlechtsmarker bei Koi-Karpfen.....	44
3.8.3.	Nachweis von Neurotransmitter-Rezeptor-Genen zwecks Ermittlung der genetischen Prädisposition für die Stellungsfähigkeit bei Hunden.....	45
3.8.4.	Sequenzierung mitochondrialer DNA	46
3.8.4.1.	Automatisierter Sequenzabgleich mittels SeSca© Modul.....	48
3.9.	Kapillar-Elektrophorese.....	49
3.9.1.	Besonderheiten bei der Auswertung.....	49
3.9.2.	Auswertung der STR Daten mittels STR Identitätsrechner	50
3.9.3.	Erstellung von Allelfrequenzdaten mittels AllelFi© Modul	52
3.9.4.	Mischlingsanalyse mittels MischSTR© Software.....	52
3.10.	Phänotypanalyse bei Hunden mittels PhätDB©	54
4.	Ergebnisse	55
4.1.	Analyse von Proben caniden Ursprungs	55
4.1.1.	Allgemein	55
4.1.2.	Genetischer Fingerabdruck.....	55
4.1.2.1.	Allelverteilung beim Stockmarks™ Dogs for Canine Kit.....	56
4.1.2.2.	Allelverteilung beim Finnzymes™ Canine Panel 1.1 Kit	60
4.1.2.3.	Mischlingsanalyse	64
4.1.2.4.	Verhaltensanalyse und Aggressionsbereitschaft	67
4.2.	Analyse von Proben equiden Ursprungs.....	69
4.2.1.	Allgemein	69

4.2.2.	Genetischer Fingerabdruck.....	69
4.2.2.1.	Allelverteilung beim Stockmarks™ Horses for Equine und Finnzymes™ Equine Panel 1.1	69
4.2.2.2.	Mischlingsanalyse	72
4.3.	Analyse von Proben cypriniformen Ursprungs.....	73
4.3.1.	Allgemein	73
4.3.2.	Genetischer Fingerabdruck.....	73
4.3.2.1.	Allelverteilung der selbsterstellten Koi-Plex.....	74
4.3.2.2.	Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen.....	76
4.4.	Analysen von Proben feliden Ursprungs.....	77
4.4.1.	Allgemein	77
4.4.2.	Genetischer Fingerabdruck.....	77
4.4.2.1.	Allelverteilung der selbstentwickelten MEOW-Plex.....	77
4.4.2.2.	Mischlingsanalyse	80
4.5.	Analyse von Proben lagomorphen Ursprungs.....	81
4.5.1.	Allgemein	81
4.5.2.	Genetischer Fingerabdruck.....	81
4.6.	Analyse von Proben cameliden Ursprungs	83
4.6.1.	Allgemein	83
4.6.2.	Genetischer Fingerabdruck.....	83
4.7.	Speziesidentifikation	86
4.7.1.	Allgemein	86
4.7.2.	Entwicklung einer Multiplex-PCR.....	86
4.7.3.	Anwendungsspektrum	88
4.8.	Aufbau einer Datenbank	90
5.	Diskussion	91
5.1.	Auswahl der Spezies.....	91
5.2.	Probenauswahl und -entnahme.....	93
5.3.	Extraktionsverfahren.....	94
5.4.	Analyse-Software	95
5.5.	Genetischer Fingerabdruck und Abstammungsanalyse	96
5.5.1.	Hund.....	96
5.5.2.	Pferd.....	96
5.5.3.	Koi-Karpfen	97
5.5.4.	Katze.....	97

5.5.5.	Kaninchen	98
5.5.6.	Kamel	98
5.6.	Mischlingsanalysen	99
5.6.1.	Hund.....	99
5.6.2.	Pferd.....	101
5.6.3.	Katze.....	101
5.7.	Verhaltensanalyse beim Hund	102
5.8.	Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen	103
5.9.	Speziesidentifikation mittels Meat-Plex Multiplex-PCR	103
6.	Zusammenfassung	104
7.	Abstract	106
8.	Ausblick	108
9.	Literaturverzeichnis	109
10.	Anhang	114
10.1.	Abkürzungsverzeichnis	114
10.2.	Abbildungsverzeichnis.....	116
10.3.	Tabellenverzeichnis.....	121
10.4.	Veröffentlichungen	125
10.5.	Tabellen.....	128
10.6.	Abbildungen	159
11.	Geräteliste	168
11.1.	Softwareverzeichnis	169
11.2.	Verbrauchsmaterial.....	170
12.	Danksagung	172
13.	Lebenslauf	173
14.	Erklärung	174

1. Einleitung

1.1. Forensische Genetik

In den letzten Jahren gewinnt die Forensische Genetik einen immer höheren Stellenwert. Mit der Entdeckung durch Alec Jeffreys 1985 (Jeffreys, et al., 1985) wird der genetische Fingerabdruck sowohl zur Identifikation, aber auch zur Entlastung von möglichen Straftätern genutzt. Aufgrund der in den letzten Jahren stetig zunehmenden Sensitivität der PCR-Systeme (Rohland, et al., 2007), lassen sich heute selbst geringste Spuren zur Erstellung von Profilen nutzen. Die sogenannten STRs (short tandem repeat) sind bei der Erstellung des genetischen Fingerabdrucks das Mittel der Wahl. Ergänzend kann z. B. bei degradierten oder Minimalspuren zusätzlich die Analyse von SNPs (single nucleotide polymorphism) erfolgen. Die Steigerung der Sensitivität geht jedoch einher mit der Gefahr einer Kontamination, die sowohl an einem Tatort sowie im Labor auftreten kann. Um dieser Gefahr vorzubeugen sind entsprechende Schutzmaßnahmen, wie Laborkittel, Mundschutz und Handschuhe unumgänglich. Weiterhin ist stets eine Negativkontrolle bei jeder Analyse mitzuführen, um eine ggf. aufgetretene Kontamination sofort zu erkennen.

Bei humanen Proben lassen sich mittlerweile bis zu 23 Y-STRs bzw. 21 autosomale STRs simultan in einer Multiplex-PCR untersuchen (PowerPlex® Y23, Promega™ bzw. PowerPlex® 21, Promega™). Neben autosomalen STRs ist auch die ANalyser Y-Chromosom und X-Chromosom spezifischer Systeme oder die Detektion von Sequenzunterschieden in der mitochondrialen DNA möglich.

Als einziger kodierender Bereich humaner DNA darf das Amelogenin, welches für das Zahnschmelzprotein kodiert, jedoch nur als Geschlechtsmarker (112 bp Y-Chromosom, 106 bp X-Chromosom), analysiert werden. Während bei humanen Proben kodierende Bereiche der DNA in Deutschland nicht analysiert werden dürfen (Duttge, et al., 2011), da diese ggf. Rückschlüsse auf Krankheiten oder Aussehen zuließen, ist die Analytik kodierender Bereiche tierischen Ursprungs gestattet. Entsprechend lassen sich so z.B. Prädispositionen für eine bestimmte Stellungsfähigkeit beim Hund (Ertel, et al., 2013) oder genetische Eigenarten verschiedener Hunderassen detektieren (Gunreben, et al., 2011).

Im Folgenden wird der Fokus auf der Analyse von DNA tierischen Ursprungs gelegt:

1.1.1. DNA

Die Desoxyribonukleinsäure wurde 1953 durch James Watson, Francis Crick und Rosalind Franklin entdeckt (Watson, et al., 1953). Sie fungiert als Träger der genetischen Information und ermöglicht die Weitergabe dieser. Desoxyribonukleinsäure (kurz DNS, engl.: DNA) liegt in der Zelle als doppelsträngige Helix vor und ist zu kompliziert gefalteten Komplexen (Chromatiden) aggregiert (Kempken und Kempken 2006). Die komplementären DNA-Einzelstränge sind antiparallel angeordnet und leiterartig miteinander verbunden, sodass sich ein Doppelstrang bildet. Die Nukleotide Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin sind die Grundbausteine der DNA. Aufgrund der sterischen Anordnung der vier Basen ordnet sich die DNA helical an (Abb. 1). Der jeweilige Einzelstrang setzt sich aus Monomeren bestehend aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Base (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin),
- Zuckermolekül (Desoxyribose)
- saurer Phosphatrest

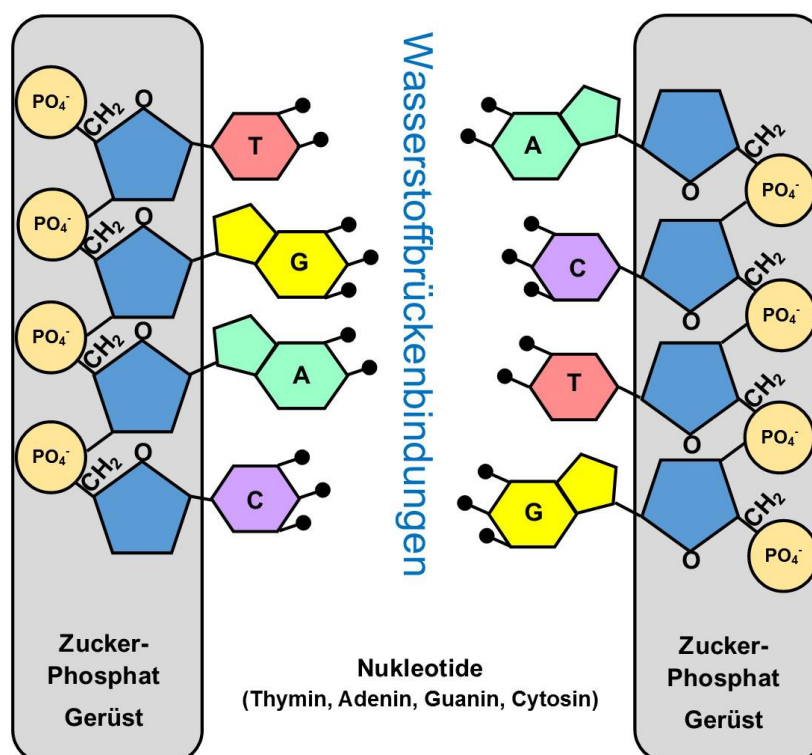


Abb. 1: Schematische Darstellung eines DNA-Doppelstrangs (selbst erstellt). Die Nukleotide Adenin und Thymin sind über zwei Wasserstoffbrücken, Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken verbunden. Die Nukleotidpaare wiederum sind über ein Zucker-Phosphat Gerüst miteinander verbunden. Aufgrund der sterischen Anordnung der Moleküle ergibt sich eine Verdrillung, sodass sich eine helicale Anordnung ausbildet.

Aufgrund chemischer Wechselwirkungen bilden jeweils Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin ein Basenpaar auf den entgegengesetzten Strängen der Doppelhelix.

Höhere Wirbeltiere weisen zwei verschiedene Arten von DNA auf; die im Zellkern befindliche nukleäre DNA sowie die zirkuläre mitochondriale DNA in den Mitochondrien (Alberts, et al., 2004). Da die Anzahl an Mitochondrien je nach Zelle stark variiert, liegt auch die mitochondriale DNA in verschiedenen Kopienzahlen vor. Mitochondriale DNA wird im Gegensatz zur nukleären DNA nicht nach den Mendel'schen Regeln, sondern rein maternal vererbt (Alberts, et al., 2005).

Die nukleäre DNA wird in der Zelle zu Chromosomen, bestehend aus dem eigentlichen DNA-Molekül sowie angelagerten Proteinen (Histonen), gepackt. Die Anzahl der Chromosomen ist dabei interspezifisch unterschiedlich und kann auch innerhalb einer Tierfamilie variieren (Yang, et al., 2004). Zusätzlich zur variablen Zahl geschlechtsunabhängiger Autosomen besitzen die meisten Wirbeltiere geschlechtsspezifische Gonosomen.

Im Gegensatz zum humanen Genom, wo in der Regel vierfach Wiederholungs- oder Komplexmotive untersucht werden, treten bei Tieren am häufigsten zwei Nukleotide umfassende Wiederholungseinheiten auf (Ostrander, et al., 1993). Zur Erstellung des genetischen Fingerabdrucks bei Tieren werden im Rahmen dieser Arbeit je nach Spezies neun bis 19 verschiedene STR-Systeme untersucht.

1.2. Der genetische Fingerabdruck

Der genetische Fingerabdruck wurde 1984 durch Sir Alec John Jeffreys in Leicester, England, entdeckt (Jeffreys, et al., 1985). Beim Vergleich hypervariabler Bereiche des menschlichen Genoms bemerkte er, dass sich bei Auftragung mit Restriktionsenzymen geschnittener DNA auf einem Gel individualspezifische Bandenmuster ausbildeten (Gill, et al., 1985). Zusätzlich konnte er bei Familien nachweisen, dass die Nachkommen jeweils ein Merkmal zeigten, welches von der Kindesmutter und eines vom Kindesvater stammte.

Ein schwerwiegender Nachteil der Analyse der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen barg jedoch die große Menge benötigter DNA (1-2 µg) und der große Zeitaufwand (Butler, 2005; Mülhardt, 2009).

Erst Ende der 80-er Jahre war es möglich, mithilfe der von Kary Mullis entwickelten Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), bestimmte Abschnitte der DNA künstlich zu vervielfältigen (Mullis, et al., 1987).

Zusammen mit der Analyse der sogenannten Short-Tandem-Repeats (STRs), kurzen repetitiven Sequenzen innerhalb der nicht-kodierenden Bereiche der DNA, konnten auch für Minimal Spuren, d.h. bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 100 pg DNA (10-20 Zellen) (Poetsch, et al., 2011), zuverlässig sogenannte genetische Fingerabdrücke generiert werden (Mansfield, et al., 2005).

1.3. Anwendungsspektrum molekulargenetischer Analysen

Neben der Identitätsanalyse mittels genetischen Fingerabdrucks zwecks Zuordnung einer Identität, lässt sich mithilfe dieser molekulargenetischen Methodik auch eine Abstammungs-, eine Mischlings- sowie eine Geschlechtsanalyse und beim Hund die Stellungsfähigkeit bestimmen:

1.3.1. Abstammungsanalyse

Vor der Etablierung der genetischen Analytik wurden sogenannte Plausibilitätsprüfungen anhand von phänotypischen Merkmalen sowie anhand des Anfang des 19. Jahrhunderts durch Karl Landsteiner entdeckten ABO-Blutgruppensystems durchgeführt (Landsteiner, 1901). Bei der Begutachtung von Mutter, Vater und Kind finden die Mendel'schen Regeln Anwendung, die besagen, dass ein Kind stets ein Merkmal des Vaters sowie ein Merkmal der Mutter vererbt bekommt. Mithilfe des ABO-Systems ließ sich aber nur eine Vaterschaft ausschließen, jedoch nicht eindeutig feststellen, da die Blutgruppenmerkmale nicht polymorph genug sind. Erst die genetische Analyse des humanen Leukozyten-Antigen Systems (HLA) ermöglichte eine genauere und aussagekräftigere Beurteilung der Abstammungsverhältnisse (Butler, 2005).

Die heute verwendete STR Analytik von Mutter, Vater und Kind erlaubt eine zuverlässige Bestimmung der Abstammung. Auch hier zeigt der Nachkomme im jeweiligen Genort stets ein Merkmal des Vaters und der Mutter (Abb. 2). Sind nicht alle Genotypen der Nachkommen in der Generation der Eltern, ergibt sich ein Ausschlusskriterium. Dabei ergibt sich eine Diskriminierungsrate von bis zu über 99,999999 %.

1.3.2. Mischlingsanalyse

Analog zur Populationsspezifität von STRs beim Menschen, erlaubt die Analyse von spezifischen Polymorphismen in der DNA von Tieren auch Rückschlüsse auf die Rasse z.B. bei Mischlingen zu tätigen. Die meist phänotypischen Charakteristika der jeweiligen Rasse werden von verschiedenen Dachverbänden vorgegeben. Zur Beurteilung müssen möglichst viele unverwandte Tiere einer bestimmten Rasse analysiert und statistisch ausgewertet werden (Gunreben, et al., 2011; Cho, 2005).

1.3.2.1. Mischlingsanalysen beim Hund

Da alle Hunderassen miteinander verwandt sind, existiert zwischen ihnen eine sogenannte Schnittmenge (ca. 19 %). D.h., dass die untersuchten Merkmale nicht 100 % spezifisch für z.B. den Pudel sind. Auch eine Dogge und ein Mops können gleiche Merkmale aufweisen. Daher ergibt sich nach der Analyse nicht eine Summe von 100 %, zusammengesetzt aus den jeweiligen Einzelergebnissen. Stattdessen lässt sich die größtmögliche genetische Ähnlichkeit eines Hundes zu einer bzw. mehreren Rassen erkennen. Aktuell (Stand: Dezember 2013) werden 359 vom weltweit agierenden kynologischen Dachverband Fédération Cynologique Internationale (FCI) (Haus-) Hunderassen anerkannt.

Dabei wird primär anhand des Phänotyps zwischen den verschiedenen Rassen unterschieden. Aufgrund des relativ engen Genpools und stetiger Kreuzung innerhalb der Rasse manifestieren sich rassespezifische Allelkombinationen. Anhand dieser kann mithilfe einer Datenbank und damit verbundenen Assoziationsanalysen, eine Bestimmung der Hunderassen bzw. bei Mischlingen Rückschlüsse auf die verschiedenen Hunderassen getätigt werden. Voraussetzung dabei ist, dass genügend unverwandte Individuen der jeweiligen Rasse untersucht wurden und deren Profile in der Datenbank gespeichert sind.

1.3.2.2. Mischlingsanalysen beim Pferd

Weltweit existieren etwa 200 anerkannte Pferderassen, wobei die Angaben je nach dem jeweiligen Dachverband (z.B. Hannoveraner Verband, Zuchtverband für Sportpferde arabischer Abstammung e.V.) um etwa 20 Rassen nach oben und unten schwanken. Bei den Pferderassen wird anhand der

Größe zusätzlich zwischen Großpferden (Reit- und Nutzpferde) und Kleinpferden (Ponys) unterschieden. Auch bei den Pferden zeigen sich aufgrund des engen Genpools und stetiger Kreuzung innerhalb der Rasse rassespezifische Allelkombinationen. Diese werden sich bei der entwickelten Methodik und damit verbundenen Assoziationsanalysen zur Nutzen gemacht, sodass eine Bestimmung der Pferderassen durchgeführt werden kann.

1.3.2.3. Mischlingsanalysen bei der Katze

Der weltweit agierende Dachverband „World Cat Federation“ (WCF) listet aktuell (Stand: Januar 2014) 105 anerkannte Katzenrassen. Dabei wird zwischen Kurzhaar-, Mittellanghaar- und Langhaarkatzen differenziert.

Da die Zucht nahezu ausschließlich innerhalb der einzelnen Rassen stattfindet, prägen sich auch bei der Katze rassespezifische Allelkombinationen aus, anhand derer mithilfe der hier entwickelten Datenbank und damit verbundenen Assoziationsanalysen-Algorithmen, eine Bestimmung der Katzenrassen sowie deren Mischlingen ermöglicht wird.

1.3.3. Geschlechtsbestimmung

Gerade in Bezug auf die Tierzucht kann es wichtig sein, das Geschlecht eines Tieres zu bestimmen. Während dies bei Säugetieren anhand der primären Geschlechtsmerkmale ohne großen Aufwand möglich ist, muss bei Fischen und Vögeln häufig eine genetische Analyse durchgeführt werden. Gerade bei Jungtieren sind häufig noch keine geschlechts-charakteristischen äußeren Merkmale ausgeprägt.

Bei der Geschlechtsbestimmung werden spezifische Bereiche auf den sogenannten Gonosomen (X- und Y-Chromosom bzw. Z- und W-Chromosom) der Tiere detektiert. Während bei Säugetieren und Fischen weibliche Individuen (XX) ein sich überlappendes Fragment zeigen, sind bei männlichen Individuen (XY) zwei verschieden große Fragmente nachweisbar (Chen, et al., 2009).. Bei Vögeln ist das Geschlechtssystem genau umgekehrt; weibliche Individuen (ZW) zeigen zwei unterschiedlich große Fragmente, männliche Vögel zeigen nur ein Fragment (ZZ) im Elektropherogramm bzw. im Gelbild (Quinn, 1999).

1.3.4. Stellungsfähigkeit beim Hund

Die Stellungsfähigkeit des Hundes wurde bereits Mitte des 19. Jahrhunderts durch Karl Werner beschrieben (Ertel, et al., 2013). Er kategorisierte die Stellung der Hunde anhand von Sozialverhalten und -fähigkeiten innerhalb eines Rudels in sieben verschiedene Bereiche:

(1) Der **vorrangige Leithund (VLH)** ist ein dominanter, ausdrucksstarker, sich aufbauender Hund. Der VLH ist dabei wenig aktiv, lässt das Rudel für sich arbeiten und steht in der Rangordnung zusammen mit dem mittleren Bindehund an höchster Stelle.

(2) Der **zweite vorrangige Bindehund (V2)** ist ebenfalls ein ausdrucksstarker Hund, orientiert sich jedoch stark am VLH. Hunde der Kategorie V2 zeigen eine hohe soziale Kompetenz, sichern den VLH und führen den dritten vorrangigen Bindehund.

(3) Der **dritte vorrangige Bindehund (V3)** ist ebenfalls ausdrucksstark, orientiert sich jedoch primär am mittleren Bindehund. V3-Hunde zeigen eine hohe innere Bereitschaft zur Konfliktschlichtung und weisen häufig eine geringe Beißhemmung auf. Ein V3-Hund wird vom mittleren Bindehund geführt und sichert diesen ab.

(4) Der **mittlere Bindehund (MBH)** wird als sozialer Mittelpunkt des Rudels angesehen. Seine primäre Funktion liegt im Erhalt der Gemeinschaft. Hunde der Kategorie MBH zeigen die höchste Sozialkompetenz im Rudel. Als einziger Hund im Rudel bestimmt dieser über die Stellung der anderen Tiere. Der MBH führt sowohl den vorrangigen als auch den nachrangigen Teil des Rudels.

(5) Der **zweite nachrangige Bindehund (N2)** unterstützt den mittleren Bindehund in allen Abläufen. Hunde der Kategorie N2 verfügen über eine hohe soziale Kompetenz und zeichnen sich in der Regel durch defensives Verhalten und Sensibilität aus. Wie der V3-Hund sichert der N2 den mittleren Bindehund und wird von diesem geführt.

(6) Der **dritte nachrangige Bindehund (N3)** fungiert als „Wächter“ für den nachrangigen Leithund und sichert diesen. Hunde der Kategorie N3 sind nicht in der Lage eigenständige Entscheidungen zu treffen und orientieren sich am nachrangigen Leithund.

(7) Der **nachrangige Leithund (NLH)** zeichnet sich primär durch seine Sensibilität aus. Bei Hunden der NLH Kategorie handelt es sich um ruhende, mental starke Hunde. NLHs leiten den

nachrangigen Teil des Rudels, sind selbst aber nicht konfliktfähig und daher abhängig von ihren N3-Wächtern. Im Falle eines Notfalls werden nachrangige Leithunde häufig geopfert.

1.4. Untersuchung tierischer DNA in der Forensik

Die Untersuchung von Wild- und Haustieren hat in den letzten Jahren in der forensischen Genetik einen immer höheren Stellenwert erlangt. Der mögliche Nutzen für die Identifikation eines bestimmten Tieres reicht dabei von der Rekonstruktion eines ungeklärten Todesfalles, über die Bestimmung der Rasse und des Geschlechts, bis hin zum Abstammungsnachweis für den Züchter. Auch die Speziesidentifikation als solches ist dabei relevant, nicht nur in Bezug auf Wilderei, sondern auch im Bereich der Lebensmittelsicherheit und in Versicherungsfragen.

Seit 2000 stieg die Zahl der Haustiere in Deutschland von etwa 24 Millionen registrierten Tieren auf über 35 Millionen Individuen (Stand 2013). Mit 27,3 Millionen Tieren machen Katzen (12,3 Mio.), Hunde (7,6 Mio.) und Kleintiere, wie Kaninchen (7,4 Mio), den weitaus größten Anteil an Individuen aus. Zusätzlich sind noch einmal 3,7 Mio. Vögel und 4,9 Mio. Haushalte mit Gartenteichen und Aquarien erfasst worden. (Statista GmbH, 2014) Die Anzahl an Pferden in Deutschland dagegen stagniert seit den 1980-er Jahren und liegt bei 440.000 Individuen (Stand 2010) (Statista GmbH, 2014).

Entsprechend hoch ist die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung einer dieser Tiere in forensisch relevanten Fällen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Tierarten zur Untersuchung ausgewählt:

1.4.1. Der Hund

Bei der Familie der Hunde (*Canidae*) handelt es sich um eine Unterfamilie der Hundeartigen (*Canioidae*). Neben dem Haushund, einer domestizierten Form des Wolfes (*Canis lupus*), gehören auch die Schakale, Kojoten, Füchse und Wölfe zu dieser Familie. Hunde ernähren sich vorwiegend von Fleisch (*carnivor*), viele jedoch auch zusätzlich von Früchten und Gemüse (*omnivor*). Mit Ausnahme der Füchse sind Hunde Rudeltiere und entwickeln ein komplexes soziales System.

Die Hunde besitzen 39 Chromosomenpaare auf; davon sind 38 Chromosomen autosomal und ein Chromosomenpaar gonosomal. Das Genom des Hundes weist nach derzeitigem Wissensstand eine Größe von 2.445 Mb auf (Dog Genome Project, Broad Institute, 2013).

1.4.2. Das Pferd

Bei den Pferden (*Equidae*) handelt es sich um eine Familie der Ordnung der Unpaarhufer (*Perissodactyla*). Neben den hier untersuchten Hauspferden (*Equus ferrus caballus*), einer domestizierten Form des Wildpferds (*Equus ferrus*), gehören auch die Zebras, Esel, Maultiere und die Przewalski-Wildpferde zu dieser Familie. Pferde ernähren sich ausschließlich von pflanzlicher Nahrung (*herbivor*) und sind sogenannte Herdentiere. (Bowling und Ruvinsky, 2000)

Hauspferde weisen einen Chromosomensatz von 32 Chromosomenpaaren auf, davon sind 31 Chromosomen autosomal und ein Chromosomenpaar gonosomal. Als Besonderheit ist hier das Maultier, ein Kreuzungsprodukt aus Eselhengst (62 Chromosomen) und Pferdestute (64 Chromosomen) zu nennen. Maultiere sind aufgrund ihrer ungeraden Anzahl resultierender Chromosomenzahl nicht fortpflanzungsfähig (Bowling und Ruvinsky, 2000). Das Genom der Hauspferde wurde 2007 mit der vollständigen Sequenzierung der DNA einer Vollblut Stute auf eine Größe von 2.475 Mb festgelegt (Wade et al., 2009).

1.4.3. Der Koi-Karpfen

Beim ostasiatischen Koi-Karpfen handelt es sich um eine Zuchtform des europäischen Karpfens (*Cyprinus carpio*); er gehört zur Familie der Karpfenartigen (*Cyprinidae*).

Der Koi-Karpfen unterscheidet sich von der Wildform vor allem in seiner häufig auffälligen und bunten Zeichnung und gilt daher seit dem 19. Jahrhundert in vielen Kulturen als Statussymbol.

Aktuell wird zwischen 16 Hauptvarianten sowie 100 Unterformen unterschieden, wobei nur die Zeichnung und Farbe als Kriterium eingesetzt wird. Eine Besonderheit bilden allerdings die Butterfly-Kois, die eine abweichende Flossenform aufweisen (Abb. 3). Bei den Koi-Karpfen handelt es sich um gesellige Tiere, die meist zusammen gehalten werden. Kois ernähren sich von Pflanzen, Insekten und Würmern. (David, 2009)

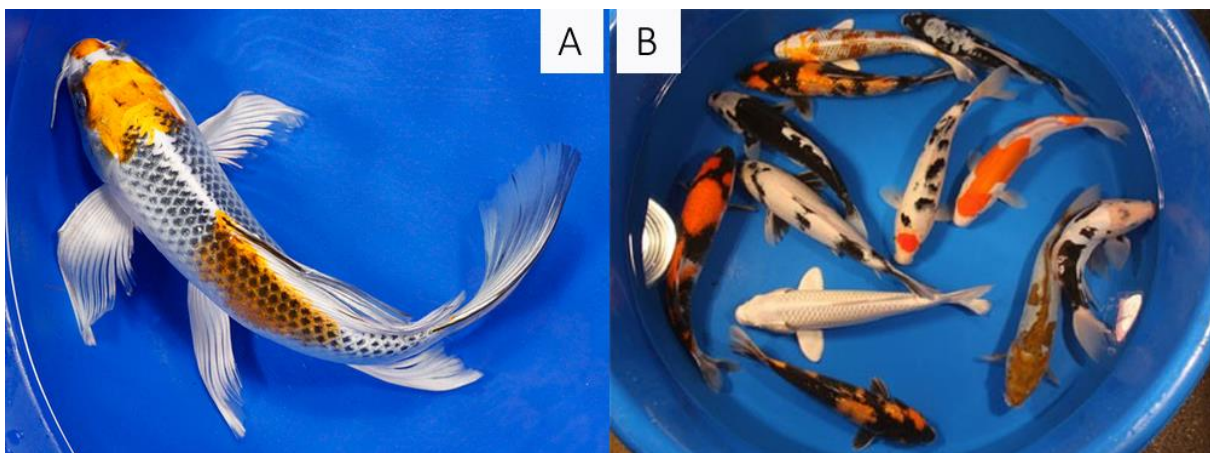


Abb. 3: Vergleich von Butterfly-Koi (A) und der normalen Zuchtform (B) (Quelle: <http://www.koi-pond-guide.com>). Zusätzlich ist in B die hohe Farbvarianz der Koi-Karpfen zu sehen.

Das Genom des Karpfens weist eine Größe von 2.700 Mb auf. Die Koi-Karpfen verfügen über 52 Chromosomenpaare. Anders als bei Säugetieren und Vögeln können Karpfen an einem Genort statt einem oder zwei Merkmalen, drei Merkmale zeigen (triallelisch), entsprechend ist eine verlässliche Abstammungsanalyse bei dieser Spezies derzeit nicht möglich (Zhang, et al. 2011).

1.4.4. Die Katze

Die Familie der Katzen (*Felidae*) gehört zur Überfamilie der Katzenartigen (*Feloidae*). Man unterscheidet zwischen den Großkatzen (z.B. Löwe und Tiger) und Kleinkatzen (z.B. Luchs und Wildkatze). Bei der im Rahmen dieser Arbeit primär untersuchten Katzen handelt es sich um die Hauskatze, eine domestizierte Form der Wildkatze. Katzen ernähren sich vorwiegend von Fleisch (*carnivor*) und gelten in der Regel als Einzelgänger. Eine Ausnahme bilden hier die Löwen, die häufig im Rudel leben.

Die Familie der Katzen weist einen Chromosomensatz von 19 Chromosomenpaaren auf. Zwei Chromosomen sind dabei gonosomal, die übrigen autosomal. Bisher konnten im Genom 20.000 Gene lokalisiert sowie 250 genetisch vererbte Krankheiten ausgemacht werden. (Vella, Shelton und McGonagle, 1999; O'Brien, et al., 2002)

1.4.5. Das Kaninchen

Die Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) gehören zur Familie der Hasen (*Leporidae*). Neben dem Wildkaninchen, gibt es 90 vom Zentralverband Deutscher Rasse-Kaninchenzüchter (Stand Februar 2014) anerkannte domestizierte Rassen. Die Differenzierung zwischen den verschiedenen Rassen erfolgt anhand der Körpergröße und des Haarwerts. Kaninchen ernähren sich ausschließlich von Pflanzen (*herbivor*) und leben in freier Wildbahn in unterirdischen Kolonien. (Blase, 2009)

Kaninchen weisen einen Chromosomensatz von 22 Chromosomenpaaren auf. Das Genom der Kaninchen besitzt eine Größe von 3.500 Mb (Rabbit Genome Project, Broad Institute, 2013).

1.4.6. Das Kamel

Zur Familie der Kamele (*Camelidae*) zählen die Altwelt-Kamele (*Camelus*) mit Dromedar (einhöckrig) und Trampeltier (zweihöckrig) sowie die Neuwelt-Kamele (*Lama* und *Vicugna*) (Abb. 4). Die Altwelt-Kamele wurden und werden aufgrund ihrer Anpassung an extreme Lebensräume, wie z.B. die Wüste, als Transportmittel eingesetzt. Häufig werden heute aber auch Kamelrennen mit den Tieren veranstaltet, was diese zu einem begehrten Statussymbol in arabischen Ländern macht. Kamele leben in Gruppen von einem Männchen und mehreren Weibchen und ernähren sich rein pflanzlich. (Shah, Qureshi und Reissmann, 2014)

Die DNA der Kamele ist in 37 Chromosomenpaaren (Taylor, et al., 1968) gepackt und weist eine Größe von 2.380 Mb auf (Consortium, 2012). Als Besonderheit gilt, dass sich jeweils die Gruppe der Altwelt-Kamele und die Gruppe der Neuwelt-Kamele untereinander fortpflanzen und zeugungsfähige Nachkommen hervorbringen können.

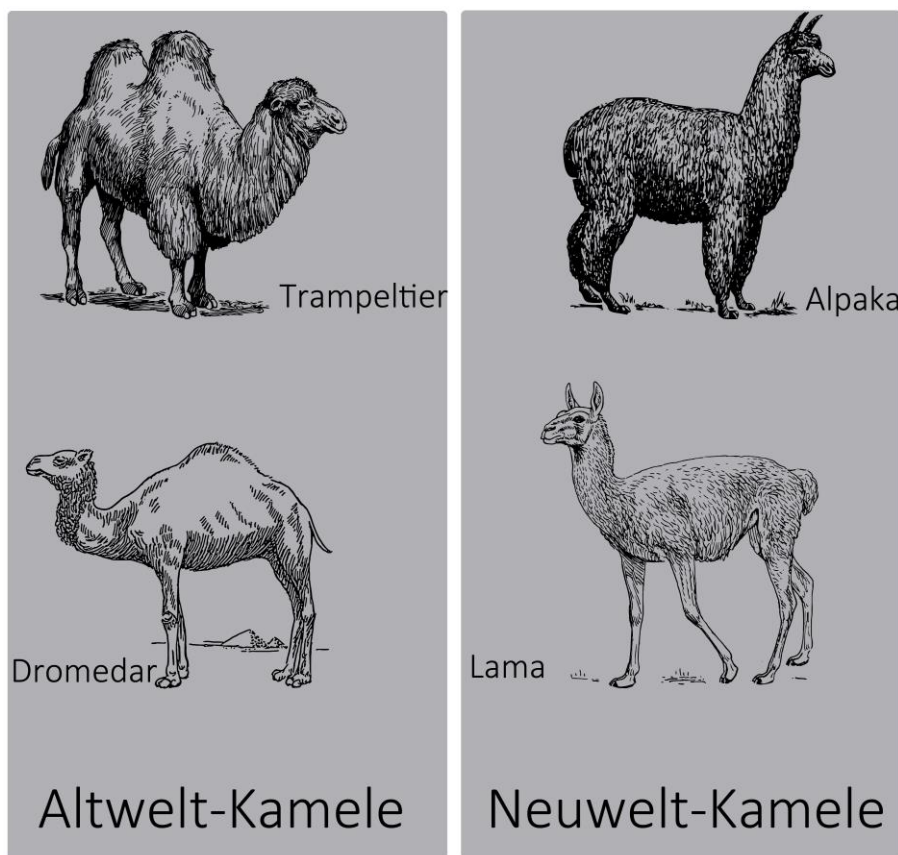


Abb. 4: Schematische Darstellung der beiden Kamel Familien (Eigene Darstellung, Zeichnungen: pixabay.de). Die Tiere der beiden Familien sind jeweils untereinander fortpflanzungsfähig.

2. Zielsetzung

Die molekulargenetische Analyse verschiedener Tierarten aus dem Heim- und Nutztierbereich hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.

Nicht nur im forensischen Kontext, sondern auch im privaten und im Bereich der Lebensmittelsicherheit kann es wichtig sein, die Identität eines Tieres, dessen Abstammung oder aber schlicht auch die involvierten Spezies als solches zu bestimmen. Die Entwicklung und Validierung speziesspezifischer Multiplex PCRs analog zu kommerziell bereits verfügbaren Methoden zur Analyse humaner Proben ist hierbei das Mittel der Wahl.

In der Lebensmittelsicherheit ist es in Zeiten von „Pferdefleischskandalen“ immer wichtiger, auch in bereits verarbeitetem Material, den Ursprung des Fleisches zu bestimmen. Die zu entwickelnde Methode soll dabei die Unterscheidung verschiedener Nutz- und Wildtiere gewährleisten. Da es sich um eine STR-basierte Analytik handelt, wäre es zusätzlich auch möglich, zu beurteilen, wie viele Individuen verarbeitet worden sind.

Die Fragmentanalyse soll dabei mit dem Genetic Analyzer ABI 3130 (Applied Biosystems™) analog zur Untersuchung humaner Proben und Multiplex-PCRs erfolgen. Die Gelelektrophorese soll das Mittel der Wahl für Fragmentanalysen bei einfacheren Fragestellungen, wie der Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen, sein.

Häufig ist es für Züchter schwierig, allein anhand von Verhaltensmerkmalen die Stellungsfähigkeit und das Aggressionspotenzial eines Hundes einzuschätzen. Für das spätere Einsatzgebiet des Tieres als Rettungs-, Jagd-, Schutz- oder Blindenhund sind jedoch je nach Anforderung jeweils verschiedene Faktoren und entsprechend Hunde unterschiedlicher Stellungsfähigkeit und Aggressionsbereitschaft gefordert. Mit der entwickelten PCR soll es möglich sein, eine genetische Einstufung bzgl. der Stellungsfähigkeit als auch des Aggressionspotenzials durchzuführen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt definieren:

1. Implementierung und Optimierung sowie die Entwicklung von STR-basierten Multiplex-PCRs zur Identifizierungs- und Abstammungsanalyse; bei ausgewählten Tierarten (Hund, Pferd, Katze) soll zusätzlich eine Methodik zur Mischlingsanalyse etabliert werden.
2. Entwicklung einer Methodik zur Speziesbestimmung mittels STR-basierter Multiplex-PCR.
3. Etablierung einer Methode zur genetischen Assoziationsanalyse bezüglich der Stellungsfähigkeit und Prädispositionen für aggressives Verhalten beim Hund.

3. Material und Methoden

3.1. Probenmaterial

Für das hier vorgestellte Projekt wurden verschiedene Probenmaterialien benötigt und untersucht:

- **Hunde** (n=250, 121 männlich, 129 weiblich) aus **83 Rassen** sowie **76 Mischlinge** wurden untersucht. Von 205 Tieren wurden Mundschleimhautabstriche aufgearbeitet, zusätzlich wurde DNA aus sechs Skelettmuskelgewebe- und zwölf Blutproben (acht Nativblut und vier Blutabstriche) extrahiert. Insgesamt wurden zusätzlich DNA Proben von **250** Tieren, die vorab bzgl. Ihrer Stellungsfähigkeit von einer Tierärztin begutachtet wurden, für die Bestimmung der genetischen Prädisposition für die Stellungsfähigkeit bzw. gesteigerter Aggressivitätsbereitschaft analysiert. Für die Untersuchung der Proben wurde stets ein Meldebogen mit Einverständniserklärung der Halter eingeholt und die Daten anonymisiert in der Datenbank (s. 3.3) gespeichert. Die Probenentnahmen erfolgten im Rahmen von Welpen- und Hundekursen, im Tierheim sowie durch die Tierhalter selbst oder durch befreundete Tierärzte. Bei den Hunden handelt es sich um Tiere aus dem gesamten Bundesgebiet, wobei das Gros der Proben von schleswig-holsteinischen Hunden stammt.
- Es wurden DNA Proben von **133 Pferden** (55 weiblich, 77 männlich) aus **46 Rassen** analysiert. Von 130 Tieren wurde DNA aus Mundschleimhautabstrichen extrahiert, zusätzlich standen drei Blutproben (nativ) zur Verfügung. Die für die Hunde bereits etablierte Methodik (s. 3.9.2, 3.9.3, 3.9.4) und Datenbankanwendung wurde im Rahmen einer während dieser Doktorarbeit betreuten Masterarbeit validiert. Wie auch bei den Hunden wurde von jedes untersuchte Tier ein Meldebogen mit Einverständniserklärung der Halter zur genetischen Untersuchung ausgefüllt. Die Proben wurden eigenhändig oder durch die Besitzer in diversen Reitställen in Kiel und Umgebung entnommen. Die Blutproben wurden von befreundeten Tierärzten zur Verfügung gestellt.
- Bei der Untersuchung der **Katzen** wurde die DNA von **123** Individuen (57 männlich, 66 weiblich) analysiert. Es wurden 113 Mundschleimhautabstriche aufgearbeitet. Zusätzlich wurden neun Blutproben sowie acht Gewebeproben analysiert. Die Validierung der entwickelten Methodik und der Software wurde im Rahmen einer während dieser Doktorarbeit betreuten Medizin-Doktorarbeit auf weitere forensische Anwendungsspektren überprüft. Für jedes untersuchte Individuum wurde die Einverständniserklärung der Halter eingeholt und die Daten anonymisiert in der entwickelten Datenbank abgelegt. Die Probenentnahme erfolgte selbsttätig bei Züchtern in der Umgebung von Kiel und Bad Segeberg oder durch die Halter selber. Sowohl die Gewebe- als auch die Blutproben wurden von einer befreundeten Tierärztin zur Verfügung gestellt.

-
- Insgesamt wurden Proben von **zehn Koi-Karpfen** (4 männlich, 6 weiblich) wurde analysiert. Dabei handelte es sich um DNA aus Abstrichen des an den Schuppen sezernierten Schleims, aus **Schuppen** von drei Individuen sowie **Muskelgewebe** von drei Individuen. Ergänzend zur Zuchtform des Karpfens, wurde die DNA eines **Wildkarpfens** sowie **Spiegelkarpfens** analysiert. Bei allen Zuchtkois handelte es sich um gekaufte Tiere, die für wenige Tage in einem Aquarium gehalten, beprobt und anschließend im Teich eines Züchters ausgesetzt wurden. Die Schuppen und das Muskelgewebe wurden von einer Zoohandlung in Form verstorbener Tiere zur Verfügung gestellt. Die Proben des Wild- und Spiegelkarpfens wurden bei einem lokalen Fischhändler erworben.
 - **Kaninchen** (n=10, 5 männlich, 5 weiblich) wurden aus drei Rassen ausgewählt. Zur Validierung dienten **drei Gewebeproben** aus dem Muskel verschiedener Tiere. Zusätzlich wurde DNA aus **zwei Blutproben** sowie **fünf Mundschleimhautabstrichen** extrahiert. Die Gewebe- und Blutproben wurden von einer bekannten Tierärztin im Rahmen ihrer Tätigkeit abgenommen und mit Einverständnis der Halter für diese Doktorarbeit zur Verfügung gestellt. Die Abstriche wurden selbst oder durch die Halter vorgenommen und die jeweiligen Daten anonymisiert in der Datenbank verarbeitet. Eine zusätzliche Validierung der Methode und Software wurde im Rahmen einer während der Doktorarbeit betreuten Medizin-Doktorarbeit an weiteren **98** Individuen durchgeführt.
 - Es wurden **10 Kamele** (4 männlich, 6 weiblich) untersucht. Dabei handelte es sich um **fünf Proben von Altweltkamelen** (Dromedar, Trampeltier) sowie **fünf Neuweltkamele** (Alpaka). Zusätzlich stand eine Gewebeprobe in Form von getrocknetem Muskelfleisch zur Verfügung. Die Mundschleimhautabstriche wurden vom Tierpark Hagenbeck sowie dem Tierpark Gettorf während tierärztlicher Routineuntersuchungen entnommen. Die Gewebeprobe wurde im Spezialfutter-Handel erworben.
 - Zur Validierung der Multiplex-PCR für die **Speziesidentifikation** wurden **20 Stück Rehwild, Damwild und Rotwild, zehn Wildschweine, fünf Dachse, sieben Feldhasen** sowie diverse kommerziell erhältliche Fleischprodukte (**Rind, Hausschwein, Pferd, Schaf, Ziege, Pute und Huhn**) analysiert. Es wurde bei der Probenauswahl der Individuen darauf geachtet, dass beide Geschlechter sowie verschiedene Altersstufen vertreten waren. Die Validierung sowie eine Studie zur Anwendbarkeit auf fäulnisveränderte Proben der Wildtier-Multiplex erfolgte im Rahmen einer während dieser Doktorarbeit betreuten Masterarbeit statt. Die Nutztier-Multiplex wurde ergänzend in Form einer ebenfalls im Rahmen dieser Doktorarbeit betreuten Medizin-Doktorarbeit auf Ihre Anwendbarkeit an verschiedenen Wurst- und Fleischwaren sowie Mageninhalt humanen Ursprungs hin überprüft.

3.2. Probenentnahme

Als Probenmaterial dienten primär **Abstriche der Mundschleimhaut**, um wenig invasiv zu sein und die Entnahme durch den Tierbesitzer so einfach wie möglich zu gestalten. Zur Anfertigung der Abstriche wurden die selbsttrocknenden Abstrichtupfer forensix© der Firma Prionics® sowie Forensic Swab© der Firma Sarstedt® verwendet.

Die Probenentnahme ist in Abb. 5 exemplarisch beim Hund gezeigt, die Entnahme von Mundschleimhaut Abstrichen bei den übrigen Spezies wurde analog vorgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Tiere, sofern möglich (bei Kaninchen und Koi-Karpfen ist dies schwierig zu kontrollieren) mindestens 30 Minuten vor der Entnahme keine Nahrung oder Flüssigkeit zu sich genommen hatten.



Abb. 5: Veranschaulichung der Probenentnahme von Mundschleimhautabstrichen beim Hund (exemplarisch). Die Lefze des Tieres wird vorsichtig nach oben geschoben und mit dem Abstrichtupfer mit etwas Druck die Flächen oberhalb der Zahnreihe sowie die Lefzeninnenflächen abgerieben.

Die Beprobung der **Koi-Karpfen** erfolgte durch Abreiben des mit Schleim-überzogenen Körpers, da eine Mundschleimhaut Beprobung zu keinen Ergebnissen führte.

Blut- und Gewebeproben wurden von befreundeten Tierärzten im Rahmen von Routineuntersuchungen bzw. -operationen entnommen. Fleisch- und Wurstproben wurden im Fachhandel oder bei lokalen Händlern erworben.

3.3. Datenverwaltung

Für die Verwaltung der anfallenden Daten sowie zur automatischen Auswertung der Ergebnisse wird eine Datenbank benötigt. Zu diesem Zweck kam die Speziesdatenbank „Wookie“ (MeMo Forensics, 2012) zum Einsatz. Neben der reinen Speicherung von Projekt- und Probanddaten wurden der Software diverse Zusatzmodule zur Analyse von genetischen Fingerabdrücken, Erstellung von Allelfrequenzdaten, Schnittstellen zu Analysegeräten, Asservatenverwaltung, Hilfestellung bei Extraktionen sowie Herstellen von Mastermixen für die verschiedenen PCRs, Erstellung von EAN128 Barcodes und QR Codes und vielen weiteren Zusatzfunktionen hinzugefügt.

Es wurde darauf geachtet, ein Programm zu nutzen, welches möglichst Ressourcen-schonend und performant arbeitet. Zusätzlich sollte die Datenbank zeitnah auf jedem Server implementierbar und ohne zusätzliche Installation im gesamten Netzwerk nutzbar sein.

Die Wookie Datenbank ist in sieben verschiedene Spezies (derzeit Hund, Katze, Pferd, Koi-Karpfen, Kamel, Kaninchen und Falke) sowie Fleischanalysen untergliedert (Abb. 6), wobei sich der Funktionsumfang je nach Spezies unterscheiden kann.

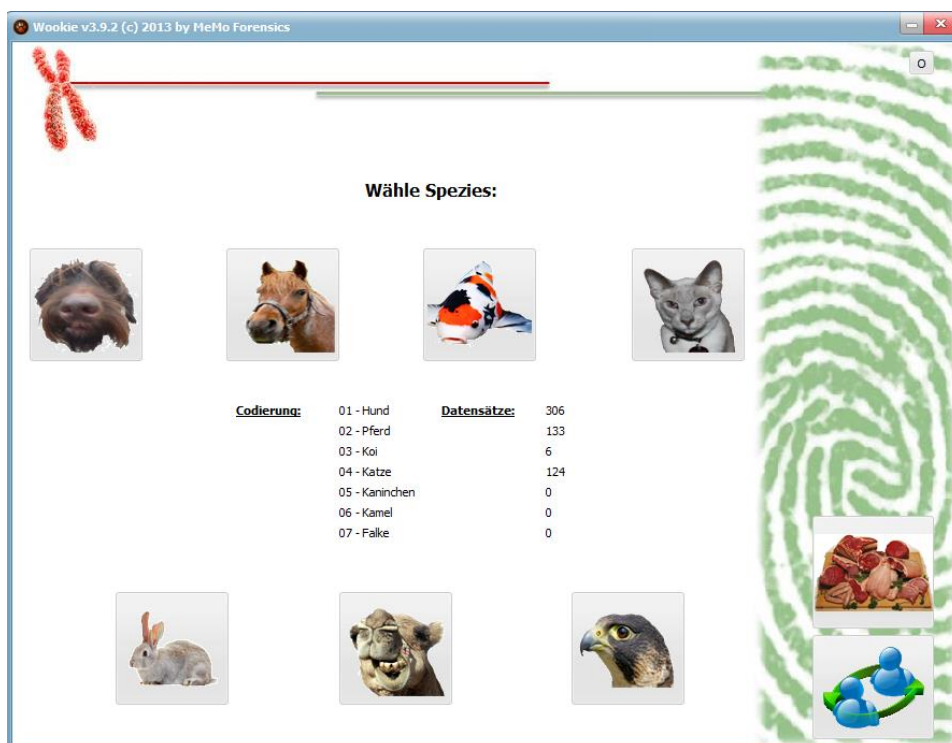


Abb. 6: Bildschirmfoto des Startfensters der Wookie Datenbank v3.9.2 (Stand Dezember 2013). Über die verschiedenen Buttons sind die verschiedenen Funktionen für die entsprechende Spezies aufrufbar. Zusätzlich ist die numerische Codierung sowie die aktuell hinterlegte Anzahl an Datensätzen für die jeweilige Spezies ablesbar. Ergänzend ist rechts die Fleisch Datenbank anwählbar.

3.4. DNA Extraktion

Die Extraktion der DNA erfolgt routinemäßig semi-automatisch mit Hilfe eines KingFisher® Flex und KingFisher® Duo Gerätes via magnetic beads Methodik. Die semi-automatische Extraktion wird bevorzugt eingesetzt, da die Methodik einfacher und schneller in der Handhabung ist. Zusätzlich liefert die semi-automatische Extraktion aber die gleiche bzw. sogar mehr isolierte DNA und ist desweiteren pro Probe gerechnet auch kostengünstiger, als die manuelle Extraktion. Die DNA ausgewählter Proben der Canidae (Hunde) wurden zusätzlich mit einer auf der Silika-Membran basierten Methodik extrahiert.

3.4.1. Manuelle DNA-Extraktion

Für die manuelle Extraktion mittels Silika-Membran wird das kommerziell erhältliche SpinSwab© Kit der Firma strateg™ verwendet.

Die Abstriche werden abgeschnitten und komplett in ein vorab beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zu den Abstrichen werden 600 µl Lysis-Puffer G sowie 20 µl Proteinase K gegeben, kurz gevortext und für mindestens 15 Minuten im Thermoschüttler bei 65 °C inkubiert.

Im Anschluss an den Lysis-Schritt wird das übriggebliebene Abstrichmaterial entfernt und 300 µl Binding-Puffer T zur Probe pipettiert. Das Gemisch wird in einen zwei ml Filtereinsatz überführt und für eine Minute bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen, der Filtereinsatz mit der Silika-Membran zweimal mit jeweils 700 µl Wasch-Puffer versehen und jeweils 30 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert. In beiden Waschsritten ist das Filtrat zu verwerfen. Im Anschluss wird die Probe noch einmal für zwei Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert, um letzte Reste des Wasch-Puffers zu entfernen.

Der Filtereinsatz wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und in zwei Elutions-Schritten jeweils 60 µl vorgewärmter Elutions-Puffer hinzugegeben, mindestens eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die Probe jeweils eine Minute bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Filtrat enthält die isolierte DNA.

3.4.2. Semi-automatische DNA-Extraktion

Die semi-automatische Extraktion erfolgt mit zwei unterschiedlichen Kits der Firma stratec™. Mundschleimhaut-Abstriche von Fleischfressern (Hund, Katze) und Haut-Abstriche bei Koi-Karpfen, Blut, Federn sowie Gewebe werden mithilfe des kommerziell erhältlichen InviMag® KF Blood Kits extrahiert. Potenziell mit Pflanzenmaterial kontaminierte Proben, wie Mundschleimhaut-Abstriche von Pferden, Kamelen und Kaninchen, werden mithilfe des InviMag® KF Plant Kits aufgearbeitet.

Bei der hier verwendeten semi-automatischen Methodik handelt es sich um eine Extraktionsmethode mittels beschichteter Magnetpartikel und liegt folgendem Prinzip zu Grunde (Abb. 7):

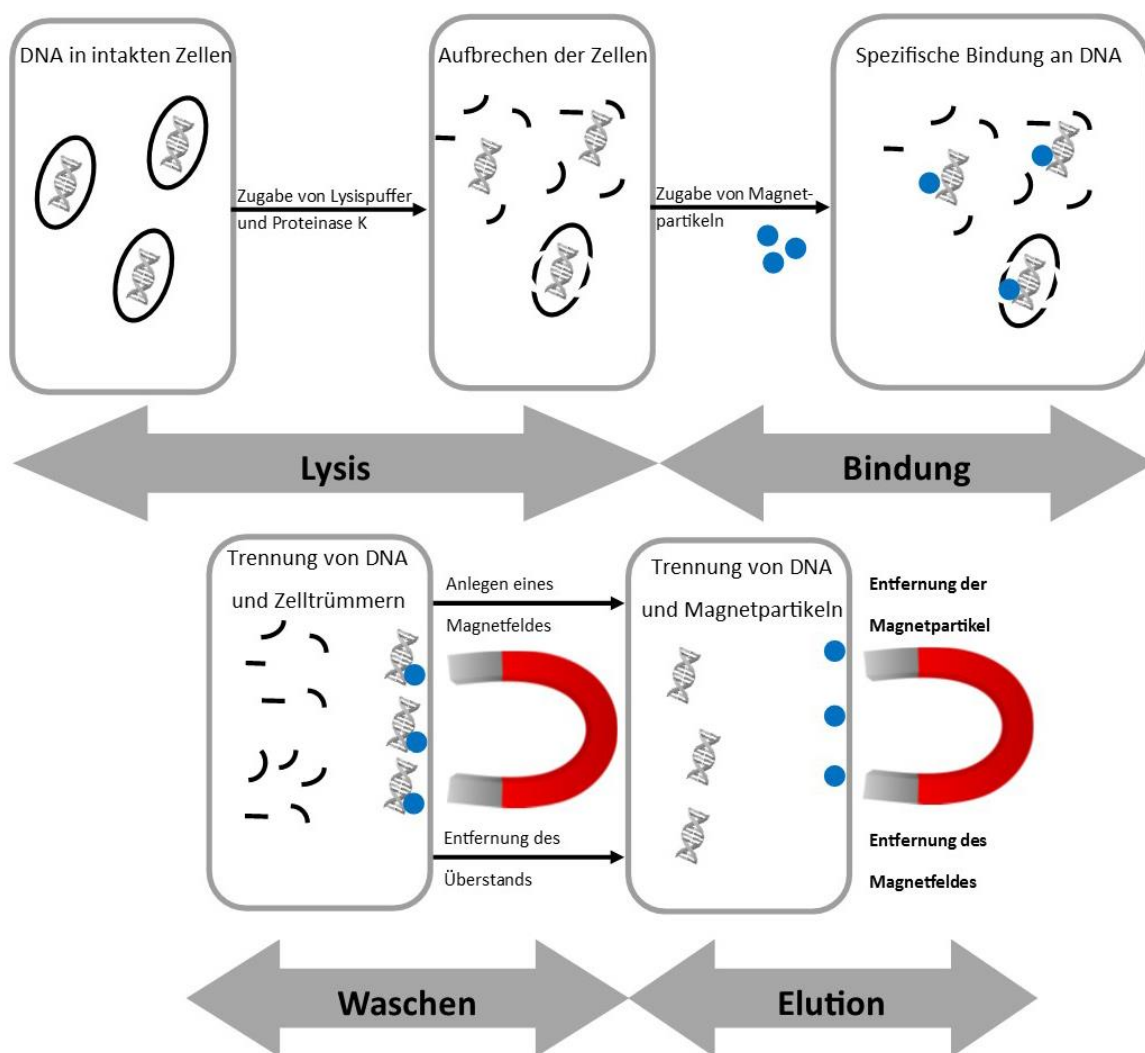


Abb. 7: Schematische Darstellung einer semiautomatischen Extraktion mittels Magnetic Beads Prinzip (eigene Darstellung). Die Extraktion erfolgte im KingFisher® Duo bzw. im KingFisher® Flex.

Nach dem Aufbrechen der Zelle durch Lysis Puffer und Proteinase K wird die negativ-geladene DNA an der Oberfläche der Magnetpartikel (MAP solution) gebunden. In drei Waschschrritten wird die DNA von Zelltrümmern und Proteinresten gereinigt, um dann im Elutionspuffer in isolierter Form wieder von den Magnetpartikeln getrennt zu werden.

3.4.2.1. Extraktion mittels InviMag® KF Blood Kit

Das Probenmaterial wird abgeschnitten bzw. bei Gewebeproben 100 mg mit einer Feinwaage abgewogen und in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 200 µl gekühlten PBS-Puffer versehen. Bei Blutproben wird 200 µl Flüssigkeit eingesetzt. Die Proben werden jeweils mit 200 µl Lysis-Puffer HLT und 20 µl Proteinase K versetzt. Das Gemisch wird für mindestens 15 Minuten bei 60 °C im Theroschüttler inkubiert. Das Abstrichmaterial sowie Gewebereste werden nach der Lysis entfernt und die gesamte Flüssigkeit aus den Eppendorf-Gefäßen in die Wells der Extraktionsplatte (Abb. 8) überführt.

<u>Well/Platte</u>	<u>Reagenz</u>
A	Binding
	Lysispuffer (200 µl) Proteinase K (20 µl) Sample (200 µl) Beads (270 µl)
B	Tips
C	Waschpuffer HLT (800 µl)
D	Waschpuffer M (900 µl)
E	Waschpuffer II (900 µl)
F	Leer
G	Leer
H	Leer
EL	Elution (100 µl)

Abb. 8: Übersicht über die in den Wells (KF Duo) bzw. Platten (KF Flex) eingesetzten Reagenzien. Angegeben ist jeweils die eingesetzte Komponente sowie dessen Volumen. Bei den Tips handelt es sich um einen (Duo) oder mehrere (Flex) Plastikämme, die über dem Magnetkopf des Geräts sitzen.

Nach einem zusätzlichen Lysis-Schritt im Gerät selbst, werden nach 15 Minuten die magnetic beads in Form der in Isopropanol-befindlichen MAP-solution zu den Proben pipettiert. Die Gesamtdauer für die Extraktion von 12 (KF Duo) bzw. 96 (KF Flex) Proben beträgt 56 Minuten und erfolgt mit dem nach Herstellerangaben (Suomalainen, et al., 2012) erstellten Extraktionsprotokoll „KFBlood“. Die

extrahierten Proben werden im Anschluss an die Extraktion in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit einem Barcode (EAN128) versehen.

3.4.2.2. Extraktion mittels Invimag® KF Plant Kit

Das Probenmaterial wird abgeschnitten bzw. bei mit Pflanzenmaterial-kontaminierten Gewebeproben (z.B. mariniertes Fleisch) 100 mg mit einer Feinwaage abgewogen und in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 200 µl gekühlten PBS-Puffer überführt. Die Proben werden jeweils mit 200 µl Lysis-Puffer HLT und 20 µl Proteinase K versetzt. Das Gemisch wird für mindestens 15 Minuten bei 60 °C im Thermoschüttler inkubiert. Das Abstrichmaterial sowie Gewebereste werden nach der Lysis entfernt und die gesamte Flüssigkeit aus den Eppendorf-Gefäßen in die Wells der Extraktionsplatte (Abb. 9) pipettiert.

Well/Platte	Reagenz
A	Binding
	Lysispuffer (400 µl) Proteinase K (20 µl) Sample (200 µl) Beads (220 µl)
B	Tips
C	Waschpuffer I (500 µl)
D	leer
E	Waschpuffer II (800 µl)
F	Waschpuffer II (800 µl)
G	leer
H	leer
EL	Elution (100 µl)

Abb. 9: Übersicht über die in den Wells (KF Duo) bzw. Platten (KF Flex) eingesetzten Reagenzien. Angegeben wurde jeweils die eingesetzte Komponente sowie dessen Volumen. Bei den Tips handelt es sich um einen (Duo) oder mehrere (Flex) Plastikschläuche, die über dem Magnetkopf des Geräts sitzen.

Nach einem zusätzlichen Lysis-Schritt im Gerät selbst, werden nach 10 Minuten die magnetic beads in Form der in Isopropanol-befindlichen SNAP-solution zu den Proben pipettiert. Die Gesamtdauer für die Extraktion von 12 (KF DUO) bzw. 96 (KF Flex) Proben beträgt 45 Minuten und erfolgt mit dem nach Herstellerangaben (Stratec, 2012) erstellten Extraktionsprotokoll „KFPlant“. Die extrahierten

Proben werden im Anschluss an die Extraktion in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit einem Barcode (EAN128) versehen.

3.5. Überprüfung von DNA-Qualität und Quantität

Die Quantifizierung der in dem Probenmaterial enthaltenen DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid-Färbung in einem zwei-prozentigem Polyacrylamid Gel. Anschließend erfolgte eine densitometrische Analyse der Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht. Die Analyse wurde mit einer selbstentwickelten Software (Modrow, et al., 2012).

3.5.1. Agarose - Gel - Elektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese werden DNA Fragmente in einem Agarose-Gel der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Agarose bildet dabei im Gel ein Maschengeflecht, in dem die DNA im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandert. Große DNA Fragmente wandern im elektrischen Feld weniger schnell durch das Geflecht als kleinere Fragmente. Dem Gel wird ein Fluoreszenzfarbstoff, wie Ethidiumbromid, beigemischt. Dieser interkaliert mit der DNA, sodass sich die verschiedenen Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar machen lassen.

Das Agarose Gel wird in einer Horizon 11-14 (Life Technologies™) für horizontale Gele gegossen. Hierzu werden 2 g Agarose (Biozym™) in 100 ml TE-Puffer in der Mikrowelle für drei Minuten bei 800 Watt aufgekocht und nach Abkühlung auf etwa 70 °C mit 5 µl Ethidiumbromid gemischt. Anschließend wird das Gemisch in den mit zwei Begrenzungen versehenen Schlitten der Gelkammer bläschenfrei gegossen und je nach Bedarf zwei Gelkämme mit 24 bzw. 12 Taschen eingesetzt. Das Gel wird zum Auspolymerisieren 30 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug belassen. Jeweils fünf µl extrahierte DNA wird mit fünf µl Gel-Ladepuffer (Roth®) versehen und eine Gesamtmenge von zehn µl des Gemischs in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wird in die erste und letzte Tasche des Gels eine DNA-Standard-Leiter (Hyperladder I oder IV, beide Bioline™) mitlaufen gelassen, um die spätere Quantifizierung der DNA zu ermöglichen. Ergänzend wird zur Qualitätskontrolle bei jedem zweiten Gel eine Positivkontrolle mit einer definierten Menge humaner DNA (10 ng, 100 ng) mitgeführt (Green, et al., 2005). An das Gel wird ein elektrisches Feld mit 130 V und 100 mA für 45 bis 60 Minuten angelegt.

3.5.2. Analyse mittels Membralyzer© Software

Zur Quantifizierung der DNA mithilfe des Gel Docs© von BioRAD™ angefertigten Fluoreszenzaufnahmen der DNA wurde die während der Diplomarbeit entwickelte Membralyzer© Software weiterentwickelt, sodass neben einer Protein-Quantifizierung auch die Quantifizierung von

DNA auf Agarose Gelen ermöglicht wurde (Modrow, et al., 2012). Im Unterschied zur Gel Doc© Software ist es mit der Membralyzer© Software möglich, Scans des Gels mit einer Farbtiefe von bis zu 48 bit (gegenüber 16 bit) zu analysieren, sodass eine Messung bis zu viermal genauer durchgeführt werden kann.

Die Software nutzt bei der Analyse die in die Grafiken eingebetteten Graustufenindices (GI). Im ersten Analyseschritt wird das aufgenommene Gelbild in das Grafikformular der Software geladen, invertiert und geschärft. Dabei erfolgt die Invertierung und Schärfung nach genormten Parametern, sodass die Messungen, auch anderer Gelbilder, untereinander vergleichbar bleiben. Im zweiten Schritt der Auswertung wird die auf dem Gel eingesetzte und aufgetrennte Leiter Bande für Bande eingelesen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Gesamt-DNA-Konzentration bekannt sein muss. Bei den im Rahmen dieser Promotionsarbeit analysierten Proben wurden die DNA Leitern Hyperladder© I und IV von der Firma Bionline™ verwendet. Mithilfe des von der Software automatisch berechneten Umrechnungsfaktors zwischen relativer DNA Konzentration und Graustufenindex lassen sich die einzelnen Banden nach der Markierung bzgl. der enthaltenen DNA quantifizieren.

3.6. Primerauswahl

Die Auswahl der Primer erfolgte zum einen aus verschiedenen Veröffentlichungen (Conyers, et al., 2012; Annavi, et al., 2011; Costa, et al., 2012; Cho, 2005; Consortium, 2012; Chen, et al., 2009; Mougél, et al., 1997; Ostrander, et al., 1993, Poetsch, et al., 2001; Vaiman, et al. 1994; Sadeghi, et al. 2009; Nanekarani, Amirinia und Amirmozofari 2011; Moran, 1993), wurden aber zum größten Teil mittels selbstentwickelter Software (STRAnalyzer©) ermittelt. Dabei liegt ein besonderer Fokus bei der Auswahl der Primer darauf, dass die von den Primern amplifizierten Fragmente sich in der späteren Multiplex-PCR nicht überschneiden und keine Primer-Dimere aufgrund von deckungsgleichen Sequenzabschnitten bildeten. Weiterhin sollen pro Spezies mindestens neun Genorte untersucht werden, sodass sich eine möglichst hohe Diskriminierungsrate ergibt. Die Primer sollen hochpolymorphe Genabschnitte flankieren und Fragmente mit einer Größe von 100 bis 450 Basenpaare amplifizieren.

Die Software scannt bei der Ermittlung von möglichen polymorphen Bereichen der DNA Whole Genome Sequenzen verschiedener Tiere, die vom Broad Institute öffentlich zum Download bereit stehen (Broad Institute, 2014). Im ersten Schritt werden von der Software nach dem Bernoulli-Prinzip mögliche zweifach, dreifach und vierfach Wiederholungsmuster erstellt, nach denen gesucht werden soll. Im zweiten Schritt bereitet die Software die häufig mehrere hundert Megabyte großen Sequenzen und mehrere Millionen Zeichen umfassenden Datensätze insoweit auf, dass diese sich mit der vorhandenen Hardware effizient analysieren lassen. Im letzten Schritt lädt die Software nach und nach die aufbereiteten Daten in das Analysemodul und scannt die Sequenzen simultan nach den Wiederholungsmustern und der Anzahl der Wiederholungen, wobei die Minimal-Anzahl skalierbar ist. Findet die Software eine polymorphe Region, werden ein 20 Basenpaar großer Vorwärts- und Rückwärts-Primer generiert, die den Bereich flankieren. Alle Ergebnisse lassen sich speichern und drucken.

Die Ergebnisse der Scans werden ergänzend mit bereits veröffentlichten Primersequenzen verglichen und die Primer ggf. angepasst. Zusätzlich werden die einzelnen Primersequenzen bzgl. ihrer Speziespezifität mit dem Online Tool blastn suite der National Library of Medicine getestet, um Kreuzreaktionen der Primer bei verschiedenen Spezies zu minimieren.

Die Primer werden sofern nicht anders angegeben von der Firma Biomers™ gefriergetrocknet angeliefert und laut Herstellerangaben mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 100 mM gebracht. Alle Primer werden am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Für den Primermix werden die Vorwärts- und Rückwärts- Primer auf zehn mM verdünnt bzw. pur (100 mM) eingesetzt, die jeweils zusammengehörenden Primerpaare eins zu eins gemischt und mit jeweils zehn µl Volumen in den Primer Gesamtmix eingesetzt

3.7. Nomenklatur der STR-Systeme

Sofern nicht anders angegeben, entspricht die Nomenklatur der STR-Systeme bei den verschiedenen Spezies den Vorgaben der ISAG und ISFG zur STR Analyse bei Tieren (Budowle, et al. 2005). Mit Ausnahme der Koi-Karpfen und bei der PCR der Multiplex-PCR zur Speziesbestimmung ist der Name des Marker von der Benennung des jeweiligen Chromosoms sowie ggf. zusätzlich der Position auf diesem abgeleitet (z.B. bei der Katze F53) oder die Marker erhalten einen festgelegten Namen nebst Nummerierung (z.B. bei den Pferden HMS3 = **H**orse **M**icrosatellite 3). Beim Koi-Karpfen leitet sich die Nomenklatur aus einer Abkürzung für *common carp* (Cca) bzw. KOI sowie dem Chromosom ab, auf dem der Genort lokalisiert ist. Bei der Speziesbestimmung wird eine dreistellige englische Abkürzung der Spezies (z.B. Pferd, engl.: *horse*, Abkürzung: HRS) sowie einer Durchnummerierung der Systeme (z.B. COW-1 und COW-2).

3.8. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient allgemein der künstlichen Vermehrung von speziellen DNA Fragmenten. Für die Reaktion werden eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen Template-DNA, passende fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (Primer), Dinukleotide (dNTPs) sowie günstige Pufferbedingungen und als Co-Faktor zur Bindung der Polymerase an den Strang, Magnesium in Form von Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) benötigt.

Das Protokoll für die hier verwendete PCR gliedert sich in fünf Schritte: die initiale Aktivierung der Polymerase bei 94 °C bis 95 °C, einen Denaturierungsschritt, einen Primerhybridisierungsschritt und einen Elongationsschritt sowie eine Finale Elongation bei 72 °C. Im Denaturierungsschritt, bei einer Temperatur von 94 °C – 95 °C, trennt sich der Doppelstrang der Template DNA. Im nachfolgenden Primerhybridisierungsschritt, bei einer Temperatur von 50 °C – 65 °C, hybridisieren die Oligonukleotide (Primer) an die einzelstrangige Template-DNA.

Das Temperaturoptimum der Polymerase liegt bei 72 °C. Die Elongationsphase findet daher bei dieser Temperatur statt. Dabei werden von der Polymerase die Oligonukleotide solange verlängert, bis wieder ein Doppelstrang vorliegt (Mülhardt, 2009). So findet nach jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA Moleküle statt (Abb. 10).

Bei den im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Temperaturprofilen wurden aufgrund theoretisch verschiedener Temperaturbindungsoptima der Primer (Mülhardt, 2009) bei einigen Spezies zwei Temperaturzyklen verwendet (Abb. 10, großer grauer Kasten). Sofern nicht anders angegeben, werden die Primer zunächst in einer Singleplex jeweils einzeln getestet. Nach erfolgreicher Validierung der Einzelprimer werden alle Primer mit der gleichen radioaktiven Markierung in einer PCR eingesetzt, um diese nach der Verifizierung zu einer Multi-Plex zusammenzuführen. Es wird jeweils ein Volumen von 1-2 μ l DNA Template bei einer enthaltenen DNA Menge von 5-10 ng eingesetzt, sofern nicht anders angegeben. Eine detaillierte Übersicht der verschiedenen Profile für alle PCRs der verschiedenen Spezies findet sich im Anhang.

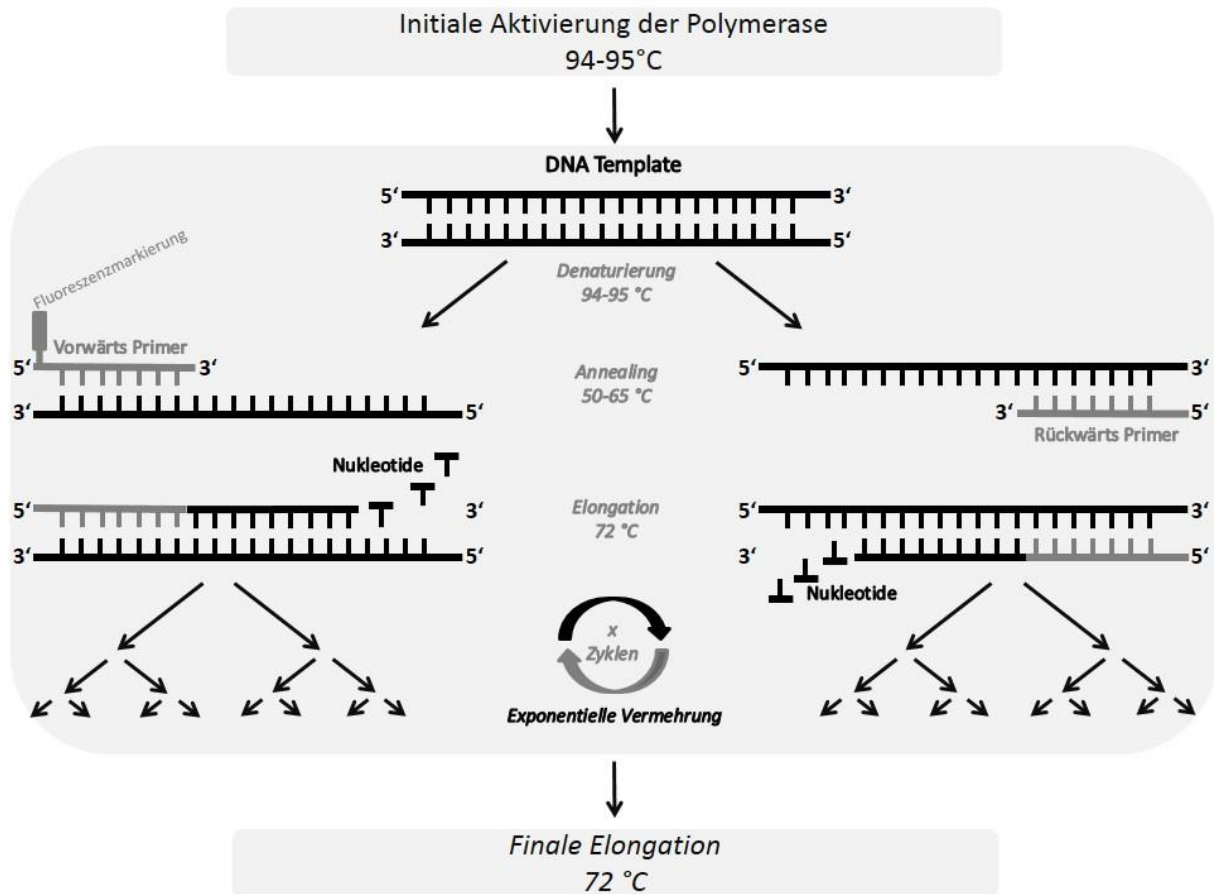


Abb. 10: Schematische Übersicht eines PCR-Zyklus (eigene Darstellung). Nach der initialen Aktivierung der Polymerase bei 94 °C bis 95 °C wird in der Denaturierungsphase bei 94 °C–95 °C der DNA-Doppelstrang getrennt. In der Primerhybridisierungsphase lagern sich die fluoreszenzmarkierten Primer an die Einzelstränge. Bei einer Temperatur von 72 °C findet die spezifische Verlängerung (Elongation) der Primer statt. Im Anschluss erfolgt eine finale Elongation bei 72 °C.

3.8.1. Multiplex-PCR

Von allen im Rahmen der Doktorarbeit untersuchten Spezies wurde mithilfe kommerziell erhältlicher oder selbstentwickelter Multiplex-PCR Kits mit mindestens neun polymorphen Genorten ein sogenannter genetischer Fingerabdruck der Tiere erstellt. In erster Linie dient dieser der Identifizierung des entsprechenden Individuums. Die Methodik kann jedoch auch erweitert werden und für Assoziationsanalysen, wie z.B. die Mischlingsanalysen bei Hund, Katze und Pferd verwendet werden (s. 3.9.4). Alle erstellten Daten wurden in der Wookie Datenbank™ (MeMo Forensics, 2012) gespeichert und mithilfe des integrierten Identitätsrechner Moduls CalcSTR© (s. 3.9.2) sowie dem Modul zur Erstellung von Allelfrequenzdaten AllelFi© (s. 3.9.3) analysiert.

3.8.1.1. Hunde

Für die Analyse der Familie der Hunde (*Canidae*) werden zwei kommerzielle Multiplex PCR Kits verwendet. Das StockMarks® for Dogs Genotyping Kit Canine von Applied Biosystems™ umfasst zehn polymorphe Genorte und wird für einfache und kommerziell angebotene genetische Fingerabdrücke sowie die Mischlingsanalyse verwendet. Das Finnzymes® Canine Panel 1.1 beinhaltet 19 polymorphe STR-Marker sowie zwei Geschlechtmarker. Dieses Kit entspricht den Vorgaben der International Society of Animal Genetics (ISAG), wonach für eine Individualisierung mindestens 15 Genorte untersucht werden sollten. Das Canine Panel 1.1 wird daher für gerichtsverwertbare Gutachten verwendet. Beide Kits werden mittels MischSTR© Software für die Mischlingsanalyse verwendet.

Mithilfe des Stockmarks™ Kits werden die Genorte PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ05, PEZ20, PEZ12, PEZ03, PEZ06, PEZ08, und FHC2079 (Details siehe Tab. 24) untersucht. Für die Analyse werden 4,5 µl Mastermix mit einem µl DNA Template in einem nerbe plus™ PCR Streifen gemischt. Der Mastermix wird wie in Tabelle Tab. 1 angesetzt und mit dem in Tabelle Tab. 25 aufgeführten Temperaturprofil mit einem GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems™) amplifiziert.

Tab. 1: Pipettierschema des Mastermix' für das Stockmarks™ for Dogs Kit. Aufgrund der geringen Mengen werden mindestens vier Proben simultan angesetzt. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.

Komponente	Volumen (µl/Probe)
Stockmarks™ PCR Buffer	0,70
Magnesiumchlorid (25 mM)	0,18
Stockmarks™ dNTP Mix	1,20
AmpliTaq® Gold Polymerase (10x)	0,18
Stockmarks™ Primermix	1,40
Aqua bidest	0,80
DNA, Probe	1,00

Neben zwei geschlechtsspezifischen Markern (X,Y) auf dem Amelogenin-Gen, werden mithilfe des Finnzymes® Canine Panel 1.1 Kits die Genorte AHT121, AHT137, AHTh171, AHTh260, AHTk211, AHTk253, CXX279, FH2054, FH2848, INRA21, INU005, INU030, INU055, REN162C04, REN169D01, REN169O18, REN247M23, und REN54P11 untersucht (Details siehe Tab. 26). Mit Ausnahme von FH2054 handelt es sich nur um Di-Nukleotid Wiederholungsmuster, dessen Peaks sich im Elektropherogramm als Triaden darstellen. Für die Analyse werden neun µl Mastermix mit zwei µl DNA Template in einem nerbe plus™ PCR Streifen gemischt. Der Mastermix wird wie in Tabelle angesetzt und mit dem in Tabelle Tab. 27 aufgeführten Temperaturprofil mit einem GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems™) amplifiziert.

Tab. 2: Pipettierschema des Mastermix' für das Finnzymes™ Canine Panel 1.1 Kit. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt ¼ des Probenvolumens.

Komponente	Volumen (µl/Probe)
Canine Panel 1.1 Mastermix	5,00
Canine Panel 1.1 Primermix	5,00
DNA, Probe	2,00

Exemplarische Elektropherogramme für beide Kits sind im Anhang unter Abbildung Abb. 35 sowie Abb. 36 zu finden.

3.8.1.2. Pferde

Wie bei den Hunden werden zwei kommerzielle Multiplex PCR Kits verwendet zur Analyse der Pferde (*Equidae*) verwendet. Das StockMarks® for Horses Genotyping Kit Equine von Applied Biosystems™ umfasst 17 polymorphe Genorte. Das Finnzymes® Equine Panel 1.1 beinhaltet 17 polymorphe STR-Marker sowie zwei Geschlechtsmarker. Beide Kits entsprechen den Vorgaben der International Society of Animal Genetics (ISAG), wonach mindestens zwölf Genorte untersucht werden sollen, und beinhalten die Genorte VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1 und CA425.

Bei Verwendung des StockMarks® for Horses Genotyping Kits werden sieben µl Mastermix mit jeweils einem µl DNA Template in einem nerbe plus™ PCR Streifen gemischt und mit dem in Tabelle (Tab. 32) beschriebenen Temperaturprofil in einem GeneAmp® 9700 von Applied Biosystems™ vermehrt. Die Zusammensetzung des Mastermix' ist in Tabelle Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Pipettierschema des Mastermix' für das Stockmarks™ for Horses Kit. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.

Komponente	Volumen (µl/Probe)
Stockmarks™ Primermix	2,00
dNTPs	2,00
Aqua bidest	1,50
StockMarks™ PCR Buffer	1,25
AmpliTaq® Gold Polymerase (10x)	0,25
DNA, Probe	2,00

Bei Verwendung des Finnzymes™ Equine Panel 1.1 Kits werden acht µl Mastermix mit jeweils zwei µl DNA Template in einem nerbe plus™ PCR Streifen gemischt und mit dem in Tabelle (Tab. 33) beschriebenen Temperaturprofil in einem GeneAmp® 9700 von Applied Biosystems™ amplifiziert. Die Zusammensetzung des Mastermix' ist in Tabelle Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Pipettierschema des Mastermix' für das Finnzymes™ Equine Panel 1.1 Kit. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt $\frac{1}{4}$ des Probenvolumens.

Komponente	Volumen (μ l/Probe)
Equine Panel 1.1 Mastermix	5,00
Equine Panel 1.1 Primermix	5,00
DNA, Probe	2,00

Exemplarische Elektropherogramme für beide Kits sind im Anhang unter Abbildung Abb. 37 zu finden.

3.8.1.3. Koi-Karpfen

Für die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks für Koi-Karpfen wird eine selbst erstellte Multiplex-PCR genutzt. Diese ermöglicht die simultane Analyse von zwölf polymorphen Genorten (MFW4, Cca02, Cca04, Cca09, MFW26, MFW7, Koi105–106, Koi29–30, Cca28, Cca06, Cca24, Cca21), die im Gros spezifisch für den Koi-Karpfen (Zuchtform von *Cyprinus rubrofuscus*) sind (Abb. 11) (Chen, et al. 2009). Der Spiegelkarpfen, eine Zuchtform zur Fleischgewinnung von *Cyprinus carpio carpio*, lässt sich ebenfalls komplett mit der Multiplex darstellen.

Die Primer werden gemäß des definierten Standardprocedures (3.6) angesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung ist in Tabelle Tab. 36, die Volumina des Primermixes ist in Tabelle Tab. 37 aufgeführt.

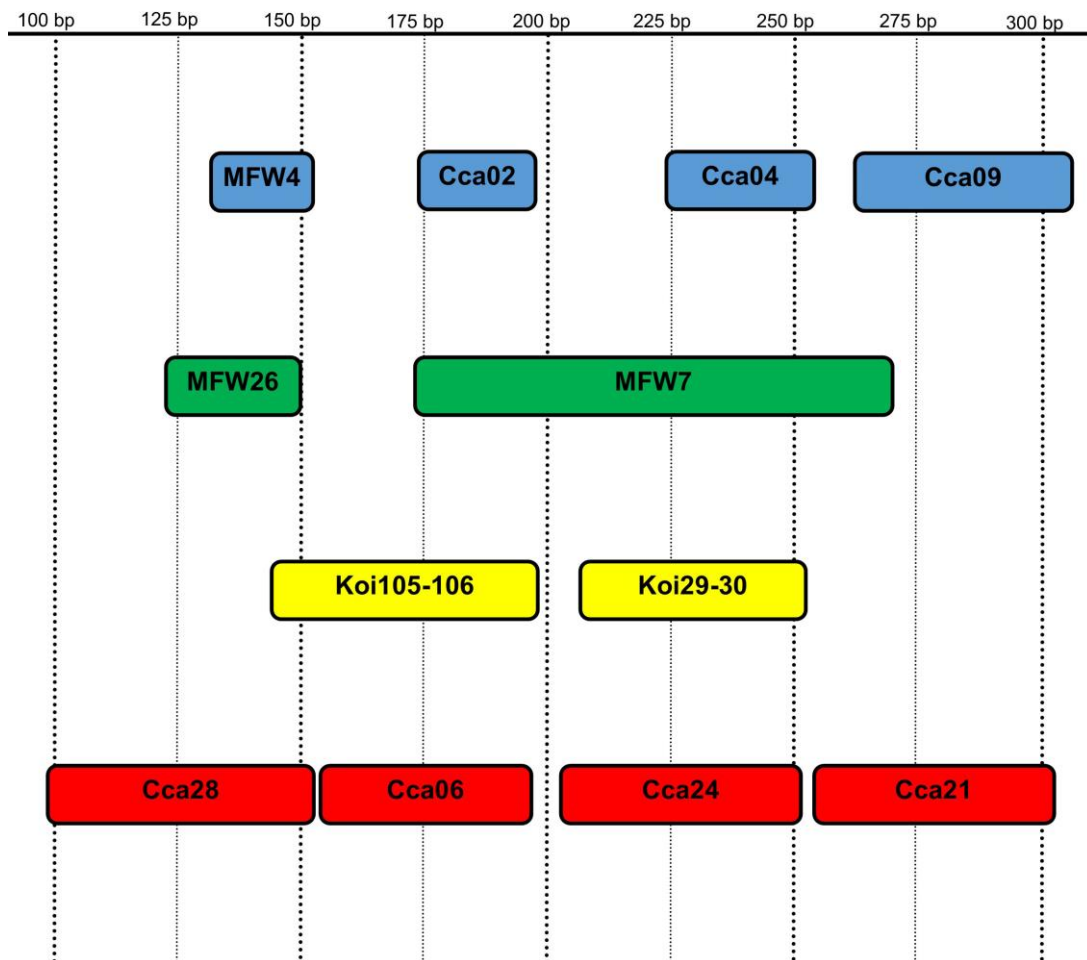


Abb. 11: Übersicht über die Koi Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, gelb=ATTO550, rot=ATTO565).

Es werden jeweils 20 µl des Mastermixes in nerbe plus™ 8-er PCR Streifen mit zwei µl DNA Template gemischt. Die PCR wird in einem GeneAMP 9700 Thermocycler mit dem in Tabelle Tab. 38 aufgeführten Profil durchgeführt. Der Mastermix wird wie in Tabelle Tab. 5 angesetzt.

Tab. 5: Pipettierschema des Mastermix' für die Koi Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.

Komponente	Volumen (µl/Probe)
Bioline™ ImmoMix	12,5
Primermix	4,00
DMSO	2,50
Aqua bidest	1,00
DNA, Probe	2,00

Exemplarische Elektropherogramme sind im Anhang unter Abbildung Abb. 39 zu finden.

3.8.1.4. Katzen

Bei der Analyse des genetischen Fingerabdrucks der Katzen werden 11 polymorphe Genorte (F53, C08, B04, G11, FCA441, D09, F124, C12, C09, F85, D06) (O'Brien, et al. 2002) nebst einem Geschlechtmarker auf dem SRY Gen untersucht. Die Nomenklatur der STR Genorte ergibt sich aus der von der ISAG angegebenen Morphologie der Autosomen (A1, A2, A3, B1, B2, B3, B4, C1, C2, D1, D2, D3, D4, E1, E2, E3, F1 und F2). Bei dem Genort FCA441 handelt es sich bereits um einen nach ISAG vorgeschlagenen Nomenklatur benannten Genort. Es handelt sich dabei um einen selbstentwickelten Assay mit Anlehnung an die Vorgaben der ISAG und an die 2002 von James Buttler entwickelte MEOW-Plex (Butler, et al. 2002).

Neben verschiedenen Hauskatzen lassen sich auch Teilprofile für Raub- und Großkatzen mithilfe der Multiplex-PCR darstellen.

Die Primer werden gemäß des definierten Standardprocedures (3.6) angesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung ist in Tabelle Tab. 34, die Volumina des Primermixes sowie die abweichenden Konzentrationen der Primer sind in Tabelle 6 (Tab. 6) aufgeführt.

Tab. 6: Pipettierschema für den Katzen-Primermix. Das Gesamtvolumen des Primermix' beträgt 120 µl. Zusätzlich ist der Fluoreszenzfarbstoff mit angegeben; die Farbe indiziert die emittierte Farbwellenlänge bei Bestrahlung mit einem Argonlaser.

lfd. Nr.	Genort	eingesetzte Konzentration (mM)	Farbstoff
1	F53	10	6-FAM
2	C08	10	6-FAM
3	B04	100	6-FAM
4	G11	100	6-FAM
5	SRY	10	JOE
6	FCA441	10	JOE
7	D09	10	JOE
8	F124	100	JOE
9	C12	100	JOE
10	C09	10	ATTO550
11	F85	10	ATTO550
12	D06	10	ATTO550

Es werden jeweils 20 µl des Mastermixes in nerbe plus™ 8-er PCR Streifen mit zwei µl DNA Template gemischt. Die PCR wird in einem GeneAMP 9700 Thermocycler mit dem in Tabelle Tab. 35 aufgeführten Profil durchgeführt. Der Mastermix wird wie in Tabelle Tab. 7 angesetzt.

Tab. 7: Pipettierschema des Mastermix' für die Katzen Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.

Komponente	Volumen (µl/Probe)
Bioline™ ImmoMix	12,5
Primermix	4,00
Aqua bidest	3,50
DNA, Probe	2,00

Exemplarische Elektropherogramme sind im Anhang unter Abbildung Abb. 38 zu finden.

3.8.1.5. Kaninchen

Bei der Analyse des genetischen Fingerabdrucks der Kaninchen werden 9 polymorphe Genorte (SAT16, SAT12, SAT3, SAT7, SAT5, SAT13, SAT8, SAT4, SAT2) (Kryger 2002)nebst einem Geschlechtsmarker auf dem Y-Chromosom untersucht (Abb. 12). Es handelt sich dabei um einen selbstentwickelten Assay mit Anlehnung an die Vorgaben der ISAG.

Neben verschiedenen domestizierten Kaninchenrassen lassen sich auch Wildkaninchen mithilfe der Multiplex-PCR darstellen.

Die Primer werden gemäß des definierten Standardprocedures (3.6) angesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung ist in Tabelle Tab. 40 aufgeführt.

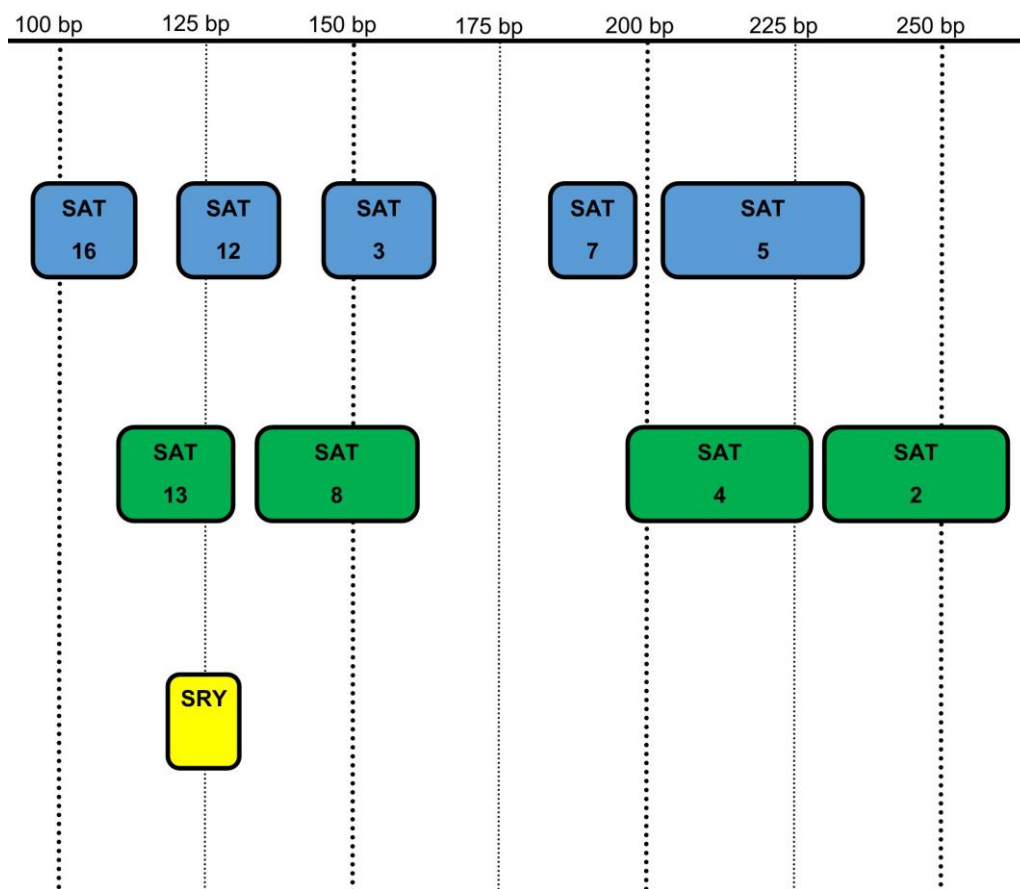


Abb. 12: Übersicht über die Kaninchen Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, gelb=ATTO550).

Es werden jeweils 20 µl des Mastermixes in nerbe plus™ 8-er PCR Streifen mit zwei µl DNA Template gemischt. Die PCR wird in einem GeneAMP 9700 Thermocycler mit dem in Tabelle Tab. 41 aufgeführten Profil durchgeführt. Der Mastermix wird wie in Tabelle Tab. 8 angesetzt.

Tab. 8: Pipettierschema des Mastermix' für die Kaninchen Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.

Komponente	Volumen (μ l/Probe)
Bioline™ ImmoMix	12,5
Primermix	4,00
Aqua bidest	3,50
DNA, Probe	2,00

Exemplarische Elektropherogramme sind im Anhang unter Abbildung Abb. 40 zu finden.

3.8.1.6. Kamele

Bei der Analyse des genetischen Fingerabdrucks der Kaninchen werden 10 polymorphe Genorte (YWLL-44, YWLL-08, YWLL-38, VOLP-10, YWLL-59, VOLP-67, LCA-66, LCA-56, YWLL-09, LCA-63) untersucht (Abb. 13). Es handelt sich dabei um einen selbstentwickelten Assay mit Anlehnung an die Vorgaben der ISAG.

Neben den Altwelt-Kamelen (Dromedar und Trampeltier) lassen sich auch Neuwelt-Kamele, wie das Alpaka, mithilfe der Multiplex-PCR darstellen.

Die Primer werden gemäß des definierten Standardprocedures (3.6) angesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung ist in Tabelle Tab. 42 aufgeführt.

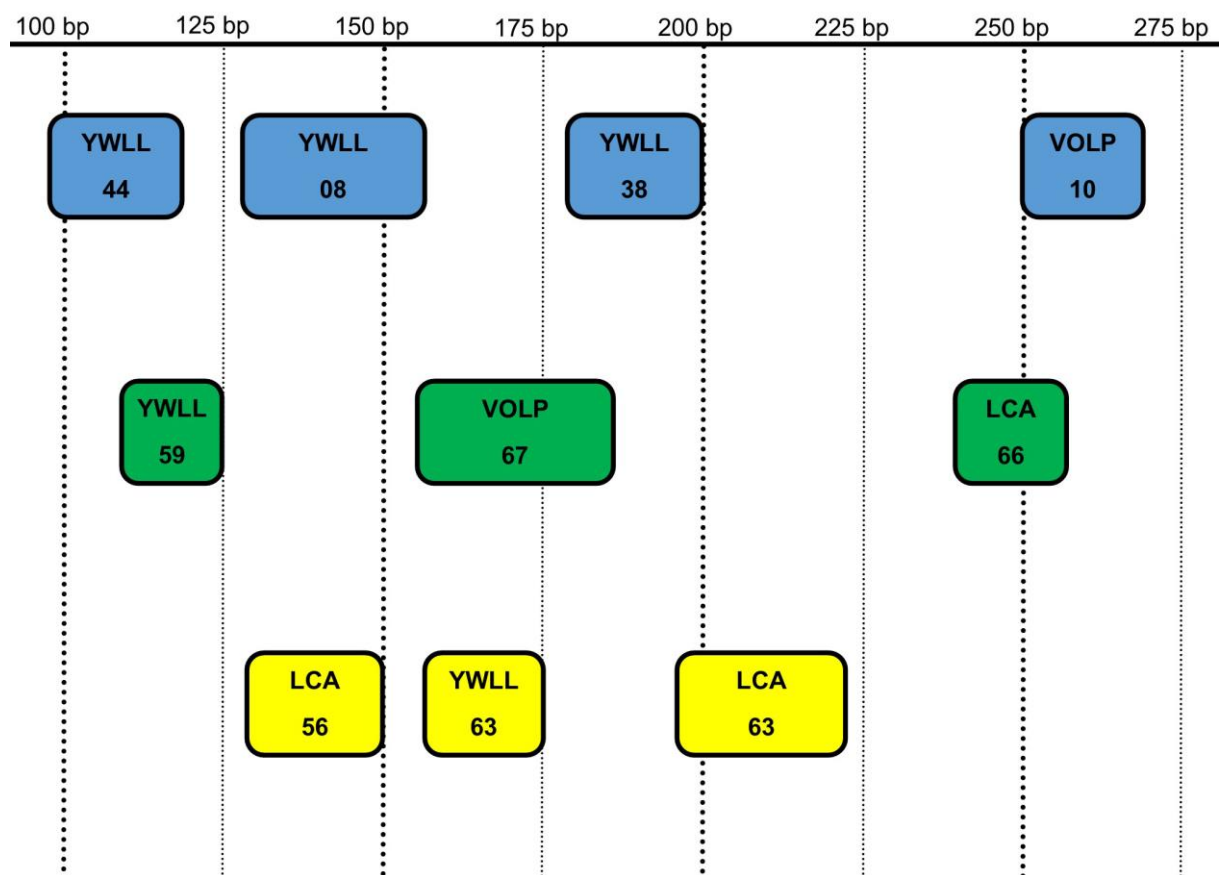


Abb. 13 Übersicht über die Kamel Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, gelb=ATTO550).

Es werden jeweils 20 µl des Mastermixes in nerbe plus™ 8-er PCR Streifen mit zwei µl DNA Template gemischt. Die PCR wird in einem GeneAMP 9700 Thermocycler mit dem in Tabelle Tab. 43 aufgeführten Profil durchgeführt. Der Mastermix wird wie in Tabelle Tab. 9 angesetzt.

Tab. 9: Pipettierschema des Mastermix' für die Kamel Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.

Komponente	Volumen (μ l/Probe)
Bioline™ ImmoMix	12,5
Primermix	4,00
Aqua bidest	3,50
DNA; Probe	2,00

Exemplarische Elektropherogramme sind im Anhang unter Abbildung Abb. 41 zu finden.

3.8.1.7. Speziesidentifizierung

Bei der Meat-Plex handelt es sich um eine STR-basierte Multiplex PCR, die den simultanen Nachweis der weit verbreitetsten europäischen Wildtiere (Hirsche, Wildschweine, Wildhasen und Dachse) sowie den meisten kommerziell genutzten Nutztieren (Rind, Pferd, Hausschwein, Schaf und Ziege). Insgesamt werden 20 Genorte analysiert (Abb. 14), wobei die Primer in eine Wild-Plex für die Wildtiere und eine Farm-Plex für die Nutztiere geteilt wird, um Primerinteraktionen während der PCR zu minimieren. Jeweils zwei μl der Amplifikate wird gemeinsam in die Fragmentanalyse gegeben.

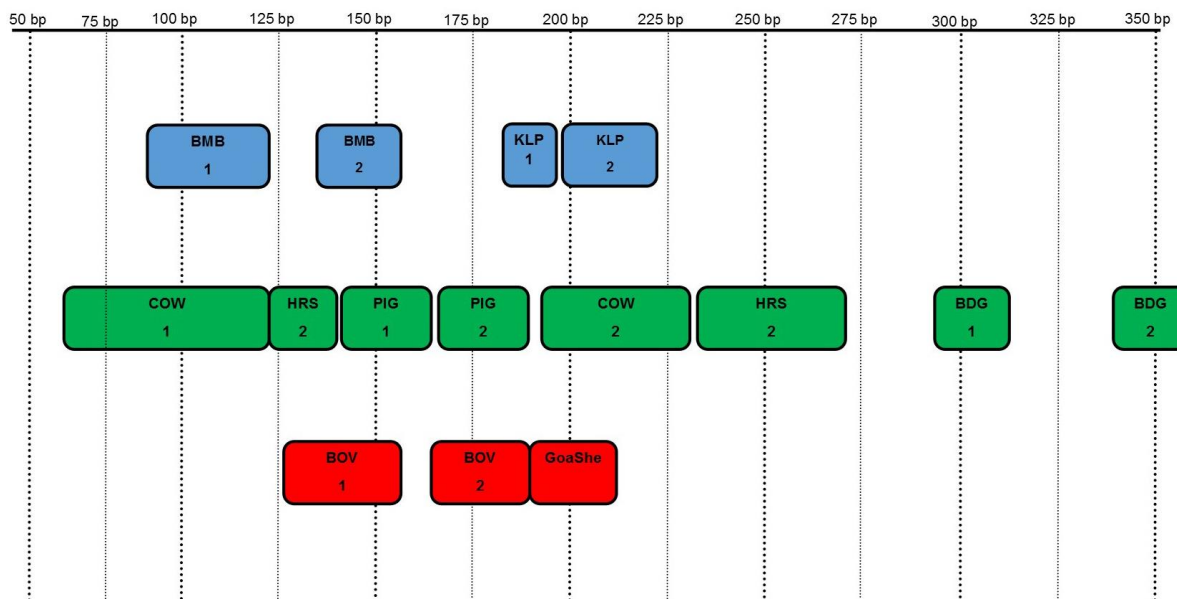


Abb. 14 Übersicht über die Meat-Plex Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, rot=ATTO565).

Die Primer werden gemäß des definierten Standardprocedures (3.6) angesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung ist in Tabelle Tab. 44 aufgeführt.

Die Primer SUS-1 und SUS-2 sowie PIG-1 und PIG-2 sind jeweils identisch und auf Wild- und Hausschweine anwendbar (Ferreira, et al. 2006, Costa, et al. 2012).

Es werden jeweils 11 μl des Mastermixes in nerbe plus™ 8-er PCR Streifen mit zwei μl DNA Template gemischt. Die PCR wird in einem GeneAMP 9700 Thermocycler mit dem in Tabelle Tab. 45 aufgeführten Profil durchgeführt. Der Mastermix wird wie in Tab. 10 angesetzt.

Tab. 10: Pipettierschema des Mastermix' für die Meat-Plexes. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen. Wird das Volumen der DNA Probe erhöht, wird weniger Volumen Wasser eingesetzt.

Komponente	Volumen (μ l/Probe)
Immo Buffer	1,25
Magnesiumchlorid (50 mM)	0,5
dNTP Mix	1,0
Immolase	0,1
Primermix (Wild-Plex, Farm-Plex, Fowl-Plex)	2,0
Aqua bidest	6,25 - 3,25
DNA, Probe	1,00 - 3,00

Exemplarische Elektropherogramme sind im Anhang unter Abbildung Abb. 42 und Abb. 43 zu finden.

3.8.2. Geschlechtmarker bei Koi-Karpfen

Zur Geschlechtsbestimmung bei Koi-Karpfen werden bereits aus der Literatur bekannte Primerpaare gewählt (Chen, et al., 2009). Die Geschlechtsbestimmung soll dabei als Ergänzung zur Erhöhung der Diskriminierungsrate bei den entwickelten genetischen Fingerabdrücken dienen.

Die unmarkierten Primer werden von der Firma Biomers™ gefriergetrocknet und laut Herstellerangaben mit TE-Puffer aufgefüllt. Für den Primermix werden die Vorwärts- und Rückwärts-Primer auf zehn mM verdünnt eingesetzt, die jeweils zusammengehörenden Primerpaare eins zu eins gemischt und mit jeweils zehn µl Volumen in den Primer Gesamtmix eingesetzt.

Es werden jeweils 20 µl des Mastermixes in nerbe plus™ 8-er PCR Streifen mit zwei µl DNA Template gemischt. Die PCR wird in einem GeneAMP 9700 Thermocycler mit dem in Tabelle Tab. 39 aufgeführten Profil durchgeführt. Der Mastermix wird wie in Tabelle Tab. 11 angesetzt.

Tab. 11: Pipettierschema des Mastermix' für die Geschlechtsanalyse beim Koi. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.

Komponente	Volumen (µl/Probe)
Bioline™ ImmoMix	6,25
Primermix	2,00
Aqua bidest	1,75
DNA, Probe	2,00

Die resultierenden Amplifikate werden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (3.5.1) der Größe nach aufgetrennt. Bei einem männlichen Koi, tritt sowohl bei der Untersuchung des Y-Chromosoms als auch des Genorts für das Haushaltsgen GAPDH ein Fragment von ca. 822 bp Länge auf. Bei weiblichen Fischen ist nur das GAPDH Gen als Bande nachweisbar.

3.8.3. Nachweis von Neurotransmitter-Rezeptor-Genen zwecks Ermittlung der genetischen Prädisposition für die Stellungsfähigkeit bei Hunden

Zur Ermittlung der Stellungsfähigkeit und genetischen Prädisposition für aggressives Verhalten von Hunden werden vier verschiedene Primer der Literatur entnommen (Hejjas, et al., 2009 ;Hejjas, et al., 2007; Hejjas, et al., 2007; Sparkman, et al., 2012; Kubinyi, et al., 2012), validiert und optimiert. Die Vorwärts-Primer für den Genort TH-4 (Tyrosin Hydroxylase Intron 4) sowie den Genort DAT-9 (Dopamin Transporter Intron 9) werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM blau markiert. Das 5'-Ende der Primer für den Genort DRD4-3 (Dopamin D4 Rezeptor Gen Exon 3) wird grün mit JOE und der Genort DBH-4 (Dopamin β -Hydroxylase Intron 4) gelb mit ATTO550 fluoreszenzmarkiert.

Die Multiplex-PCR wird in zwei PCRs geteilt, da die Primer für DAT-9 mit den übrigen Primern interagieren und Artefakte bilden. Die Primerpaare für TH-4, DRD4-3 und DBH-4 werden zusammen in eine PCR, DAT-9 in eine einzelne PCR gegeben. Die beiden Amplifikate werden eins zu eins dann in die Fragmentanalyse gegeben.

Die Primer werden gemäß des definierten Standardprocedures (3.6) angesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung ist in Tabelle Tab. 29 aufgeführt.

Es werden jeweils 10 μ l des Mastermixes in nerbe plus™ 8-er PCR Streifen mit zwei μ l DNA Template gemischt. Die PCR wird in einem GeneAMP 9700 Thermocycler mit dem in Tabelle (Tab. 29) aufgeführten Profil durchgeführt. Der Mastermix wird wie in Tabelle Tab. 12 angesetzt.

Tab. 12: Pipettierschema des Mastermix' für die Verhaltensanalyse beim Hund. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen. Wird mehr DNA Probe eingesetzt, wird entsprechend weniger Volumen Wasser eingesetzt.

Komponente	Volumen (μ l/Probe)
Bioline™ ImmoMix	6,25
Primermix	2,00
Aqua bidest	1,75 - 0,75
DNA, Probe	1,00 - 2,00

3.8.4. Sequenzierung mitochondrialer DNA

Die mitochondriale DNA (mtDNA) wurde nur bei den Hunden analysiert und diente der Ergänzung der Mischlingsanalyse auf STR-Assoziations-Basis. Aufgrund der maternalen Vererbung der mtDNA lässt sich diese Methodik nicht alleinstehend und entsprechend nur ergänzend zu der anderen Methode nutzen. Bei der Analyse der mitochondrialen DNA werden drei sich um jeweils zehn Basenpaare überlappende 307 bp bis 334 bp große Abschnitte untersucht (Gundry, et al. 2007, Schneider, Seo und Rittner 1999).

Ähnlich wie bei der Multiplex-PCR werden spezifische, unmarkierte Primerpaare, eine Polymerase, Dinukleotide sowie Magnesiumchlorid und geeignete Pufferbedingungen benötigt. Als Template dient mitochondriale DNA. Die Vorbereitung zur eigentlichen Sequenzierung am ABI© Prism™ 310 gliedert sich in vier Arbeitsschritte:

Zunächst werden die drei beschriebenen Fragmente der mitochondrialen DNA spezifisch vermehrt. Hierzu werden pro Probe 20 µl Mastermix mit fünf µl Template DNA versehen. Vorwärts- und Rückwärts-Primer werden von 100 mM auf 10 mM verdünnt, im Verhältnis eins zu eins gemischt und jeweils nur ein Primerpaar pro Probe verwendet (Tab. 13).

Tab. 13: Übersicht über den Master Mix für die erste PCR zur mtDNA Analyse. Das Gesamtvolumen pro Probe beträgt 20 µl, es werden 5 µl Template hinzugegeben.

Komponente	Volumen (µl/Probe)
Immobuffer (10x)	2,5
Magnesiumchlorid (50 mM)	0,75
DMSO	1,0
dNTPs (2,5 mM)	2,0
Immolase	0,2
Primermix (10 mM)	2,0
Aqua bidest	11,55
DNA, Probe	2,00

Im zweiten Schritt werden die Proben Invisorb® DNA CleanUp Kit von stratec™ aufgereinigt, um unspezifische DNA zu entfernen. Zunächst wird 130 µl Buffer P direkt zum Amplifikat in der Reaktionsgefäß pipettiert, die gesamte Probe auf ein vorher vorbereitetes 2 ml Eppendorf Gefäß mit Filtereinsatz gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Gemisch 30 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen pro Minuten zentrifugiert und das Filtrat verworfen.

Nun werden 700 µl Waschpuffer auf den Filtereinsatz gegeben, für 30 Sekunden zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Es folgt eine zusätzliche Zentrifugation für drei Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minuten. Der Filtereinsatz wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, 30 µl Elutionspuffer hinzupipettiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 60 Sekunden wird die DNA aus dem Filtereinsatz gelöst; das Filtrat enthält die gereinigte DNA.

Im dritten Schritt werden die spezifisch vermehrten DNA Fragmente mithilfe des BDT Ready Reaction Mix Kits (life™ technologies) mit fluoreszenzmarkierten dNTPs vermehrt. Hierzu wird pro Probe 16 µl Mastermix, bestehend aus vier µl des BDT Ready Reaction Mix', zwei µl des jeweiligen Vorwärts Primers (10 mM) und zehn µl Aqua bidest, mit vier bis acht Mikroliter der Probe. Das Temperaturprofil für die Sequenzierungs PCR ist im Anhang unter Tabelle Tab. 31 aufgeführt

Im letzten Schritt wird die Probe noch einmal mithilfe des DNA Dye Ex Kits (Quiagen™) von überschüssigen dNTPs gereinigt. Hierzu werden die im Kit enthaltenen Polymer-gefüllten Säulchen unten abgeknickt, der Deckel etwa zu einem Viertel aufgedreht und in ein 2 ml Sammelgefäß gesetzt. Das Säulchen wird im Sammelgefäß für drei Minuten bei 3.000 Umdrehungen pro Minuten zentrifugiert und anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Beim Pipettieren des Sequenzierungsprodukts wird darauf geachtet, dass die Schräge des Säulcheninhalts (das tiefere Ende nach innen) beibehalten, das Polymer nicht berührt wurde und die Probe nicht am Polymer vorbei lief. Die Probe wird drei Minuten bei 3.000 Umdrehungen zentrifugiert und das Säulchen entfernt. Das entstandene Eluat enthält das Sequenzierprodukt.

Im ABI© Prism™ 310 werden im Sammelgefäß 16 µl Formamid mit vier bis acht µl des Sequenzierprodukts versehen und mit den Dye-Set Parametern POP6® (Applied Bioscience™) und der Matrix BigDye v.3.1 analysiert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgt mit der Software BioEdit 7.1.11 von Tom Hall.

3.8.4.1. Automatisierter Sequenzabgleich mittels SeSca© Modul

Da sich die manuelle Auswertung der Sequenzierungen der mitochondrialen DNA als aufwendig und langwierig erwies, wurde für die Analyse ein Software-Modul entwickelt, welches die automatisierte Auswertung der Sequenzdaten ermöglicht. Das System verwendet dabei als Standard die sequenzierte DNA eines Sibirischen Wolfs (Broad Institute) und detektiert, analog zur Anderson Sequenz bei humaner mtDNA, die Abweichungen der detektierten Sequenz im Vergleich zur Standardsequenz des entsprechenden Abschnitts (Tab. 30).

Da in der mitochondrialen DNA häufig auch Mutationen in Form von Deletionen und Insertionen auftreten können, musste ein Algorithmus geschrieben werden, der entsprechende Abweichungen vor dem eigentlich Sequenzabgleich aufspürt, dokumentiert und die zu analysierende Sequenz so anpasst, dass ein Abgleich möglich ist.

Die gefundenen Mutationen werden jeweils in einem Extrafeld angezeigt und nach Angabe der Rasse der untersuchten Rasse als Standard für die spätere Mischlingsanalyse in der Datenbank gespeichert. In Abb. 15 ist ein Bildschirmfoto der Oberfläche der Software gezeigt.

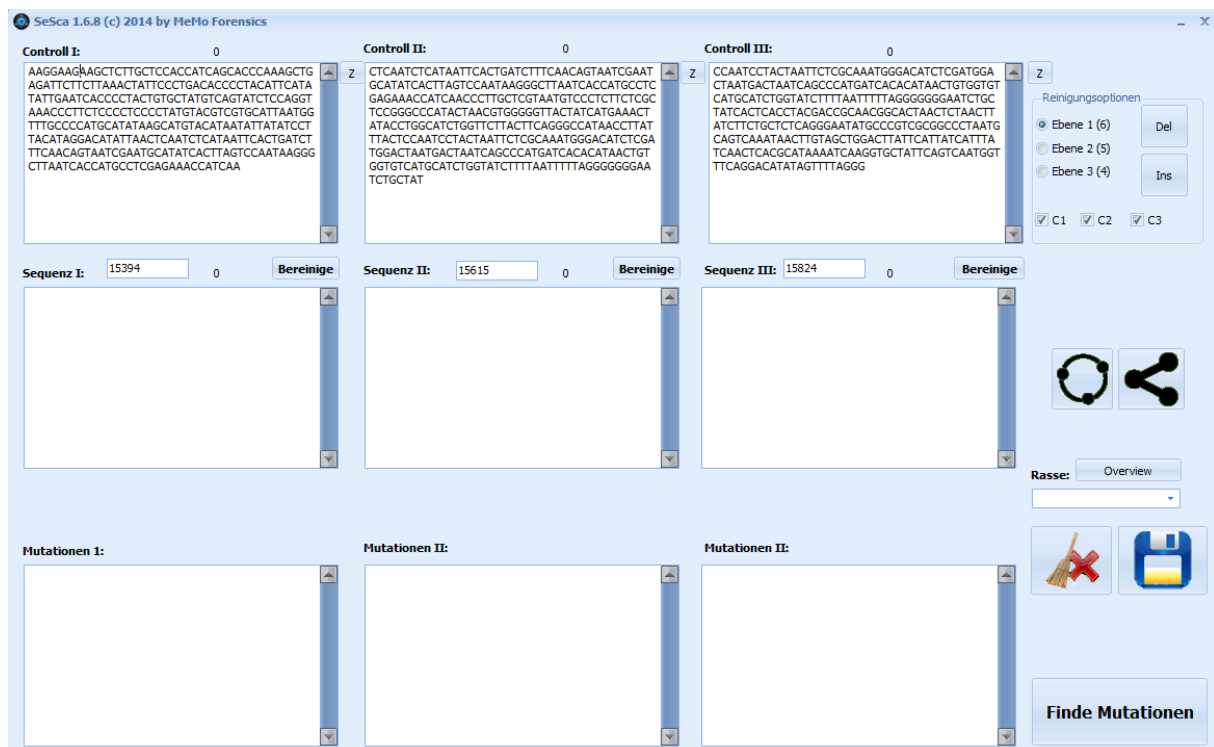


Abb. 15: Bildschirmfoto der Oberfläche der SeSca© Software. Oben in den Feldern Controll I bis III sind die jeweiligen Referenzsequenzen der drei verschiedenen mtDNA Bereiche hinterlegt. In den Feldern Sequenz I bis III werden die zu analysierenden Sequenzen eingefügt. Nach einem Klick auf die Buttons >>Del<<, >>Ins<< und >>Bereinige<< werden die Sequenzen auf Deletions- und Insertionsmutationen hin untersucht und entsprechend zur eigentlichen Analyse aufbereitet. Der Abgleich erfolgt nach einem Klick auf >>Finde Mutationen<<, die entsprechenden Abweichungen zur Referenzsequenz werden in den Feldern Mutationen I bis III angezeigt.

3.9. Kapillar-Elektrophorese

Bei der Kapillar-Elektrophorese laufen die DNA Fragmente durch eine mit einem Polymer gefüllte Kapillare. Dabei ist, wie bei der Gel-Elektrophorese (3.5.1), ein elektrisches Feld angelegt, durch das kleine DNA Fragmente schneller laufen als größere Fragmente. Die Fragmente werden während der Analyse von einem Argon-Laser erfasst, der den Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende des DNA Fragments anregt und die emittierte Wellenlänge des Farbstoffs wird mithilfe eines CCD Sensors detektiert. Mithilfe der verschiedenen Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe bei Anregung durch den Laser ist es möglich, gleichgroße Produkte verschiedener Primer simultan in einem Lauf zu analysieren. Das Gerät gibt die Ergebnisse der Analyse in Form eines Elektropherogramms aus. Dabei repräsentiert ein Peak jeweils ein Fragment, wobei die Fragmentgröße an der X-Achse abgelesen werden kann. Bei jeder Analyse läuft simultan ein DNA Größenstandard mit, um bei der anschließenden Auswertung mithilfe der GeneMapper® 3.4.1 Software die exakte Fragmentgröße ermitteln zu können.

Bei den im Rahmen der Doktorarbeit entwickelten Multiplex-PCRs werden jeweils ein bis drei Mikroliter DNA Template in 11,7 µl Formamid mit den DNA Größenstandards LIZ500 (vier Fluoreszenzfarbstoffe) bzw. ROX500 (drei Fluoreszenzfarbstoffe) gemischt. Die Proben werden dazu in eine 96-Well Platte (Applied Bioscience™) pipettiert und einem POP4® Polymer (Applied Biosystems™) in einer 36 cm Kapillare für 45 Minuten laufen gelassen. Die detaillierten Parameter des Geräts für die Messung sind im Anhang unter (Tab. 46) nachzulesen.

3.9.1. Besonderheiten bei der Auswertung

In der Speziesgenetik werden speziell STR-Systeme untersucht, die sich aus Dinukleotid-Wiederholungen zusammensetzen (Tozaki, 2001). Anstelle einzelner Peaks treten häufig „Orgelpfeifen-ähnliche“ aufsteigende Peaks zusätzlich zum Haupt-Peak auf. Bei diesen Stotterbanden handelt es sich um einen Mutationsprozess (*DNA-Slippage*) aufgrund einer Änderung in der Zahl der sich wiederholenden Einheiten durch verrutschte Strangverlängerung, die während der DNA-Replikation in der PCR stattfindet. Im Zuge der Replikation kann die Polymerase mehrfach „abrutschen“ (Brinkmann, 1998). Das zu kurze Amplifikat wird jedoch durch Wiederanlagerung der DNA-Polymerase während der Replikation ebenfalls exponentiell vermehrt. Es wird eine irreparable Schlaufe ausgebildet, die wiederum durch Deletion verkürzt oder entsprechend durch Duplikation verlängert wird (Murray, 1993). So entstehen 2-4 bp große Zusatzallele, die vor und nach dem eigentlichen Peak auftreten können. Bei Tetranukleotid-Wiederholungen sowie Komplex-Wiederholungen (z.B. (ATG)₃(CTGC)_n) wird dieses Phänomen weitaus weniger beobachtet (Walsh, 1996).

3.9.2. Auswertung der STR Daten mittels STR Identitätsrechner

Nach der Auswertung des Elektropherogramms mithilfe der GeneMapper® Software (Applied Biosystems™) lässt sich über eine Schnittstelle zur Wookie Datenbank™ (MeMo Forensics, 2012) der Datensatz importieren und eine Identitätsberechnung mithilfe des CalcSTR© Moduls durchführen. Dabei werden die ermittelten Fragmentlängen der spezifischen Genorte bezüglich ihres Auftretens in der entsprechenden Spezies Population mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichwichts und folgender Formeln errechnet:

$$(1) \text{Homozygotie} : G_{\text{hom}} = (\text{Allelfrequenz1})^2$$

$$(2) \text{Heterozygotie} : G_{\text{het}} = 2 \bullet (\text{Allelfrequenz1} \bullet \text{Allelfrequenz2})$$

$$(3) \text{Phänotypfrequenz} : P_{\text{ges}} = \prod_{i=1}^a \text{Genotypfrequenz}_i$$

$$(4) \text{Wahrscheinlichkeitsindex} : W_i = \frac{100}{(1 + P_{\text{ges}})}$$

$$(5) \text{Diskrimierungsrate} : D = \frac{1}{P_{\text{ges}}}$$

G_{hom} =Genotypfrequenz bei Homozygotie; G_{het} =Genotypfrequenz bei Heterozygotie; P_{ges} =Phänotypfrequenz; i =jeweiliger Genort; a =letzter Genort; W_i =Wahrscheinlichkeitsindex; D =Diskrimierungsrate

Alle Berechnungen werden von der Software automatisch durchgeführt, dabei können verschiedene Allelfrequenzdaten der Berechnung zu Grunde gelegt werden, um z.B. die größte Spezifität für die Hunderasse Deutsch-Drahthaar zu gewährleisten. Es können bereits veröffentlichte Datensätze aus früheren Papern oder selbst-erstellte Frequenzdaten des AllelFi© Moduls (3.9.3) verwendet werden. In Abbildung Abb. 16 ist ein Bildschirmfoto der CalcSTR© Software gezeigt. Das Modul berechnet nicht nur die Identitätswahrscheinlichkeit, sondern verwaltet auch die gesamten eingegebenen genetischen Fingerabdrücke, speichert diese und bereitet die Datensätze für die weitere Analyse mit dem AllelFi© Modul oder der STR-Assoziations-Analyse (Mischlingsanalyse) mit dem MischSTR© Modulen auf.

CalcSTR Dog Mode

Auswertung

Phänotypfrequenz: 5,038848E-11

WI: 99,9999999949612

Einer von: 19.845.806.026 (20 Milliarden) besitzt diese Merkmalskombination.

Bei Homozygotie nur Allel 1 eintragen, Allel 2 auf '0' belassen.

Neu berechnen

Solve

Genort	Allel 1	Allel 2	Genotyp-Frequenz
Pez1	110	114	0,04
Pez20	175	0	0,25
Pez8	231	239	0,04
FHC2054	154	0	0,09
Pez12	268	275	0,18
FHC2079	275	279	0,18
FHC2010	230	243	0,02
Pez3	116	137	0,1
Pez5	101	102	0,12
Pez6	176	180	0,18

Clear

ABI

Individuum: DOG-02-2012affb

verwandt

MischSTR

Generiere Gutachten

Abb. 16: Bildschirmfoto des CalcSTR® Moduls. In den Dropdown-Feldern wird die detektierte Fragmentlänge für den spezifischen Genort manuell eingegeben oder über die ABI Schnittstelle direkt importiert. Die Phänotypfrequenz wird in Echtzeit mit jeder Eingabe berechnet. Der Wahrscheinlichkeitsindex sowie die Diskriminierungsrate werden mit einem Klick auf >>Solve<< berechnet. Über den Button >O< lassen sich weitere Allelfrequenzdaten laden und mit einem Klick auf >>Neu Berechnen<< entsprechend neu analysieren.

3.9.3. Erstellung von Allelfrequenzdaten mittels AllelFi© Modul

Mithilfe des in die Wookie Datenbank™ (MeMo Forensics, 2012) integrierten AllelFi© Moduls lassen sich für die jeweils verwendete Multiplex PCR der verschiedenen Spezies Allelfrequenzdaten automatisch berechnen. Zunächst filtert die Software die möglichen Allele für die jeweiligen Genorte heraus. Dem Hardy-Weinberg-Theorem (homozygotes Merkmal:=1, heterozygotes Merkmal:=0,5) folgend, analysiert der Algorithmus die Fingerabdruck Datenbank nach den möglichen Allelen und ermittelt automatisch die Frequenz des Allels in der vorliegenden Population.

Da in der Datenbank auch immer die Rasse angegeben wird, lassen sich mithilfe des Moduls auch Frequenzdaten einer bestimmten Rasse, „definierte“ Mischlingsdaten von bis zu vier Rassen oder gepoolte Daten der Gesamtpopulation erstellen.

Alle Daten lassen sich über das Optionsfeld der CalcSTR© Module als Berechnungsgrundlage laden. Zusätzlich verfügt das AllelFi© Modul über eine Exportschnittstelle zum VAT Vaterschaftsrechner (Baur, 2007), sodass die erstellten Frequenzdaten auch für Verwandtschaftsanalysen in dem kommerziell erhältlichen Programm genutzt werden können.

3.9.4. Mischlingsanalyse mittels MischSTR© Software

Die MischSTR© Software (MeMo Forensics, 2014) wurde als Erweiterung der Analyse des genetischen Fingerabdrucks verschiedener Spezies entwickelt. Das Programm führt bei der Auswertung eine vollautomatische Assoziationsanalyse auf Basis der in der Wookie Datenbank™ (MeMo Forensics, 2012) hinterlegten genetischen Fingerabdrücke durch.

Im ersten Schritt werden Allelfrequenzdaten von jeder in der Datenbank befindlichen Rasse erstellt und gespeichert. Im Folgenden werden Analogien zwischen dem zu untersuchenden Profil und der entsprechenden Rasse gefiltert und als Wahrscheinlichkeitsindex aufgezeigt. Im letzten Schritt wird anhand der Analogien eine Diskriminierungsrate für die entsprechende Rasse berechnet und mit dem Wahrscheinlichkeitsindex multipliziert. Daraus lässt sich anhand des erstellten genetischen Fingerabdrucks die genetische Übereinstimmung mit verschiedenen Rassen erstellen und in Kombination mit einer phänotypischen Begutachtung (3.10) effektiv zur Mischlingsbeurteilung anwenden.

In Abbildung Abb. 17 ist ein Bildschirmfoto der MischSTR© Software gezeigt. Die Auswertung gliedert sich in drei Schritte, die jeweils durch die Buttons repräsentiert werden. Es zeigt sich zwar auch eine genetische Übereinstimmung mit einem Beagle, der Deutsch-Drahthaar mit der Anonymisierung **affb** lässt sich jedoch mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9999 % der Rasse Deutsch-Drahthaar zuweisen.

MischSTR v1.5.1 (c) 2013 by MeMo Forensics

Schritt 1: **Generiere Daten**
Rassen in der Datenbank: 59

Schritt 2: **Eingabe der Multi-Plex**

Schritt 3: **Komplex-Analyse**

Rasse	PEZ12	PEZ12	Übereinstimmungen	WI	WI gesamt
Deutsch-Drahthaar	268	275	1	0,99999999	99,9999
Beagle	268	0	0,55	0,99999920	55
Rauhaar-Teckel	0	275	0,55	0,99999999	55
Staffordshireterrier	0	275	0,55	0,99999788	55
Golden Retriever	0	275	0,5	0,99999999	50
Kleiner Münsterländer	268	275	0,5	0,99999947	50
Nackthund	268	0	0,5	0,99999980	50
Labrador Retriever	268	0	0,45	0,99999999	45
Rottweiler	0	275	0,45	0,99994635	45
Setter	268	0	0,45	0,99986268	45
Chinesischer Nackthund	268	0	0,45	0,99224806	45
Deutsch-Langhaar	268	275	0,4	0,99999223	40
Jack Russel Terrier	268	0	0,4	0,99999999	40
Manxar Vizsla	0	275	0,35	0,99993896	35

Abb. 17: Bildschirmfoto der MischSTR® Oberfläche. Die Analyse wurde in drei Schritte unterteilt. Angezeigt werden die aktuell in der Datenbank befindlichen Rassen sowie die genetische Übereinstimmung des in Schritt 2 eingegeben genetischen Fingerabdrucks mit der entsprechenden Rasse.

3.10. Phänotypanalyse bei Hunden mittels PhätDB©

Zur Ergänzung und Komplettierung der Mischlingsbeurteilung bei Hunden musste zur Steigerung der Genauigkeit der Phänotyp mit einbezogen werden. Hierzu wurde die Phänotypdatenbank PhätDB© (MeMo Forensics, 2014) verwendet, welche über die Datensätze von aktuell 359 von der Fédération Cynologique Internationale (FCI) anerkannten Rassen verfügt.

Die Datensätze mussten hierzu aufgearbeitet werden, sodass sie in der Software mithilfe eines Suchalgorithmus analysiert werden konnten. Die FCI Kriterien der jeweiligen Hunderasse wurden für die Datenbank und folgende Felder umgearbeitet:

- Bezeichnung der Hunderasse
- Größe in Zentimeter (cm)
- Schnauze (Form, Bartwuchs)
- Farbe des Fells
- Felltyp (lang, kurz, glatt, rau, wellig)
- Weitere Merkmale (Bartwuchs, Gewicht, Ohren (spitz, schlapp, angelegt) u.ä.)

Anhand der eingegeben Suchkriterien liefert die Suchfunktion der Datenbank eine Liste der möglichen Hunderassen sowie einen Wahrscheinlichkeitsindex.

Die Phänotypdatenbank wurde ergänzend mit der FCI Online Datenbank verknüpft, sodass mit einem Doppelklick auf die in der Ergebnisliste aufgelistete Hunderasse, deren Details nebst Foto online abgerufen werden können.

Mithilfe der Phänotypdatenbank lässt sich ergänzend zur MischSTR Analyse eine aussagekräftige Beurteilung bezüglich Hunderassenzusammensetzung eines Individuums tätigen.

4. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden genetische Analysen an insgesamt sechs verschiedenen Spezies (Hund, Katze, Pferd, Koi-Karpfen, Kaninchen und Kamel) untersucht. Dabei wurden insgesamt 551 Individuen unterschiedlichen Alters, Rasse und Geschlecht untersucht. Als Probenmaterial dienten Mundschleimhautabstriche, zur Optimierung und Validierung der Methodik wurden zusätzlich Gewebe- sowie Blutproben verwendet.

Die Vergleichbar- und Reproduzierbarkeit der Analysen wurde bei der Multiplex durch die Programmierung eines Panels für das Analysegerät ABI 3130 (Applied Biosystems™) gewährleistet, das sich, sofern nicht anders beschrieben, jeweils an der Fragmentlänge plus/minus 0,4 Basenpaare orientiert.

4.1. Analyse von Proben caniden Ursprungs

4.1.1. Allgemein

Es wurden Proben von insgesamt 205 Hunden untersucht. Dabei handelte es sich um 89 männliche Individuen und 93 weibliche Tiere.

4.1.2. Genetischer Fingerabdruck

Mit Hilfe des Stockmarks for Dogs Canine Kit von Applied Biosystems™ (zehn STR Marker) ließen sich zuverlässig 202 Vollprofile erstellen. Bis zu einem DNA-Einsatz von 10 ng ließ sich noch ein voller genetischer Fingerabdruck generieren.

Um die Kosten für die Analyse zu minimieren, wurde das Mastermix Volumen zunächst erfolgreich von 9 µl auf 4,5 µl halbiert. Dabei konnten alle zehn Systeme stabil und ohne Auswirkungen auf die Peakhöhe reproduziert werden, sodass bei den folgenden Analysen stets das halbierte Mastermix-Volumen zur Analyse verwendet wurde. Eine weitere Halbierung des Ansatzes auf 2,25 µl führte zu einem Ausfall der Systeme FHC2054, PEZ6 und PEZ8 und wurde nicht weiter verfolgt.

Um die Vorgaben der ISFG und ISAG zu erfüllen wurde zusätzlich das Finnzymes Canine Panel 1.1 von Thermo Scientific™ (17 STR Marker plus Geschlechtsmarker) validiert. Hier ließ sich bis zu einem DNA Gehalt von 5 ng ein volles Profil erstellen. Hier wurde ebenfalls das Mastermix-Volumen von 20 µl auf 10 µl halbiert, ohne dass sich negative Einflüsse auf die Stabilität oder Peakhöhe der STR Systeme zeigten. Bei einer weiteren Halbierung wurden Ausfälle in den Systemen FHC2054, Amelogenin und AHT121 beobachtet. Daher wurden alle weiteren Analysen mit 10 µl Mastermix-Volumen durchgeführt.

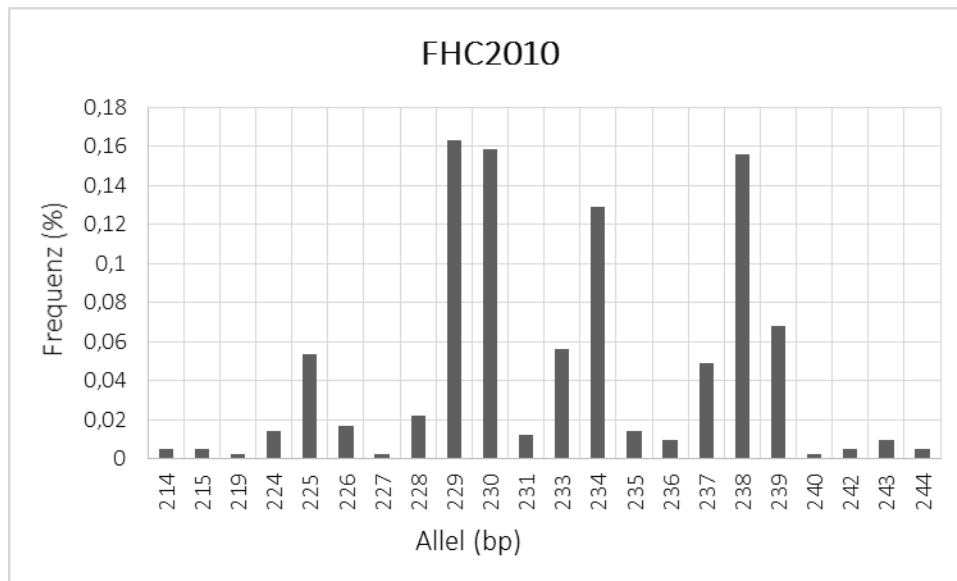
4.1.2.1. Allelverteilung beim Stockmarks™ Dogs for Canine Kit

Mithilfe des Stockmarks™ Dogs for Canine Kits (Applied Biosystems®) ließen sich simultan zehn STR Merkmale untersuchen. Für alle 205 untersuchten Tiere konnten genetische Profile erstellt werden. Mit den aus diesen Daten erstellten Allelfrequenzdaten konnten zuverlässig Identitäts- und Abstammungsanalysen durchgeführt werden. In den verschiedenen Genorten zeigten sich 20 (PEZ20) bis maximal 41 (PEZ6) Allele mit einer durchschnittlichen Diskriminierungsrate von 99,54 %. Eine Komplettübersicht über die gepoolten Daten sowie eine detaillierte Statistik für jeden Genort findet sich in Tabelle (Tab. 19) im Anhang.

Zusätzlich ließen sich in den verschiedenen Genorten charakteristische Allelverteilungen für bestimmte Hunderasse erkennen. Einige besonders charakteristische Allele spezifischer Hunderassen werden im Folgenden exemplarisch gezeigt:

Im Genort **FHC2010** wurden für die gepoolte Hundepopulation 22 Allele detektiert. Bei der Gruppe der Stöberhunde (Deutsch-Drahthaar, Deutsch-Kurzhaar, Böhmisch Rauhbart, Deutsch-Langhaar) zeigten sich hier fünf Allelausprägungen, wobei die Allele 234 (35 %) und 238 (45 %) besonders häufig nachgewiesen wurden. Für die Gruppe der Beagle konnten in diesem Genort nur drei Allele gezeigt werden. Besonders häufig tritt hier das Allel 229 bei 50 % der untersuchten Individuen auf. Eine Gegenüberstellung der gepoolten sowie der beiden Hundegruppen ist in Abbildung Abb. 18 gezeigt.

A) Gepoolte Daten für FHC2010:



B) Vergleich Stöberhunde und Beagle für den Genort FHC2010:

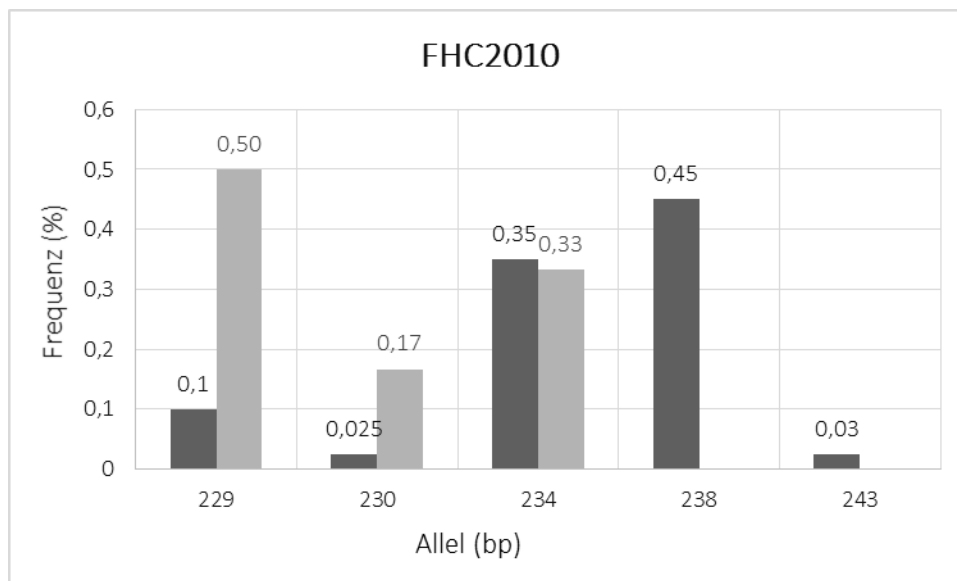
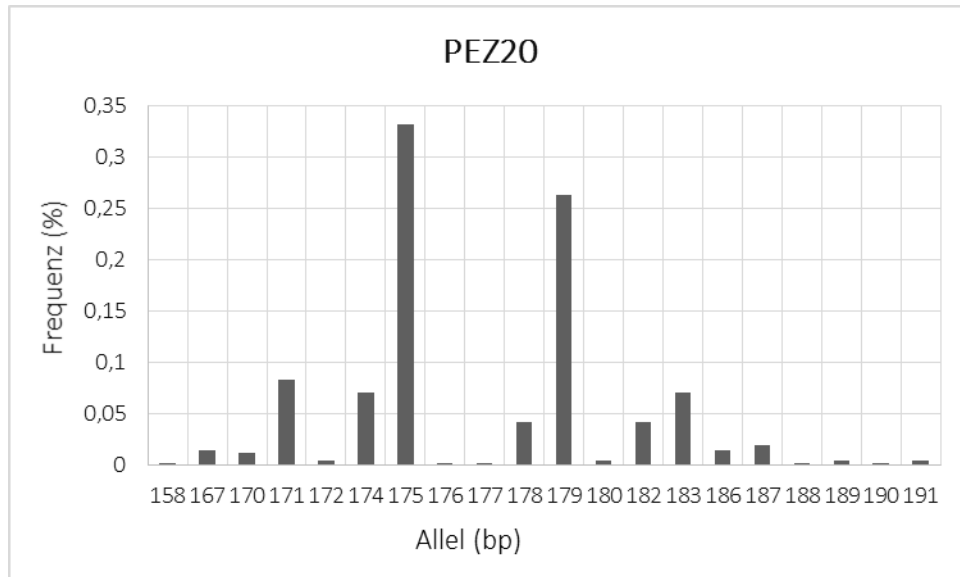


Abb. 18: Allelverteilung für den Genort FHC2010. In der gepoolten Hundepopulation konnten 22 Allele nachgewiesen werden. In diesem Genort konnten fünf Allele für die Gruppe der Stöberhunde sowie drei Genorte für die Beagle detektiert werden. In B) schwarz=Stöberhunde, grau=Beagle. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

Der STR-Marker **PEZ20** zeigt für die gepoolte Hundepopulation 20 Allele. Für die exemplarisch gewählte Gruppe der Stöberhunde wurden hier vier Allelausprägungen detektiert. Das Allel 175 trat mit 75 % am Häufigsten auf. Bei den Beaglen hingegen konnten nur zwei Allele mit dem Allel 179 (83 %) nachgewiesen werden (Abb. 19).

A) Gepoolte Daten für den Genort PEZ20:



B) Vergleich Stöberhunde und Beagle für den Genort PEZ20:

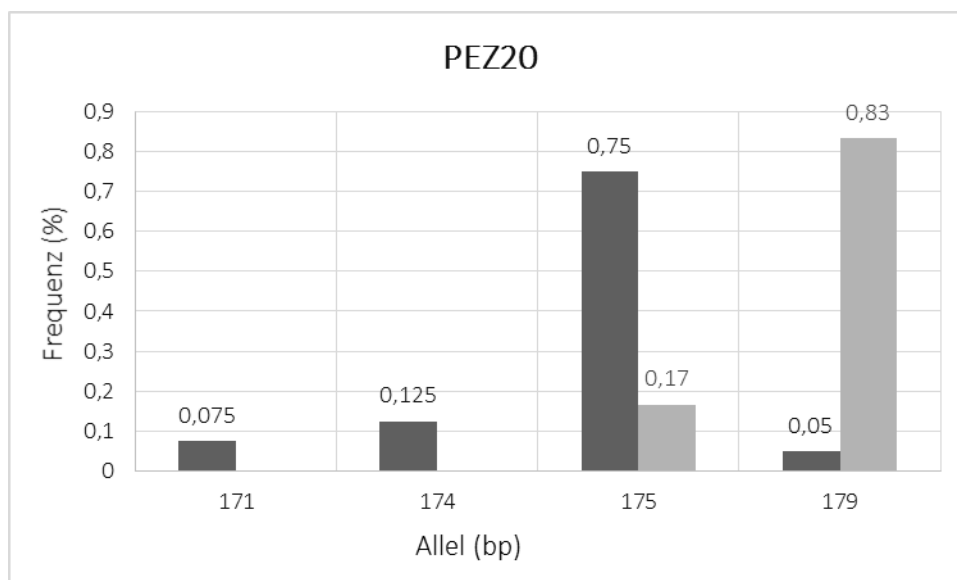
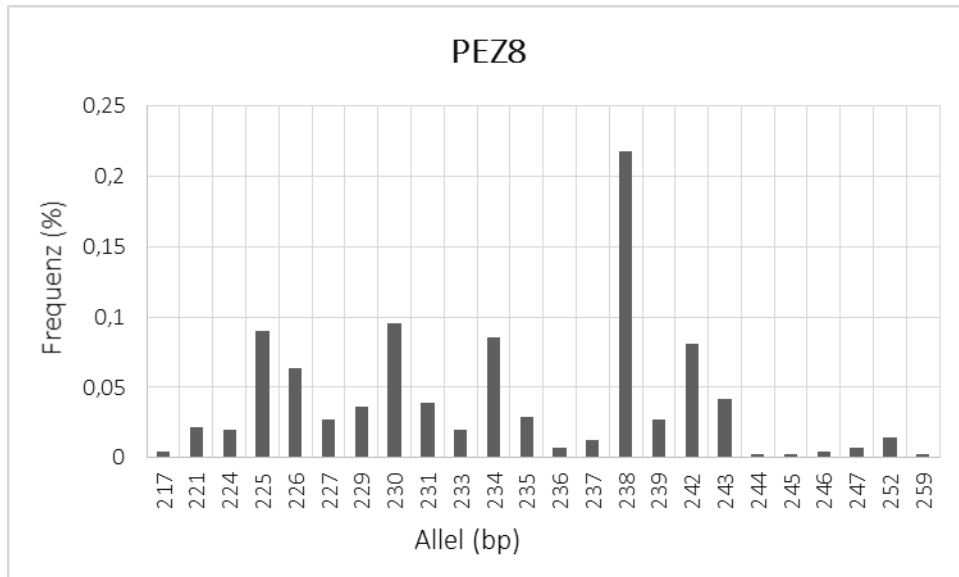


Abb. 19: Allelverteilung für den Genort PEZ20 In der gepoolten Hundepopulation konnten 20 Allele nachgewiesen werden. In diesem Genort konnten vier Allele für die Gruppe der Stöberhunde sowie zwei Genorte für die Beagle detektiert werden. In B) schwarz=Stöberhunde, grau=Beagle. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

Für den Genort **PEZ8** konnten für die untersuchte Gesamtpopulation 29 verschiedene Allele detektiert werden. Bei den Stöberhunden konnten acht Allele nachgewiesen werden, wobei das Allel 258 mit 58 % am Häufigsten auftrat. Die untersuchten Beagle zeigten vier Allele, ein charakteristisches Allel war in diesem Genort jedoch nicht nachweisbar (Abb. 20).

A) Gepoolte Daten für den Genort PEZ8:



B) Vergleich Stöberhunde und Beagle für den Genort PEZ8:

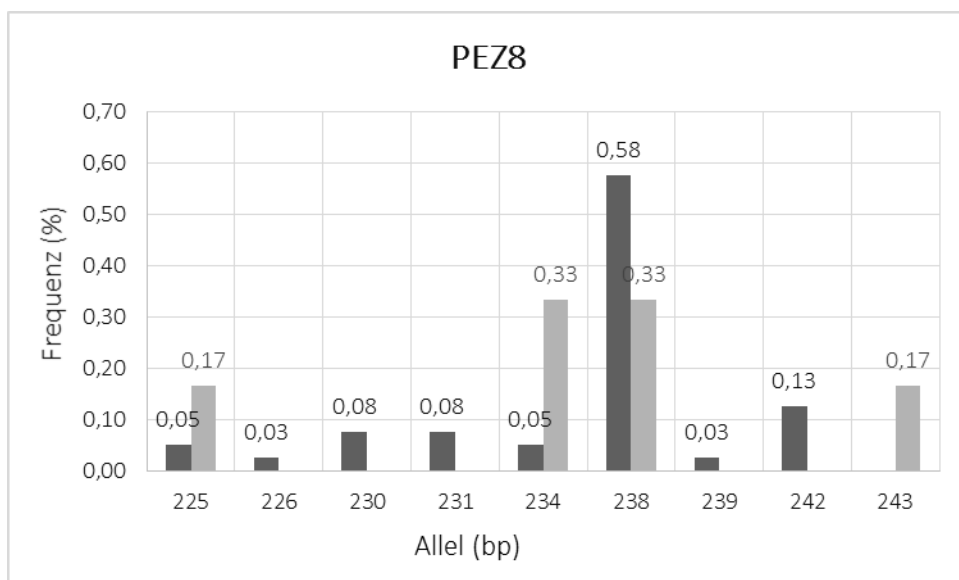


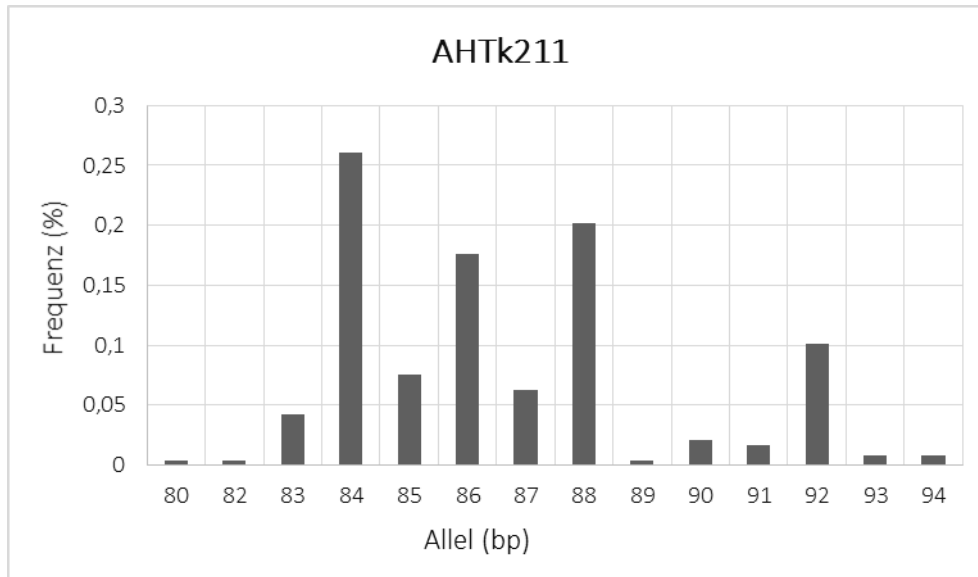
Abb. 20: Allelverteilung für den Genort PEZ8 der Kategorie „Stöberhunde“. In diesem Genort konnten acht Allele detektiert werden. In B) schwarz=Stöberhunde, grau=Beagle. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

4.1.2.2. Allelverteilung beim Finnzymes™ Canine Panel 1.1 Kit

Mithilfe des Finnzymes™ Canine Panel 1.1 (Thermo Scientific®) ließen sich simultan 17 STR Merkmale untersuchen. Es wurden für 119 Hunde zusätzlich mit diesem Kit genetische Daten erhoben. Mithilfe der aus diesen Daten erstellten Allelfrequenzen ließen sich zuverlässig Identitäts- und Abstammungsanalysen erstellen. In den verschiedenen Systemen konnten 12 (AHTk253) bis 22 (AHT121) Allele pro Genort nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine durchschnittliche Diskriminierungsrate von 99,01 %. Details zur Allelverteilung der untersuchten Gesamtpopulation sind im Anhang in Tabelle (Tab. 20) aufgeführt. Im Folgenden wird exemplarisch die Allelverteilung in einzelnen Genorten an Hunderassen der Kategorie „Stöberhunde“ (Deutsch-Drahthaar, Deutsch-Kurzhaar, Böhmisch Rauhbart und Deutsch-Langhaar) und Retriever (Golden Retriever, Labrador Retriever, Flat-Coated-Retriever) im Vergleich mit der Gesamtpopulation gezeigt. Mithilfe der selbsterstellten Software-Module AllelFi und Allel_Sta lassen sich direkt aus der Datenbank Allelfrequenzen sowie zugehörige Statistiken für jede beliebige Hunderasse, aber auch definierte Mischlinge oder gepoolte Populationen generieren.

Für den **Genort AHTk211** konnten 14 Allele für die Gesamtpopulation detektiert werden. Die Stöberhunde zeigten hier vier verschiedene Allele (84, 86, 88, 92). Am Häufigsten trat das Allel 84 (41,7 %) auf. Bei den Retrievern konnten fünf Allele nachgewiesen werden, wobei das Allel 90 mit 38 % am Häufigsten beobachtet wurde (Abb. 21).

A) Allelverteilung für die untersuchte Gesamtpopulation für den Genort AHTk211:



B) Vergleich der Allelverteilung für Stöberhunde und Retriever:

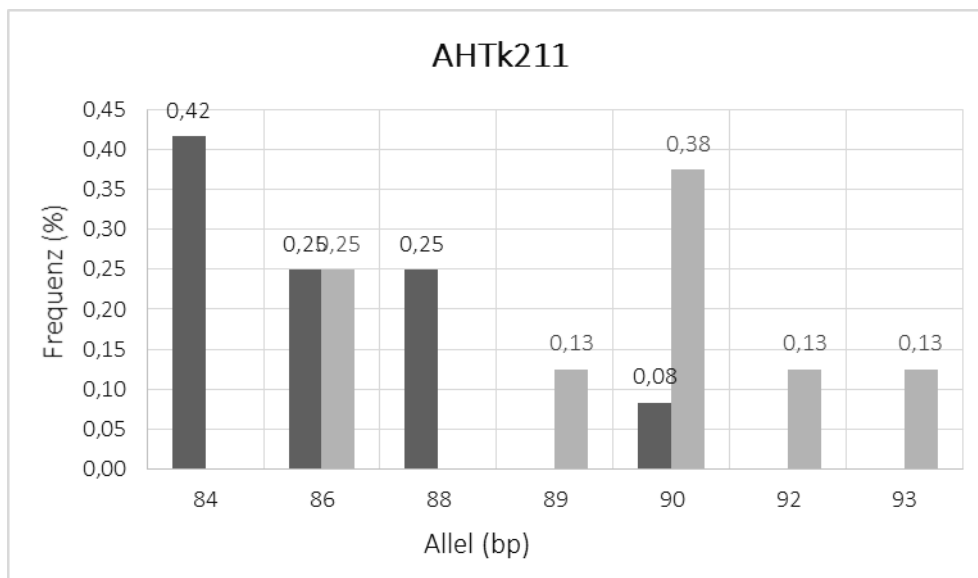
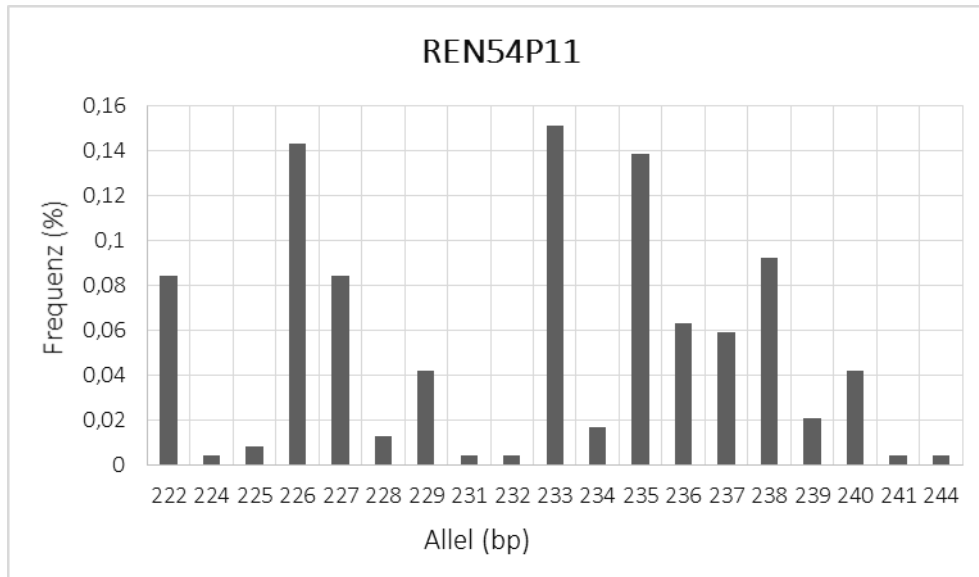


Abb. 21: Allelverteilung für den Genort AHTk211. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten vier Allele für die Stöberhunde (schwarz) und fünf Allele für die Retriever (grau) detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

Für das STR-System **REN54P11** konnten 19 Allelausprägungen detektiert werden. Die Gruppe der Stöberhunde zeigte hier sieben Allele. Am häufigsten trat das Allel 237 (33,3 %) auf. Bei den Retrievern

Konnten fünf Allele nachgewiesen die jeweils bei 12,5 % bzw. 25 % der Tiere nachweisbar waren.

A) Allelverteilung der Gesamtpopulation für den Genort REN54P11:



B) Allelverteilung von Stöberhunden und Retrievern im Vergleich:

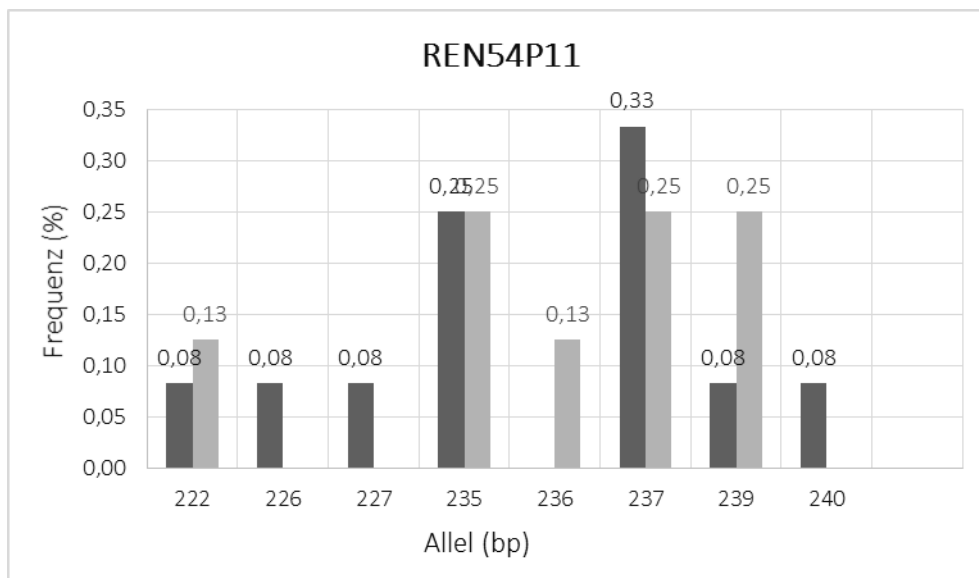
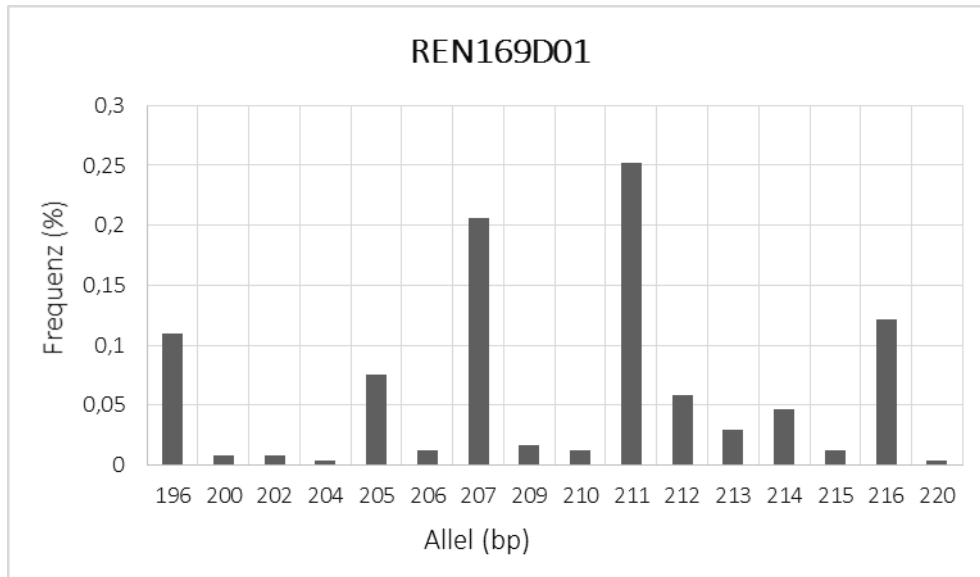


Abb. 22: Allelverteilung für den Genort REN54P11. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten sieben Allele für die Stöberhunde (schwarz) und fünf Allele für die Retriever (grau) detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

Für den Genort **REN169D01** konnten 17 verschiedene Allele detektiert werden. Für die Stöberhunde konnten sechs Allele nachgewiesen werden, am Häufigsten trat das Allel 212 (25 %) auf, die restlichen Allele waren homogen verteilt. Bei den Retrievern wurden vier Allele detektiert, das Allel 206 wurde mit 38 % am Häufigsten detektiert.

A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation:



B) Vergleich der Allelverteilung von Stöberhunden und Retrievern

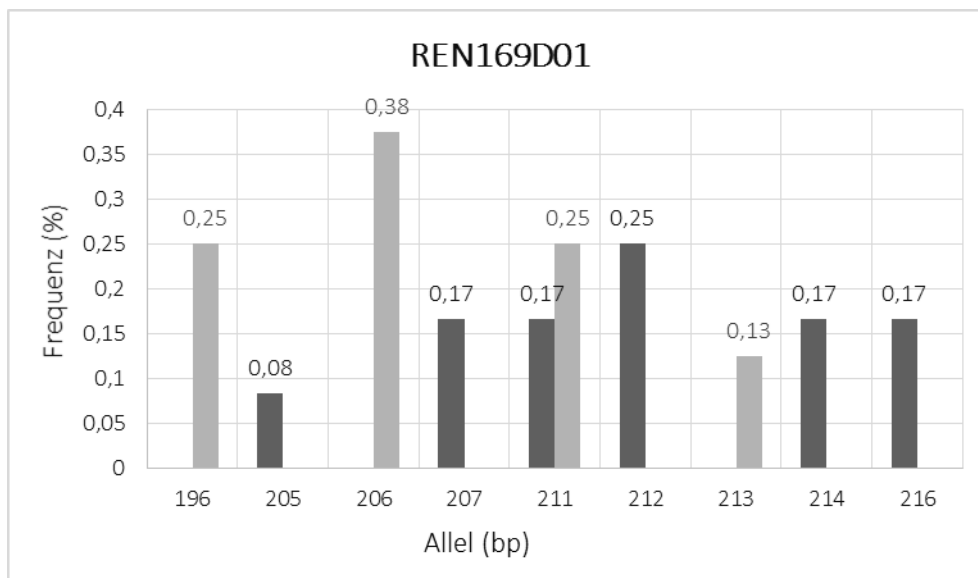


Abb. 23: Allelverteilung für den Genort REN169D01. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten sechs Allele für die Stöberhunde(schwarz) und vier Allele für die Retrievern (grau) detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.


4.1.2.3. Mischlingsanalyse

Für die Mischlingsanalyse wurden die gesammelten genetischen Daten der untersuchten Tiere, die mithilfe des Stockmarks™ for Dogs Canine Kit erstellt wurden, insgesamt 83 Hunderassen zugeordnet, d.h. die bisher aufgebaute Datenbank deckt 23 % der von der FCI anerkannten 359 Rassen ab. Es wurden insgesamt 76 Profile von Zweifach-Mischlingen (Vater und Mutter verschiedene, aber bekannte Rassehunde) und Mehrfach-Mischlingen (Vater und Mutter unbekannter Rasse oder ebenfalls Mischlinge) untersucht. Von den untersuchten Mischlingen waren die beteiligten Rassen nur bei 20 Individuen bekannt. Bei den übrigen Tieren waren die beteiligten Rassen nicht bekannt oder nur anhand des Phänotyps vom Besitzer bestimmt worden. In allen Fällen von Zweifach-Mischlingen konnten die bekannten Rassen genetisch bestätigt werden. In den durchgeführten Analysen lag die genetische Übereinstimmung bei diesen Mischlingen stets bei über 50 % mit der entsprechenden Hunderasse. Bei Mehrfach-Mischlingen zeigte sich die rein genetische Analyse manchmal als schwierig, da eine genetische Schnittmenge von etwa 20 % zwischen den verschiedenen Rassen zu beobachten ist und bei den Tieren die genetische Übereinstimmung häufig unter 50 % mit den in der Datenbank hinterlegten Rassen lag. Auch die genetische Differenzierung zwischen engverwandten Hunderassen, wie dem Golden Retriever und dem Labrador Retriever oder dem Deutsch-Drahthaar und dem Deutsch-Kurzhaar, ist häufig auch bei reinrassigen Tieren schwierig. In Tab. 14 sind exemplarisch drei Mischlingsanalysen von einem Zweifach-Mischling und einem Mehrfach-Mischling aufgeführt.

Reinrassige Tiere zeigten bei den Analysen genetische Übereinstimmungen von mindestens 80 % mit der entsprechenden Rasse. Keiner der untersuchten Mischlinge zeigte eine genetische Übereinstimmung von mehr als 71 % mit einer der hinterlegten Hunderassen. Damit ließ sich bei einer genetischen Übereinstimmung von mindestens 80 % von einer Reinrassigkeit des untersuchten Tieres ausgehen.

Tab. 14: Übersicht über die Ergebnisse von drei Mischlingsanalysen. Für alle Tiere wurde ein Bild mitgeschickt und Stockmaß und Gewicht des Tieres waren bekannt. Sofern bekannt, wurde zusätzlich vom Besitzer die beteiligte Rasse angegeben. Es wurde jeweils eine genetische Mischlingsanalyse sowie ergänzend eine Phänotypanalyse zur Bestätigung durchgeführt. Im Fall von 01-tBuG konnten sowohl genetisch als auch phänotypisch neben den angegebenen Rassen noch zusätzlich der Magyar Vizsla nachgewiesen. Hierbei handelt es sich allerdings, wie beim Pointer, um einen Vorstehhund. Entsprechend ist das Ergebnis nachvollziehbar.

Bild	ID	Benannte Rassen	Mischlings-analyse	Phänotyp-Analyse	Gesamturteil
	01-cGIA	-Labrador -?	-Labrador (70%) -Magyar Vizsla (45%) -Staffordshire Terrier (30%)	-Labrador (75%) -Magyar Vizsla (37,5%) -Staffordshire Terrier (25%)	- Labrador (>70%) - Magyar Vizsla (>40%) -Staffordshire Terrier (>25%)
	01- Gina	-Golden Retriever -?	-Golden Retriever (50%) -Kleiner Münsterländer (44%) -Nova Scotia Duck Tolling Retriever (40%)	-Golden Retriever (62,5%) -Kleiner Münsterländer (42,86%)	-Golden Retriever (>50%) -Kleiner Münsterländer (>40%) [-weitere Retriever-Art]
	01-tBuG	-Border Collie -Pointer	-Border Collie (44%) -English Pointer (30%) -Magyar Vizsla (26 %)	-Border Collie (50%) -English Pointer (50%) -Kurzhaar Vizsla (37,5 %)	-Border Collie (>40%) -English Pointer (>40%) -Magyar Vizsla Kurzhaar (>25 %)

Bild	ID	Benannte Rassen	Mischlings-analyse	Phänotyp-Analyse	Gesamturteil
	01-PePe	?	-Staffordshire Terrier (40%) -Beagle(35%) -Jack Russel Terrier (30%)	-Jack Russel Terrier (45%) - Staffordshire Terrier (42%) -Beagle (25%)	-Staffordshire Terrier (>40%) -Beagle(>35%) -Jack Russel Terrier (30%)

Um die genetische Mischlingsanalyse zu bestätigen und damit auch die Diskriminierungsrate zu erhöhen, wurden alle untersuchten Tiere zusätzlich phänotypisch analysiert. Hierzu wurden Angaben zur Größe, Form der Schnauze, Farbvarianz, Felltyp sowie ggf. Gewicht und besondere Merkmale (Bart, Schlappohren, ausgeprägte Lefzen u.ä.) in eine Suchmaske eingegeben und eine Datenbank mit den Rassestandards der FCI nach diesen Kriterien durchsucht. Die Phänotypdatenbank liefert anhand der eingegebenen Kriterien einen Wahrscheinlichkeitswert für die phänotypische Übereinstimmung mit einer bestimmten Rasse. Zusammen mit der Phänotypanalyse ließ sich mithilfe des Stockmarks™ for Dogs Canine Kit von Applied Biosystem® eine zu 98 % akkurate Aussage bzgl. der Rassezugehörigkeit der Mischlinge treffen. Mithilfe des Finnzymes for Dogs Panel 1.1 von Thermo Scientific ließ sich nur bei 25 % der untersuchten Individuen genetisch die korrekte Hunderasse ermitteln, obwohl die untersuchten 18 Systeme eine höhere Diskriminierungsrate erwarten ließen. Nahezu bei jeder Analyse wurde eine genetische Übereinstimmung von 80 % mit der Rasse American Staffordshire Terrier angegeben.

Zusätzlich wurde die mitochondriale DNA von 51 Hunden sequenziert (Tab. 23). Dabei wurde darauf geachtet, möglichst die DNA vieler Hunde einer Rasse bzw. einer Kategorie (Retriever, Terrier, Schäferhunde) zu analysieren. Durch die Sequenzierung dreier Bereiche der mitochondrialen Bereiche und dem Vergleich mit der DNA eines Sibirischen Wolfs ließen sich zwar verschiedene Haplotypen der Hunde diskriminieren, es war jedoch nicht möglich, spezifische Punktmutationen im mitochondrialen Genom einer bestimmten Hunderasse eindeutig zuzuordnen. Einzig bei den Rassen Mops (Punktmutation C zu T an Position 15805) und Rottweiler (G zu A an Position 15639, C zu T an Position 15814 und T zu C an Position 16025) konnte eine Tendenz zu spezifischen Mutationen ausgemacht werden. Die größte genetische Brandbreite zeigte sich bei den Terriern mit drei bis 17 Mutationen. Ein Mischling (laut Besitzer: Schäferhund-Leonberger-Retriever) zeigte keinerlei Abweichung zu den Vergleichssequenzen mehrerer Deutscher Schäferhunde.

4.1.2.4. Verhaltensanalyse und Aggressionsbereitschaft

Für die Verhaltensanalyse wurden 263 Hunde verschiedener Rassen beider Geschlechter untersucht. Diese Tiere wurden vor der genetischen Analyse von mehreren Tierärzten bzgl. ihrer Stellungsfähigkeit und ihres möglichen aggressiven Verhaltens kategorisiert. Bei der genetischen Analyse wurden die Genorte TH-4, DAT-9, DRD4-3 und DBH-4 untersucht. Eine Homozygotie in DRD4-3 ist dabei unmittelbar mit einem gesteigerten Aggressionspotenzial assoziiert (Hejjas, Vas und Topal, et al. 2007).

Entsprechend der tierärztlichen Einteilung wurden 26 vorrangige Leithunde, 44 vorrangige 2. Bindehunde, 54 vorrangige 3. Bindehunde, 25 nachrangige Leithunde, 31 nachrangige 3. Bindehunde, 41 nachrangige 2. Bindehund und 42 mittlere Bindehund untersucht (Abb. 24).

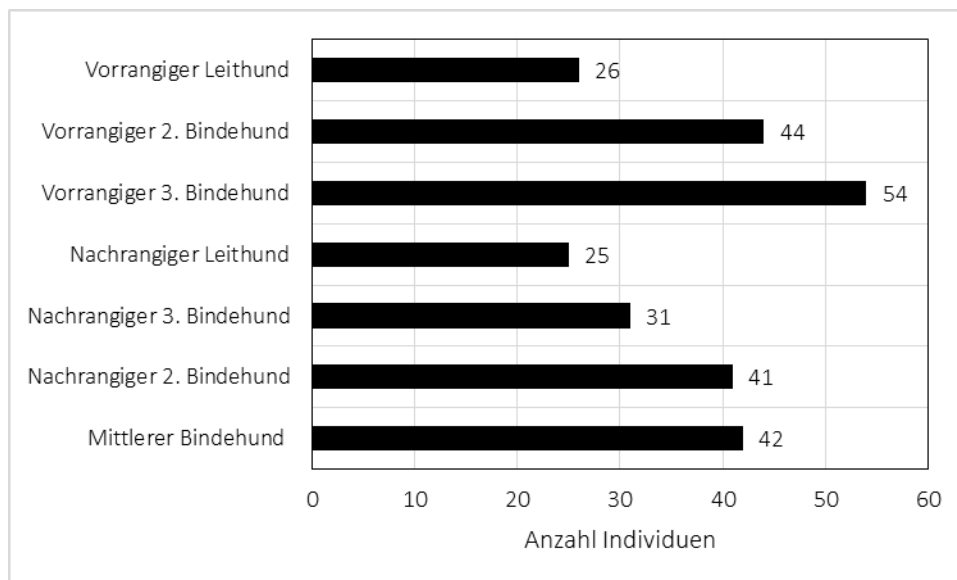


Abb. 24: Übersicht der bei der Stellungsfähigkeit untersuchten Hunde. Die Kategorisierung erfolgte vorab durch 5 unabhängige Tierärzte anhand des Sozialverhaltens der Tiere. Das hier gezeigte Kollektiv diente als Referenz für die genetischen Analysen.

Mithilfe der erstellten Referenzdatenbank wurde zusätzlich eine Analyse zuvor nicht bewerteter Hunde durchgeführt werden. Hierzu wurden zunächst anhand der Referenztiere Allelfrequenzen für die vier untersuchten Marker erstellt (Tab. 15) und mithilfe einer Bayesischen Verteilung über die selbstentwickelte Software Rudi v1.0.1 geprüft, mit welcher Stellungsfähigkeit das untersuchte Tier die größte genetische Übereinstimmung zeigt. Von den insgesamt 263 Hunden konnte in 243 Fällen ein komplettes Profil aller vier Genmarker erstellt werden. Die übrigen 40 Proben waren nur einfach vorhanden und sichtbar durch eine Bakterienbesiedlung kontaminiert.

Tab. 15: Übersicht über die Allelverteilung beim vorrangigen Leithund (VLH; n= 26) im untersuchten Kollektiv für alle vier Genorte. Die größte Variabilität zeigt der Genort DRD4-3, der mit einem gesteigerten Aggressionspotenzial assoziiert ist.

TH-4		DAT-9		DRD4-3		DBH-4	
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
1/2	0,18	1/1	0,18	1/3	0,09	2/2	0,27
1/2/3/4	0,18	1/2	0,64	2/2	0,36	2/4	0,18
2/3	0,09	1/5	0,09	2/3	0,09	2/5	0,18
3/3	0,09	5/5	0,09	2/4	0,09	2/7	0,09
3/4	0,45			2/6	0,09	5/5	0,09
				6/6	0,18	7/9	0,09
				7/7	0,09		

Die Stellungsfähigkeit ließ sich bei den untersuchten 10 Blindproben mit einer Genauigkeit von 89 % auf zwei Stellungen eingrenzen. Dabei waren Tiere, die vom Besitzer als aggressiv (n=6) oder sehr umgänglich (n=4) beschrieben worden, durchgängig einer entsprechenden Stellungsfähigkeit assoziierbar. Zusätzlich ließ sich für den mit dem Aggressionspotential-assoziierten Marker DRD4-3 bei allen aggressiven Hunden eine entsprechende genetische Prädisposition in Form einer Heterozygotie in diesem Genort bestimmen.

4.2. Analyse von Proben equiden Ursprungs

4.2.1. Allgemein

Es wurden Proben von insgesamt 133 Pferden untersucht. Dabei handelte es sich um 77 männliche Individuen und 56 weibliche Tiere aus 40 verschiedene Rassen unterschiedlichen Alters.

4.2.2. Genetischer Fingerabdruck

Mit Hilfe des Stockmarks for Horses Equine Kit von Applied Biosystems™ und des Finnzymes Equine Panel 1.1 (beide 17 STR Marker plus Geschlechtsmarker) ließen sich zuverlässig 92 Vollprofile erstellen. Bei den übrigen Tieren (41 Pferde) konnte aufgrund fehlender oder bereits verbrauchter B-Proben kein Profil erstellt werden. Beide Kits nutzten die gleichen STR Systeme, sodass diese untereinander vergleichbar waren. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng.

Um die Kosten für die Analyse zu minimieren, wurde das Mastermix Volumen bei beiden Kits zunächst erfolgreich von 20 µl auf 10 µl halbiert. Dabei konnten alle 17 Systeme stabil und ohne Auswirkungen auf die Peakhöhe reproduziert werden, sodass bei den folgenden Analysen stets das halbierte Mastermix Volumen zur Analyse verwendet wurde. Eine weitere Halbierung des Ansatzes führte zu einem Ausfall variierender Systeme und zur Artefaktbildung.

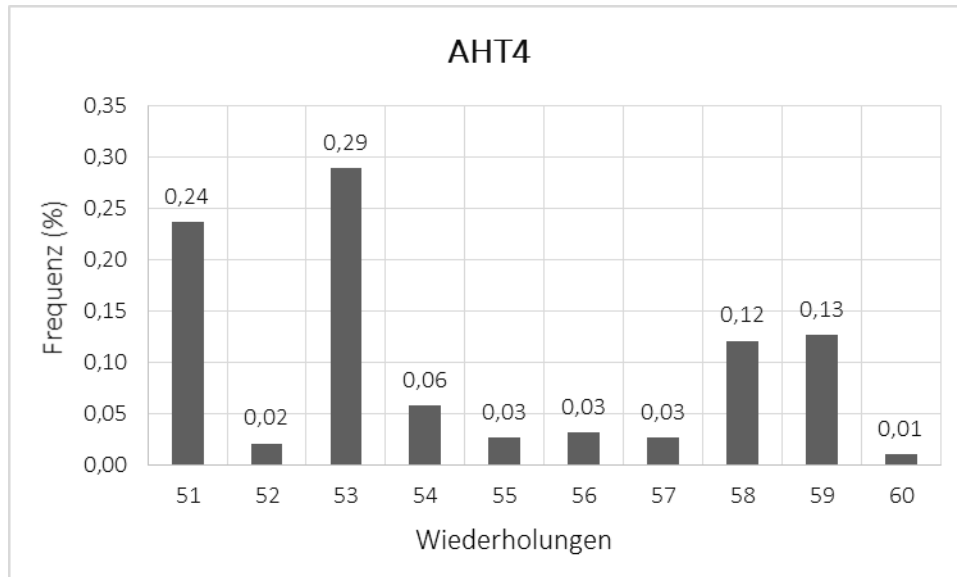
Die Vergleichbar- und Reproduzierbarkeit der Analyse wurde bei beiden Multiplexes durch die Programmierung eines Panels für das Analysegerät ABI 3130 (Applied Biosystems™) gewährleistet, das sich jeweils an der Anzahl der Wiederholungen (Dinukleotidwiederholungen) plus/minus 2 Basenpaare orientiert. Regelmäßig wurde eine Positivkontrolle des Pferdes mit der Identifikationsnummer 020912JOjt mitgeführt.

4.2.2.1. Allelverteilung beim Stockmarks™ Horses for Equine und Finnzymes™ Equine Panel 1.1

Mithilfe des Stockmarks™ Horses for Equine (Applied Biosystems®) und Finnzymes™ Equine Panel 1.1 (Thermo Scientific®) Kits ließen sich simultan die identischen 17 STR Merkmale untersuchen. Eine Übersicht über die Allelverteilung innerhalb der Gesamtpopulation ist im Anhang unter Tabelle Tab. 21 aufgeführt. In den verschiedenen STR-Systemen konnten zwischen sechs (HMS7) und elf (CA425) Allele nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Diskriminierungsrate für die Systeme lag bei 92,87 %. Die erstellten Allelfrequenzdaten ließen sich adäquat für die Identitäts- und Abstammungsanalyse verwenden. Im Folgenden wird exemplarisch an zwei STR-Systemen die Allelverteilung der untersuchten Gesamtpopulation mit denen der Pferderasse „Fjordpferd“ und Araber gezeigt.

Für den Genort **AHT4** konnten in der untersuchten Pferde-Gesamtpopulation zehn Allele detektiert werden. Für die Fjordpferde konnten insgesamt fünf Allelausprägungen gezeigt werden. Am häufigsten trat das Allel 59 (53,3 %). Auch für die Araber wurden fünf Allele nachgewiesen, wobei 50 % der untersuchten Individuen das Allel 53 aufwies.

A) Übersicht über die Allelverteilung der Gesamtpopulation für den Genort AHT4:



B) Allelverteilung im Vergleich Fjordpferd zu Araber:

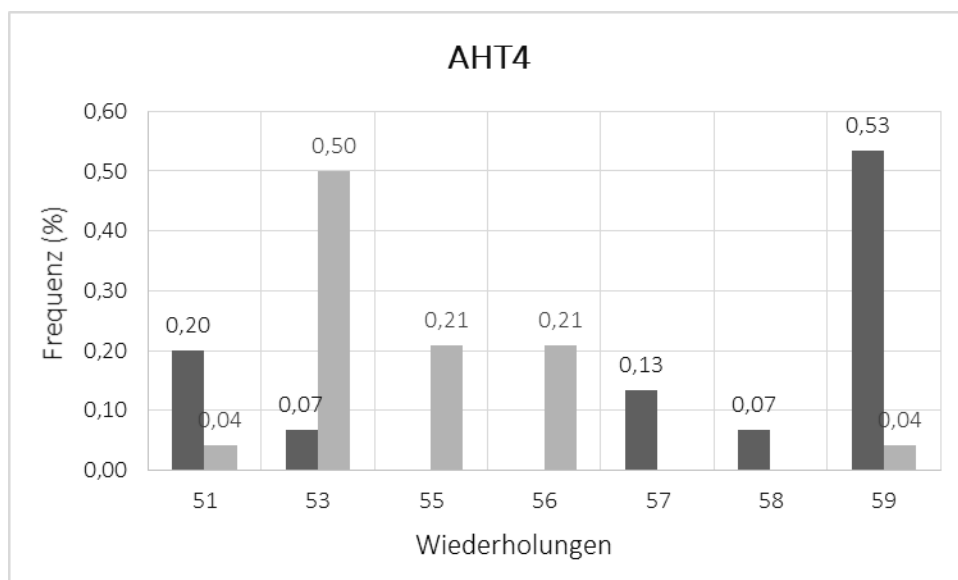
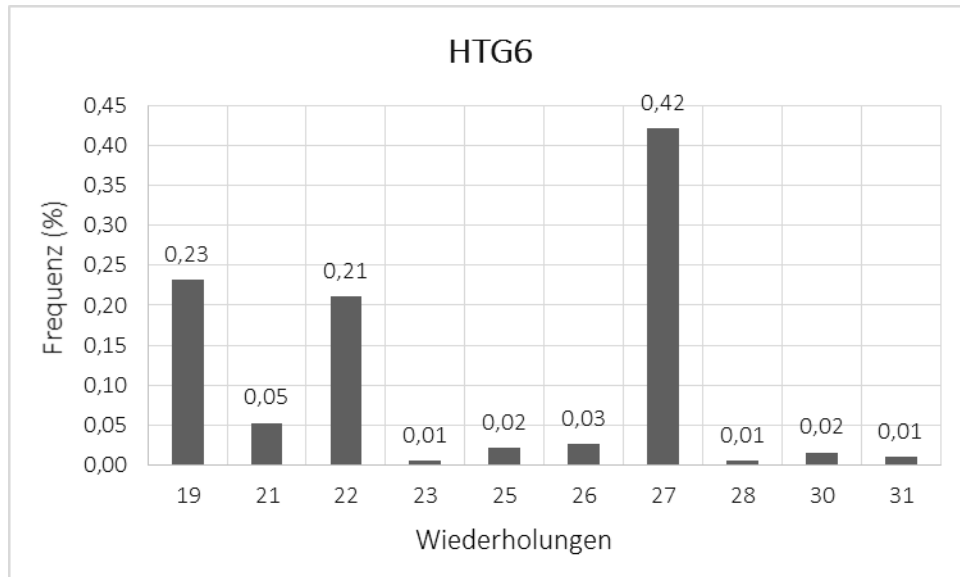


Abb. 25: Allelverteilung für den Genort AHT4. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten fünf Allele für das Fjordpferd (schwarz) und fünf Allele für die Araber detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

Im STR-System **HTG6** wurden für die gepoolte Population neun Allele nachgewiesen. Für die Fjordpferde konnte lediglich das Allel 27 bestimmt werden, obwohl es sich um unverwandte Tiere handelte. Die Araber zeigten in HTG6 sechs unterschiedliche Alle, am Häufigsten wurde das Allel 22 mit 54 % detektiert.

A) Übersicht über die Allelverteilung der Gesamtpopulation für den Genort HTG6:



B) Allelverteilung im Vergleich Fjordpferd zu Araber:

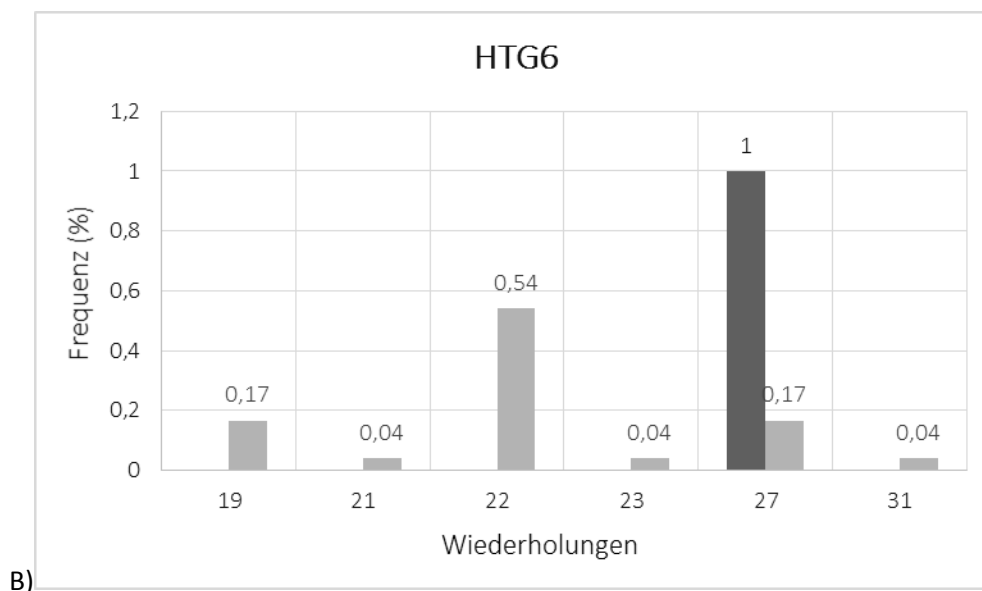


Abb. 26: Allelverteilung für den Genort HTG6. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnte ein Allel für das Fjordpferd (schwarz) und sechs Allele für die Araber detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

4.2.2.2. Mischlingsanalyse

Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Rassen ließ sich bisher keine biostatistisch vertretbare Mischlingsanalyse durchführen. Die bereits für die Hunde etablierte Methodik ließ sich aber für die bereits hinterlegten Rassen anwenden und bei ersten Blindproben erfolgreich einsetzen. Wie in 4.2.2.1 gezeigt, lassen sich, wie auch bei den Hunden, charakteristische Allelausprägungen verschiedener Rassen detektieren, die eine Mischlingsanalyse gewährleisten. Für die Mischlingsanalyse wurden die genetischen Fingerabdrücke insgesamt 41 Pferderassen zugeordnet, d.h. die bisher aufgebaute Datenbank deckt 21 % der anerkannten 200 Rassen ab.

Zu beachten ist jedoch, dass einige Pferderassen teilweise auch allein anhand ihrer phänotypischen Merkmale einer bestimmten Rasse zugeordnet werden (Pintu=geflecktes Pferd), weshalb eine rein genetische Einstufung bei dieser Rasse derzeit nicht möglich scheint.

4.3. Analyse von Proben cypriniformen Ursprungs

4.3.1. Allgemein

Es wurden Proben von 10 Koi-Karpfen untersucht. Dabei handelte es sich um 6 männliche Individuen und 4 weibliche Tiere. Eine Einteilung in verschiedene Koi-Rassen erfolgt anhand der Zeichnung, nicht anhand von genetischen Merkmalen. Einzig die Unterscheidung von normalen Kois und Butterfly-Kois ist anhand der größeren Flossen möglich. Bei der Auswahl der Fische wurde darauf geachtet, dass diese aus verschiedenen Zuchtbetrieben stammten, sodass eine möglichst große Varianz erfasst und unverwandte Tiere analysiert werden konnten.

4.3.2. Genetischer Fingerabdruck

Mit Hilfe der entwickelten Multiplex-PCR (12 STR Marker) ließen sich zuverlässig für alle Tiere Vollprofile erstellen. Hier lag die Nachweisgrenze bei 1,25 ng (Abb. 27).

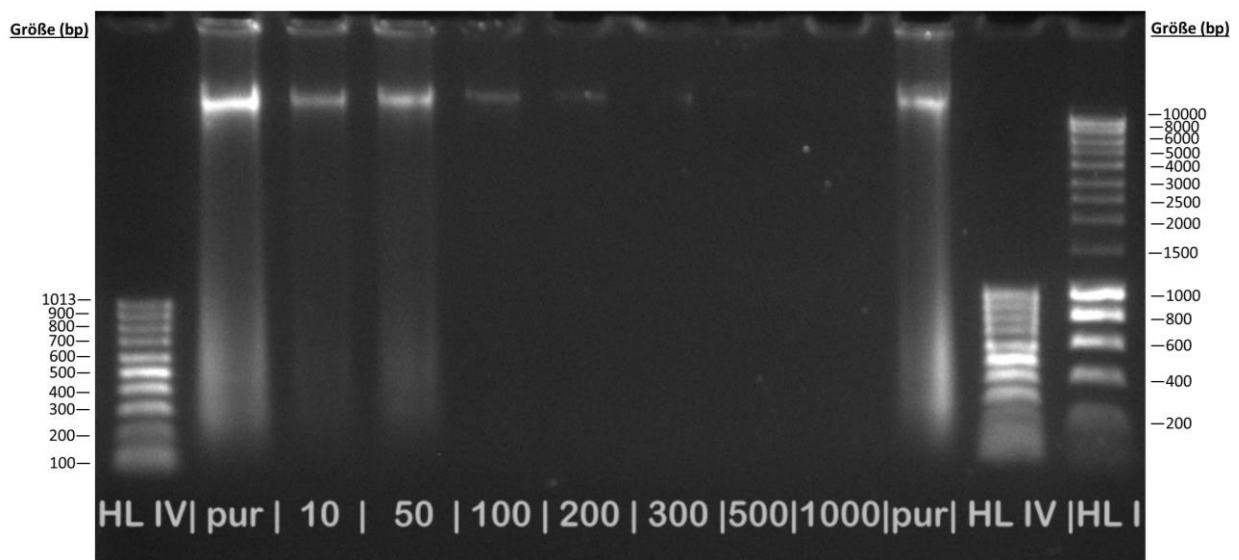


Abb. 27: Extraktion von Koi-DNA aus 100 mg Skelettmuskulatur. Abgebildet ist ein 2%-iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid-Färbung. HL I = Hyperladder I; HL IV=Hyperladder IV (beide Biomers™)

Bei dem Koi mit der Identifikationsnummer 030312JüRg handelte es sich um einen Butterfly-Koi, genetisch konnte keine Abweichung zu den übrigen analysierten Kois festgestellt werden, die entwickelte Multiplex PCR deckte auch diese Unterart komplett ab.

Zur Validierung wurden zusätzlich verschiedene Proben (Blut, Gewebe, Mundschleimhautabstrich, Schuppen und Schuppenabrieb) eines Wildkarpfens sowie eines Spiegelkarpfens extrahiert und analysiert. Aus allen Probenarten ließ sich ein volles Profil erstellen. Damit deckt die entwickelte Multiplex auch die Wildtypen der domestizierten Kois ab.

4.3.2.1. Allelverteilung der selbsterstellten Koi-Plex

Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Individuen (n=10) war eine statistische Auswertung der Allelverteilung zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Bei den bisherigen Analysen zeigte sich jedoch, dass die Genorte Cca09, Cca28 und Cca21 bei allen untersuchten Individuen die gleiche homozygote Allelkombination (Cca09: 275/275; Cca28: 126/126; Cca21: 262/262) aufwiesen, obwohl eine Verwandtschaft aufgrund der unterschiedlichen Zuchtbetriebe weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

Die in der Literatur häufig beschriebene Triallelität konnte bei der untersuchten Population in den verwendeten STR Systemen nicht nachgewiesen werden.

Tab. 16: Übersicht über die genetischen Daten der untersuchten Koi-Karpfen. Wenn eine Null angegeben ist, so besteht eine Hetero- oder Homozygotie.

ID	MFW4			Cca02			Cca04		
03-Vali	151	160	0	176	186	0	256	263	0
03-Jürg	146	160	0	185	0	0	231	0	0
03-DöRT	140	148	0	185	0	0	231	0	0
03-SPIG	140	159	0	176	185	0	232	247	0
03-RaLf	147	0	0	185	0	0	230	232	0
03-BeAT	152	0	0	184	0	0	230	0	0
03-iNGe	149	160	0	184	0	0	232	0	0
03-FrDr	140	0	0	176	184	0	255	0	0
03-HuGO	131	148	0	185	0	0	231	255	0
03-Kapf	140	0	0	176	0	0	247	0	0

ID	Cca09			MFW26			MFW7		
03-Vali	275	0	0	131	133	0	230	0	0
03-Jürg	275	0	0	120	0	0	191	0	0
03-DöRT	275	0	0	115	135	0	191	217	0
03-SPIG	275	0	0	131	0	0	195	0	0
03-RaLf	275	0	0	123	0	0	232	0	0
03-BeAT	275	0	0	137	0	0	212	0	0
03-iNGe	275	0	0	131	135	0	210	0	0
03-FrDr	275	0	0	137	0	0	191	210	0
03-HuGO	275	0	0	115	135	0	191	217	0
03-Kapf	275	0	0	140	145	0	191	0	0

ID	Koi105-106			Koi29-30			Cca28		
03-Vali	190	0	0	254	261	0	127	0	0
03-Jürg	169	0	0	261	0	0	127	0	0
03-DöRT	182	191	0	255	0	0	127	0	0
03-SPIG	189	0	0	237	0	0	127	0	0
03-RaLf	173	0	0	242	261	0	127	0	0
03-BeAT	159	0	0	254	0	0	127	0	0
03-iNGe	153	0	0	237	0	0	127	0	0
03-FrDr	187	189	0	237	0	0	127	0	0
03-HuGO	182	191	0	255	0	0	127	0	0
03-Kapf	189	0	0	242	254	0	127	0	0

ID	Cca06			Cca24			Cca21		
03-Vali	180	0	0	210	0	0	262	0	0
03-Jürg	190	0	0	209	242	0	262	0	0
03-DöRT	170	190	0	235	241	0	262	0	0
03-SPIG	163	173	0	209	237	0	262	0	0
03-RaLf	171	190	0	210	240	0	262	0	0
03-BeAT	158	190	0	209	0	0	262	0	0
03-iNGe	179	0	0	237	0	0	262	0	0
03-FrDr	190	0	0	235	0	0	262	0	0
03-HuGO	170	190	0	235	241	0	262	0	0
03-Kapf	163	0	0	209	0	0	262	0	0

4.3.2.2. Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen

Die Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen sollte als weiteres Diskriminierungsmerkmal, ergänzend zu der Multiplex-PCR dienen. Bei der Methodik handelte es sich lediglich um eine Abwandlung bereits publizierter Primer sowie die Anpassung des PCR Protokolls auf die routinemäßig eingesetzten Geräte und Reagenzien des Instituts für Rechtsmedizin (Chen, et al. 2009).

Das ursprüngliche Protokoll mit AmpliTaq® Gold Polymerase (Bioline™) wurde auf den ImmoMix© Red (Bioline™) übersetzt. Diese Umstellung führte zu guten, reproduzierbaren Ergebnissen.

Die Geschlechtsbestimmung wurde, wie auch die Multiplex PCR, an verschiedenen Probenarten sowohl der domestizierten als auch den Wildformen (Spiegelkarpfen und Wildkarpfen) ausgetestet. Sowohl bei Abrieben als auch Gewebe (z.B. Schuppen) konnte das Geschlecht zuverlässig und reproduzierbar bestimmt werden.

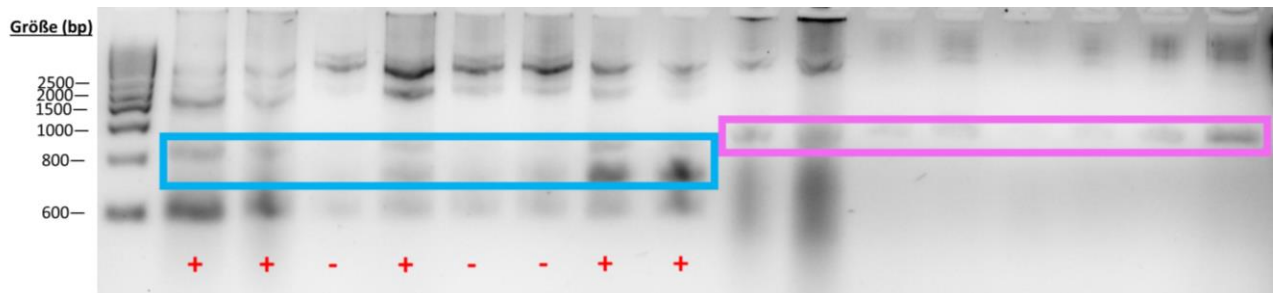


Abb. 28: Genetische Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen. Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt. In allen Proben konnte das Fragment des Haushaltgens GAPDH (rosa) nachgewiesen werden. Das Y-spezifische Fragment ist blau umrandet. Sowohl Abrieb als auch Schuppe des Spiegelkarpfens zeigten das gleiche Resultat. Bei allen übrigen Proben handelte es sich um Abriebe der Schuppen. +: positiver Test; -: negativer Test 1: Spiegelkarpfen – Abstrich | 2: Spiegelkarpfen – Schuppe | 3: 03- Jürg | 4: 03-Beat | 5: 03-Dört | 6: 03-Ralf | 7: 03-xPmi | 8: 03-ZnFe

Bei männlichen Koi-Karpfen trat sowohl bei der Untersuchung des Y-Chromosoms ein Fragment von ca. 822 bp Länge auf, als auch zusätzlich ein etwa 1.000 bp großes Fragment des Genorts für das Haushaltsgen GAPDH. Bei weiblichen Fischen war nur das 1.000 bp große Fragment des GAPDH Gens als Bande detektierbar.

4.4. Analysen von Proben feliden Ursprungs

4.4.1. Allgemein

Es wurden Proben von insgesamt 123 Katzen untersucht. Dabei handelte es sich um 64 männliche Individuen und 59 weibliche Tiere aus 40 verschiedenen Rassen unterschiedlichen Alters.

4.4.2. Genetischer Fingerabdruck

Mit Hilfe der entwickelten Multiplex-PCR (12 STR Marker plus Geschlechtsmarker) ließen sich zuverlässig 51 Vollprofile erstellen. Hier lag die Nachweisgrenze bei 380 pg (Abb. 29).

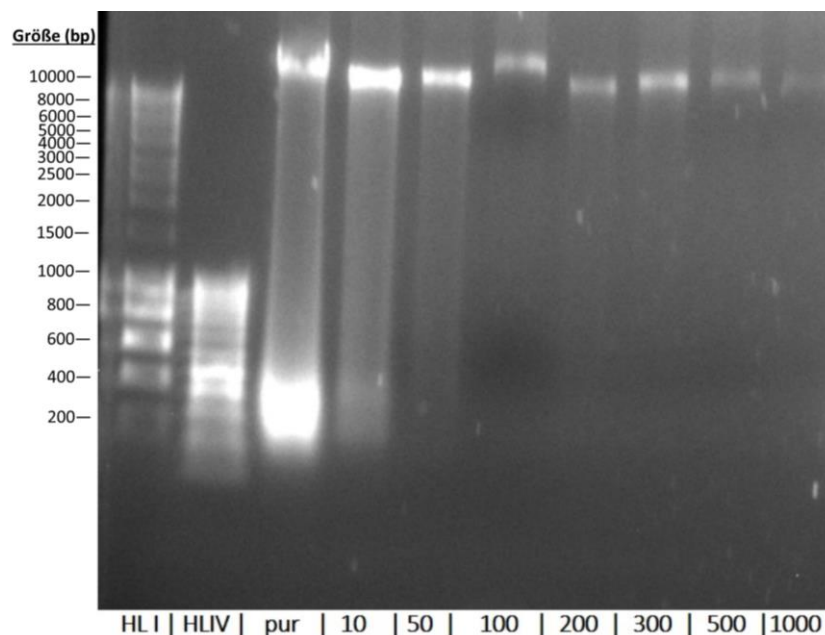


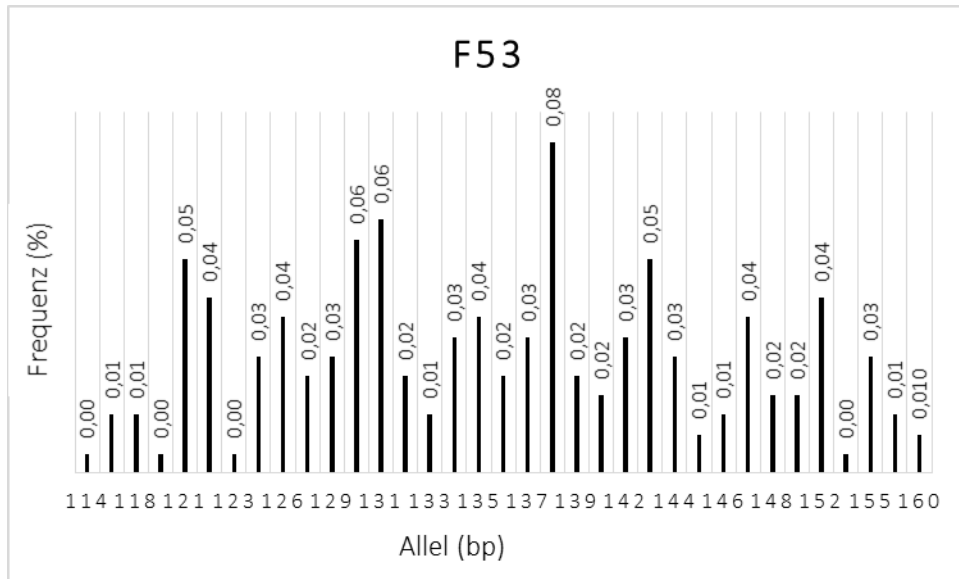
Abb. 29: Extraktion von Katzen-DNA aus 100 mg Gewebe. Abgebildet ist ein 2%-iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid-Färbung. HL I = Hyperladder I; HL IV=Hyperladder IV (beide Biomers™)

4.4.2.1. Allelverteilung der selbstentwickelten MEOW-Plex

Mithilfe der entwickelten Multiplex-PCR ließen sich simultan zwölf STR Merkmale untersuchen. Für alle 132 untersuchten Katzen ließ sich ein genetisches Profil erstellen. In den verschiedenen Genorten konnten zwischen 21 (D06) und 57 (F85) Allelausprägungen detektiert werden. Es zeigte sich eine durchschnittliche Diskriminierungsrate von 99,67 %. Eine Gesamtübersicht sowie eine detaillierte Statistik ist im Anhang in Tab. 22 zu finden. Im Folgenden werden exemplarisch Genorte im Vergleich von der Rasse Europäisches Kurzhaar mit Ragdoll sowie der untersuchten Gesamtpopulation gezeigt. Mithilfe der selbsterstellten Software Module AllelFi und Allel_Sta lassen sich direkt aus der Datenbank Allelfrequenzen sowie zugehörige Statistiken für jede beliebige Katzenrasse, aber auch definierte Mischlinge oder gepoolte Populationen generieren.

Für den Genort **F53** konnten in der Gesamtpopulation der untersuchten Katzen 35 Allelausprägungen detektiert werden. Für das Europäische Kurzhaar zeigten sich 17 verschiedene Allele. Am Häufigsten trat das Allel 147 (13,3 %) auf. Bei der Rasse Ragdoll traten vier Allele auf, das Allel 136 wurde mit 50 % am meisten beobachtet (Abb. 30).

A) Allelverteilung in der gepoolten Katzenpopulation für den Genort F53:



B) Allelverteilung von Europäischem Kurzhaar und Ragdoll:

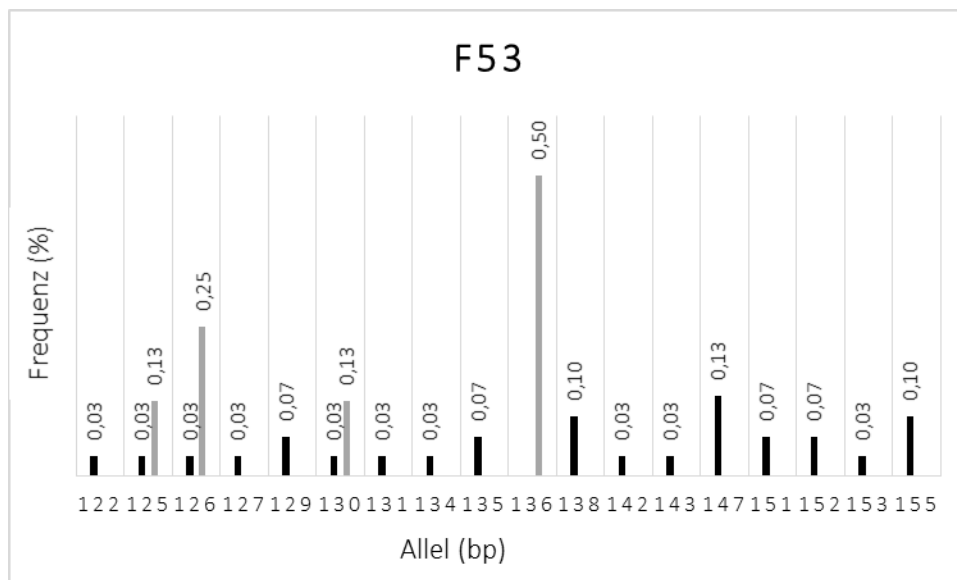
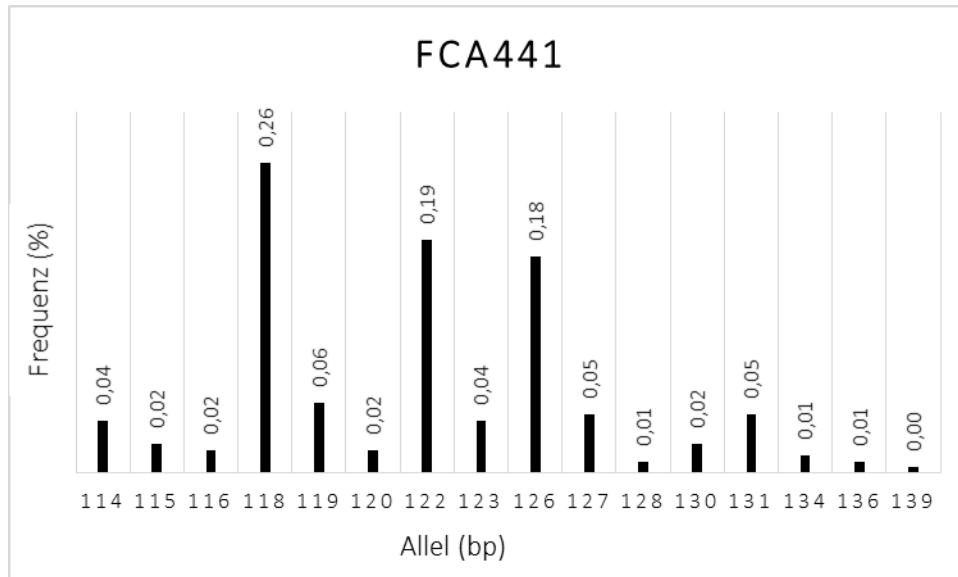


Abb. 30: Allelverteilung für den Genort F53. A) Allelausprägungen in der Gesamtpopulation. B) schwarz=Allele Europäisches Kurzhaar; grau=Allelausprägung Ragdoll. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.

Im Genort **FCA441** konnten 16 verschiedene Allele für die Katzen-Gesamtpopulation bestimmt werden. Für das Europäische Kurzhaar konnte aus neun Allelen am Häufigsten das Allel 118 (26,7 %) nachgewiesen werden. Bei den Ragdoll zeigten sich nur vier Allele, wobei das Allel 127 mit 40 % am meisten vertreten war.

A) Allelverteilung in der gepoolten Katzenpopulation für den Genort FCA441:



B) Allelverteilung von Europäischem Kurzhaar und Ragdoll:

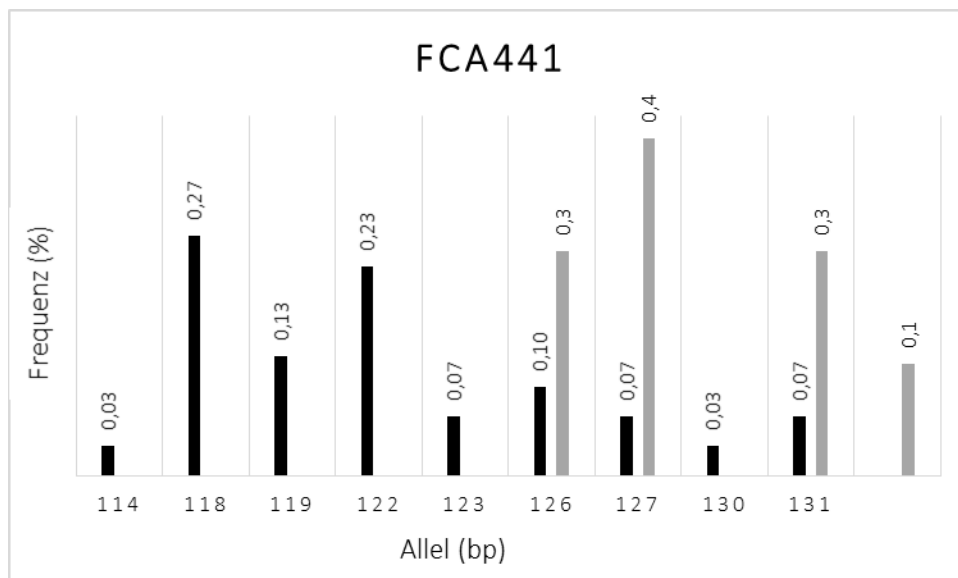


Abb. 31: Allelverteilung für den Genort FCA441. A) Allelausprägungen in der Gesamtpopulation. B) schwarz=Allele Europäisches Kurzhaar; grau=Allelausprägung Ragdoll. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an

4.4.2.2. Mischlingsanalyse

Für die Mischlingsanalyse wurden die gesammelten genetischen Fingerabdrücke insgesamt 37 Katzenrassen zugeordnet, d.h. die bisher aufgebaute Datenbank deckt 35 % der anerkannten 105 Rassen der WCF ab. Auch bei dieser Spezies konnten, wie in 4.4.2.1 gezeigt, sich rasse-spezifische Allelausprägungen nachgewiesen werden. Wie auch bei der Mischlingsanalyse bei den Pferden galt auch hier, dass eine Analyse zwar möglich war, bisher aber zu wenig Rasse-Daten vorlagen, um eine adäquate Aussage treffen zu können. Erste Blindproben verliefen zwar positiv, es müssen aber weitere Katzen erfasst werden.

4.5. Analyse von Proben lagomorphen Ursprungs

4.5.1. Allgemein

Es wurden Proben von insgesamt zehn Kaninchen untersucht. Dabei handelte es sich um 6 männliche Individuen und 4 weibliche Tiere. Eine Einteilung in verschiedene Kaninchen-Rassen erfolgt primär anhand von Haarwert, Größe und Ohrenform, nicht anhand von genetischen Merkmalen. Bei der Auswahl der Tiere wurde darauf geachtet, dass diese aus verschiedenen Zuchtbetrieben stammten, sodass eine möglichst große Varianz erfasst und unverwandte Tiere analysiert werden konnten.

4.5.2. Genetischer Fingerabdruck

Mit Hilfe der entwickelten Multiplex-PCR mit neun STR Markern plus Geschlechtsmarker ließen sich zuverlässig für alle Tiere Vollprofile erstellen. Bei dem für die Verdünnungsreihe verwendeten Ovargewebe konnte bis zu einem DNA Gehalt von 38 pg noch ein voller genetischer Fingerabdruck generieren (Abb. 32).

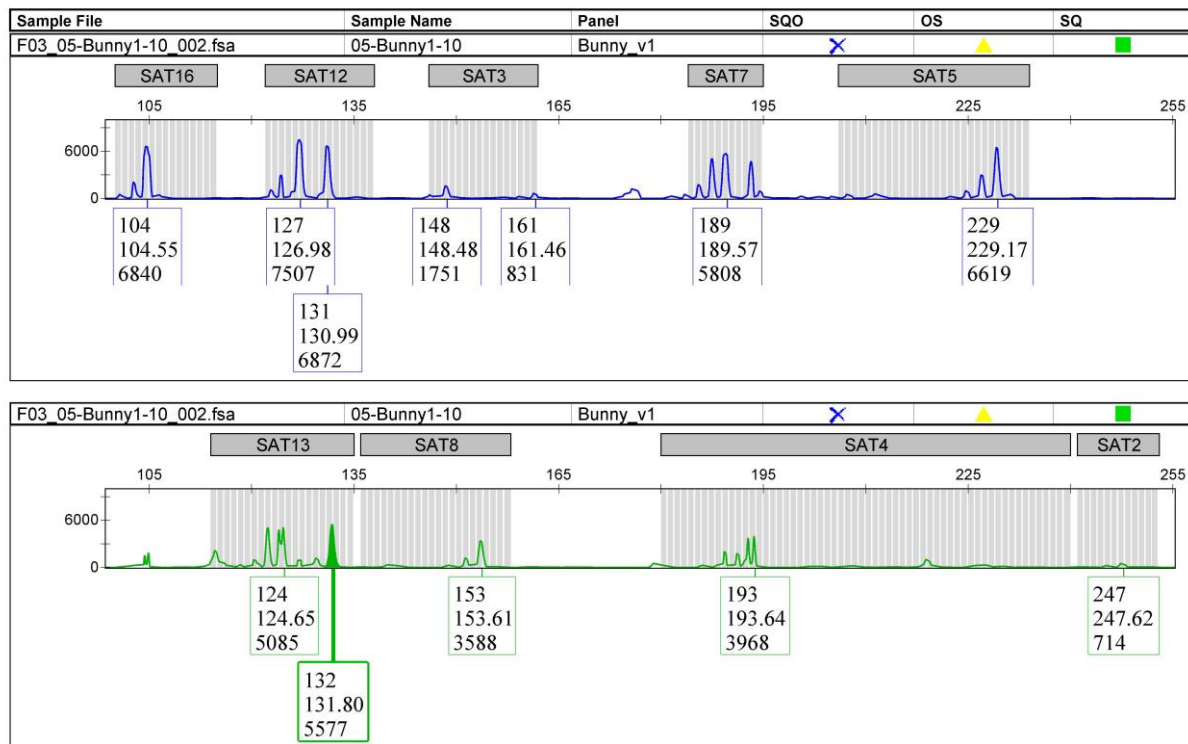


Abb. 32: Elektropherogramm von von Kaninchen DNA aus 100 mg Ovargewebe. Ein volles Profil konnte bis zu einen DNA Gehalt von 38 pg dargestellt werden.

Zur Validierung wurden zusätzlich verschiedene Proben (Blut, Gewebe und Mundschleimhautabstriche) eines Wildkaninchens extrahiert und analysiert. Aus allen Probenarten ließ sich ein volles Profil erstellen, sodass die entwickelte Multiplex auch die Wildtypen abdeckt.

Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Individuen (n=10) war eine statistische Auswertung der Allelverteilung zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

4.6. Analyse von Proben cameliden Ursprungs

4.6.1. Allgemein

Es wurden Proben von insgesamt zehn Altwelt-Kamelen (Dromedar und Trampeltier) und Neuwelt-Kamele (Alpaka und Lama) untersucht. Bei der Auswahl der Tiere wurde darauf geachtet, dass diese aus verschiedenen Zuchtbetrieben stammten, sodass eine möglichst große Varianz erfasst und unverwandte Tiere analysiert werden konnten.

4.6.2. Genetischer Fingerabdruck

Mit Hilfe der entwickelten Multiplex-PCR mit zehn STR Markern ließen sich zuverlässig für alle Tiere Vollprofile erstellen. Bei dem für die Verdünnungsreihe verwendeten Trockenfleisch (Skelettmuskulatur) konnte bis zu einem DNA Gehalt von 0,6 ng noch ein voller genetischer Fingerabdruck generiert werden. Da lediglich bei der reinen DNA im Gel noch hochmolekulare DNA sichtbar nachzuweisen war, wird das Gelbild nicht gezeigt.

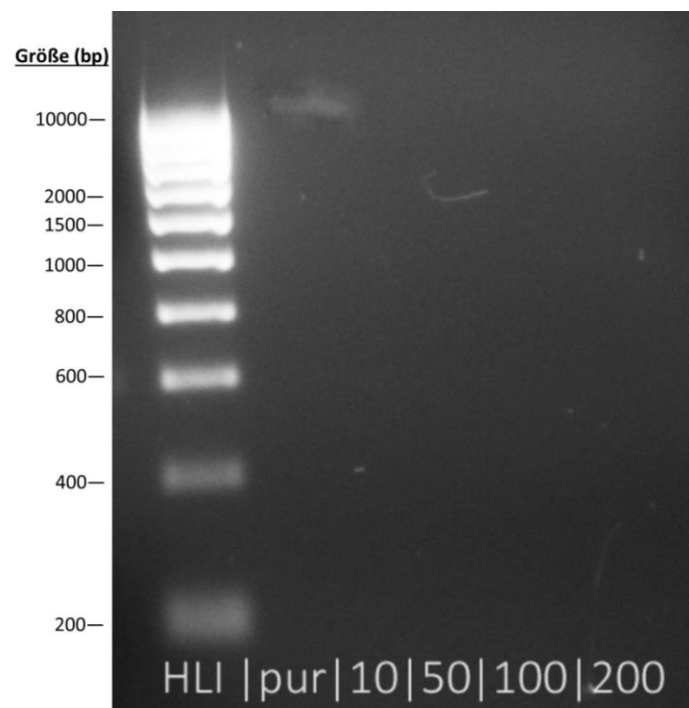


Abb. 33: Verdünnungsreihe von Kamel-DNA. Es handelt sich um ein 2%-iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung. Als Ausgangsmaterial diente im Handel erworbenes Trockenfleisch. Hochmolekulare DNA konnte nur in der unverdünnten DNA nachgewiesen werden.

Zur Validierung wurden zusätzlich verschiedene Proben (Gewebe (Trockenfleisch aus Skelettmuskulatur) und Mundschleimhautabstriche) verwendet. Aus allen Probenarten ließ sich ein volles Profil erstellen.

Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Individuen (n=10) war eine statistische Auswertung der Allelverteilung zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Wie in Tabelle Tab. 17 zu sehen, ließ sich jedoch bereits eine Identitäts- und auch Abstammungsbegutachtung mithilfe des genetischen Profils durchführen. Für eine statistische Berechnung müssten weitere Tiere untersucht werden.

Tab. 17 Übersicht über die genetischen Daten der untersuchten Kamele. Angegeben ist jeweils die ID sowie die Kamelart, in chronologischer Reihenfolge. Eine Null bedeutet, dass das Merkmal homozygot vorliegt.

ID	Kamelart	YWLL-44		YWLL-08		YWLL-38	
06-HiHO	Dromedar	111	0	140	149	180	183
06-TrFh	Dromedar	96	111	129	0	183	188
06-Fgdx	Alpaka	98	0	158	0	171	174
06-hyme	Alpaka	98	0	154	156	173	178
06-Enhu	Alpaka	97	0	131	158	171	0
06-fdZM	Trampeltier	111	0	133	147	180	0
06-pCrK	Alpaka	92	0	139	0	171	179
06-NBGe	Trampeltier	107	0	149	151	181	190
06-Khqp	Alpaka	97	0	137	0	172	174
06-uvll	Alpaka	98	0	137	151	171	178
06-vUgW	Trampeltier	107	0	133	149	180	191
06-JfDO	Alpaka	96	0	139	147	173	178

ID	Kamelart	VOLP-10		YWLL-59		VOLP-67	
06-HiHO	Dromedar	251	0	105	120	166	168
06-TrFh	Dromedar	270	0	105	107	145	152
06-Fgdx	Alpaka	231	0	96	0	155	162
06-hyme	Alpaka	231	0	92	98	153	155
06-Enhu	Alpaka	220	231	122	124	160	162
06-fdZM	Trampeltier	0	0	120	128	167	169
06-pCrK	Alpaka	234	0	91	0	153	0
06-NBGe	Trampeltier	271	0	120	0	169	0
06-Khqp	Alpaka	220	232	128	130	154	0
06-uvll	Alpaka	231	0	92	98	154	0
06-vUgW	Trampeltier	0	0	105	107	179	190
06-JfDO	Alpaka	233	0	124	0	173	0

ID	Kamelart	LCA-66		LCA-56		YWLL-09	
06-HiHO	Dromedar	240	242	133	0	180	0
06-TrFh	Dromedar	238	240	131	0	165	0
06-Fgdx	Alpaka	222	228	135	0	160	0
06-hyme	Alpaka	222	0	140	0	161	0
06-Enhu	Alpaka	237	259	140	0	164	0
06-fdZM	Trampeltier	231	0	133	0	164	178
06-pCrK	Alpaka	220	228	139	0	164	0
06-NBGe	Trampeltier	232	247	133	0	178	0
06-Khqp	Alpaka	205	223	138	0	162	164
06-uvll	Alpaka	242	248	135	137	177	0
06-vUgW	Trampeltier	231	0	133	0	170	0
06-JfDO	Alpaka	241	0	139	0	164	0

ID	Kamelart	LCA-63	
06-HiHO	Dromedar	210	219
06-TrFh	Dromedar	216	218
06-Fgdx	Alpaka	215	220
06-hyme	Alpaka	219	0
06-Enhu	Alpaka	220	259
06-fdZM	Trampeltier	210	0
06-pCrK	Alpaka	220	0
06-NBGe	Trampeltier	210	0
06-Khqp	Alpaka	220	0
06-uvll	Alpaka	220	0
06-vUgW	Trampeltier	210	0
06-JfDO	Alpaka	213	220

4.7. Speziesidentifikation

4.7.1. Allgemein

Es wurden Proben von insgesamt 60 Wild- und Nutztieren untersucht. Bei der Auswahl der Tiere wurde darauf geachtet, dass von jeder Spezies mindestens fünf Vertreter verschiedenen Alters sowie beider Geschlechter untersucht wurden.

4.7.2. Entwicklung einer Multiplex-PCR

Um die Gefahr einer Primerinteraktion zu minimieren, wurden die Primer der verschiedenen Multiplexes unterschiedlich farbmarkiert und liefen jeweils getrennt voneinander als einzelne Multiplex mit dem gleichen Thermoprofil in einem Thermocycler. Zur Fragmentanalyse im Genetic Analyzer konnten jedoch die Produkte beider PCRs simultan in einer Probe analysiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe konnte zwischen den verschiedenen Spezies unterschieden werden. Die Primer für die Wildtiere wurden mit 6-FAM blau markiert (Abb. 42), die Primer für die Nutztiere mit JOE (grün) und ATTO565 (rot) markiert (Abb. 34).

Mithilfe der so zusammengefassten Meat-Plex konnten erfolgreich die drei primär in Europa auftretenden Wildtiergruppen Hirsche (Damwild, Rotwild, Wapiti) inklusive Trughirsche (Rehwild, Sikawild) sowie Wildschweine und Wildhasen, die fünf Nutztierarten: Rind, Pferd, Hausschwein, Ziege und Schaf simultan in einer Fragmentanalyse detektiert werden.

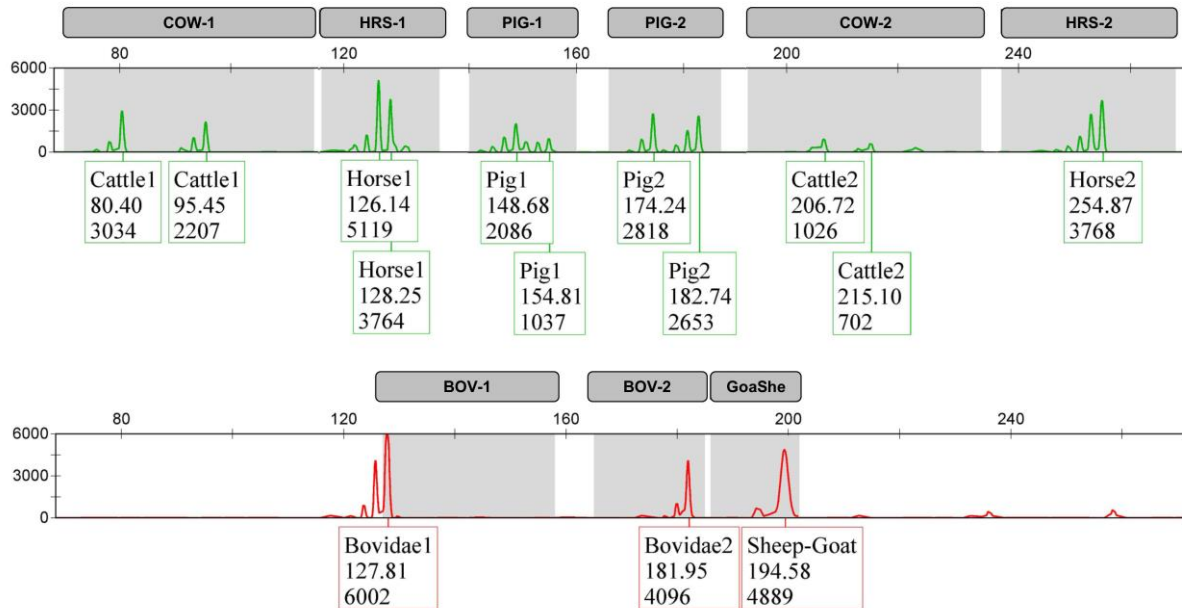


Abb. 34: Genetische Analyse von Landwirtschaftlichen Nutztieren mithilfe der Meat-Plex. Gezeigt sind alle auftretenden STR-Systeme für die gängigsten Fleischerzeuger. Gut zu erkennen ist auch die aufgrund von DNA Slippages auftretende Triadenform der Peaks im Elektropherogramm.

Für alle Spezies wurden mindestens zwei speziesspezifische Marker in die Multiplexe eingesetzt, um eine Doppelbestimmung zu gewährleisten. Lediglich bei der Analyse von Damwild DNA fiel stets das System BMB-1 aus, sodass hier nur eine Einfachbestimmung möglich ist.

Die verwendeten Wildschwein-Primer (SUS-1 und SUS-2) sowie die Hausschwein-Primer (PIG-1 und PIG-2) zeigen jeweils eine Reaktion auf beide Arten, sodass eine Unterscheidung zwischen Wild- und Hausschwein über die Meat-Plex nicht gewährleistet ist.

4.7.3. Anwendungsspektrum

Neben verschiedenen Gewebeproben der unterschiedlichen Tiere wurde auch verarbeitetes Fleisch sowie Wurstwaren auf Anwendbarkeit der Meat-Plex getestet. Dabei wurde sowohl mit Gewürzen und Salz mariniertes, als auch gekochtes Fleisch überprüft (Tab. 18).

Tab. 18: Übersicht über getestetes, bereits verarbeitetes Fleisch, welches mit der Meat-Plex untersucht wurde. Mit Ausnahme des Cevapcici (Rind, gewürzt, roh) wurden bei allen Lebensmitteln die erwarteten Spezies nachgewiesen.

Fleischart	Spezies (exp)	Spezies (obs)	Marker	Peakhöhe (RFU)	DNA Konzentration (ng/μl)	Mischung
Cevapcici (Rind & Schwein, gewürzt, roh)	Rind, Schwein	Rind, Schwein	COW-1/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	106/1803/978/242/676	0,375/0,75	1:3
Cevapcici (Rind, gewürzt, roh)	Rind	Rind, SCHWEIN	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	754/193/4372/5140/195/709	0,375/0,75	1:3
Wurstchen (Schwein, roh)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	3569/5183	5	kein Gemisch
Hackfleisch (Schwein, gewürzt, roh)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	1217/4293	1,5	kein Gemisch
Leberwurst (Rind & Schwein, gewürzt, gekocht)	Rind, Schwein	Rind, Schwein	COW-1/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	362/632/633/5306/4864	0,375/4,0	1:10
Leberwurst (Schwein, geräuchert)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	2007/4230	4.0	kein Gemisch
Hackfleisch (Rind & Schwein, roh)	Rind, Schwein	Rind, Schwein	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/PIG-1/PIG-2	468/178/3494/2650/3550/2830	1,0/4,0	1:4
Hackfleisch (Rind & Schaf, roh)	Rind, Schaf	Rind, Schaf	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/GoaShe	1535/637/2630/3230/100	1.5/0,375	4:1
Hackfleisch (Rind & Schaf, gewürzt, roh)	Rind, Schaf	Rind, Schaf	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2/GoaShe	203/295/2545/2975/1330	0,75/1,5	1:2
Hackfleisch (Rind, roh)	Rind	Rind	COW-1/COW-2/BOV-1/BOV-2	398/179/2792/1694	0,75	kein Gemisch
Steak (Schwein, mariniert)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	586/1124	0,75	kein Gemisch

Fleischart	Spezies (exp)	Spezies (obs)	Marker	Peakhöhe (RFU)	DNA Konzentration (ng/μl)	Mischung
Salami (Schwein, geräuchert)	Schwein	Schwein	PIG-1/PIG-2	2574/4230	4	kein Gemisch
Wildsalami (Wildschwein)	Wildschwein	Wildschwein	SUS-1/SUS-2	4061//2826/ 7887//2283	4	kein Gemisch

In allen verarbeiteten und bearbeiteten Lebensmitteln ließen sich die erwarteten Spezies identifizieren. In einem reinen Rinder-Cevapcici konnte auch nach einer Doppelbestimmung wider Erwarten eine größere Menge Schweine-DNA nachgewiesen werden. Zusätzlich zur eigentlich Speziesbestimmung konnte auch festgestellt werden, ob es sich um ein oder mehrere Individuen handelte.

4.8. Aufbau einer Datenbank

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden mithilfe einer bestehenden Datenbank-Software (Wookie Datenbank, MeMo Forensics) genetische Datensätze verschiedener Spezies gesammelt.

Neben Grundfunktionen, wie dem Speichern von Halterdaten und Bildern der Tiere, können die Daten des genetischen Fingerabdrucks zu den kommerziell erhältlichen und selber entwickelten Multiplex-PCRs gespeichert, verwaltet und ausgewertet werden. Es war beispielsweise möglich, rassespezifische Allelfrequenzen, Abstammungs-, Identitäts- und Mischlingsanalysen zuverlässig zu erstellen.

Die Software besitzt zusätzlich diverse Schnittstellen zu weiteren selbstentwickelten Auswerte- und Analysetools, wie dem Allel_Sta© Modul zur biostatistischen Analyse von Allelfrequenzdaten oder dem MischSTR© Modul zur Analyse von Mischlingsverteilungen.

Um die Gefahr von Übertragungsfehlern zu minimieren, verfügt die Datenbank über bidirektionale Schnittstellen zu dem Extraktionsgerät (Thermo Scientific™) und dem Genetic Analyzer ABI 3130 (Applied Biosystems™).

Die Datenbank ist so ausgelegt, dass diese auf jedem Netzwerkspeicher lauffähig ist, eine zusätzliche Software wird nicht benötigt. Dabei können pro Spezies problemlos über 12.000 Datensätze hinterlegt werden, ohne dass mit Performanceeinbußen oder Stabilitätsproblemen zu rechnen ist.

5. Diskussion

5.1. Auswahl der Spezies

In dieser Arbeit wurden fünf Spezies untersucht. Dabei wurden sowohl forensisch relevante Tierarten als auch ggf. unter kommerziellen Aspekten interessante Tierarten ausgewählt:

Hund:

Der Hund spielt gerade im forensischen Kontext heute eine Schlüsselrolle. Ist er doch neben der Katze das verbreitetste Haustier. Neben dem Nachweis von Hunde-DNA beispielsweise an einem Täter oder Tatort, können Tiere auch selber Opfer einer Gewalttat sein oder sogar als „Tatwaffe“ eingesetzt werden (Modrow et al. im Review). Auch im versicherungstechnischen Kontext, z.B. nach einem Autounfall, kann es wichtig sein einen Hund zu identifizieren. Natürlich haben auch Züchter ein großes Interesse daran in Bezug auf die optimale Vererbung, aber auch aus kommerziellen Gründen zur Abstammungs- und Identitätssicherung, eine genetische Analyse durchführen zu lassen.

Pferd:

Bei Pferden kann es ebenfalls aus vielen Gründen wichtig sein, ein genetisches Profil zu erstellen. Im forensischen Kontext sind hier die „Pferde-Ripper“ aus den letzten Jahren zu nennen, wo anhand von Spuren an Tatwerkzeugen ggf. ein Täter überführt werden könnte. Aber auch Abstammung und Identität sind für die Zucht sowie den Pferdesport wichtig.

Koi-Karpfen:

Der Koi-Karpfen erfreut sich in Europa immer größerer Beliebtheit. Neben der Abstammungsanalyse in der Zucht kann es auch wichtig sein, das teure Eigentum zu schützen, indem eine Identitätssicherung stattfindet. Damit kann z.B. nach einem Diebstahl das entsprechende Tier leichter wiedergefunden werden.

Katze:

Neben dem Hund ist auch die Katze als Haustier weit verbreitet. Aufgrund dieser Tatsache kann sie unmittelbar oder indirekt an Straftaten beteiligt sein. Ein genetisches Profil kann somit dazu beitragen ggf. einen Täter zu überführen oder eine Leiche zu identifizieren. Zusätzlich ist in der Zucht eine Abstammungs- und Identitätsanalyse wichtig.

Kaninchen:

Das Kaninchen ist ebenfalls ein weit verbreitetes Haustier in Europa. Obwohl es im forensischen Kontext eher eine untergeordnete Rolle spielt, ist es für die Züchter sehr relevant eine Identitäts- und Abstammungssicherung zu gewährleisten.

Kamel:

Das Kamel steht in keinerlei bekannten, forensischen Kontext. Hier ist das Interesse vielmehr kommerzieller Natur, da es sich um beliebte Rentiere handelt und der Besitz gerade im arabischen Raum als Statussymbol gilt. Entsprechend besteht ein großes Interesse von Züchtern und Besitzern, das Eigentum durch eine Identitätsanalyse zu schützen bzw. ergänzend durch eine Abstammungsanalyse im Wert zu bestätigen.

5.2. Probenauswahl und -entnahme

Bei der Auswahl der Proben mussten diverse Parameter eingehalten werden, um eine möglichst spezifische, aussagekräftige Interpretation zu gewährleisten. Es wurde darauf geachtet, die gleiche Anzahl weiblicher wie männlicher Individuen zu untersuchen, um möglichst eine repräsentative 50/50 Verteilung zu erzielen. Zusätzlich wurden Tiere aller Altersstufen und sofern möglich, die DNA vieler Rassen einer Spezies analysiert. Waren unter den Probengebern verwandte Tiere, wurden diese Datensätze gesondert in der Datenbank markiert und für die Erstellung von Allelfrequenzdaten nicht mit einbezogen. Bei Proben zur Speziesidentifikation mittels Meat-Plex wurde darauf geachtet, verschiedene Zubereitungsarten der Fleisch- und Wurstwaren auszuwählen, um möglichst das gesamte Spektrum kommerziell erhältlicher Waren zu erfassen.

Für die Mischlingsanalysen bei Pferd, Katze und Hund wurde als interner Standard festgelegt, dass DNA von mindestens fünf unverwandten Tieren einer Rasse analysiert werden musste, um die generierten Datensätze verwenden zu können.

Bei der Analyse der Stellungsfähigkeit und Prädispositionsanalyse für aggressives Verhalten wurden Hundeproben eines bzgl. der Stellungsfähigkeit bekannten Kollektivs an Hunden untersucht. Die Stellungsfähigkeit wurde bei diesen Tieren unabhängig voneinander von mindestens zwei Tierärzten beurteilt und die Ergebnisse der genetischen Analyse als Richtwert in der Datenbank erfasst.

Um die Entnahme von genetischem Material möglichst wenig invasiv und traumatisch für die Tiere zu gestalten, wurden primär Mundschleimhautabstriche zur Extraktion der DNA verwendet. Gewebe und Blutproben wurden lediglich im Rahmen von ohnehin durchgeführten Untersuchungen von Tierärzten entnommen.

Zur Minimierung einer potentiellen Kontamination durch Nahrungsreste (z.B. Nassfutter bei Hund und Katze), wurde darauf geachtet, dass das entsprechende Tier innerhalb der letzten 30 Minuten vor der Probenentnahme keine Nahrung oder Flüssigkeit zu sich genommen hatte.

5.3. Extraktionsverfahren

Während sich die Extraktion von DNA aus Mundschleimhautabstrichen von Fleischfressern (Katze und Hund) sowie aus den Mucus Abstrichen beim Koi-Karpfen bezüglich der PCR Amplifikation als unproblematisch erwies, ließen sich aus entsprechenden Proben von Pflanzenfressern (Kamel, Pferd und Kaninchen) häufig keine genetischen Profile erstellen. Dies war auf Pflanzenbestandteile zurückzuführen, die die Tiere während der Nahrungsaufnahme zu sich nahmen. Die im Pflanzenmaterial enthaltenen Polysaccharide sowie Endonucleasen führten zu einer Degradation der enthaltenen DNA, ergänzend wirkten Polyphenole und sekundäre Metabolite als zusätzliche Inhibitoren für enzymatische Reaktionen, wie bei der PCR (Khanuja, et al., 1999).

Bei der manuellen Extraktion der DNA mittels Silica-Membran aus Pflanzenmaterial-kontaminierten Proben zeigte sich auch bei Zusatz von zusätzlichen Puffern und Fällungsschritten, dass die enthaltenen Inhibitoren mit dieser Methodik nicht soweit entfernt werden konnten, dass die Erstellung eines genetischen Profils möglich wäre. Um auch diese Proben als Ausgangsmaterial nutzen zu können, wurde daher mittels semi-automatischer Extraktion via *magnetic beads* Methodik ein spezielles Kit zur Extraktion von DNA aus Pflanzenmaterial (InviMag© Plant DNA mini Kit, Stratec®) verwendet. Mithilfe dieses Kits ließ sich auch genomische DNA tierischen Ursprungs aus den Proben extrahieren, weiterhin bot das InviMag® Plant DNA Kit den zusätzlichen Vorteil gegenüber dem InviMag© Blood DNA Kit, dass die enthaltenen Puffer PCR-Inhibitoren aus Pflanzenmaterial zuverlässig entfernten (Stratec, 2012), sodass die Erstellung eines genetischen Profils problemlos möglich war.

Aus allen Proben ließ sich mit Hilfe der semi-automatischen DNA-Extraktion und der beiden Stratec® Kits genügend DNA extrahieren, um einen genetischen Fingerabdruck zu erstellen. Einzig aus wenigen feucht gewordenen und nicht kontrolliert getrockneten Abstrichen ließ sich keine DNA mehr extrahieren, da die Spezies-DNA bereits komplett von Bakterien degradiert worden war. Zusätzlich ließ sich auch bei einigen nicht mit Bakterien besiedelten Abstrichen nicht genügend DNA zur Erstellung eines Profils extrahieren. Diese Proben wurden jedoch durch den Halter selbst entnommen, es könnte möglich sein, dass der Abrieb nicht adäquat durchgeführt oder das Tier ggf. vorher getränkt wurde. Das vorherige Tränken könnte zur Verdünnung der DNA-Konzentration führen bzw. könnte die PCR durch Pflanzenmaterial aus der Nahrung inhibiert werden.

In Folgestudien sollte daher penibel darauf geachtet werden, bei der Probenentnahme den Abrieb adäquat anzufertigen und die Kontamination von Mundschleimhautabstrichen mit etwaigen Pflanzenmaterial minimal zu halten, um damit den Aufwand bei der Extraktion möglichst gering zu gestalten.

5.4. Analyse-Software

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten bzw. verwendeten Software Module ermöglichen die Computer-gestützte Auswertung, Analyse sowie Assoziationsanalyse von genetischen Fingerabdrücken verschiedener Spezies. Das Modul AllelFi erlaubt die automatische Berechnung von Allelfrequenzen aus bereits in der Datenbank hinterlegten STR Profilen. Diese Frequenzen wiederum werden im CalcSTR Modul zur Identitätsanalyse verwendet, um mithilfe des Hardy-Weinberg-Theorems aus den Genotypfrequenzen Phänotypfrequenzen sowie einen Wahrscheinlichkeitsindex für das Vorkommen in einer definierten Population zu berechnen.

Die rassespezifischen Allelfrequenzdaten der jeweiligen Spezies dienen bei der Mischlingsanalyse als Grundlage zur genetischen Bestimmung der Rasse.

Um auch eine vollwertige Abstammungsanalytik zu gewährleisten, lassen sich die generierten Allelfrequenzdaten in das Baur VAT Programm (Baur, 2007) exportieren.

Die drei genannten Module erwiesen sich mit geringen Anpassungen bzgl. der Anzahl an untersuchten STR-Systemen und ggf. auftretender Triallelität (Koi-Karpfen) als universell adaptierbar auf alle im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Spezies und bieten hiermit ein mächtiges Werkzeug für etwaige biostatistischen Untersuchungen zur Identitäts-, Abstammungs-, Mischlings- und Verhaltensanalytik.

5.5. Genetischer Fingerabdruck und Abstammungsanalyse

5.5.1. Hund

Mithilfe beider hier verwendeten kommerziell erhältlichen Multiplex-PCR Kits von Applied Biosystem® (Stockmarks™ Canine for Dogs) und Finnzymes® (Canine Panel 1.1) ließen sich bei **205** untersuchten Hunden genetische Fingerabdrücke erstellen. Einzig bei sieben Hunden konnte aufgrund von Bakterienbefall des Abstrichmaterials oder zu wenig enthaltener DNA kein Profil erstellt werden.

Wie anhand der Allelverteilung für die untersuchte Hundepopulation gezeigt, lag die Diskriminierungsrate (PD) beim **Stockmarks™ Kit** mit 10 untersuchten STR-Systemen im Mittel bei **99,54 %**. Für das **Finnzymes™ Kit** mit 18 untersuchten Genorten lag der PD-Wert im Mittel nur bei **99,01 %**. Mit den erstellten Frequenzdaten ließen sich entsprechend zuverlässige Aussagen zur Identitäts- und auch zur Abstammungsanalyse tätigen (Cho, 2005). Hierbei wurde mithilfe des Stockmarks™ Kits gegenüber des Finnzymes™ Kits eine höhere Diskriminierungsrate erzielt, obwohl weniger STR-Systeme untersucht wurden. Dies wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass es sich bei den STR-Systemen im Stockmarks™ Kit durchgehend um *complex* und *compound* Wiederholungsmotive handelt, während es sich bei den untersuchten Genorten im Finnzymes™ Kit nur um Dinukleotid-Wiederholungen handelt. Bereits 1999 konnten Krenz et al. am Modell des grauen Baumfroschs nachweisen, dass Dinukleotid-Wiederholungen weniger diskriminierend als komplexere Wiederholungsmuster sind (Krenz, et al., 1999).

In einem Fall von schwerer Tierquälerei mit Todesfolge des beteiligten Hundes, konnte mithilfe der Identitätsanalyse ein während der Tat verwendetes Schlagwerkzeug und darauf befindliches Blut dem toten Tier mit einer Phänotypfrequenz von **$2,76 \times 10^{-15}$** , das entspricht einem Hund in 361 Billionen, Tieren zugeordnet werden. Der Täter konnte durch die Analyse überführt und bestraft werden (Modrow, et al., im Review).

Es ist bei weiteren Analysen strikt darauf zu achten, dass möglichst keine verwandten Tiere bei der statistischen Auswertung der Allelverteilung untersucht werden, um eine Verfälschung der Daten zu verhindern.

In Folgeanalysen sollte (primär bei nicht bekannter Hunderasse) zusätzlich immer mit gepoolten Frequenzdaten gerechnet werden, um die Aussagekraft zu erhöhen, da hier die gesamte Bandbreite an Allelen erfasst wird.

5.5.2. Pferd

Zur Erstellung der genetischen Profile beim Pferd wurden die zwei Kits, das Stockmarks™ for Horses Equine Kit und das Finnzymes™ Equine Panel 1.1 verwendet. Beide Kits nutzen das gleiche Set an

STR-Systemen, bei denen es sich jeweils um Dinukleotid-Wiederholungsmotive handelt. Mithilfe beider Kits ließen sich gleichermaßen gute und reproduzierbare genetische Profile erstellen. Aufgrund der zuweilen hohen Kontamination mit pflanzlichen Inhibitoren ließ sich nur bei **90 % der untersuchten 133 Individuen** ein volles STR-Profil erstellen.

Für die gezeigte gepoolte Pferde-Population lag die Diskriminierungsrate bei über **92 %**. Im Vergleich dazu weisen die Fjordpferde eine niedrige mittlere Diskriminierungsrate von **84 %** auf. Dieser vergleichsweise niedrige PD-Wert begründet sich auf der Tatsache, dass diese Rasse aufgrund jahrelanger Züchtung und Isolation einen sehr engen Genpool aufweist (Bhatnagar, et al., 2011). Dadurch erklärt sich auch das Auftreten nur eines Allels im Genort HTG6, trotz laut Züchter nicht verwandter Individuen.

Trotzdem ließen sich mit den generierten Daten zuverlässig Identitäts- und Abstammungsanalysen durchführen. Bei unbekanntem Pferderassen oder auch bei Fjordpferden sollte zusätzlich jedoch, wie auch bei den Hunden, mit gepoolten Allelfrequenzdaten gerechnet werden, um die Aussagekraft zu erhöhen.

5.5.3. Koi-Karpfen

Mithilfe der selbst-entwickelten Koi-Multiplex-PCR konnten **für alle untersuchten Tiere** aus den Abstrichen des Körperschleims (Mucus) der Tiere genetische Fingerabdrücke erstellt werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Koi-Karpfen um eine domestizierte Zuchtform des Wildkarpfens handelt und eine genetische Verwandtschaft zu weiteren wilden Karpfenarten, wie z.B. dem Spiegelkarpfen und dem Graskarpfen, besteht, ließen sich **auch für diese Wildformen** zuverlässig genetische Fingerabdrücke erstellen.

Die bereits für die übrigen Tiere **angewandte und etablierte Methodik ließ sich zwar auch auf die Koi-Karpfen anwenden**, jedoch könnte bei weiteren Untersuchungen eine Identitäts- und Abstammungsanalyse ggf. erschwert werden, da an einem Genort **statt einem oder zwei Allelen auch drei Allele** auftreten könnten (Zheng, et al., 2010). Bei den hier untersuchten Individuen konnte allerdings **keine Triallelität** detektiert werden. Bei den zehn untersuchten Individuen konnten bereits individuelle Merkmale detektiert werden, sodass eine spätere Identitäts- und Abstammungsanalyse vielversprechend erscheint.

Um eine zuverlässige Abstammungs- und Identitätsanalytik zu gewährleisten, müssten in Folgestudien weitere Individuen untersucht werden, um so Allelfrequenzen erstellen zu können.

5.5.4. Katze

Zum Erstellen eines genetischen Fingerabdrucks für Katzen wurde die von John Butler im Jahre 2002 vorgestellte MEOW-Plex als Anhaltspunkt verwendet und bezüglich der radioaktiven Markierung und Konzentration der Primer und die Nutzung der Immolase als Polymerase während der PCR angepasst (Butler, et al., 2002).

Mithilfe der semi-automatischen Extraktion konnte aus **98 %** der **123 Proben** erfolgreich DNA extrahiert und ein genetisches Profil erstellt werden. Die Diskriminierungsrate für die gezeigte Population lag im Mittel bei **99,67 %**. Dieser hohe PD-Wert resultiert aus der Tatsache, dass kontinuierlich viele Katzenrassen untereinander gekreuzt sowie auch Wildtypen eingekreuzt werden und entsprechend eine **große Vielfalt** im Genpool herrscht.

Mithilfe der entwickelten Methodik können **zuverlässig Abstammungs- und Identitätsanalysen durchführen**.

5.5.5. Kaninchen

Die selbst-entwickelte Bunny-Plex Multiplex-PCR ermöglicht die **Erstellung genetischer Fingerabdrücke** bei der Familie der Hasenartigen. Aufgrund der Abstammung vom Wildkaninchen ließen sich neben der domestizierten Form problemlos auch Profile des Wildkaninchens darstellen. Da domestizierte Kaninchenrassen nur anhand ihres Phänotyps (primär: Haarwert und Größe) unterschieden werden, ließen sich für **alle hier untersuchten Rassen erfolgreich typisieren**.

Aufgrund der Ernährungsweise der Kaninchen musste, wie schon bei den Pferden, eine DNA Extraktion mittels InviMag™ Plant Kit erfolgen. Da Kaninchen haltungsbedingt stets Zugang zu futtergeeignetem Pflanzenmaterial haben, lässt sich eine Kontamination mit PCR Inhibitoren bei dieser Spezies am schlechtesten minimieren.

Dennoch ließ sich **aus allen untersuchten Abstrichen ein volles Profil erstellen**. Eine Abstammungs- und Identitätsanalytik ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl an bisher untersuchten Individuen noch nicht möglich. Die bereits entwickelte und etablierte Auswertemethodik ließe sich jedoch **ohne Einschränkung auch hier übertragen**. Bei den zehn untersuchten Individuen konnten bereits individuelle Charakteristika nachgewiesen werden, sodass eine spätere Identitäts- und Abstammungsanalyse auch hier vielversprechend erscheint.

5.5.6. Kamel

Die selbst-entwickelte Camel-Plex Multiplex-PCR ließ sich **bei allen untersuchten Abstrichen** und nach der Extraktion **mit dem InviMag™ Plant mini Kit (Strattec®) verwenden**, um ein vollständiges DNA Profil des jeweiligen Individuums zu erstellen. Da zu der Familie der *Camilidae* neben den

Altwelt-Kamelen (Dromedar und Trampeltier) auch die **Neuwelt-Kamele (Alpaka und Lama)** zählen, ließen sich auch für diese Tiere STR-Profile anfertigen.

Unter den untersuchten Proben waren auch Alpaka Familien, sodass eine **Abstammungsbegutachtung simuliert** werden konnte. In allen drei Fällen ließ sich das **Jungtier den jeweiligen Elterntieren eindeutig zuordnen**.

Für eine umfangreiche Identitäts- und Abstammungsanalyse sollte unbedingt das Kollektiv der Daten erhöht werden, um so auch hier Allelfrequenzdaten generieren zu können. Die etablierte Analyse-Methodik ließe sich jederzeit an die Kamele anpassen.

5.6. Mischlingsanalysen

5.6.1. Hund

Beim Vergleich der beiden Hunde Kits zeigte sich, dass mit dem Stockmarks™ Kit in den untersuchten Genorten für die verschiedenen Rassen charakteristische Allele nachweisbar waren. Mit den beim Finnzymes Kit verwendeten Systemen hingegen, ließen sich keine spezifischen Charakteristika feststellen. In der Regel waren die auftretenden Allele homogen innerhalb der Rasse verteilt. Dies unterstützt auch die höhere Diskriminierungsrate des Stockmarks™ Kits gegenüber dem Finnzymes™ Kit. Bei der Assoziationsanalyse zeigte sich, dass beispielsweise bei einem Rassehund nach der Analyse mit dem Stockmarks™ Kit nur ein (korrekter) Treffer mit einer genetischen Übereinstimmung von >90 % ausgegeben wurde. Bei der Analyse des gleichen Individuums mit dem Finnzymes™ Kit wurden aber drei bis vier Rassen mit > 80 % genetischer Übereinstimmung bestimmt. Häufig handelte es sich hierbei um den American Staffordshire Terrier, der offensichtlich eine hohe genetische Bandbreite aufweist, dass er entsprechend viele Übereinstimmungen mit untersuchten Tieren zeigte. Die zusätzlich mit angegebenen Rassen waren in der Regel nicht einmal der entsprechenden Kategorie (wie z.B. Retriever = Golden Retriever/Labrador/Flat Coated Retriever) zuzuordnen. Sicherlich ist dies auch auf die geringere Diskriminierungsrate des Finnzymes™ Kit mit den Dinukleotid-Wiederholungsmustern zurückzuführen (Ostrander, et al., 1993).

Zusätzlich zeigte sich bei den Auswertungen, dass die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Hunderassen sich stets in 20-30 % des genetischen Profils glichen. Dies ist eventuell auf den gemeinsamen Vorfahren in Form des Wolfes zurückzuführen. Daher wurden Profile von Wölfen mit in die Datenbank integriert und als eine Kontrolle bei jeder Analyse mit aufgeführt.

In einem forensisch relevanten Fall, bei dem ein Sportschütze zwei Hunde erschossen, im Kofferraum transportiert und später vergraben hatte, um die Tat zu vertuschen, konnte mithilfe der Identitätsanalyse der Täter überführt werden. Zusätzlich wurde eine Mischlingsanalyse durchgeführt, um die Rasse der beiden Tiere zur weiteren Bestätigung, dass es sich nicht um seine eigenen Tiere

handelte, zu ermitteln. Bei beiden Tieren (Schäferhund-Boxer-Mischlinge) konnten die beiden beteiligten Rassen festgestellt, die Tat damit nachgewiesen und der Täter verurteilt werden.

Es empfiehlt sich zur zusätzlichen Validierung bei jeder Mischlingsanalyse immer auch eine Phänotypanalyse des Tieres durchzuführen, da bei der Verwendung des Finnzymes™ Kits keine adäquate Aussage bzgl. der Hunderasse ohne die Phänotypanalyse getätigt werden kann.

Die entwickelte Assoziationsmethodik ließ sich sehr gut zur Mischlingsanalyse mit dem Stockmarks™ for Dogs Canine Kit von Applied Biosystems verwenden. Hier konnten in allen zehn untersuchten Systemen charakteristische Allelausprägungen für eine entsprechende Hunderasse oder Kategorie (z.B. Retriever, Beagle, Stöberhund) detektiert werden. Eine Zuordnung zu einer bestimmten Rasse konnte genetisch stets zuverlässig getroffen und in der anschließenden Phänotypanalyse untermauert werden.

Für weitere Mischlingsanalysen sollte primär das Stockmarks™ Kit Anwendung finden. Das Finnzymes Kit eignet sich weniger gut, kann aber als Ergänzung bei unklaren Fällen genutzt werden.

Aktuell lassen sich mithilfe der Datenbank nur etwa 100 Hunderassen zuverlässig abdecken. Um die Diskriminierungsrate weiter zu erhöhen, sollte das Datenkollektiv erweitert werden, sodass mehr Hunderassen und mehr Individuen pro Rasse zur Verfügung stehen.

Eine Mischlingsanalyse mittels mitochondrialer Sequenzanalyse erwies sich als nicht diskriminierend genug und entsprechend ungeeignet für die Mischlingsbeurteilung beim Hund. Es zeigten sich zu viele Überschneidungen der mitochondrialen Hunde-Haplotypen untereinander und zu wenig spezifische Mutationen der einzelnen Hunderassen, sodass eine klare Differenzierung nicht möglich war. Beispielsweise zeigte ein bekannter Mischling aus Schäferhund, Mallinois und Berner-Sennenhund keinerlei Abweichungen zu reinrassigen Schäferhunden in der Datenbank. Da mitochondriale DNA rein maternal vererbt wird (Alberts, Johnson, et al. 2004), ließe sich ohnehin mit dieser Methodik nur die mütterliche Linie des Tieres erfassen. Damit würde ein Mischling aus Mutter=Mops und Vater=Dackel beispielsweise genetisch immer als Mops von der Auswertesoftware erkannt werden, da der paternale Anteil nicht detektierbar ist. Entsprechend ließe sich die mitochondriale DNA allenfalls bedingt zur Bestimmung der Rasse des Muttertiers heranziehen.

5.6.2. Pferd

Sowohl mit dem Stockmarks™ Kit als auch mit dem Finnzymes™ Kit ließen sich mithilfe der für die Hunde etablierten Methodik reproduzierbar und zuverlässig Assoziationsanalysen zur genetischen Mischlingsanalyse durchführen. Aktuell umfasst die Datenbank allerdings nur etwas 20 % der etwa 200 anerkannten Pferderassen, daher kann biostatistisch aktuell noch keine signifikante Aussage zur beinhalteten Rasse bei Pferde-Mischlingen getätigt werden. Erschwerend hinzu kommt, dass bei einigen Pferderassen die Kategorisierung allein anhand von phänotypischen Merkmalen, wie der Fellfarbe getätigt wird.

Im Rahmen anschließender Studien sollten weitere Rassen untersucht und Daten von mehr Individuen eingespeist werden, um die Genauigkeit und Aussagekraft der Analysen zu steigern und biostatistisch untermauern zu können.

5.6.3. Katze

Mithilfe der selbst-entwickelten Multiplex-PCR ließen sich mit den bisher hinterlegten Katzenrassen in der Datenbank reproduzierbar und zuverlässig Mischlingsanalysen durchführen. Die bereits für die Hunde und Pferde eingesetzte Assoziationsanalyse-Methodik ließ sich problemlos auch auf die Katzenrassen übertragen.

Viele Katzenrassen sind allerdings in Deutschland nur wenig verbreitet, sodass die Datenbank bisher nur etwa 40 von 105 anerkannten Rassen erfassen konnte. Entsprechend gilt auch hier, wie bei den Pferden, dass die für die Hunde etablierte Methodik problemlos anwendbar ist, allerdings weitere genetische Daten von verschiedenen Katzenrassen notwendig sind. Hier sollte die Datenbank im Rahmen von Folgestudien erweitert werden, um so die Genauigkeit und biostatistische Aussagekraft noch weiter zu steigern.

5.7. Verhaltensanalyse beim Hund

Mithilfe des untersuchten Kollektivs an DNA Proben bereits eingestufte Hunde ließ sich eine große Datenbank mit genetischen Daten, die mit Stellungsfähigkeit und Verhalten assoziiert sind, etablieren. Bei durchgeführten Blindproben mit der DNA bereits kategorisierter Hunde, die jedoch bei der Auswertung nicht bekannt war, konnte mit Ausnahme weniger Fälle immer mindestens die grobe Einstufung der Tierärzte verifiziert werden (VLH, V2 oder V3, MBH, N2 oder N3, NLH) (Ertel, et al., 2013).

Hunde, die von ihrem Besitzer als aggressiv bzw. besonders umgänglich beschrieben wurden, konnten über die Assoziationsanalyse in allen zehn Fällen einer entsprechenden Stellungsfähigkeit zugeordnet werden. Zusätzlich konnte im Genort DRD4-3, der bei auftretender Heterozygotie mit einem gesteigerten Aggressionspotential assoziiert ist, bei aggressiven Tieren diese Heterozygotie in allen Fällen detektiert werden.

Im Falle zweier Wurfgeschwister der Rasse „Kleiner Münsterländer“ konnte bei beiden Tieren die gleiche Heterozygotie in DRD4-3 bestimmt werden. Während 01-JbTY mit der Stellungsfähigkeit vorrangiger Leithund assoziiert war, zeigte der Bruder 01-QNtp eine Assoziation mit der Stellungsfähigkeit mittlerer Bindehund. 01-JbTY zeigte ein extrem aggressives Verhalten sowohl gegenüber Artgenossen als auch Menschen, während 01-QNtp als Familienhund keinerlei Auffälligkeiten zeigt. Der kurz beschriebene Fall zeigt, dass eine genetische Prädisposition für ein Verhaltensmuster zwar ein Indiz sein kann, jedoch nicht zwangsläufig auch auftreten muss. Hier spielen sicherlich auch weitere Faktoren, wie soziales Umfeld und „Erziehung“ eine signifikante Rolle. Um eine explizite Aussage auf genetischer Basis durchführen zu können, sollten daher zusätzliche Tests und weitere Daten erfasst und ausgewertet sowie ggf. ähnlich wie bei der Identitätsanalyse zwischen den verschiedenen Hunderassen unterschieden werden, um die Genauigkeit und biostatistische Signifikanz zu erhöhen.

Weiterhin könnten zusätzlich zu den bereits untersuchten vier Systemen, weitere mit dem Verhalten assoziierte Systeme in die Multiplex-PCR integriert und auf das Probenkollektiv angewendet werden, um so die Genauigkeit weiter zu erhöhen (Hejjas, et al., 2009; Hejjas, et al., 2007).

5.8. Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen

Die Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen erfolgte analog zur 2009 von Chen et al. publizierten Methodik (Chen, et al., 2009). Für die hier untersuchten Koi und Wildkarpfen ließ sich die Analyse ohne Probleme anwenden. Abweichend von der beschriebenen Publikation wurde jedoch ein Standard Immolase Mastermix für die Amplifikation verwendet. Für alle Tiere ließ sich nach der PCR das Geschlecht mittels Größentrennung im Agarose-Gel reproduzierbar bestimmen.

Ergänzend zum genetischen Fingerabdruck und phänotypischer Bestimmung des Geschlechts kann diese Methodik für Züchter bei der Zucht ausschlaggebend sein.

5.9. Speziesidentifikation mittels Meat-Plex Multiplex-PCR

In allen im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Gewebeproben und Proben von zubereiteten Fleisch- und Wurstwaren konnte reproduzierbar die Herkunft des Fleisches bzgl. der Spezies bzw. des Gemischs festgestellt werden. Mithilfe der erstellten Verdünnungsreihen ließ sich zusätzlich anhand der relativen Peakhöhen ein ungefähres Mischungsverhältnis, z.B. bei gemischtem Hackfleisch, bestimmen. Zwischen beiden Multiplexes (Wild-Plex und Farm-Plex) kam es zu keinen Kreuzreaktionen der Primer untereinander, was ein zusätzliches Indiz für die Speziespezifität der Primer darstellt.

Als Besonderheit bei der Auswertung der Meatplex ist zu nennen, dass die Primer BOV-1 und BOV-2 bei allen Tieren der Gruppe der Hornträger (lat. *Bovidae*) anwendbar sind. Das heißt, befand sich in der Probe nur Rindfleisch, zeigten sich zusätzlich zu den Ausschlägen in COW-1 und COW-2 auch Peaks in diesen beiden Systemen. Das gleiche galt für Ziegen und Schafe: Schafe zeigten die Kombination GaoShe und BOV-1, Ziegen die Kombination GoaShe und BOV-2. Allerdings konnte bei den Schafen gezeigt werden, dass die vorab genannten Kombinationen nicht auf alle Rassen anwendbar waren. Aufgrund von Kreuzungen zwischen Ziege und Schaf zeigten sich auch Individuen mit GoaShe und den zwei Bovidae Systemen sowie Ziegen- und Schafrassen mit jeweils umgekehrten Kombinationen.

Dennoch erwies sich die Meat-Plex als adäquate, schnelle und zuverlässige Methodik zum Vorscreening von nicht zuzuordnenden, unbekanntem Gewebeproben und Lebensmitteldiagnostik (Modrow, et al., in Vorbereitung).

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene molekulargenetische Methoden zur Erstellung eines genetischen Profils ausgewählter Spezies entwickelt. Mithilfe dieser wurden Identitäts- und Abstammungs- sowie bei Hund, Pferd und Katze ergänzend Mischlingsanalysen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Datenbank etabliert, um die notwendige Grundlage für die biostatistische Analyse zu schaffen. Bei Hund und Pferd wurde auf kommerziell erhältliche Kits von Applied Biosystems® und Finnzymes® zurückgegriffen. Für die Katzen wurde auf Basis einer Veröffentlichung aus 2002 (Butler, et al., 2002) eine Multiplex-PCR angepasst und weiterentwickelt. Für die Spezies Koi-Karpfen, Kaninchen und Kamel wurden mithilfe von Whole Genome Scans mit einer selbst-entwickelten Software Primer ausgewählt, diese mit dem Blast Algorithmus des *The National Center for Biotechnology Information* validiert und entsprechende Multiplex-PCRs entwickelt und etabliert.

Alle Probenentnahmen sollten möglichst wenig invasiv und stressfrei für die Tiere ablaufen, sodass die Extraktion der DNA im Regelfall aus Abstrichen der Mundschleimhaut oder bei den Koi-Karpfen aus Abstrichen des Körperschleims erfolgte. Das Problem der Kontamination durch PCR-Inhibitoren aus Pflanzenmaterial konnte mithilfe eines speziellen Extraktionskits für Pflanzenmaterial kompensiert werden. Zusätzlich standen Gewebe- und Blutproben zur Verfügung, die während Routineuntersuchungen mit Einverständnis der Tierhalter von verschiedenen Tierärzten zur Verfügung gestellt wurden.

Als weitere forensische Anwendung wurde eine Multiplex-PCR zur Speziesidentifikation entwickelt, um den tierischen Ursprung unbekannter Proben, aber auch zubereiteter Fleischprodukte zu bestimmen. Hierbei wurden zunächst zwei einzelne Multiplexe, die Wild-Plex für Wildschwein, Feldhase, Trug- und Hirschartige sowie den Dachshund und die Farm-Plex für Rind, Schaf, Ziege, Pferd und Hausschwein entwickelt, die jedoch auch zu einer alle Tiere umfassenden Meat-Plex zusammengefasst werden können.

Insgesamt wurden 405 Hunde (Identität, Abstammung, mtDNA, Mischlingsanalyse, Verhaltensanalyse), 133 Pferde, 10 Koi-Karpfen, 123 Katzen, 10 Kaninchen und 10 Kamele und Alpakas sowie 60 Fleisch- und Gewebeproben bei der Speziesidentifikation untersucht.

Aus den gesamten DNA-Profil Daten wurde mithilfe des Software-Moduls AllelFi© (MeMo Forensics, 2014) sowohl für die verschiedenen Rassen Allelfrequenzen als auch gepoolte Allelfrequenzdaten erstellt. Diese wurden für die weitere Auswertung im Identitätsrechner CalcSTR© (MeMo Forensics, 2014) und für die genetische Assoziationsanalyse im MischSTR© (MeMo Forensics, 2014) zur Bestimmung der jeweiligen Rasse verwendet. Bei allen untersuchten Probenkollektiven mit $n > 100$ wurden Allelfrequenzdaten generiert, deren Diskriminierungsrate für die einzelnen Rassen mindestens

bei 84 %, gepoolt stets über 99 % lag. Aufgrund der bisher niedrigen Individuenzahl ließ sich für Koi-Karpfen, Kaninchen und Kamele keine repräsentative Allelverteilung erstellen, jedoch lässt sich die für Hund, Pferd und Katze etablierte Methodik problemlos auf diese Spezies übertragen. Einzig die Abstammungs- und Identitätsanalytik beim Koi-Karpfen könnte aufgrund von ggf. auftretender Triallelität erschwert werden, jedoch zeigten die bisher untersuchten Individuen, inklusive der drei untersuchten Wildformen, dieses Phänomen nicht.

Weiterhin erwies sich die Sequenzanalytik mitochondrialer DNA bei 51 Hunden als nicht nutzbar für die Mischlingsanalytik, da keine rassespezifischen Mutationen detektierbar waren, mit denen sich adäquat zwischen den Tieren unterscheiden ließ. Hier war die STR-Assoziationsanalyse das Mittel der Wahl. Aufgrund der höheren Diskriminierungsrate von *compound* und *complex* Wiederholungseinheiten im Stockmarks™ for Dogs Canine Kit (Applied Biosystems®) gegenüber Dinukleotidwiederholungen im Finnzymes™ Canine Panel 1.1 (Thermo Scientific®), eignete sich dieses besser für die STR-basierte Mischlingsanalyse. Ergänzt durch die Phänotypanalyse ließ sich mithilfe des Stockmarks™ Kits für alle Mischlinge eine reproduzierbare Beurteilung durchführen.

Die entwickelte Multiplex-PCR mit vier untersuchten Systemen zur Verhaltens- und Aggressionsanalyse erwies sich als sehr guter Ansatz zur genetischen Bestimmung der Stellungsfähigkeit und Prädispositionsbestimmung für aggressives Verhalten des Hundes. Insgesamt wurde ein Kollektiv von 250 bereits kategorisierten Tieren untersucht. Bei Blindproben konnte mithilfe der Assoziationsanalyse stets mindestens die Hauptgruppe der Stellungsfähigkeit sowie, sofern angegeben, eine genetische Prädisposition für aggressives Verhalten bestimmt werden.

Ergänzend zum genetischen Fingerabdruck beim Koi-Karpfen wurde eine bereits veröffentlichte Methodik zur Geschlechtsbestimmung beim Karpfen (Chen, et al., 2009) auf eine Immolase-basierte PCR umgewandelt und konnte erfolgreich bei allen untersuchten Kois eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten verschiedene Multiplex-PCRs validiert und (weiter-)entwickelt werden, die sich sehr gut als Werkzeug zur Abstammungs-, Identitäts- und Mischlingsanalyse verschiedener Spezies eignen. Zusätzlich wurde eine Datenbank mit genetischen Profilen verschiedener Rassen etabliert und eine Auswertesoftware entwickelt bzw. validiert, die computergestützt komplizierte biostatistische Assoziations- sowie Identitätsanalysen auswertet und aus DNA-Profilen Allelfrequenzdaten erstellen kann.

7. Abstract

In this study various molecular genetic methods were developed to create a genetic profile of selected species. Additionally, these methods were used to perform identity, parentage and for dogs, cats and horses pedigree analysis. In addition, a database has been established to provide the necessary basis for biostatistical analysis. For dog and horse analysis commercially available STR kits from Applied Biosystems® and Finnzymes® were used. The multiplex PCR for the analysis of cats were based on a publication from 2002 (Butler, et al. 2002), adapted and further developed. The primers for the species koi carp, rabbit and camel were chosen by Whole Genome Scans with a self-developed software. These were validated with the Blast algorithm of the National Center for Biotechnology Information and combined to a multiplex PCR.

The sampling procedure should be as non-invasive and stressless for the animals as possible. Therefore, in most cases the DNA was extracted from buccal or for koi carps from body mucus swabs. The problem regarding a contamination with PCR inhibitors from plant material could be minimized using a special DNA extraction kit for plant materials. Additionally, tissue and blood samples were provided by several vets. The samples were taken during routine examinations with the approval of the animal owners.

Furthermore, a multiplex PCR for the species identification was developed as a further forensic application. This method is not only usable to determine the originator of unknown tissues samples but also to identify the species used in processed meat products. Therefore, two individual multiplex PCRs were developed: the Wild-Plex for the identification of boar, hare, badger and the *cervidae* family and the Farm-Plex for common livestock such as cattle, goat, sheep horse and pig. Both PCRs can be combined in the Meat-Plex.

Collectively 397 dogs, 137 horses, ten koi carps, 125 cats, ten rabbits and 25 camels and alpakas as soon as 60 meat and tissue samples for the species identification were investigated. Using the collected DNA profile datasets allele frequency data for the specific breeds as well as pooled allele frequencies were generated using the self-developed AllelFi© software module. The generated allele frequencies were used for further analysis using the identity calculator CalcSTR© and MischSTR© (both MeMo Forensics, 2014) module for genetic association analysis to determine the breed. Allele frequency datasets were generated for all sample collectives with $n > 100$. The power of discrimination for the individual breeds was at minimum 84 %, for pooled population continuously over 99 %. Because of the low amount of investigated individuals it was not possible to compile representative allele distributions for the koi carps, rabbits and camels. But the established methods used for the dogs, horses and cats are fully transferable to these species. Only the determination of the identity and parentage for the koi carps might be tricky, because of the possibility of triallelity. In

this thesis none of the investigated individuals as well as the three probed wild carps showed this phenomena.

The sequencing of mitochondrial DNA of 51 dogs was not applicable for the genetic determination of the breed. It was not possible to detect breed specific mutation which might be usable to differentiate between the dog breeds. For this application the STR association analysis was the best choice. Regarding to the high power of discrimination of compound and complex repeats of the STR systems used in the Stockmarks™ Dogs for Canine Kit (Applied Biosystems®) in contrast to the dinucleotide repeats of the STR systems used in the Finnzymes™ Canine Panel 1.1 (Thermo Scientific®) the Stockmarks™ Kit was more adequate for the STR based breed application.

The developed multiplex PCR of four genetic systems for the investigation of behavior and pack position proved to be an adequate approach to determine the pack position and a genetic predisposition for aggressive behavior of dogs. A collective of 250 categorized individuals were investigated. Analyzing unknown samples using this association analysis it was possible to determine the main group of the pack position at minimum.

In addition to the genetic fingerprint of the koi carp a published method (Chen, et al. 2009) for the gender determination was adapted to an Immolase based PCR assay and could be applied successfully to all investigated individuals.

During this PhD thesis several multiplex PCRs could be validated and (further) developed which could be used as an adequate tool for the parentage, identity and breed analysis. Additionally, a database of genetic profiles from different species and breeds was established. An evaluation software was developed which allows the computational, biostatistical analysis of complicated genetic association and identity analysis and the generation of allele frequencies from DNA profiles.

8. Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich die entwickelte Methodik sehr gut für die Identitäts-, Abstammungs- und Mischlingsanalytik eignet. Da bisher jedoch nicht alle von den jeweiligen Dachverbänden anerkannten Hunde-, Pferde- und Katzenrassen in der Datenbank repräsentiert werden, sollte im Rahmen von Folgestudien das bestehende Probenkollektiv um weitere Rassen ergänzt werden.

Derzeit stehen nicht genügend unverwandte Koi-Karpfen, Kaninchen und Kamele als Probengeber zur Verfügung, um eine repräsentative, biostatistische Analyse durchführen zu können und die Allelverteilung zu untersuchen. Hier sollte im Rahmen von Einzelprojekten eine Aufstockung des Kollektivs erfolgen. Gleiches gilt für die Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen.

Bei der Verhaltens- und Aggressionsanalyse werden die jeweiligen Allele am entsprechenden Genort aktuell als ein Gesamtmerkmal betrachtet. Um die Genauigkeit zu steigern, sollte die Analyseroutine angepasst und hier ergänzend eine ungekoppelte Betrachtung der Einzelallele erfolgen. Zusätzlich sollte in einer Folgestudie überprüft werden, ob sich rassespezifische Allelverteilungen bei den Hundegruppen (z.B. Mollosoide, Retriever, Stöberhunde) ableiten lassen.

Die Speziesidentifikation beschränkt sich derzeit auf die Säugetiere. Als häufige Nahrungsquelle dient jedoch auch das Geflügel. Hier sollte die Meat-Plex um die häufigsten Vertreter, wie Huhn, Pute, Ente und Gans erweitert werden. Weiterhin wäre es ggf. im forensischen, aber auch lebensmitteltechnischen Kontext von Interesse, die Meat-Plex um STR-Marker für Hund, Katze, Ratte und Meerschweinchen sowie einen Inhibitor- (z.B. Hydra) und humanen Marker zu ergänzen.

In diesem Zusammenhang wäre auch die Etablierung einer STR-basierten Analytik für exotischere Tiere, wie Löwe und Tiger, Elefant, Nashorn, Giraffe, Schlangen, Schildkröten, Falken und Strauße anzudenken.

Da im Rahmen dieser Doktorarbeit nur ausgewählte Spezies untersucht werden konnten, sollte die entwickelte und etablierte Methodik auf weitere Spezies zur Abstammungs- und Identitätsanalytik ausgeweitet werden. Dadurch könnte auf Basis eines kommerziell erhältlichen Kits (Stockmarks™ for Cattle Bovine Kit, Applied Biosystems®) für die Erstellung des genetischen Fingerabdrucks bei Rindern die Datenbank sehr leicht oder mit selbsttätig entwickelten Multiplex-PCRs für beispielsweise Schweine, Hirsche, Falken oder Schafe erweitert werden.

9. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., et al. 2005.** *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 3. Auflage.* Weinheim : Wiley-VCH Verlag, 2005.
- Alberts, B., et al. 2004.** *Molecular Biology of the Cell, 4. Auflage.* Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto : Wiley-VCH Verlag, 2004.
- Annavi, G., et al. 2011.** Characterisation of twenty-one European badger (*Meles meles*) microsatellite loci facilitates the discrimination of second-order relatives. *Conservation Genet Resour.* 2011.
- Bhatnagar, A., East, C. und Splan, R. 2011.** Genetic variability of the Norwegian Fjord horse in North America. *Animal Genetic Resources/.* 2011, Bd. 11, S. 43-49.
- Blase, R. 2009.** *Die Jägerprüfung: Das Lehr-, Lern- und Nachschlagewerk für Ausbildung und Praxis (30. Auflage).* s.l. : Quelle + Meyer, 2009.
- Bowling, A. und Ruvinsky, A. 2000.** *The Genetics of the Horse.* s.l. : Cab International, 2000.
- Brinkmann, B., et al. 1998.** Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *American Journal of Human Genetics.* 1998, Bd. 62, S. 1405-1414.
- Broad Institute. 2014.** Broad Institute. *broadinstitute.com.* [Online] 2014. [Zitat vom: 08. 04 2014.] <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>.
- Budowle, B., et al. 2005.** Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal Medicine.* April 2005, S. 295-302.
- Butler, J. 2005.** *Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* s.l. : Academic Press, 2005.
- Butler, J., et al. 2002.** The MeowPlex: A New DNA Test Using Tetranucleotide STR Markers for the Domestic Cat. *Profiles in DNA - www.promega.de.* 2002.
- Chen, J., et al. 2009.** A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio.* *Molecular and Cellular Probes.* 2009, Bd. 23, S. 235-239.
- Cho, G. J. 2005.** Microsatellite Polymorphism and Genetic Relationship in Dog Breeds in Korea. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 8, 2005, 18, S. 1071-1074.
- Consortium, The Bactrian Camels Genome Sequencing and Analysis. 2012.** Genome sequences of wild and domestic bactrian camels. *nature communications* 3:1202. 2012.
- Conyers, C., et al. 2012.** Development of a Microsatellite-Based Method for the Differentiation of European Wild Boar (*Sus scrofa scrofa*) from Domestic Pig Breeds (*Sus scrofa domestica*) in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2012, S. 3341-3347.
- Costa, V., et al. 2012.** Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *BMC Research Notes* 5. 2012, S. 479-485.

-
- David, L. 2009.** *Inheritance of colors and evolution of koi and carp: A study about genetic diversity of carp populations, inheritance of color traits in koi and evolution of the tetraploid genome of this species.* s.l. : VDM Verlag, 2009.
- Duttge, G., Engel, W. und Zoll, B. 2011.** *Das Gendiagnostikgesetz im Spannungsfeld von Humangenetik und Recht.* [Hrsg.] Barbara Zoll. 2011. Bd. 11.
- Ertel, B. und Wichers, S. W. 2013.** *Der Verständigungsschlüssel zum Hund- Die vererbten Rudelstellungen der Hunde nach Philipp, Josef und Karl Werner (1810-1977) Ein anderer Blick auf die Sozialstruktur von Hunden.* 2013.
- Ferreira, E., et al. 2006.** GENETIC STRUCTURE OF THE WILD BOAR (SUS SCROFA L.) POPULATION IN PORTUGAL. *Wildlife Biological Practice* 2 (1). 2006, S. 17-25.
- Gill, P., Jeffreys, A. und Werret, D. 1985.** Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature.* 1985, Bd. 318, S. 577-579.
- Green, R., et al. 2005.** Developmental Validation of the Quantifiler(tm) Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. *Journal of Forensic Science.* 50, 2005, Bd. 4.
- Gundry, R., et al. 2007.** Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Dog: Control Region Variation Within and Among Breeds. *Journal of Forensic Sciences.* 19. 04 2007.
- Gunreben, B., Hölzer, S. und Müller, E. 2011.** Genetische Rassezuordnung von Hunden. *Kleintiermedizin.* 2011, S. 72-74.
- Hejjas, K., et al. 2007.** Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Animal Genetics.* 2007, Bd. 38, S. 629-633.
- Hejjas, K., et al. 2009.** Molecular and behavioral analysis of the intron 2 repeat polymorphism in the canine dopamine D4 receptor gene. *Genes, Brain and Behavior.* 2009, Bd. 8, S. 330-336.
- Hejjas, K., et al. 2007.** Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dogs and wolves. *Mammal Genome.* 2007, Bd. 18, S. 871-879.
- Jeffreys, A., Wilson, V. und Thein, S. L. 1985.** Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *nature.* 1985.
- Kempken, Frank und Kempken, Renate. 2006.** *Gentechnik bei Pflanzen: Chancen und Risiken, 3. Auflage.* Berlin : Springer Verlag, 2006.
- Khanuja, S., et al. 1999.** Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter.* 17, 1999, S. 1-7.
- Krenz, J., et al. 1999.** Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in the gray tree frog, *Hyla chrysoscelis.* *Genome.* 1999, Bd. 42, S. 676-680.

-
- Kryger, U. 2002.** *Genetic variation among South African hares (Lepus spec.) as inferred from mitochondrial DNA and microsatellites.* 2002. PHD thesis.
- Kubinyi, E., et al.** Polymorphism in the Tyrosine Hydroxylase (TH) Gene Is Associated with Activity-Impulsivity in German Shepherd Dogs. *PLoS ONE.* Bd. 7, 1.
- Landsteiner, K. 1901.** Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Bluts. *Wien Klinische Wochenschrift.* 1901, Bd. 14, S. 1132-1134.
- Mansfield, E., et al. 2005.** Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) systems using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis.* 1, 2005, Bd. 19, S. 101-107.
- Modrow, Eckart. 2002.** *Informatik mit Delphi, Band 1.* Scheden : emu-online, 2002.
- **2003.** *Informatik mit Delphi, Band 2.* Scheden : emu-online, 2003.
- **2004.** *Theoretische Informatik mit Delphi.* Scheden : emu-online, 2004.
- Modrow, J., et al. 2012.** Highly reliable quantification of proteins such as members of the HSP70 superfamily based on the grey scale index via immune detection stained bands on a Western blot. *Highly reliable quantification of proteins such as members of the HSP70 superfamily based on the grey scale index via immune detection stained bands on a Western blot.* 2012, Bd. Volume 222, Issues 1–3, S. 256–258.
- Modrow, J.-H., et al. in Vorbereitung.** Identification of European wild and farm animals using multiplex STR-Assays. *Forensic Science.* in Vorbereitung.
- Modrow, J.-H., et al. im Review.** Molekulargenetische Identifikation von Canidae in der forensischen Praxis. *Rechtsmedizin.* im Review.
- Moran, C. 1993.** Microsatellite Repeats in Pig (*Sus domestica*) and Chicken (*Gallus domesticus*) Genomes. *The Journal of Heredity* 84. 1993, S. 274-280.
- Mougel, F., Mounolou, J. und Monnerot, M. 1997.** Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics* 28. 1997, S. 58-72.
- Mülhardt, Cornel. 2009.** *Der Experimentator - Molekularbiologie / Genomics, 6. Auflage.* Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- Mullis, K. und Faloona, A. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 1987, Bd. 155, S. 335-350.
- Murray, V., Monchawin, C und England, P.R. 1993.** The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeats PCR. *Nucleic Acids Research.* 1993, Bd. 21, S. 2395-2398.
- Nanekarani, S., Amirinia, C. und Amirmozofari, N. 2011.** Genetic analysis of Karakul sheep breed using microsatellite markers. *African Journal of Microbiology Research* 5 (6). 2011, S. 703-707.
- O'Brien, S., et al. 2002.** THE FELINE GENOME PROJECT. *Annual Review of Genetics* Vol. 36. Dezember 2002, S. 657-686.

- Ostrander, E., Sprague, G. und Rine, J. 1993.** Identification and Chracterization od Dinucleotide Repeat (CA)_n Markers for Genetic Mapping in Dog. *Genomics*. 1993, Bd. 16, S. 207-213.
- Poetsch, M., et al. 2001.** Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer D possible employment in forensic applications. *Forensic Science International* 116. 2001, S. 1-8.
- Poetsch, M., et al. 2011.** First experiences using the new Powerplex® ESX17 and ESI17 kits in casework analysis and allele frequencies for two different regions in Germany. *International Journal of Legal Medicine*. September 2011, S. 733-739.
- Promega. 2006.** ProtoBlot(R) II AP System with stabilized Substrate. 1 2006.
- Quinn, T. 1999.** Sex and the single chromosome. *Int. Ornithol. Congr.* 1999, S. 434-449.
- Rohland, N. und Hofreiter, M. 2007.** Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*. 2007, S. 343-352.
- Sadeghi, R., et al. 2009.** Genetic Analysis in Tali Goats Based on 13 Microsattelite Markers. *Research Journal of Biological Sciences* 4 (6). 2009, S. 734-737.
- Schneider, P., Seo, Y. und Rittner, C. 1999.** Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *International Journal of Legal Medicine*. 1999, Bd. 112, 5, S. 315-316.
- Schwark, T., Heinrich, A. und von Wurmb-Schwark, N. 2011.** Genetic identification of highly putrefied bodies using DNA from soft tissues. *Int J Legal Med*. 125 (6), 2011, S. 891-894.
- Shah, M. G., Qureshi, A. S. und Reissmann, M. 2014.** *Phenotypic and Genetic Differentiation of Pakistani Camel Breeds*. s.l. : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014.
- Sparkman, A., et al. 2012.** Evidence for a genetic basis for delayed dispersal in a cooperatively breeding canid. *Animal Behaviour*. 2012, Bd. 83, S. 1091-1098.
- Statista GmbH. 2014.** Anzahl der Haustiere in deutschen Haushalten seit 2008. *Statista - Das Statistik Portal*. [Online] 2014. [Zitat vom: 26. 03 2014.] <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/30157/umfrage/anzahl-der-haustiere-in-deutschen-haushalten-seit-2008/>.
- . 2014. Entwicklung des Pferdebestands in Deutschland seit 1900. *Statista - Statistik Portal*. [Online] 2014. [Zitat vom: 26. 03 2014.] <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/163428/umfrage/entwicklung-des-pferdebestands-in-deutschland-seit-1900/>.
- Stratec. 2012.** http://www.stratec.com/share/molecular/Manuals/InviMag/KF96_Flex/InviMagPlantDNAMiniKit_KF96.pdf. *stratec.com*. [Online] 2012. [Zitat vom: 08. 04 2014.] http://www.stratec.com/share/molecular/Manuals/InviMag/KF96_Flex/InviMagPlantDNAMiniKit_KF96.pdf.

-
- Stratec Invitek. 2012.** Purification of Forensic DNA Samples with the KingFisher® Magnetic Particle Processor and Characterization of the Purified DNA. *Stratec Biomedical* . [Online] 2012. [Zitat vom: 12. 03 2014.]
- Suomalainen, S., et al. 2012.** Optimization of the DNA Purification. *ThermoScientific.com*. [Online] 2012. [Zitat vom: 08. 04 2014.] <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D16546~.pdf>.
- Taylor, K., et al. 1968.** Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenetics* 7. 1968, S. 8–15.
- Tozaki, T., Kakoi, S. und Mashima, K. 2001.** Population study and validation of paternity testing for thoroughbredhorses by 15 microsatellite loci. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2001, Bd. 63, S. 1191-1197.
- Vaiman, D., et al. 1994.** A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome* 5. 1994, S. 288-294.
- Vella, C., Shelton, L. und McGonagle, J. 1999.** *Genetics for Cat Breeders and Veterinarians*. s.l. : Cima Robinson's, 1999.
- Wade, C. M. 2009.** Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science Vol. 326 no. 5954*. 06. 11 2009, S. 865-867.
- Walsh, P., Fildes, R. und Reynolds, R. 1996.** Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus VWA. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24, S. 2807-2812.
- Watson, J. und Crick, E. 1953.** Molecular structure of nucleic acids; a structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953, Bd. 171, S. 737-738.
- Yang, F., et al. 2004.** Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. *Chromosome Research*. 2004, Bd. 12, S. 65-76.
- Zhang, Y., et al. 2011.** Identification of Common Carp Innate Immune Genes with Whole-Genome Sequencing and RNA-Seq Data. *Journal of Integrative Bioinformatics* 8(2). 2011, S. 169 ff.
- Zheng, X., et al. 2010.** A set of polymorphic trinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers for silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and cross-amplification in crucian carp. *Biochem Genet*. 2010, Bd. 48, 7-8, S. 624-635.

10. Anhang

10.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
a	Anzahl Allele
A. dest	Aqua dest
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar, Größenangabe für Nukleinsäuren
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
C	Cytosin
ca.	circa
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
et al.	et alteri
G	Guanin
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
K	Kind
kb	Kilobasenpaar
M	Molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
NK	Negativkontrolle
ng	Nanogramm
PAA	Poly-Acrylamid
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PK	Positivkontrolle
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RFU	relative fluorescent unit

rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
STR	short tandem repeat
T	Thymin
Taq	DNA-Polymerase des <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris/HCl-EDTA-Puffer
V	Volt
VNTR	variable number tandem repeats
µg	Mikrogramm

10.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines DNA-Doppelstrangs (selbst erstellt). Die Nukleotide Adenin und Thymin sind über zwei Wasserstoffbrücken, Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken verbunden. Die Nukleotidpaare wiederum sind über ein Zucker-Phosphat Gerüst mit einer verbunden. Aufgrund der sterischen Anordnung der Moleküle ergibt sich eine Verdrillung, sodass sich eine helicale Anordnung ausbildet.....	2
Abb. 2: Vergleich von Homozygotie und Heterozygotie am Beispiel eines fiktiven Genorts (eigene Darstellung). Gezeigt ist jeweils die Sequenzabfolge einer Homozygotie und Heterozygotie sowie das zugehörige Ergebnis in einem Elektropherogramm. Die Wiederholungsmuster (hier: CT-Dinukleotidwiederholungen) sind fett hervorgehoben. bp=Basenpaare	4
Abb. 3: Vergleich von Butterfly-Koi (A) und der normalen Zuchtform (B) (Quelle: http://www.koi-pond-guide.com). Zusätzlich ist in B die hohe Farbvarianz der Koi-Karpfen zu sehen.	12
Abb. 4: Schematische Darstellung der beiden Kamel Familien (Eigene Darstellung, Zeichnungen: pixabay.de). Die Tiere der beiden Familien sind jeweils untereinander fortpflanzungsfähig.	14
Abb. 5: Veranschaulichung der Probenentnahme von Mundschleimhautabstrichen beim Hund (exemplarisch). Die Lefze des Tieres wird vorsichtig nach oben geschoben und mit dem Abstrichtupfer mit etwas Druck die Flächen oberhalb der Zahnreihe sowie die Lefzeninnenflächen abgerieben.....	18
Abb. 6: Bildschirmfoto des Startfensters der Wookie Datenbank v3.9.2 (Stand Dezember 2013). Über die verschiedenen Buttons sind die verschiedenen Funktionen für die entsprechende Spezies aufrufbar. Zusätzlich ist die numerische Codierung sowie die aktuell hinterlegte Anzahl an Datensätzen für die jeweilige Spezies ablesbar. Ergänzend ist rechts die Fleisch Datenbank anwählbar.....	19
Abb. 7: Schematische Darstellung einer semiautomatischen Extraktion mittels Magnetic Beads Prinzip (eigene Darstellung). Die Extraktion erfolgte im KingFisher® Duo bzw. im KingFisher® Flex.	21
Abb. 8: Übersicht über die in den Wells (KF Duo) bzw. Platten (KF Flex) eingesetzten Reagenzien. Angegeben ist jeweils die eingesetzte Komponente sowie dessen Volumen. Bei den Tips handelt es sich um einen (Duo) oder mehrere (Flex) Plastikämme, die über dem Magnetkopf des Geräts sitzen.	22
Abb. 9: Übersicht über die in den Wells (KF Duo) bzw. Platten (KF Flex) eingesetzten Reagenzien. Angegeben wurde jeweils die eingesetzte Komponente sowie dessen Volumen. Bei den Tips handelt es sich um einen (Duo) oder mehrere (Flex) Plastikämme, die über dem Magnetkopf des Geräts sitzen.	23

-
- Abb. 10: Schematische Übersicht eines PCR-Zyklus (eigene Darstellung). Nach der initialen Aktivierung der Polymerase bei 94 ° C bis 95 ° C wird in der Denaturierungsphase bei 94 ° C - 95 ° C der DNA-Doppelstrang getrennt. In der Primerhybridisierung-Phase lagern sich die fluoreszenzmarkierten Primer an die Einzelstränge. Bei einer Temperatur von 72 ° C findet die spezifische Verlängerung (Elongation) der Primer statt. Im Anschluss erfolgt eine finale Elongation bei 72 ° C..... 29
- Abb. 11: Übersicht über die Koi Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, gelb=ATTO550, rot=ATTO565). 34
- Abb. 12: Übersicht über die Kaninchen Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, gelb=ATTO550)..... 38
- Abb. 13 Übersicht über die Kamel Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, gelb=ATTO550)..... 40
- Abb. 14 Übersicht über die Meat-Plex Multiplex-PCR. Die X-Achse zeigt die jeweilige zu erwartende Fragmentlänge der einzelnen STR-Systeme in Basenpaaren an. Die Farben zeigen den analogen Fluoreszenzfarbstoff an (blau=6-FAM, grün=JOE, rot=ATTO565)..... 42
- Abb. 15: Bildschirmfoto der Oberfläche der SeSca© Software. Oben in den Feldern Controll I bis III sind die jeweiligen Referenzsequenzen der drei verschiedenen mtDNA Bereiche hinterlegt. In den Feldern Sequenz I bis III werden die zu analysierenden Sequenzen eingefügt. Nach einem Klick auf die Buttons >>Del<<, >>Ins<< und >>Bereinige<< werden die Sequenzen auf Deletions- und Insertionsmutationen hin untersucht und entsprechend zur eigentlichen Analyse aufbereitet. Der Abgleich erfolgt nach einem Klick auf >>Finde Mutationen<<, die entsprechenden Abweichungen zur Referenzsequenz werden in den Feldern Mutationen I bis III angezeigt..... 48
- Abb. 16: Bildschirmfoto des CalcSTR© Moduls. In den Dropdown-Feldern wird die detektierte Fragmentlänge für den spezifischen Genort manuell eingegeben oder über die ABI Schnittstelle direkt importiert. Die Phänotypfrequenz wird in Echtzeit mit jeder Eingabe berechnet. Der Wahrscheinlichkeitsindex sowie die Diskriminierungsrate werden mit einem Klick auf >>Solve<< berechnet. Über den Button >O< lassen sich weitere Allelfrequenzdaten laden und mit einem Klick auf >>Neu Berechnen<< entsprechend neu analysieren. 51
- Abb. 17: Bildschirmfoto der MischSTR© Oberfläche. Die Analyse wurde in drei Schritte unterteilt. Angezeigt werden die aktuell in der Datenbank befindlichen Rassen sowie die genetische

Übereinstimmung des in Schritt 2 eingegeben genetischen Fingerabdrucks mit der entsprechenden Rasse.....	53
Abb. 18: Allelverteilung für den Genort FHC2010. In der gepoolten Hundepopulation konnten 22 Allele nachgewiesen werden. In diesem Genort konnten fünf Allele für die Gruppe der Stöberhunde sowie drei Genorte für die Beagle detektiert werden. In B) schwarz=Stöberhunde, grau=Beagle. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.	57
Abb. 19: Allelverteilung für den Genort PEZ20 In der gepoolten Hundepopulation konnten 20 Allele nachgewiesen werden. In diesem Genort konnten vier Allele für die Gruppe der Stöberhunde sowie zwei Genorte für die Beagle detektiert werden. In B) schwarz=Stöberhunde, grau=Beagle. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.	58
Abb. 20: Allelverteilung für den Genort PEZ8 der Kategorie „Stöberhunde “. In diesem Genort konnten acht Allele detektiert werden. In B) schwarz=Stöberhunde, grau=Beagle. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.	59
Abb. 21: Allelverteilung für den Genort AHTk211. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten vier Allele für die Stöberhunde (schwarz) und fünf Allele für die Retriever (grau) detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.	61
Abb. 22: Allelverteilung für den Genort REN54P11. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten sieben Allele für die Stöberhunde (schwarz) und fünf Allele für die Retriever (grau) detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.	62
Abb. 23: Allelverteilung für den Genort REN169D01. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten sechs Allele für die Stöberhunde(schwarz) und vier Allele für die Retriever (grau) detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.	63
Abb. 24: Übersicht der bei der Stellungsfähigkeit untersuchten Hunde. Die Kategorisierung erfolgte vorab durch 5 unabhängige Tierärzte anhand des Sozialverhaltens der Tiere. Das hier gezeigte Kollektiv diente als Referenz für die genetischen Analysen.....	67
Abb. 25: Allelverteilung für den Genort AHT4. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnten fünf Allele für das Fordpferd (schwarz) und fünf Genorte für die Araber detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an.	70

- Abb. 26: Allelverteilung für den Genort HTG6. A) Allelverteilung in der untersuchten Gesamtpopulation. B) In diesem Genort konnte ein Allel für das Fordpferd (schwarz) und sechs Genorte für die Araber detektiert werden. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an. 71
- Abb. 27: Extraktion von Koi-DNA aus 100 mg Skelettmuskulatur. Abgebildet ist ein 2%-iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid-Färbung. HL I = Hyperladder I; HL IV=Hyperladder IV (beide Biomers™) 73
- Abb. 28: Genetische Geschlechtsbestimmung beim Koi-Karpfen. Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt. In allen Proben konnte das Fragment des Haushaltsgens GAPDH (rosa) nachgewiesen werden. Das Y-spezifische Fragment ist blau umrandet. Sowohl Abrieb als auch Schuppe des Spiegelkarpfens zeigten das gleiche Resultat. Bei allen übrigen Proben handelte es sich um Abriebe der Schuppen. +: positiver Test; -: negativer Test 1: Spiegelkarpfen - Abstrich |2: Spiegelkarpfen - Schuppe |3: 03- Jürg |4: 03-Beat |5: 03-Dört |6: 03-Ralf |7: 03-xPmi |8: 03-ZnFe 76
- Abb. 29: Extraktion von Katzen-DNA aus 100 mg Gewebe. Abgebildet ist ein 2%-iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid-Färbung. HL I = Hyperladder I; HL IV=Hyperladder IV (beide Biomers™) 77
- Abb. 30: Allelverteilung für den Genort F53. A) Allelausprägungen in der Gesamtpopulation. B) schwarz=Allele Europäisches Kurzhaar; grau=Allelausprägung Ragdoll. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an..... 78
- Abb. 31: Allelverteilung für den Genort FCA441. A) Allelausprägungen in der Gesamtpopulation. B) schwarz=Allele Europäisches Kurzhaar; grau=Allelausprägung Ragdoll. Die X-Achse zeigt jeweils das Allel, die Y-Achse gibt die prozentuale Verteilung in der untersuchten Population an..... 79
- Abb. 32: Elektropherogramm von von Kaninchen DNA aus 100 mg Ovargewebe. Ein volles Profil konnte bis zu einen DNA Gehalt von 38 pg dargestellt werden. 81
- Abb. 33: Verdünnungsreihe von Kamel-DNA. Es handelt sich um ein 2%-iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung. Als Ausgangsmaterial diente im Handel erworbenes Trockenfleisch. Hochmolekulare DNA konnte nur in der unverdünnten DNA nachgewiesen werden. 83
- Abb. 34: Genetische Analyse von Landwirtschaftlichen Nutztieren mithilfe der Meat-Plex. Gezeigt sind alle auftretenden STR-Systeme für die gängigsten Fleischerzeuger. Gut zu erkennen ist auch die aufgrund von DNA Slippages auftretende Triadenform der Peaks im Elektropherogramm. 87
- Abb. 35: Nachweis von hunde-spezifischen STR-Merkmalen mit dem Stockmarks™ for Dogs Kit (Applied Biosystems®). Exemplarisch gezeigt für den Hund mit der ID 01-TySn. Es konnte in allen zehn Genorten ein Merkmal dargestellt werden. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt..... 159
- Abb. 36: Nachweis von hunde-spezifischen STR-Merkmalen mit dem Finnzymes™ Canine Panel 1.1 Kit (Thermo Scientific®). Exemplarisch gezeigt für den Hund mit der ID 01-affb. Ein Volumen von 2 µl

mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 17 Genorten ein Merkmal dargestellt werden.	160
Abb. 37: Nachweis von pferde-spezifischen STR-Merkmalen mit dem Finnzymes™ Equine Panel 1.1 Kit (Thermo Scientific®). Exemplarisch gezeigt für das Pferd mit der ID 02-ucNt. Ein Volumen von 1 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 17 Genorten ein Merkmal dargestellt werden.	161
Abb. 38: Nachweis von Katzen-spezifischen STR-Merkmalen mit dem selbst-weiterentwickelten MEOW-Plex Kit. Exemplarisch gezeigt für eine Gewebeprobe einer Katze. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus 100 mg Ovargewebe wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 12 Genorten ein Merkmal dargestellt werden.....	162
Abb. 39: Nachweis von koi-spezifischen STR-Merkmalen mit der selbst-entwickelten Koi-PLex. Exemplarisch gezeigt für den Koi-Karpfen mit der ID 03-JüRG. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus einem Körperschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 12 Genorten ein Merkmal dargestellt werden. In den Genorten MFW26 und MFW7 lassen sich sehr gut die aufgrund eines Abrutschens der Polymerase entstehenden Triaden bzw. „Orgelpfeifen-artigen “ Peaks erkennen.	163
Abb. 40: Nachweis von kaninchen-spezifischen STR-Merkmalen mit der selbst-entwickelten Bunny-Plex. Exemplarisch gezeigt für das Kaninchen mit der ID 05-jACKY. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen neun Genorten ein Merkmal dargestellt werden.	164
Abb. 41: Nachweis von kamel-spezifischen STR-Merkmalen mit der selbst-entwickelten Camel-Plex Multiplex-PCR. Exemplarisch gezeigt für das Kamel mit der ID 06-CML4. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus 100 mg Gewebe wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen zehn Genorten ein Merkmal dargestellt werden.....	165
Abb. 42: Elektropherogramm der Wild-Plex. Zur besseren Übersicht, wurden bei der Einzelanalyse der Wild-Plex die Wildschwein-Systeme mit JOE (grün) markiert und zusätzlich zwei Marker für die Marderartigen (Mustelidae) ergänzt.....	166
Abb. 43: Elektropherogramme der Farm-Plex. Gezeigt ist der Vergleich von selbst-angeseztem Hackfleisch (A) und kommerziell erhältlichem Hackfleisch (B). In (B) ist zusätzlich ablesbar, dass das Fleisch von mindestens zwei Schweinen verwendet wurde.....	167

10.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Pipettierschema des Mastermix ‘ für das Stockmarks™ for Dogs Kit. Aufgrund der geringen Mengen werden mindestens vier Proben simultan angesetzt. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.	30
Tab. 2: Pipettierschema des Mastermix ‘ für das Finnzymes™ Canine Panel 1.1 Kit. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt $\frac{1}{4}$ des Probenvolumens.	31
Tab. 3: Pipettierschema des Mastermix ‘ für das Stockmarks™ for Horses Kit. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.	32
Tab. 4: Pipettierschema des Mastermix ‘ für das Finnzymes™ Equine Panel 1.1 Kit. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt $\frac{1}{4}$ des Probenvolumens.	33
Tab. 5: Pipettierschema des Mastermix ‘ für die Koi Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.....	35
Tab. 6: Pipettierschema für den Katzen-Primermix. Das Gesamtvolumen des Primermix ‘ beträgt 120 μ l. Zusätzlich ist der Fluoreszenzfarbstoff mit angegeben; die Farbe indiziert die emittierte Farbwellenlänge bei Bestrahlung mit einem Argonlaser.	36
Tab. 7: Pipettierschema des Mastermix ‘ für die Katzen Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.....	37
Tab. 8: Pipettierschema des Mastermix ‘ für die Kaninchen Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.....	39
Tab. 9: Pipettierschema des Mastermix ‘ für die Kamel Multiplex PCR. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das zweifache Probenvolumen.....	41
Tab. 10: Pipettierschema des Mastermix ‘ für die Meat-Plexes. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.	43
Tab. 11: Pipettierschema des Mastermix ‘ für die Geschlechtsanalyse beim Koi. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.	44
Tab. 12: Pipettierschema des Mastermix ‘ für die Verhaltensanalyse beim Hund. Der einkalkulierte Pipettierverlust beträgt das doppelte Probenvolumen.	45
Tab. 13: Übersicht über den Master Mix für die erste PCR zur mtDNA Analyse. Das Gesamtvolumen pro Probe beträgt 20 μ l, es werden 5 μ l Template hinzugegeben.....	46
Tab. 14: Übersicht über die Ergebnisse von drei Mischlingsanalysen. Für alle Tiere wurde ein Bild mitgeschickt und Stockmaß und Gewicht des Tieres waren bekannt. Sofern bekannt, wurde zusätzlich vom Besitzer die beteiligte Rasse angegeben. Es wurde jeweils eine genetische Mischlingsanalyse sowie ergänzend eine Phänotypanalyse zur Bestätigung durchgeführt. Im Fall von 01-tBuG konnten	

sowohl genetisch als auch phänotypisch neben den angegebenen Rassen noch zusätzlich der Magyar Vizsla nachgewiesen. Hierbei handelt es sich allerdings, wie beim Pointer, um einen Vorstehhund. Entsprechend ist das Ergebnis nachvollziehbar.	65
Tab. 15: Übersicht über die Allelverteilung beim vorrangigen Leithund (VLH; n= 26) im untersuchten Kollektiv für alle vier Genorte. Die größte Variabilität zeigt der Genort DRD4-3, der mit einem gesteigerten Aggressionspotenzial assoziiert ist.....	68
Tab. 16: Übersicht über die genetischen Daten der untersuchten Koi-Karpfen. Wenn eine Null angegeben ist, so besteht eine Hetero- oder Homozygotie.	74
Tab. 17 Übersicht über die genetischen Daten der untersuchten Kamele. Angegeben ist jeweils die ID sowie die Kamelart, in chronologischer Reihenfolge. Eine Null bedeutet, dass das Merkmal homozygot vorliegt.	84
Tab. 18: Übersicht über getestetes, bereits verarbeitetes Fleisch, welches mit der Meat-Plex untersucht wurde. Mit Ausnahme des Cevapcicis (Rind, gewürzt, roh) wurden bei allen Lebensmitteln die erwarteten Spezies nachgewiesen.	88
Tab. 19: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Hunden. Es wurde das Stockmarks™ Kit für die Analyse verwendet. HE= Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a= Anzahl Allele	128
Tab. 20: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Hunden. Es wurde das Finnzymes™ Kit für die Analyse verwendet. HE= Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a=Anzahl Allele	131
Tab. 21: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Pferden. Es wurde das Finnzymes™ und das Stockmarks™ Kit für die Analyse verwendet. HE= Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a=Anzahl Allele	135
Tab. 22: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Katzen. Es wurde eine selbsterstellte PCR für die Analyse verwendet. HE=Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a=Anzahl Allele	138
Tab. 23: Übersichtstabelle über die Ergebnisse der Sequenzierung der mtDNA ausgewählter Hunderassen. Angegeben ist jeweils die Rasse sowie die detektierten Mutationen in der entsprechenden Kontrollregion. Die Zahl gibt die Position der Mutation, der Buchstabe jeweils das mutierte Nukleotid an.	142
Tab. 24: Übersicht über die Stockmarks™ Genotyping for Dogs Canine Kit. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente.....	146
Tab. 25: Übersicht über das Temperaturprofil für das Stockmarks™ Hunde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	146

Tab. 26: Übersicht über das Finnzymes™ Canine 1.1 Kit. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente. Di=Dinkleotid, Tetra=Tetranukleotide	147
Tab. 27: Übersicht über das Temperaturprofil für das Finnzymes™ Hunde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	148
Tab. 28: Übersicht über die Multiplex zur Bestimmung der Stellungsfähigkeit beim Hund. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Primerhybridisierungs-Temperatur und Größe der Fragmente.	148
Tab. 29: Übersicht über das Temperaturprofil für die PCR zur Verhaltens- und Stellungsfähigkeitsanalyse beim Hund. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	148
Tab. 30: Übersicht über die verwendeten Referenzsequenzen bei der Analyse der mitochondrialen DNA der Hunde. Als Referenz diente die DNA Sequenz eines Wolfes (Broad Institute).	149
Tab. 31: Übersicht über das Temperaturprofil mtDNA Sequenzierungs-PCR beim Hund. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	149
Tab. 32: Übersicht über das Temperaturprofil für das Stockmarks™ Pferde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	150
Tab. 33 Übersicht über das Temperaturprofil für das Finnzymes™ Pferde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	150
Tab. 34: Übersicht über die MEOW-Plex Katzen-Multiplex-PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen und Größe der Fragmente.	151
Tab. 35: Übersicht über das Temperaturprofil für die Katzen-Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	151
Tab. 36: Übersicht über die Koi-Plex Koi-Karpfen-Multiplex-PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente.	152
Tab. 37 Pipettierschema für den Koi Primermix. Das Gesamtvolumen des Primermix ‘ beträgt 120 µl. Zusätzlich wird der Fluoreszenzfarbstoff mit angegeben; die Farbe indiziert die emittierte Farbwellenlänge bei Bestrahlung mit einem Argonlaser.	152
Tab. 38: Übersicht über das Temperaturprofil für die Koi-Karpfen Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	153
Tab. 39: Übersicht über das Temperaturprofil für die PCR zur Bestimmung des Geschlechts beim Koi-Karpfen. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	153

Tab. 40: Übersicht über die Kaninchen-spezifische Multiplex PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente.....	154
Tab. 41: Übersicht über das Temperaturprofil für die Kaninchen Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.....	154
Tab. 42: Übersicht über die Kamel Multiplex PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie die Größe der Fragmente (fwd=Vorwärts-Primer; rev=Rückwärts-Primer).	155
Tab. 43: Übersicht über das Temperaturprofil für die Kamel Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	156
Tab. 44: Übersicht über die Meat-Plex Multiplex PCR. Aufgeführt sind jeweilige Spezies, STR Systeme, Primersequenzen sowie die Größe der Fragmente und die PCR.	156
Tab. 45: Übersicht über das Temperaturprofil für die Meat-Plex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.	157
Tab. 46: Übersicht über die im Genetic Analyzer ABI 3130 verwendeten Parameter.....	158

10.4. Veröffentlichungen

Veranstaltung/Zeitschrift	Titel	Autoren	Art
Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 06/202; 39(3):87-93.	The SNPforID Assay as a Supplementary Method in Kinship and Trace Analysis	T. Schwark, P. Meyer, M. Harder, J.-H. Modrow, N. von Wurmb-Schwark	Paper
Forensic Science International - Volume 222, Issue , Pages 256-258, 30 October 2012	Highly reliable quantification of proteins such as members of the HSP70 superfamily based on the grey scale index via immune detection stained bands on a Western blot	J.-H. Modrow, A. Preuße-Prange, P. Meyer, M. Harder, T. Schwark, N. von Wurmb-Schwark	Paper
Rechtsmedizin (im Review)	Molekulargenetische Identifikation von Canidae in der forensischen Praxis	J.-H. Modrow, O. Revyakina, H. Reder, , J. Hasse, N. von Wurmb-Schwark, T. Schwark	Paper
ISALM/DGRM 2011	Automatisierte Analyse von Datensätzen zur Qualitätssicherung in der forensischen Routinearbeit	J.-H. Modrow, P. Meyer, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
Norgenta 2012	Der molekulargenetische Speziesnachweis in der rechtsmedizinischen Praxis	O. Revyakina, T. Schwark, J.-H. Modrow, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
DGRM 2012	Die Stabilität von Proteinen in Gewebeextrakten	J. Hasse, J.-H. Modrow, A. Preuße-Prange, T. Schwark, J. Preuß-Wössner, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
DGRM 2012	Weiterentwicklung des STR-Rechners CalcSTR© und Entwicklung eines SNPIdentitätsrechners mit Gutachtengenerator	J.-H. Modrow, P. Meyer, A. Preuße-Prange, T. Schwark, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
Norgenta 2012	Weiterentwicklung des STR-Rechners CalcSTR© und Entwicklung eines SNPIdentitätsrechners mit Gutachtengenerator	J.-H. Modrow, P. Meyer, A. Preuße-Prange, T. Schwark, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag

Veranstaltung/Zeitschrift	Titel	Autoren	Art
Norgenta 2012	Die Stabilität von Proteinen in Gewebeextrakten	J. Hasse, J.-H. Modrow, A. Preuße-Prange, T. Schwark, J. Preuß-Wössner, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
Norgenta 2012	Das Lumatec™ Superlite© 400 in der forensischen Spurenkunde	H. Reder, J.-H. Modrow, J. Hasse, A. Preuße-Prange, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
Norgenta 2012	Software für das Qualitätsmanagement während forensischer DNA-Untersuchungen	S. Kornell, P. Meyer, J.-H. Modrow,	Postervortrag
ISALM/DGRM 2011	Entwicklung einer Datenbank zur Archivierung und Bearbeitung forensischer Datensätze	P. Meyer, J.-H. Modrow, N. von Wurmb-Schwark	Vortrag
DGRM 2012	Die Expression von Stressproteinen in der menschlichen Niere	J. Hasse, N. von Wurmb-Schwark, A. Preuße-Prange, J.-H. Modrow, J. Preuß-Wössner, T. Schwark	Vortrag
DGRM 2012	Der molekulargenetische Speziesnachweis in der rechtsmedizinischen Praxis	O. Revyakina, T. Schwark, J.-H. Modrow, N. von Wurmb-Schwark	Vortrag
Ideenwettbewerb 2012 des WTSH	MeMo Forensics – Entwicklung von Software mit medizinischem, (forensisch) biologischem und chemischem Hintergrund	J.H. Modrow, P.Meyer, A. Modrow	Vortrag
Norgenta 2012	Expression von HSP70 in der menschlichen Niere und der mögliche Zusammenhang zu ausgewählten Todesursachen	J. Hasse, N. von Wurmb-Schwark, A. Preuße-Prange, J.-H. Modrow, J. Preuß-Wössner, T. Schwark	Vortrag
Norgenta 2012	Der Einfluss von Formalin auf Protein- und DNA-Analysen im Gewebe, zerstört es mehr als es erhält?	A. Preuße-Prange, J.H. Modrow, T.Schwark, N. von Wurmb-	Vortrag

Veranstaltung/Zeitschrift	Titel	Autoren	Art
		Schwark	
ISFG 2013	Wild-Plex: A STR based multiplex-PCR for the identification of wild European animals in forensic case work	Nicole von Wurmb-Schwark, Elisabeth Richert; Jan-Hendrik Modrow; Thorsten Schwark	Postervortrag
ISFG 2013	Establishment of a STR multiplex PCR for the identification of farm animal species in gastric contents and food	Thorsten Schwark; Vera Hessling; Jan-Hendrik Modrow; Nicole von Wurmb-Schwark	Postervortrag
DGRM 2012	Mitochondriale DNA-Veränderungen im Kleinhirn in Zusammenhang mit hypoxischen Ereignissen	Preuss, M; Schwark, T; Twelsiek, S; Preuße-Prange, A; Modrow, J-H; von Wurmb-Schwark, N	Postervortrag
Norgenta 2013	Entwicklung einer Datenbank zur QM konformen Verarbeitung von Datensätzen in der forensischen Routine	Hasse, J und Modrow J, Meyer P, von Wurmb-Schwark N	Postervortrag
Norgenta 2013	Etablierung einer STR-Multiplex zur Identifizierung von Nutztieren in Lebensmitteln und Mageninhalt	Jan-Hendrik Modrow, E. Richert, J. Hasse, T.Schwark, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
Norgenta 2013	Entwicklung einer STR-Multiplex-PCR für die Identifikation europäischer Wildtiere in der Forensik	E. Richert, J.-H. Modrow, A. Preuße-Prange, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag
Norgenta 2013	Entwicklung einer STR basierten Multiplex-PCR und Auswertesoftware zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks der Katze	C. Enzenauer und J. Modrow, E. Steinmeier, T. Schwark, N. von Wurmb-Schwark	Postervortrag

10.5. Tabellen

Tab. 19: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Hunden. Es wurde das Stockmarks™ Kit für die Analyse verwendet. HE= Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a= Anzahl Allele

FHC2010	a=22	FHC2054	a=228	FHC2079	a=225	PEZ1	a=221
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
214	0,00487805	140	0,00487805	170	0,00487805	101	0,00487805
215	0,00487805	144	0,02682927	264	0,00731707	102	0,00487805
219	0,00243902	145	0,05853659	270	0,03414634	103	0,00487805
224	0,01463415	148	0,00243902	271	0,13170732	104	0,00243902
225	0,05365854	149	0,17560976	272	0,05609756	105	0,01219512
226	0,01707317	150	0,03414634	273	0,01219512	106	0,03658537
227	0,00243902	151	0,00243902	274	0,07317073	109	0,01707317
228	0,02195122	153	0,09756098	275	0,19756098	110	0,14390244
229	0,16341463	154	0,0902439	276	0,06585366	111	0,00731707
230	0,15853659	156	0,00243902	277	0,02926829	112	0,00731707
231	0,01219512	157	0,00243902	278	0,08292683	113	0,07073171
233	0,05609756	158	0,05609756	279	0,13170732	114	0,19512195
234	0,12926829	161	0,00243902	280	0,02926829	116	0,00731707
235	0,01463415	162	0,06585366	281	0,0097561	117	0,06829268
236	0,0097561	163	0,00731707	282	0,0195122	118	0,22439024
237	0,04878049	165	0,00243902	283	0,00731707	119	0,00243902
238	0,15609756	166	0,1097561	284	0,00487805	121	0,0097561
239	0,06829268	167	0,00243902	286	0,01219512	122	0,10243902
240	0,00243902	168	0,0097561	287	0,00243902	125	0,00243902
242	0,00487805	169	0,00487805	288	0,00487805	126	0,02926829
243	0,0097561	170	0,06829268	290	0,03902439	130	0,02195122
244	0,00487805	171	0,00243902	291	0,00731707	HE: 0,86724569	
HE: 0,89236169		172	0,00487805	294	0,0097561	H0: 0,95354239	
H0: 0,95631929		173	0,01219512	295	0,00731707	PD: 0,99367837	
PD: 0,99510735		174	0,05365854	299	0,0097561	P-Value: 0,00632163	
P-Value: 0,00489265		175	0,01219512	HE: 0,90090422			
		178	0,00487805	H0: 0,96039024			
		237	0,00487805	PD: 0,99603617			
		HE: 0,91850089		P-Value: 0,00396383			
		H0: 0,96707317					
		PD: 0,99708932					
		P-Value: 0,00291068					

PEZ20	a=220	PEZ3	a=235	PEZ5	a=222	PEZ6	a=241
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
158	0,00243902	100	0,00243902	100	0,03414634	164	0,0097561
167	0,01463415	101	0,00243902	101	0,33902439	165	0,01219512
170	0,01219512	107	0,00243902	102	0,09268293	166	0,00243902
171	0,08292683	109	0,00243902	103	0,03170732	167	0,00487805
172	0,00487805	110	0,0195122	104	0,0097561	168	0,00731707
174	0,07073171	111	0,00487805	105	0,15365854	169	0,00243902
175	0,33170732	112	0,00731707	106	0,02439024	171	0,00731707
176	0,00243902	113	0,00731707	108	0,01219512	172	0,04390244
177	0,00243902	115	0,01219512	109	0,1902439	173	0,00243902
178	0,04146341	116	0,02926829	110	0,0097561	174	0,00487805
179	0,26341463	117	0,02682927	111	0,00243902	175	0,02682927
180	0,00487805	118	0,09512195	112	0,00243902	176	0,1
182	0,04146341	119	0,14146341	113	0,04878049	177	0,00487805
183	0,07073171	120	0,02926829	115	0,00243902	178	0,01219512
186	0,01463415	121	0,04390244	116	0,00731707	179	0,09512195
187	0,0195122	122	0,08780488	122	0,00243902	180	0,18536585
188	0,00243902	123	0,06829268	84	0,00243902	181	0,02439024
189	0,00487805	125	0,00243902	93	0,01219512	182	0,0195122
190	0,00243902	124	0,01707317	95	0,00243902	183	0,10487805
191	0,00487805	125	0,02682927	96	0,00243902	184	0,1
HE:	0,79917906	126	0,03414634	97	0,00487805	185	0,02682927
H0:	0,9502439	127	0,01219512	99	0,00243902	186	0,00487805
PD:	0,98995895	128	0,05121951	HE:	0,81091017	187	0,02195122
P-Value:	0,01004105	129	0,0804878	H0:	0,95498891	188	0,03414634
		131	0,01463415	PD:	0,99140501	189	0,00243902
		132	0,03170732	P-Value:	0,00859499	190	0,00731707
		133	0,00243902			191	0,01707317
		134	0,0195122			192	0,02439024
		135	0,04878049			193	0,0097561
		137	0,00487805			194	0,00731707
		138	0,0097561			195	0,00243902
		140	0,00487805			196	0,00243902
		141	0,00487805			199	0,00487805
		144	0,00487805			200	0,00731707
		228	0,00243902			203	0,00487805
		HE:	0,93791791			204	0,00243902
		H0:	0,97117517			206	0,00243902
		PD:	0,99811872			207	0,00243902
		P-Value:	0,00188128	PEZ6		209	0,00487805
				HE:	0,9176859	210	0,00731707
				H0:	0,97579268	217	0,00243902
				PD:	0,99794215		
				P-Value:	0,00205785		

PEZ8	a=29	PEZ12	a=40		
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz		
217	0,00487805	260	0,00487805		
221	0,02195122	261	0,00243902		
224	0,0195122	262	0,00243902		
225	0,0902439	264	0,04146341		
226	0,06341463	265	0,02439024		
227	0,02682927	266	0,0097561		
229	0,03658537	267	0,03170732		
230	0,09512195	268	0,06585366		
231	0,03902439	269	0,03658537		
233	0,0195122	270	0,00731707		
234	0,08536585	271	0,17073171		
235	0,02926829	272	0,04146341		
236	0,00731707	273	0,04878049		
237	0,01219512	274	0,02682927		
238	0,21707317	275	0,15609756		
239	0,02682927	276	0,02439024		
242	0,0804878	277	0,01463415		
243	0,04146341	278	0,04634146		
244	0,00243902	279	0,02439024		
245	0,00243902	280	0,00731707		
246	0,00487805	281	0,01463415		
247	0,00731707	282	0,02195122		
248	0,00487805	283	0,0097561		
250	0,00243902	284	0,0097561		
251	0,02682927	285	0,00487805		
252	0,01463415	286	0,0195122		
254	0,00243902	287	0,00731707		
258	0,00243902	289	0,00731707		
259	0,00243902	292	0,00731707		
HE:	0,90848305	293	0,00243902		
H0:	0,96585366	295	0,00731707		
PD:	0,99684424	296	0,0097561		
P-Value:	0,00315576	297	0,00243902		
		299	0,0097561		
		300	0,00487805		
		302	0,00243902		
		303	0,04390244		
		305	0,00243902		
		315	0,00243902	HE:	0,9251517
		318	0,00731707	H0:	0,97536585
				PD:	0,99812879
				P-Value:	0,00187121

Tab. 20: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Hunden. Es wurde das Finnzymes™ Kit für die Analyse verwendet. HE= Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a=Anzahl Allele

AHTk211	a=14	CXX279	a=18	REN169018	a=17	INU055	a=16
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
80	0,00819672	107	0,00409836	149	0,00409836	192	0,00409836
82	0,00819672	110	0,00819672	153	0,02868852	194	0,00409836
83	0,04098361	111	0,0204918	154	0,00819672	195	0,02868852
84	0,26229508	112	0,00819672	155	0,04508197	196	0,00819672
85	0,07786885	113	0,17622951	157	0,24590164	197	0,3442623
86	0,17622951	114	0,05327869	159	0,12295082	198	0,02459016
87	0,06147541	115	0,20491803	160	0,00819672	199	0,12295082
88	0,20081967	116	0,01639344	161	0,11065574	200	0,03688525
89	0,00409836	117	0,05737705	162	0,04508197	201	0,10245902
90	0,0204918	118	0,01229508	163	0,06557377	202	0,00409836
91	0,01639344	119	0,00819672	164	0,0942623	203	0,0942623
92	0,09836066	120	0,25819672	165	0,06147541	205	0,14754098
93	0,00819672	121	0,01229508	166	0,1147541	206	0,00409836
94	0,00819672	122	0,07786885	167	0,0204918	207	0,03688525
		123	0,01229508	168	0,00819672	209	0,01639344
		124	0,03688525	169	0,00409836	222	0,00409836
HE:	0,83777629	126	0,0204918	170	0,00409836		
H0:	0,92947179	132	0,00409836				
PD:	0,98841259					HE:	0,8243415
P-Value:	0,01158741			HE:	0,87419674	H0:	0,93855042
		HE:	0,83881788	H0:	0,94167079	PD:	0,98902134
		H0:	0,94167079	PD:	0,99259981	P-Value:	0,01097866
		PD:	0,9905187	P-Value:	0,00740019		
		P-Value:	0,0094813				

REN54P11		a=19		INRA21		a=15		AHT137		a=22		REN169D01		a=17	
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
222	0,08196721	100	0,02868852	119	0,00819672	196	0,11065574								
224	0,00409836	102	0,00409836	124	0,00819672	200	0,00819672								
225	0,00819672	103	0,00409836	125	0,00409836	202	0,00819672								
226	0,14344262	109	0,00819672	128	0,16803279	204	0,00409836								
227	0,08196721	89	0,29098361	130	0,03278689	205	0,07786885								
228	0,01229508	90	0,0204918	132	0,0204918	206	0,01229508								
229	0,04098361	91	0,15163934	133	0,00819672	207	0,20491803								
231	0,00409836	92	0,00409836	134	0,16393443	209	0,01639344								
232	0,00409836	93	0,0942623	135	0,00819672	210	0,01229508								
233	0,1557377	94	0,00409836	136	0,00819672	211	0,24590164								
234	0,01639344	95	0,26639344	138	0,12704918	212	0,05737705								
235	0,1352459	96	0,01229508	140	0,0204918	213	0,02868852								
236	0,07377049	97	0,07377049	142	0,05327869	214	0,04508197								
237	0,05737705	98	0,00819672	144	0,17622951	215	0,01229508								
238	0,09016393	99	0,01229508	145	0,00819672	216	0,12704918								
239	0,0204918			146	0,07377049	217	0,00409836								
240	0,04098361			147	0,00409836	220	0,00409836								
241	0,00409836	HE: 0,80425111		148	0,03688525										
244	0,00409836	H0: 0,92977191		149	0,04098361										
		PD: 0,98601794		150	0,00409836	HE: 0,85415931									
		P-Value: 0,01398206		151	0,01229508	H0: 0,93881303									
HE: 0,90281407				84	0,00409836	PD: 0,99088496									
H0: 0,94847413						P-Value: 0,00911504									
PD: 0,99488495															
P-Value: 0,00511505				HE: 0,88182332											
				H0: 0,95042017											
				PD: 0,99409117											
				P-Value: 0,00590883											

AHTh260	a=15	AHTk253	a=12	INU005	a=22	INU030	a=14
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
225	0,01229508	281	0,00409836	103	0,00819672	139	0,00409836
227	0,00409836	282	0,00819672	104	0,01639344	141	0,2295082
235	0,01229508	283	0,01229508	105	0,00409836	143	0,04508197
237	0,18032787	285	0,07377049	106	0,00409836	144	0,00409836
239	0,08196721	287	0,16803279	108	0,00409836	145	0,08606557
241	0,04098361	288	0,00409836	109	0,13114754	146	0,01639344
242	0,00819672	289	0,35655738	111	0,00409836	147	0,20901639
243	0,05327869	290	0,00819672	115	0,00819672	148	0,16803279
244	0,05327869	291	0,15163934	116	0,00409836	149	0,01639344
245	0,00819672	292	0,01229508	118	0,00409836	150	0,18442623
246	0,33606557	293	0,15983607	120	0,01229508	151	0,00409836
248	0,11065574	295	0,00819672	121	0,00409836	152	0,00819672
250	0,01229508			122	0,31967213	154	0,00819672
252	0,05737705			123	0,03278689	155	0,00409836
254	0,0204918	HE: 0,77939411		124	0,18442623		
		H0: 0,91736695		125	0,03688525		
		PD: 0,98161618		126	0,06147541	HE: 0,82852553	
HE: 0,81812725		P-Value: 0,01838382		128	0,04098361	H0: 0,92947179	
H0: 0,92372334				130	0,09016393	PD: 0,98775182	
PD: 0,98600979				131	0,00409836	P-Value: 0,01224818	
P-Value: 0,01399021				132	0,00409836		
				136	0,00819672		
				HE: 0,82252313			
				H0: 0,95298119			
				PD: 0,99154872			
				P-Value: 0,00845128			

AHTh171		REN247M23	
a=16	a=13		
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
217	0,04098361	259	0,00409836
218	0,01639344	268	0,04098361
219	0,24180328	269	0,04508197
221	0,06557377	270	0,34016393
223	0,02868852	271	0,02868852
225	0,15163934	272	0,11885246
226	0,00409836	273	0,1557377
227	0,02459016	274	0,12295082
229	0,07786885	275	0,02459016
230	0,00409836	276	0,02459016
231	0,04098361	277	0,01229508
233	0,15163934	278	0,00409836
235	0,11885246	279	0,03278689
236	0,00409836		
237	0,01639344		
239	0,00409836	HE:	0,81463173
		H0:	0,92917167
		PD:	0,98675941
HE:	0,86341007	P-Value:	0,01324059
H0:	0,94142363		
PD:	0,9919653		
P-Value:	0,0080347		

Tab. 21: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Pferden. Es wurde das Finnzymes™ und das Stockmarks™ Kit für die Analyse verwendet. HE= Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a=Anzahl Allele

VHL20	a=10	HTG4	a=7	AHT4	a=10	HMS7	a=8
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
22	0,00526316	42	0,00526316	51	0,23684211	65	0,17368421
23	0,10526316	43	0,27368421	52	0,02105263	66	0,03684211
24	0,03684211	44	0,14736842	53	0,28947368	67	0,35263158
26	0,13684211	45	0,35789474	54	0,05789474	68	0,0631579
27	0,31052632	46	0,03157895	55	0,02631579	69	0,12105263
28	0,17368421	47	0,06842105	56	0,03157895	70	0,2
29	0,04210526	48	0,1	57	0,02631579	71	0,01578947
30	0,04736842			58	0,12105263	72	0,00526316
31	0,05263158			59	0,12631579		
32	0,07894737	HE: 0,82650303		60	0,01052632		
		H0: 0,90349265				HE: 0,87640571	
		PD: 0,97831288				H0: 0,87745098	
HE: 0,89684256		P-Value: 0,02168712		HE: 0,89684256		PD: 0,97940095	
H0: 0,92205882				H0: 0,90808824		P-Value: 0,02059905	
PD: 0,98968426				PD: 0,98710532			
P-Value: 0,01031574				P-Value: 0,01289468			

HTG6	a=10	AHT5	a=12	HMS6	a=9	ASB23	a=11
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
19	0,23157895	36	0,00526316	58	0,1	71	0,00526316
21	0,05263158	39	0,00526316	59	0,11052632	72	0,01052632
22	0,21052632	42	0,01578947	60	0,12105263	73	0,22105263
23	0,00526316	43	0,19473684	61	0,00526316	74	0,17368421
25	0,02105263	44	0,15263158	62	0,07368421	75	0,15789474
26	0,02631579	45	0,11578947	63	0,4631579	76	0,11052632
27	0,42105263	46	0,07368421	64	0,00526316	81	0,01578947
28	0,00526316	47	0,07894737	65	0,01052632	83	0,10526316
30	0,01578947	48	0,21052632	66	0,01052632	84	0,00526316
31	0,01052632	49	0,12631579			85	0,16842105
		51	0,01052632			86	0,00526316
		52	0,00526316	HE: 0,84856185			
HE: 0,83812716				H0: 0,90231092			
H0: 0,91176471				PD: 0,97836598		HE: 0,91176471	
PD: 0,98201413		HE: 0,89484213		P-Value: 0,02163402		H0: 0,93048128	
P-Value: 0,01798587		H0: 0,9125817				PD: 0,99197861	
		PD: 0,98831579				P-Value: 0,00802139	
		P-Value: 0,01168421					

ASB2	a=10	HTG10	a=11	HTG7	a=9	HMS3	a=11
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
99	0,01052632	23	0,1	37	0,00526316	53	0,17894737
100	0,01578947	25	0,15263158	38	0,19473684	54	0,01052632
101	0,17368421	26	0,13157895	39	0,00526316	55	0,00526316
103	0,14736842	27	0,18947368	40	0,1	58	0,17894737
104	0,21052632	28	0,04210526	41	0,14736842	59	0,10526316
105	0,09473684	29	0,15263158	42	0,49473684	60	0,05789474
106	0,03157895	30	0,03157895	43	0,03157895	61	0,27894737
107	0,13157895	31	0,07894737	44	0,00526316	62	0,07368421
108	0,07894737	32	0,1	72	0,00526316	63	0,07894737
99	0,02105263	33	0,01578947			64	0,00526316
		34	0,00526316			65	0,00526316
				HE:	0,78579152		
HE:	0,92419983			H0:	0,88865546		
H0:	0,92941176	HE:	0,91025086	PD:	0,96939879	HE:	0,88765138
PD:	0,99241998	H0:	0,92058824	P-Value:	0,03060121	H0:	0,90625
P-Value:	0,00758002	PD:	0,99102509			PD:	0,98595642
		P-Value:	0,00897491			P-Value:	0,01404358

HMS2	a=9	ASB17	a=8	LEX3	a=12	HMS1	a=9
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
88	0,01578947	32	0,07894737	49	0,00526316	60	0,00526316
89	0,16842105	33	0,02631579	50	0,04210526	65	0,00526316
90	0,04210526	34	0,17894737	52	0,11578947	66	0,12105263
91	0,12631579	35	0,23157895	53	0,03157895	67	0,24210526
92	0,11578947	36	0,08421053	54	0,01052632	68	0,0631579
93	0,25789474	37	0,02105263	55	0,02105263	69	0,00526316
94	0,08421053	38	0,09473684	56	0,15263158	70	0,40526316
96	0,02105263	40	0,22105263	57	0,12105263	71	0,05263158
97	0,04736842			58	0,11052632	74	0,03684211
				59	0,08421053		
		HE:	0,90506055	60	0,22631579		
HE:	0,92279412	H0:	0,90808824	70	0,00526316	HE:	0,85294118
H0:	0,9248366	PD:	0,98813257			H0:	0,9012605
PD:	0,99142157	P-Value:	0,01186743			PD:	0,9789916
P-Value:	0,00857843			HE:	0,91089965	P-Value:	0,0210084
				H0:	0,92941176		
				PD:	0,99108997		
				P-Value:	0,00891003		

CA425	a=13
Allel	Frequenz
100	0,21052632
101	0,27368421
102	0,0631579
84	0,00526316
86	0,00526316
91	0,00526316
92	0,00526316
93	0,01578947
95	0,04736842
96	0,11052632
97	0,01052632
98	0,03157895
99	0,18947368
HE:	0,82495844
H0:	0,92510121
PD:	0,98653526
P-Value:	0,01346473

Tab. 22: Übersicht über die Allelausprägung der Gesamtpopulation an Katzen. Es wurde eine selbsterstellte PCR für die Analyse verwendet. HE=Erwartete Heterozygotie, H0=Beobachtete Heterozygotie, PD=Diskriminierungsrate, P=Signifikanz, a=Anzahl Allele

F53	a=35	C08	a=27	B04	a=42	G11	a=34
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
114	0,00485437	165	0,00970874	186	0,00485437	339	0,01456311
117	0,01456311	171	0,00485437	244	0,00485437	340	0,00485437
118	0,01456311	173	0,00485437	251	0,00485437	342	0,00970874
119	0,00485437	175	0,00970874	255	0,01456311	343	0,01941748
121	0,05339806	176	0,01941748	256	0,03398058	346	0,13592233
122	0,04368932	177	0,19902913	257	0,01456311	347	0,03398058
123	0,00485437	180	0,00485437	259	0,08252427	348	0,00485437
125	0,02912621	181	0,12135922	260	0,03398058	350	0,04368932
126	0,03883495	185	0,03398058	261	0,00485437	353	0,0776699
127	0,02427184	188	0,00485437	262	0,00970874	354	0,03398058
129	0,02912621	189	0,19902913	263	0,0631068	357	0,04368932
130	0,05825243	193	0,10679612	264	0,02912621	360	0,01456311
131	0,0631068	194	0,01456311	266	0,03883495	361	0,00970874
132	0,02427184	197	0,03883495	267	0,02912621	364	0,08737864
133	0,01456311	201	0,04854369	268	0,03398058	365	0,04368932
134	0,03398058	205	0,01456311	271	0,05339806	368	0,09708738
135	0,03883495	207	0,03883495	272	0,00485437	369	0,04368932
136	0,02427184	208	0,01941748	274	0,01456311	371	0,01941748
137	0,03398058	211	0,00485437	275	0,03883495	372	0,00970874
138	0,08252427	212	0,00970874	276	0,01941748	373	0,02912621
139	0,02427184	213	0,00485437	278	0,02912621	374	0,02912621
140	0,01941748	214	0,00485437	279	0,04368932	375	0,05339806
142	0,03398058	216	0,00485437	282	0,01941748	376	0,00970874
143	0,05339806	220	0,02912621	283	0,02427184	377	0,01941748
144	0,02912621	222	0,02427184	285	0,01941748	378	0,01941748
145	0,00970874	223	0,01941748	286	0,08252427	382	0,01456311
146	0,01456311	226	0,00485437	287	0,03883495	383	0,00485437
147	0,03883495			289	0,02912621	385	0,01941748
148	0,01941748			290	0,05339806	386	0,01941748
151	0,01941748	HE: 0,88462626		291	0,00485437	388	0,00970874
152	0,04368932	H0: 0,96296296		293	0,02427184	389	0,00970874
153	0,00485437	PD: 0,9957269		294	0,02912621	390	0,00485437
155	0,02912621	P-Value: 0,0042731		295	0,00485437	396	0,00485437
156	0,01456311			297	0,01456311	400	0,00485437
160	0,00970874			298	0,00485437		
				300	0,00485437		
				301	0,00485437	HE: 0,94033368	
HE: 0,96008106				309	0,00485437	H0: 0,97058824	
H0: 0,97142857				310	0,00485437	PD: 0,99824511	
PD: 0,99885946				313	0,00485437	P-Value: 0,00175489	
P-Value: 0,00114054				317	0,01456311		

F5 F533 a=35		C08 a=27		B04 a=42		G11 a=34	
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
				321	0,00485437		
				HE:	0,95876143		
				H0:	0,97619048		
				PD:	0,99901813		
				P-Value:	0,00098187		

FCA441 a=16		D09 a=32		F124 a=43		C12 a=19	
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
114	0,04368932	159	0,00485437	263	0,00485437	311	0,00485437
115	0,02427184	163	0,00485437	264	0,00970874	340	0,00970874
116	0,01941748	167	0,00485437	265	0,00485437	344	0,08737864
118	0,25728155	168	0,11650485	266	0,01456311	345	0,01456311
119	0,05825243	169	0,00970874	267	0,00970874	348	0,03398058
120	0,01941748	171	0,00970874	268	0,01941748	351	0,11165049
122	0,19417476	172	0,09223301	269	0,00485437	352	0,01941748
123	0,04368932	173	0,01941748	270	0,00485437	354	0,00970874
126	0,17961165	174	0,00970874	271	0,01456311	355	0,12621359
127	0,04854369	175	0,01941748	272	0,02427184	358	0,24271845
128	0,00970874	176	0,16990291	274	0,00970874	359	0,08252427
130	0,02427184	177	0,00485437	275	0,01941748	360	0,04854369
131	0,04854369	178	0,00485437	276	0,02427184	361	0,00485437
134	0,01456311	180	0,12135922	277	0,04368932	362	0,08737864
136	0,00970874	181	0,05825243	278	0,00485437	363	0,05339806
139	0,00485437	182	0,03883495	279	0,05339806	365	0,00485437
		184	0,08252427	280	0,0776699	366	0,02427184
		185	0,00485437	281	0,02912621	367	0,00485437
HE:	0,84956169	186	0,01941748	282	0,00970874	371	0,00970874
H0:	0,9375	188	0,05339806	283	0,03398058		
PD:	0,99059761	189	0,00970874	284	0,03883495		
P-Value:	0,00940239	192	0,01456311	285	0,00485437	HE:	0,88269394
		194	0,01456311	286	0,00485437	H0:	0,94839039
		195	0,00485437	287	0,09223301	PD:	0,993826
		196	0,01941748	288	0,09223301	P-Value:	0,006174
		197	0,00485437	289	0,00485437		
		198	0,00970874	290	0,01941748		
		202	0,02912621	291	0,08737864		
		206	0,00970874	292	0,02427184		
		224	0,00485437	293	0,00485437		
		240	0,00485437	294	0,01941748		
		245	0,00485437	295	0,05825243		
				296	0,01456311		
				298	0,01456311		

FCA441	a=16	D09	a=32	F124	a=43	C12	a=19
Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz	Allel	Frequenz
		HE:	0,91615609	299	0,03398058		
		H0:	0,9693568	300	0,00485437		
		PD:	0,99737988	303	0,00970874		
		P-Value:	0,00262012	304	0,01456311		
				306	0,00485437		
				307	0,00970874		
				308	0,00485437		
				312	0,00485437		
				314	0,00485437		
				HE:	0,95126779		
				H0:	0,97696997		
				PD:	0,99886669		
				P-Value:	0,00113331		

C09		F85		D06	
Allel	a=36 Frequenz	Allel	a=57 Frequenz	Allel	a=21 Frequenz
125	0,01456311	187	0,00970874	315	0,00485437
126	0,00970874	189	0,00485437	316	0,02912621
132	0,0631068	197	0,00970874	317	0,05825243
133	0,07281553	208	0,00485437	318	0,01456311
134	0,00485437	209	0,01941748	320	0,02427184
135	0,00485437	223	0,01456311	321	0,2961165
136	0,03883495	227	0,00485437	322	0,07281553
137	0,02912621	239	0,00485437	324	0,01941748
141	0,01941748	243	0,00970874	325	0,16504854
142	0,00970874	244	0,04854369	326	0,03883495
144	0,01456311	246	0,00485437	329	0,02912621
145	0,03883495	247	0,01456311	330	0,00485437
146	0,00970874	248	0,00485437	332	0,05339806
147	0,00485437	249	0,01456311	333	0,07281553
148	0,01456311	251	0,00970874	334	0,00485437
149	0,01456311	252	0,02427184	336	0,01941748
151	0,00485437	253	0,00970874	337	0,05825243
152	0,01456311	254	0,01941748	338	0,00970874
153	0,0631068	255	0,02427184	341	0,01456311
154	0,01941748	256	0,01456311	344	0,00485437
155	0,00970874	257	0,01456311	345	0,00485437
156	0,00485437	258	0,03398058		
157	0,10679612	259	0,00485437		
158	0,02912621	260	0,01456311	HE: 0,85964747	
160	0,00970874	261	0,00970874	H0: 0,95238095	
161	0,0776699	262	0,03883495	PD: 0,99331655	
162	0,04368932	263	0,00485437	P-Value: 0,00668345	
164	0,00485437	264	0,00970874		
165	0,10194175	265	0,01456311		
166	0,04368932	266	0,03398058		
169	0,03398058	267	0,0631068		
170	0,03883495	268	0,00970874		
173	0,01456311	269	0,01941748		
174	0,00485437	270	0,04368932		
177	0,00485437	271	0,03883495		
180	0,00485437	272	0,01456311		
		273	0,0631068		
		275	0,00485437		
HE: 0,94499953		278	0,00485437		
H0: 0,97222222		279	0,04368932		
PD: 0,99847221		280	0,00485437		
P-Value: 0,00152779		282	0,00970874		
		283	0,03883495		

Rasse	Mutationen Kontrollregion 1	Mutationen Kontrollregion 2	Mutationen Kontrollregion 3	Anzahl Mutationen
	15465C			
Böhmisch-Raubart	15491T	15861A- 15869C-15873T		4
Chinesischer Nackthund	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Cotondetular	15526T-15595T-15612C- 15632T-15639G-15643G- 15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15912T-15955T- 16003G-16083G	15
Deutsch-Drahthaar	15639A	15814T	16025C	3
Deutsch-Drahthaar	15526T-15595T-15612C- 15632T-15639G-15643G- 15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15912T-15955T- 16003G-16083G	15
Deutscher Schäferhund	15508T-15526T-15611C- 15639G-15650C	15800C-15814T- 15912T	15912T-15955T- 16003G	11
Deutscher Schäferhund (altdeutsch)	15508T-15526T-15611C- 15639G-15650C	15800C-15814T- 15912T	15912T-15955T- 16003G	11
Deutscher- Schäferhund	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Deutscher- Schäferhund	15508T-15526T-15611C- 15639G-15650C	15800C-15814T- 15912T	15912T-15955T- 16003G	11
Elo	15627G-15636C-15639A- 15652A-15665C	15814T-15841T		7
Flat Coated Retriever	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Golden Retriever	15526T-15595T-15612C- 15632T-15639G-15643G- 15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15955T-16003G- 16083G	14
Jack Russel Terrier	15526T-15595T-15612C- 15632T-15639G-15643G- 15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15912T-15955T- 16003G-16083G	15

Rasse	Mutationen Kontrollregion 1	Mutationen Kontrollregion 2	Mutationen Kontrollregion 3	Anzahl Mutationen
Jack Russel Terrier	15639A	15814T	16025C	3
Jack Russel Terrier	15620C-15627G-15639A	15751C-15814T	15955T	6
Jack Russel Terrier	15639A	15814T	16025C	3
Jack Russel Terrier	15526T-15595T-15612C- 15632T-15639G-15643G- 15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15912T-15955T- 16003G-16083G	15
Jack Russel Terrier	15526T-15595T-15612C- 15632T-15639G-15643G- 15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15912T-15955T- 16003G-16083G	15
Jack Russel Terrier (Parson)	15639A	15814T	16025C	3
Jack Russel Terrier (Parson)	15493A-15526T-15595T- 15612C-15632T-15639G- 15643G-15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15912T-15938D- 15955T-16003G- 16083G	17
Labrador Retriever	15620C-15627G-15639A	15814T		4
Labrador Retriever	15627G-15639A	15814T	15955T	4
Labrador Retriever	15620C-15627G-15639A	15814T	16025C-16032G	6
Mischling				0
Mischling	15639A	15814T	16025C	3
Mischling	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Mops	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Mops	15805T			1
Mops	15805T			1
Mops	15805T			1
Mops	15805T			1
Mops	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Rottweiler	15639A	15814T	16025C	3
Rottweiler	15639A	15814T	16025C	3
Rottweiler	15639A	15814T	16025C	3
Rottweiler	15639A	15814T	16025C	3

Rasse	Mutationen Kontrollregion 1	Mutationen Kontrollregion 2	Mutationen Kontrollregion 3	Anzahl Mutationen
Schweizer Weißer Schäferhund	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Staffordshireterrier	15508T-15526T-15611C- 15639G-15650C	15710T-15800C- 15814T-15912T	15912T-15955T- 16003G	12
Staffordshireterrier	15620C-15627G-15639A	15814T	15955T	5
Staffordshireterrier (American)	15526T-15595T-15612C- 15632T-15639G-15643G- 15652A	15800C-15814T- 15815C-15912T	15912T-15955T- 16003G-16083G	15
Staffordshireterrier (American)	15508T-15526T-15611C- 15639G-15650C	15710T-15800C- 15814T-15912T	15912T-15955T- 16003G	12
Zwergschnauzer	15805T			1
Zwergschnauzer	15805T			1
Zwergschnauzer	15627G-15632T-15639A	15814T	16025C	5
Zwergschnauzer	15627G-15632T-15639A	15814T	16025C	5
Zwergschnauzer	15639A	15814T	16025C	3

Tab. 24: Übersicht über die Stockmarks™ Genotyping for Dogs Canine Kit. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente.

Genort	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Motiv	Länge (bp)
PEZ1	GGCTGTCACCTTTCCCTTC	CACCACAATCTCTCTCATAAATAC	CATA	95-136
FHC2054	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	GATA	140-184
FHC2010	AAATGGAACAGTTGAGCATGC	CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	ATGA	220-248
PEZ05	GCTATCTTGTTTCCCACAGC	GTCACTGTATACAACATTGTC	AAAG	97-121
PEZ20	CCTAAATTAGAGGTCTAACC	GTAAGCGGGAATGTGCTCCTC	AAAT	152-202
PEZ12	GTAGATTAGATCTCAGGCAG	GTAGGTCCTGGTAGGGTGTGG	AAAG	250-317
PEZ03	CACTTCTCATACCCAGACTC	CAATATGTCAACTATACTTC	AAG	95-154
PEZ06	ATGAGCACTGGGTGTTATAC	ACACAATTGCATTGTCAAAC	AAAT	166-215
PEZ08	TATCGACTTTATCACTGTGG	ATGGAGCCTCATGTCTCATC	AAAT	230-260
FHC2079	CAGCCGAGCACATGGTTT	ATTGATTCTGATATGCCCAGC	GGAT	263-299

Tab. 25: Übersicht über das Temperaturprofil für das Stockmarks™ Hunde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
95	10 min	1	Initialschritt
95	30 sek	20	Denaturierung
58	30 sek	20	Primerhybridisierung
72	1 min	20	Elongation
95	30 sek	15	Denaturierung
56	30 sek	15	Primerhybridisierung
72	1 min	15	Elongation
72	30 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 26: Übersicht über das Finnzymes™ Canine 1.1 Kit. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente. Di=Dinkleotid, Tetra=Tetranukleotide

Genort	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Motiv	Länge (bp)
AHTk211	TTAGCAGCCGAGAAATACGC	ATTCGCCCCGACTTTGGCA	di	79-101
CXX279	TGCTCAATGAAATAAGCCAGG	GGCGACCTTCATTCTCTGAC	di	109-133
REN169O18	CACCCAACCTGTCTGTTCCCT	ACTGTGTGAGCCAATCCCTT	di	150-170
INU055	CCAGGCGTCCCTATCCATCT	GCACCACTTTGGGCTCCTTC	di	190-216
REN54P11	GGGGGAATTAACAAAGCCTGAG	TGCAAATTCTGAGCCCCACTG	di	222-244
INRA21	ATGTAGTTGAGATTTCTCCTACGG	TAATGGCTGATTTATTTGGTGG	di	87-111
AHT137	TACAGAGCTCTTAACTGGGTCC	CCTTGCAAAGTGTCATTGCT	di	126-156
REN169D01	AGTGGGTTGCAAGTGGAAC	AATAGCACATCTTCCCCACG	di	199-221
AHTh260	CGCTATACCCACACCAGGAC	CCACAGAGGAAGGGATGC	di	230-254
AHTk253	ACATTTGTGGGCATTGGGGCTG	TGCACATGGAGGACAAGCACGC	di	277-297
INU005	CTTTCTACCAGCAAGGTTAC	TTCCCATTTAATTGCCTCT	di	102-136
INU030	GGCTCCATGCTCAAGTCTGT	CATTGAAAGGGAATGCTGGT	di	139-157
Amelogenin	GTGCCAGCTCAGCAGCCCGTGGT	TCGGAGGCAGAGGTGGCTGTGGC	-	174-218
FH2848	CAAAACCAACCCATTCACTC	GTCACAAGGACTTTTCTCCTG	di	222-244
AHT121	TATTGCGAATGTCACTGCTT	ATAGATACTCTCTCTCCG	di	68-118
FH2054	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	tetra	135-179
REN162C04	TTCCCTTTGCTTTAGTAGGTTTTG	TGGCTGTATTCTTTGGCACA	di	192-212
AHTh171	AGGTGCAGAGCACTCACTCA	CCCATCCACAGTTCAGCTTT	di	215-239
REN247M23	CTGGTAACACCAAGGCTTTCC	TGTCTTTTCCATGGTGGTGA	di	258-282

Tab. 27: Übersicht über das Temperaturprofil für das Finnzymes™ Hunde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
98	3 min	1	Initialschritt
98	15 sek	30	Denaturierung
60	75 sek	30	Primerhybridisierung
72	30 sek	30	Elongation
72	5 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 28: Übersicht über die Multiplex zur Bestimmung der Stellungsfähigkeit beim Hund. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Primerhybridisierungs-Temperatur und Größe der Fragmente.

Genort	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Primerhybridisierung (°C)	Größe (bp)
TH-4	GTCTGTCTGCTGTCTGGCTCCC	TGGAGAGGCTTCTGACACCC	65	178-240
DAT-9	CTCCTGTGTCCCCGCTGTCTT	GACAGAGCAGGGCAGGGAGG	65	268-315
DRD4-3	CGCGCGTCGGCCAAGCTG	GCGGGGGGCAGGGGGCG	67	90-475
		TGGGCTGGGGGTGCCGTCC	67	
DBH-4	CCCCTCACCTCCAAGCAG	AGGGTGATGTGGGCAGGAT	56	228-275

Tab. 29: Übersicht über das Temperaturprofil für die PCR zur Verhaltens- und Stellungsfähigkeitsanalyse beim Hund. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
95	1 min	1	Initialschritt
95	1 min	35	Denaturierung
65	1 min	35	Primerhybridisierung
72	1 min	35	Elongation
72	10 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 30: Übersicht über die verwendeten Referenzsequenzen bei der Analyse der mitochondrialen DNA der Hunde. Als Referenz diente die DNA Sequenz eines Wolfes (Broad Institute).

Name	Sequenz	Position (bp)
Kontrollregion 1	AAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAGATTCT TCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCT ACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCTTCTCCCCTCCCCTAT GTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACAT AATATTATATCCTTACATAGGACATATTAECTCAATCTCATAATTCACT GATCTTTCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGC TTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAA	15394-15710
Kontrollregion 2	CTCAATCTCATAATTCACTGATCTTTCAACAGTAATCGAATGCATATC ACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAA CCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTG GGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAG GGCCATAACCTTATTTACTCCAATCCTACTAATTCTCGCAAATGGGAC ATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGT GGTGTGCATGCATCTGGTATCTTTAATTTTAGGGGGGAATCTGCT AT	15615-15949
Kontrollregion 3	CCAATCCTACTAATTCTCGCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGA CTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGCATGCATCTGGTAT CTTTAATTTTAGGGGGGAATCTGCTATCACTCACCTACGACCGCA ACGGCACTAACTCTAACTTATCTTCTGCTCTCAGGGAATATGCCCGTC GCGGCCCTAATGCAGTCAAATAACTGTAGCTGGACTTATTCATTATC ATTTATCAACTCACGCATAAAATCAAGGTGCTATTCAATGGTTT CAGGACATATAGTTTTAGGG	15824-16131

Tab. 31: Übersicht über das Temperaturprofil mtDNA Sequenzierungs-PCR beim Hund. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
95	10 min	1	Initialschritt
95	1 min	30	Denaturierung
56	1 min	30	Primerhybridisierung
72	2 min	30	Elongation
72	30 min	1	Finale Elongation
20	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 32: Übersicht über das Temperaturprofil für das Stockmarks™ Pferde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
95	10 min	1	Initialschritt
95	30 sek	30	Denaturierung
60	30 sek	30	Primerhybridisierung
72	60 sek	30	Elongation
72	60 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 33 Übersicht über das Temperaturprofil für das Finnzymes™ Pferde KIT. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
98	3 min	1	Initialschritt
98	15 sek	30	Denaturierung
60	75 sek	30	Primerhybridisierung
72	30 sek	30	Elongation
72	5 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 34: Übersicht über die MEOX-Plex Katzen-Multiplex-PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen und Größe der Fragmente.

Genort	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Länge (bp)
F53	CCTATGTTGGGAGTAGAGATCACCT	GTGTCTTGAGTGGCTGTGGCATTTC	154-186
C08	GATCCATCAATAGGTAAATGGATAAAGAAGATG	TGGCTGAGTAATATCCACTGTCTCTC	178-230
B04	TGAAGGCTAAGGCACGATAGATAGTC	GTGTCTCCACCCAGGTGCTCTGCTTC	194-280
G11	ATCCATCTGTCCATCCATCTATT	GGTCAGCATCTCCACTTGAGG	324-344
SRY	TGCGAACTTTGCACGGAGAG	GCGTTCATGGGTCGTTTGACG	101
FCA441	GTGTCTTGATCGGTAGGTAGGTAGATATAG	ATATGGCATAAGCCTGAAGCAAA	152-178
D09	CCGAGCTCTGTTCTGGGTATGAA	GTGTCTTCTAGTTGGTCGGTCTGTCTATCTG	198-280
F124	TGTGCTGGGTATGAAGCCTACTG	GTGTCTCCATGCCATAAAGGCTCTGA	211-265
C12	GAGGAGCTTACTTAAGAGCATGCGTTC	GTGTCTTAAACCTATATTCGGATTGTGCCTGCT	219-263
C09	AAATTTCAATGTCTTGACAACGCATAAG	GTGTCTCCAGGAACACCATGTTGGGCTA	123-175
F85	TAAATCTGGTCCTCACGTTTTTC	GCCTGAAAATGTATCCATCACTTCAGAT	216-316
D06	CCAAGGAGCTCTGTGATGCAAA	GTTCCACAGGTAAACATCAACCAA	199-265

Tab. 35: Übersicht über das Temperaturprofil für die Katzen-Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
95	10 min	1	Initialschritt
94	1 min	28	Denaturierung
59	1 min	28	Primerhybridisierung
72	1 min	28	Elongation
72	45 min	1	Finale Elongation
25	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 36: Übersicht über die Koi-Plex Koi-Karpfen-Multiplex-PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente.

Genort	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Motiv	Länge (bp)
MFW4	TCCAAGTCAFTTTAATCACCG	GGGAAGCGTTGACAACAAGC	(CA) _n	138-152
Cca02	ATGCAGGGCTCATGTTGCTCATAG	GCAGACAGACACGTTGCTCTCG	(TA) ₂₀	173-194
Cca04	ATCCCTTACCGCCCTGTGT	AGCTGAAAAACGCTGTCAC	(TA) ₂₄	224-258
Cca09	AATGCCTATTACATTATGAAAAT	ACTAAGAATTTGCTATTAAACACTGG	(AGAC) ₈ (AGAT) ₁₉	263-307
MFW26	CCCTGAGATAGAAAACCACTG	CACCATGCTTGGATGCAAAG	(CA) _n	122-150
MFW7	TACTTTGCTCAGGACGGATGC	ATCACCTGCACATGGCCACTC	(CA) _n	174-269
Koi105-106	AGTCCAAGCGGGTGAATA	TGTTTCTGCCCTGCTCTG	(CA) ₃₄	141-198
Koi29-30	CTGACCCTGAAGAGAACAAC	GCCTCATCAAAGACATCAAG	(TGGT) ₆	219-255
Cca28	ATGACCGACAGACAGACAGACCTT	CCATCCATCCGAATTCTGCTAA	(GACA) ₆ (GATA) ₁₁	98-152
Cca06	TTCTACAAGCATGGTTTCTACAGC	TTTGCCTGCTAAAATTTGTCATA	(TA) ₂₆	154-196
Cca24	AAATTTTCAAGACTGGGTGGTT	ACAGCAAGATGACAAAATGAGTG	(AT) ₃₄	210-252
Cca21	CTGGGTAAATGCATGCTTCAT	CGTTGCCTTGCATAGTTGAA	(TAA) ₁₇	259-272

Tab. 37 Pipettierschema für den Koi Primermix. Das Gesamtvolumen des Primermix' beträgt 120 µl. Zusätzlich wird der Fluoreszenzfarbstoff mit angegeben; die Farbe indiziert die emittierte Farbwellenlänge bei Bestrahlung mit einem Argonlaser.

lfd Nr.	Genort	eingesetztes Volumen (µl)	Farbstoff
1	MFW4	5	6-FAM
2	Cca02	10	6-FAM
3	Cca04	15	6-FAM
4	Cca09	5	6-FAM
5	MFW26	10	JOE
6	MFW7	10	JOE
7	Koi105-106	10	ATTO550
8	Koi29-30	10	ATTO550
9	Cca28	10	ATTO565
10	Cca06	15	ATTO565
11	Cca24	15	ATTO565
12	Cca21	5	ATTO565

Tab. 38: Übersicht über das Temperaturprofil für die Koi-Karpfen Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
95	10 min	1	Initialschritt
95	30 sek	35	Denaturierung
55	30 sek	35	Primerhybridisierung
72	1 min	35	Elongation
72	30 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 39: Übersicht über das Temperaturprofil für die PCR zur Bestimmung des Geschlechts beim Koi-Karpfen. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
94	10 min	1	Initialschritt
94	30 sek	30	Denaturierung
60	30 sek	30	Primerhybridisierung
72	1 min	30	Elongation
72	10 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 40: Übersicht über die Kaninchen-spezifische Multiplex PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie Wiederholungsmotiv und Größe der Fragmente.

Genort	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Motiv	Länge (bp)
SAT16	AATCAGCCTCTATGAATTCCC	AATGCTACATGGTAACCAGGC	(TG)15	109-115
SAT12	CTTGAGTTTTAAATTCGGGC	GTTTGGATGCTATCTCAGTCC	(CTAT)10	122-138
SAT3	GGAGAGTGAATCAGTGGGTG	GAGGGAAAGAGAGACAGG	(TG)10	146-162
SAT7	GTAACCACCCATGCACACTC	GCACAATACCTGGGATGTAG	(TG)14	184-195
SAT5	GCTTCTGGCTTCAACCTGAC	CTTAGGGTGCAGAATTATAAGAG	(TG)23TTT	206-234
SAT13	CAGTTTTGAAGGACACCTGC	GCCTCTACCTTTGTGGGG	(GT)13	114-128
SAT8	CAGACCCGGCAGTTGCAGAG	GGGAGAGAGGATGGAGGTATG	(CT)14(GT)8	136-158
SAT4	GGCCAGTGCCTTACATTTGG	TGTTGCAGCGAATTGGGG	(TC)22	195-240
SAT2	GCTCTCCTTGGATACTCC	GCTTTGGATAGGCCAGATC	(TC)15	241-253
SRY	CGGTGATGTGAAACACACAA	TACAGGGAGATGCACAAACG	keines	125-132

Tab. 41: Übersicht über das Temperaturprofil für die Kaninchen Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
94	10 min	1	Initialschritt
94	30 sek	30	Denaturierung
60	30 sek	30	Primerhybridisierung
72	30 sek	30	Elongation
94	30 sek	15	Denaturierung
55	30 sek	15	Primerhybridisierung
72	30 sek	15	Elongation
72	5 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 42: Übersicht über die Kamel Multiplex PCR. Aufgeführt sind jeweiligen STR Systeme, Primersequenzen sowie die Größe der Fragmente (fwd=Vorwärts-Primer; rev=Rückwärts-Primer).

Primer	Sequenz	Länge (bp)
<i>YWLL-44fwd</i>	CTCAACAATGCTAGACCTTGG	104-106
<i>YWLL-44rev</i>	GAGAACACAGGCTGGTGAATA	
<i>YWLL-08fwd</i>	ATCAAGTTGAGGTGCTTTCC	132-158
<i>YWLL-08rev</i>	CCATGGCATTGTGTTGAAGAC	
<i>YWLL-38fwd</i>	GGCCTAAATCCTACTAGAC	180-186
<i>YWLL-38rev</i>	CCTCTCACTCTTGTCTCCTC	
<i>VOLP-10fwd</i>	CTTTCTCCTTCCTCCCTACT	250-264
<i>VOLP-10rev</i>	CGTCCACTTCCTTCATTTCC	
<i>YWLL-59fwd</i>	TGTGCAGGAGTTAGGTGTA	115-117
<i>YWLL-59rev</i>	CCATGTCTCTGAAGCTCTGGA	
<i>VOLP-67fwd</i>	TTAGAGGGTCTATCCAGTTTC	157-185
<i>VOLP-67rev</i>	TGGACCTAAAAGAGTGGAG	
<i>LCA-66fwd</i>	GTGCAGCGTCCAATAGTCA	234-238
<i>LCA-66rev</i>	CCAGCATCGTCCAGTATTCA	
<i>LCA-56fwd</i>	ATGGTGTTCACAGGGCGTTG	134-138
<i>LCA-56rev</i>	GCATTACTGAAAAGCCCAGG	
<i>YWLL-09fwd</i>	AACTCTAGGAACCGGAATGC	160-162
<i>YWLL-09rev</i>	ACGCAATCTACACTCCTTGC	
<i>LCA-63fwd</i>	TTACCCAGTCCTTCGTGGG	196-220
<i>LCA-63rev</i>	GGAACCTCGTGGTTATGGAA	

Tab. 43: Übersicht über das Temperaturprofil für die Kamel Multiplex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
94	10 min	1	Initialschritt
94	30 sek	30	Denaturierung
55	30 sek	30	Primerhybridisierung
72	30 sek	30	Elongation
94	30 sek	15	Denaturierung
53	30 sek	15	Primerhybridisierung
72	30 sek	15	Elongation
72	5 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 44: Übersicht über die Meat-Plex Multiplex PCR. Aufgeführt sind jeweilige Spezies, STR Systeme, Primersequenzen sowie die Größe der Fragmente und die PCR.

lfd. Nr.	Spezies	Marker	Vorwärts -Primer	Rückwärts-Primer	Länge (bp)	PCR
1	Hirsche	BMB-1	CGTGAATCTTAACCAGG TCT	GGTCAGCTTCATTTAGAAA C	82-115	Wild-Plex
2	Hirsche	BMB-2	CCAAAGACCCAACAGAT G	TTGTAACACAGCAAAAGCA TT	135-155	Wild-Plex
3	Hasenartige	KLP-1	AAGGTATTA AATTGGGC ACTC	GACTGAAATTGATGTGCTA CC	180-194	Wild-Plex
4	Hasenartige	KLP-1	TGCCTTAAAGGCTGATT CTG	GGATATCAAAGAACATGCC C	198-212	Wild-Plex
5	Rind	COW-1	CGAATTC CAAATCTGTT AATTTGCT	ACAGACAGAAACTCAATGA AAGCA	64-115	Farm-Plex
6	Pferd	HRS-1	CTATCTCAGTCTTGATTG CAGGAC	CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCT C	116-137	Farm-Plex
7	Wildschwein, Hausschwein	PIG-1	TGAGAGGTCAGTTACA GAAGACC	GATCCTCCTCCAAATCCCAT	140-160	Farm-Plex, Wild-Plex
8	Wildschwein, Hausschwein	PIG-2	AGGTCCTACTGTCCATC ACAGG	GAAGCAGAGTTGGCTTACA GTG	166-187	Farm-Plex, Wild-Plex
9	Rind	COW-2	GAGTAGAGCTACAAGA TAAACTTC	TA ACTACAGGGTGTTAGAT GAACTC	193-235	Farm-Plex

lfd. Nr.	Spezies	Marker	Vorwärts -Primer	Rückwärts-Primer	Länge (bp)	PCR
10	Pferd	HRS-2	CCACTAAGTGTCTGTTTC AGAAGG	CACAAGTGTCTCTGATA GG	237-268	Farm-Plex
11	Marder	BDG-1	CTAAGCCTTACGCCTAC ATTATACAC	TATTGGCGAGTCTAGGTCC TG	297-305	Wild-Plex
12	Marder	BDG-2	TGACCTGAGCCGAAGTC AG	AAAGCCAATACTTATTTACC ATCCTG	345-353	Wild-Plex
13	Bovidae	BOV-1	GACAAAACCCTTTTAGC ACAGG	AATTGCATGGAAAGTTCTC AGC	127-157	Farm-Plex
14	Bovidae	BOV-2	TGGCATTGTGAAAAGA AGTAAAA	CTAGCACTATCTGGCAAGC A	165-185	Farm-Plex
15	Schaf/ Ziege	GoaShe	AGTCTGAAGGCCTGAG AACC	CTTACAGTCCTTGGGGTTG C	186-202	Farm-Plex

Tab. 45: Übersicht über das Temperaturprofil für die Meat-Plex. Es ist jeweils die Temperatur, die Zeit sowie die Anzahl Zyklen für den jeweiligen Schritt angegeben.

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl Zyklen	Schritt
95	10 min	1	Initialschritt
95	30 sek	17	Denaturierung
60	30 sek	17	Primerhybridisierung
72	1 min	17	Elongation
95	30 sek	17	Denaturierung
55	30 sek	17	Primerhybridisierung
72	30 sek	17	Elongation
72	1 min	1	Finale Elongation
4	∞	∞	Stabilisierung

Tab. 46: Übersicht über die im Genetic Analyzer ABI 3130 verwendeten Parameter.

Parameter	Wert
Injektionszeit	16 -22 Sekunden
Injektionsvolt	1.0 kV
Laufvolt	15.0 kV
Lauftemperatur	60 °C
Laufzeit	1200 - 3000 Sekunden

10.6. Abbildungen

AB Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

Barkplex45

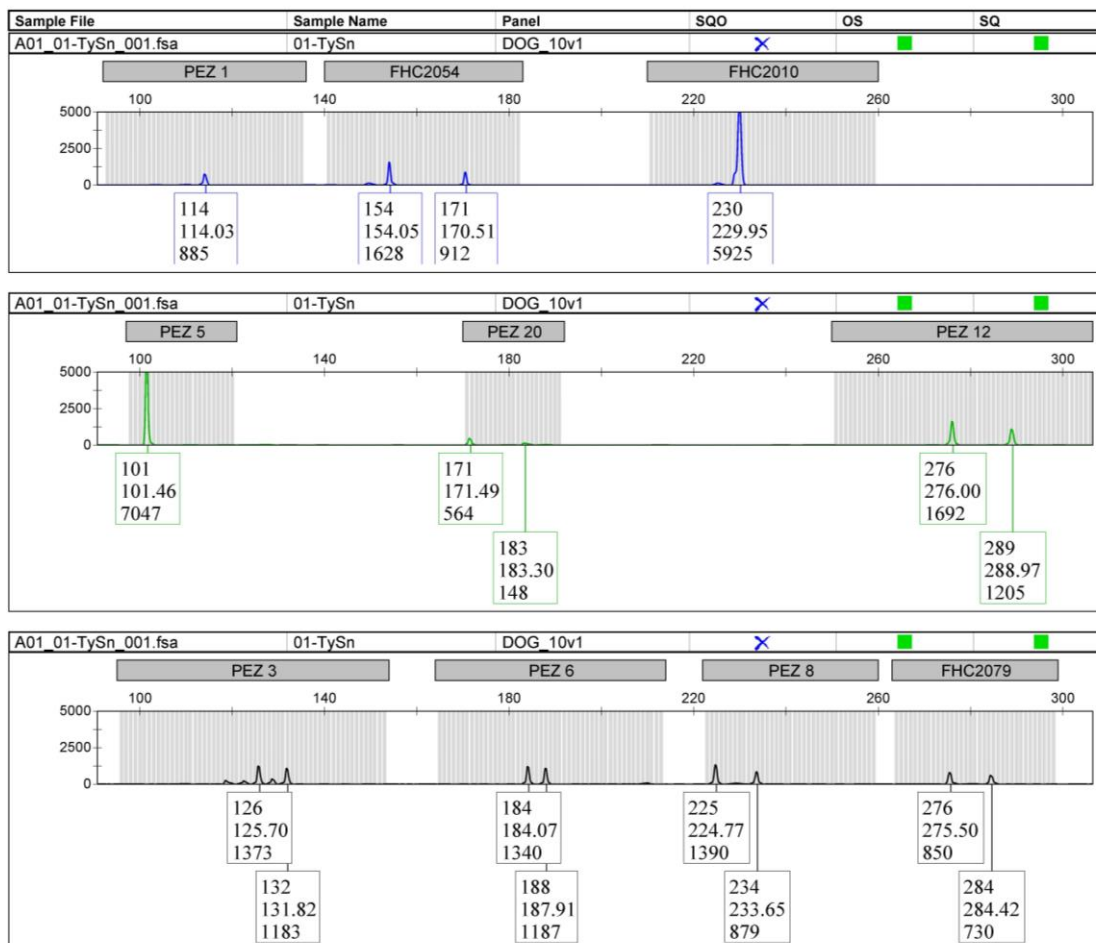


Abb. 35: Nachweis von hunde-spezifischen STR-Merkmalen mit dem Stockmarks™ for Dogs Kit (Applied Biosystems®). Exemplarisch gezeigt für den Hund mit der ID 01-TySn. Es konnte in allen zehn Genorten ein Merkmal dargestellt werden. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher® Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt.

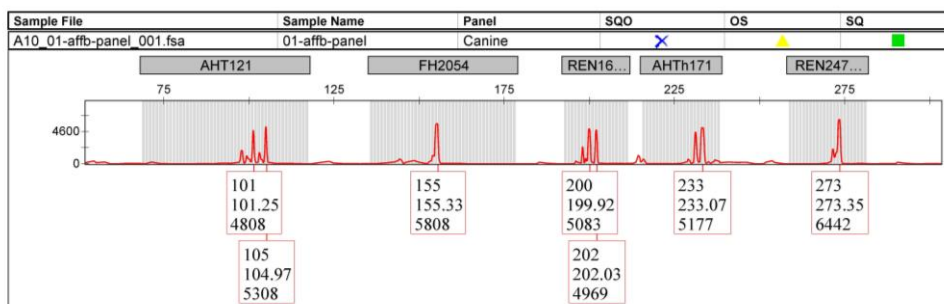
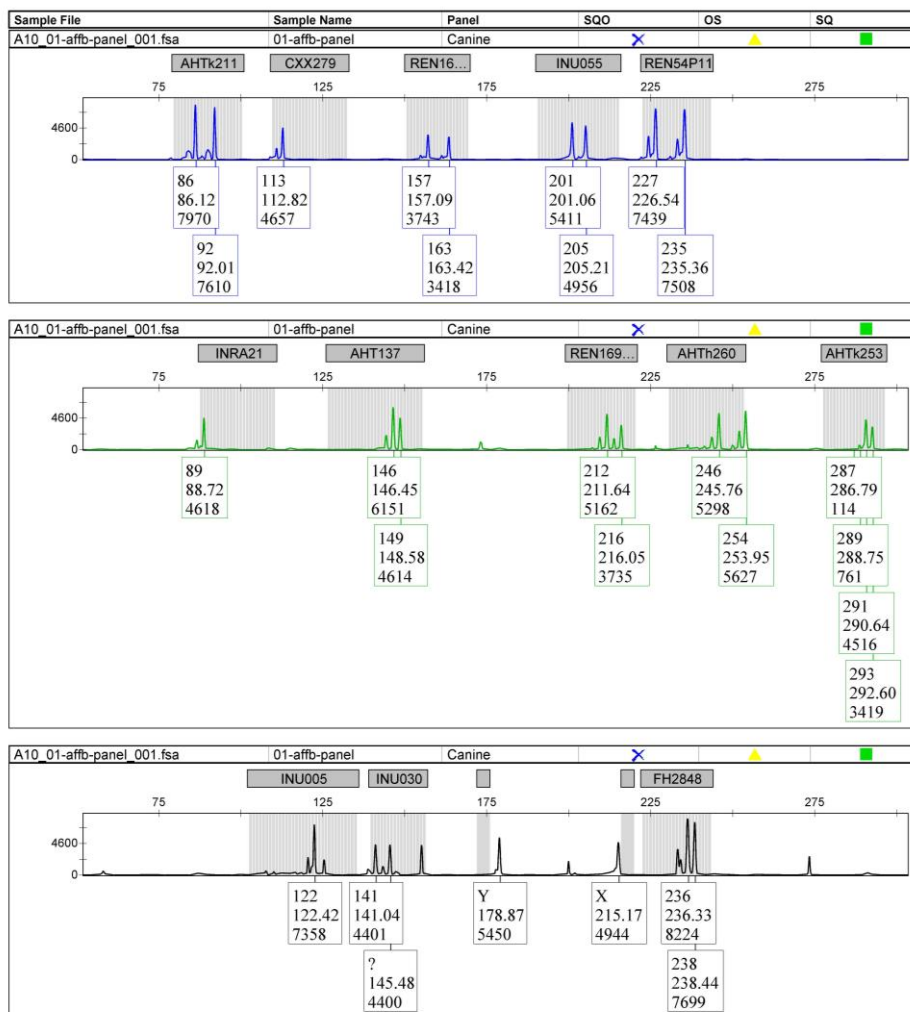


Abb. 36: Nachweis von hunde-spezifischen STR-Merkmalen mit dem Finnzymes™ Canine Panel 1.1 Kit (Thermo Scientific®). Exemplarisch gezeigt für den Hund mit der ID 01-affb. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 17 Genorten ein Merkmal dargestellt werden.



Abb. 37: Nachweis von pferde-spezifischen STR-Merkmalen mit dem Finzymes™ Equine Panel 1.1 Kit (Thermo Scientific®). Exemplarisch gezeigt für das Pferd mit der ID 02-ucNt. Ein Volumen von 1 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 17 Genorten ein Merkmal dargestellt werden.

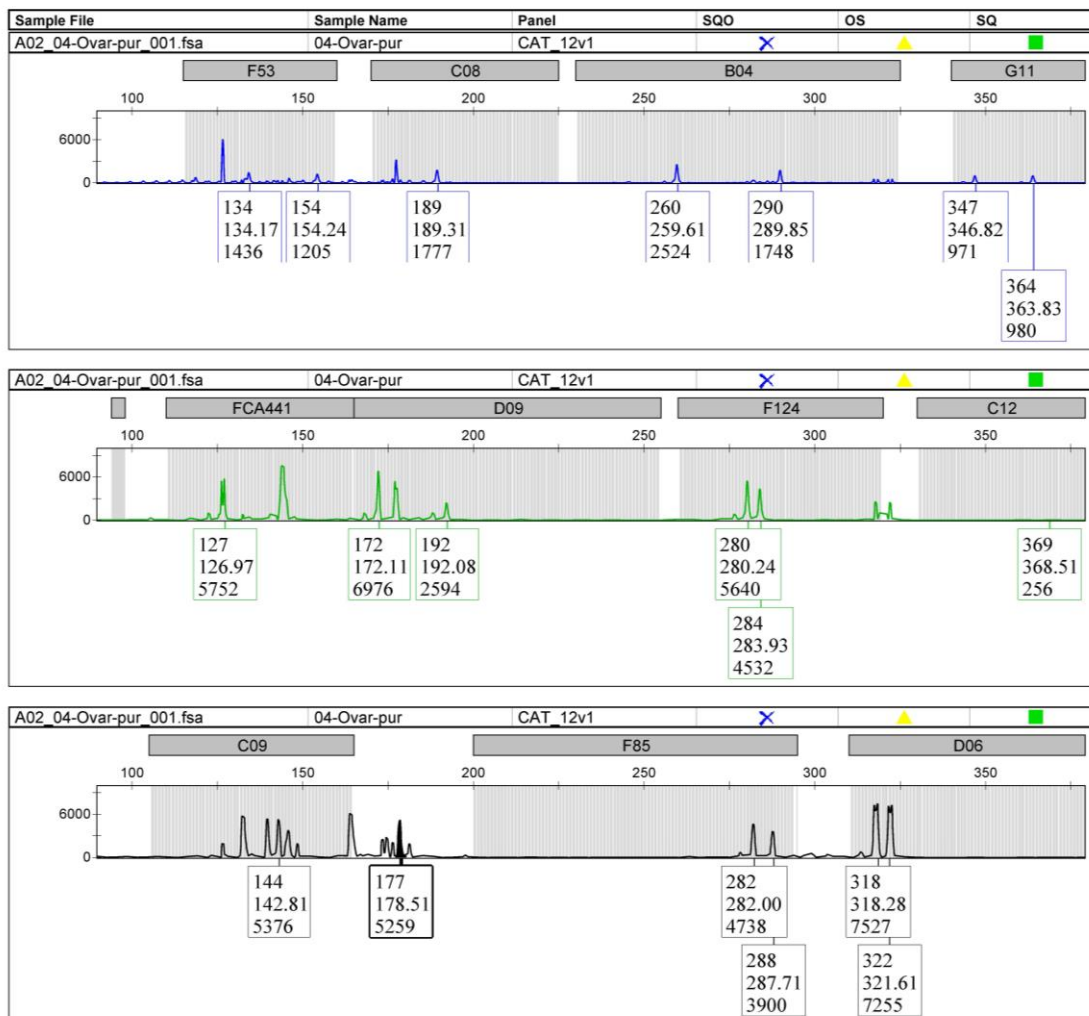


Abb. 38: Nachweis von Katzen-spezifischen STR-Merkmalen mit dem selbst-weiterentwickelten MEOW-Plex Kit. Exemplarisch gezeigt für eine Gewebeprobe einer Katze. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher® Flex extrahierter DNA aus 100 mg Ovargewebe wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 12 Genorten ein Merkmal dargestellt werden.

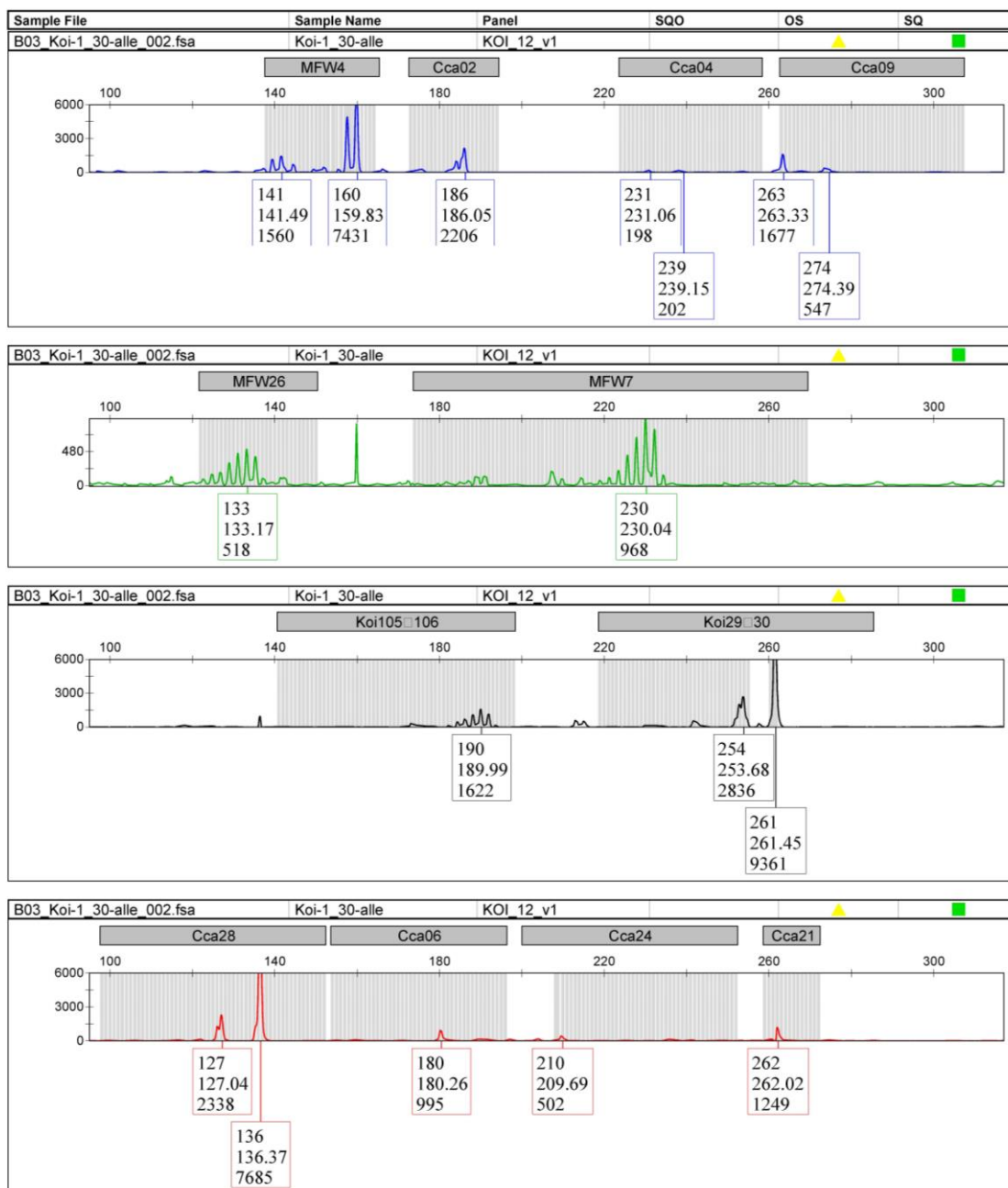


Abb. 39: Nachweis von koi-spezifischen STR-Merkmalen mit der selbst-entwickelten Koi-Plex. Exemplarisch gezeigt für den Koi-Karpfen mit der ID 03-Jürg. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher® Flex extrahierter DNA aus einem Körperschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen 12 Genorten ein Merkmal dargestellt werden. In den Genorten MFW26 und MFW7 lassen sich sehr gut die aufgrund eines Abrutschens der Polymerase entstehenden Triaden bzw. „Orgelpfeifen-artigen“ Peaks erkennen.

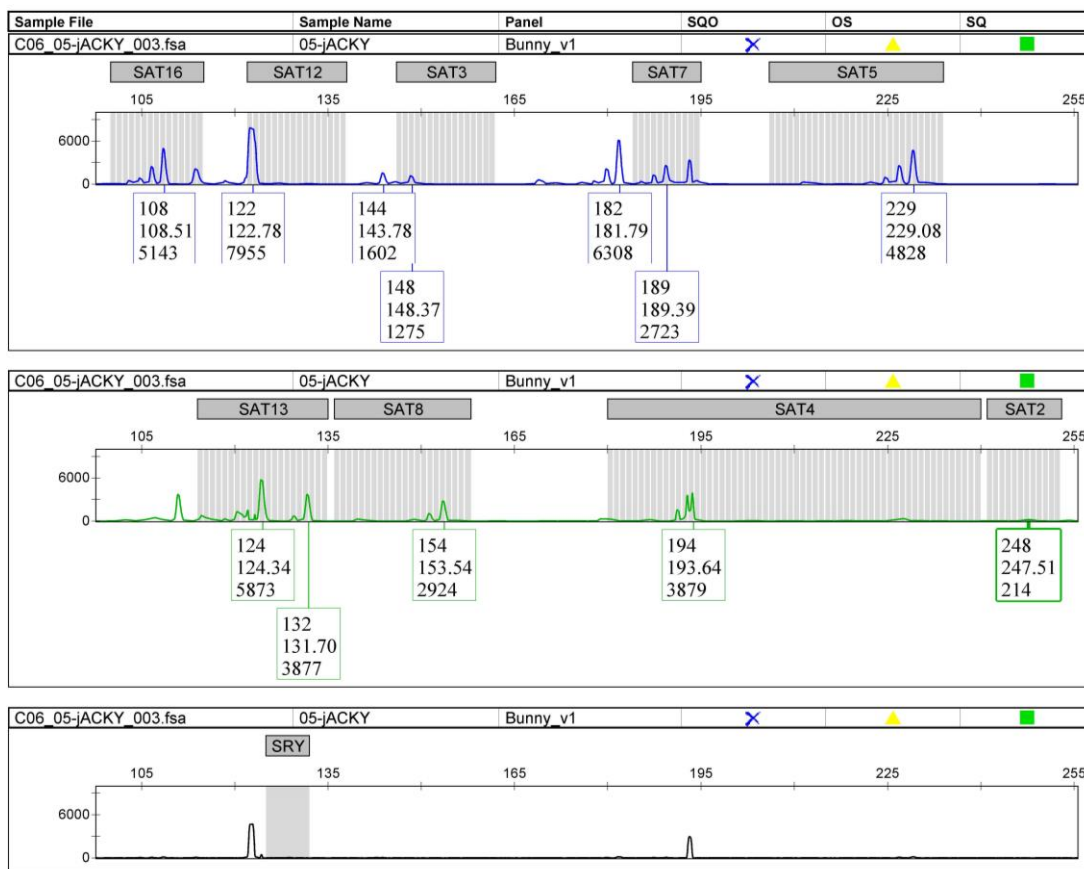


Abb. 40: Nachweis von kaninchen-spezifischen STR-Merkmalen mit der selbst-entwickelten Bunny-Plex. Exemplarisch gezeigt für das Kaninchen mit der ID 05-jACKY. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher® Flex extrahierter DNA aus einem Mundschleimhautabrieb wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen neun Genorten ein Merkmal dargestellt werden.

Camel1

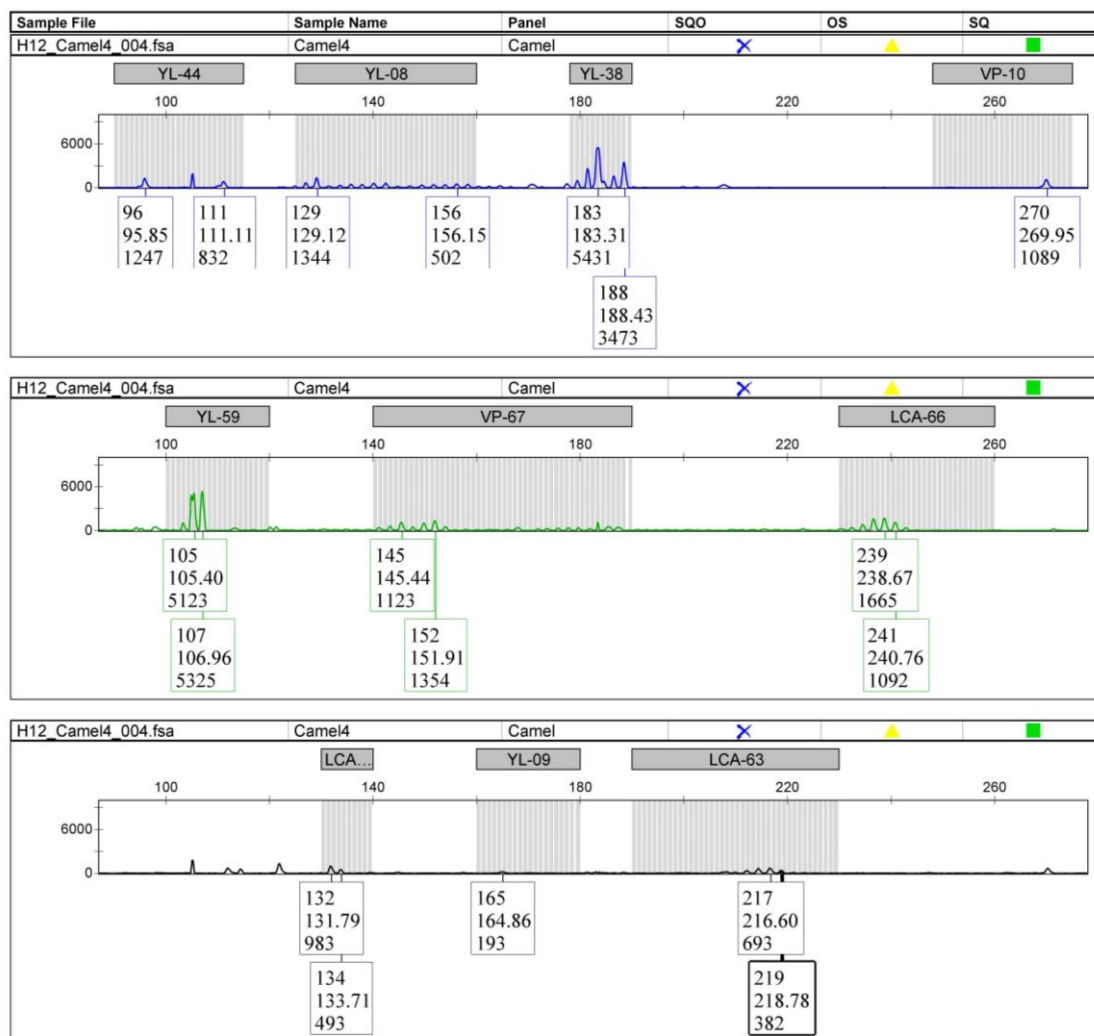


Abb. 41: Nachweis von kamel-spezifischen STR-Merkmalen mit der selbst-entwickelten Camel-Plex Multiplex-PCR. Exemplarisch gezeigt für das Kamel mit der ID 06-CML4. Ein Volumen von 2 µl mithilfe des King Fisher© Flex extrahierter DNA aus 100 mg Gewebe wurde pur in die PCR eingesetzt. Es konnte in allen zehn Genorten ein Merkmal dargestellt werden.

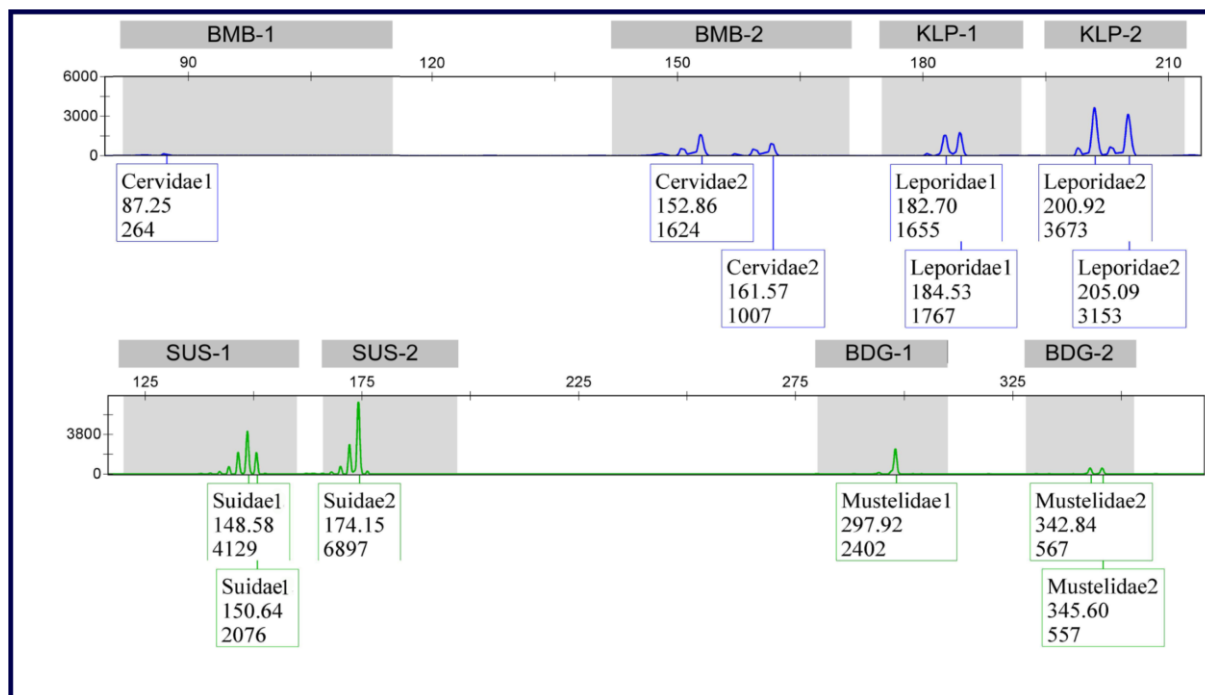


Abb. 42: Elektropherogramm der Wild-Plex. Zur besseren Übersicht, wurden bei der Einzelanalyse der Wild-Plex die Wildschwein-Systeme mit JOE (grün) markiert und zusätzlich zwei Marker für die Marderartigen (Mustelidae) ergänzt.



Abb. 43: Elektropherogramme der Farm-Plex. Gezeigt ist der Vergleich von selbst-angesetztem Hackfleisch (A) und kommerziell erhältlichem Hackfleisch (B). In (B) ist zusätzlich ablesbar, dass das Fleisch von mindestens zwei Schweinen verwendet wurde.

11. Geräteliste

- 1D Barcode Scanner, hama
- ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems Inc.
- Aspire Ethos 5960G Notebook, Acer
- Aspire One 150L Netbook, Acer
- Athlon II X2 5600 Server, AMD
- Centrifuge 5424; Eppendorf AG
- Color Laserjet 2550L Laserdrucker, HP
- Core2Quad 8200 Server, Intel
- EEEPC T101M Tablet, Asus
- Elektrophoresekammer, Gibco BRL Horizon® 11.14; Scientific Support Inc.
- Ficoll 400; Sigma-Aldrich Biochemie GmbH
- Gel-Doc UV-Kammer; Bio-Rad Laboratories GmbH
- KingFisher® Duo Extraktionsgerät, Thermo Scientific™
- KingFisher® Flex Extraktionsgerät, Thermo Scientific™
- Kühlschrank; Liebherr Hausgeräte GmbH
- Kühlschrank; Robert Bosch GmbH
- Mikrowave 800; Severin Elektrogeräte GmbH
- Minizentrifuge, Sprout™; G. Kisker GbR Produkte für die Biotechnologie
- Officejet JS 5780 All-in-One Multifunktionsgerät, HP
- P-Touch QL-560 Etikettendrucker, brother
- Thermocycler GeneAmp® PCR-System 2700; Applied Biosystems Inc.
- Thermocycler GeneAmp® PCR-System 9700; Applied Biosystems Inc.
- Thermomixer 5436; Eppendorf AG
- Thermomixer comfort; Eppendorf AG
- Tiefkühlschrank; Liebherr Hausgeräte GmbH
- Ultraschallbad Elmasonic one; Elma® Hans Schmidbauer GmbH & Co KG
- Veriti 96 Well Thermal Cycler von Applied Biosystems Inc.
- Vortexer Genie 2™; Scientific Industries Inc.
- Vortexer II, Mixomat; Erich Eydam KG
- Vortexer; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- Vortex-Genie®2T; Scientific Industries Inc.
- Zentrifuge 5415; Eppendorf AG
- Zentrifuge, Micro Centrifuge, 6000rpm; Carl Roth GmbH & Co. KG

11.1. Softwareverzeichnis

- 3130 Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0 (Software für den 3130 Genetic Analyzer); Applied Biosystems Inc.
- Gel-Doc Quantity One (Software für die Bedienung der Gel-Doc UV-Kammer); Bio-Rad Laboratories GmbH
- GeneMapper™ ID Software 3.2 – Human Identification Analysis (Software für den 3130 Genetic Analyzer); Applied Biosystems Inc.
- VAT, Software zur Abstammungsanalyse, Baur, Fimmers und Spitz, 2007
- RAD Studio XE2 und XE5 Professional (Programm zur Softwareentwicklung), Embarcadero
- Membralyzer© (Analysesoftware für Protein- und DNA Quantifizierung), MeMo Forensics*
- MischSTR© (Software zur Mischlingsanalyse), MeMo Forensics
- PhätDB© Phänotypdatenbank, MeMo Forensics
- SeSca© (Software zur Auswertung von DNA Sequenzen), MeMo Forensics*
- STRAnalyzer© (Software zur Detektion von polymorphen Bereichen in der DNA), MeMo Forensics*
- Wookie Speziesdatenbank, MeMo Forensics
 - AllelFi© Modul zur Erstellung von Allelfrequenzen
 - CalcSTR© Modul zur Berechnung von Identitäten

*die hier aufgeführte Software im Namen von MeMo Forensics wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit selber entwickelt

11.2. Verbrauchsmaterial

- 1x TBE-Puffer: Tris, Borsäure, EDTA, A. dest; eigene Herstellung
- 1x TE-Puffer: Tris, EDTA (pH 8,0); eigene Herstellung
- 310 POP-4™ Performance Optimized Polymer, Applied Biosystems™
- 3130 POP-6™ Performance Optimized Polymer, Applied Biosystems™
- 5x TBE-Puffer: Tris, Borsäure, EDTA, A. dest; eigene Herstellung
- Agarose; Biomers
- Ammoniumpersulfat, Merck™
- DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR; G. Kisker GbR Produkte für die Biotechnologie
- DNA-Exitus-Plus™; AppliChem GmbH
- Einmal-Handschuhe, Hartmann
- Einmal-OP-Kittel; Universitätsklinikum S.-H.
- Ethanol vergällt, Vergällungsmittel auf 100 IA, 1% Petroläther, ca. 100% Vol.; Th. Geyer GmbH & Co. KG
- FA-Mikrotiterplatte; Applied Biosystems™
- GeneScan™ LIZ500™ Size Standard; Applied Biosystems™
- Gummiseptaplatte für FA-Mikrotiterplatte
- H₂O – HPLC analyzed; J.T. Barker – Mallinckrodt Baker B. V.
- Invisorb® SpinSwab Kit; stratec™
- Natriumchlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG
- OP-Mundschutz/-Maske, Face Mask, Barrier® No Compromise in Security; Mölnlycke Health Care GmbH
- PCR-Softtubes, 0,2 ml; Biozym Scientific GmbH
- Pinzette; Carl Roth GmbH & Co. KG
- Pipette, 0,5-10 µl; Eppendorf AG
- Pipette, 100-1000 µl; Eppendorf AG
- Pipette, 10-100 µl; Eppendorf AG
- Pipette, 50-250 µl; Eppendorf AG
- Pipettenspitzen, 10 µl; nerbe plus™.
- Pipettenspitzen, 100 µl; nerbe plus™.
- Pipettenspitzen, 1000 µl; nerbe plus™.
- Pipettenspitzen, 1250 µl; nerbe plus™
- Pipettenspitzen, 2,5 µl; nerbe plus™.
- Polymer, performance optimized polymer; Applied Biosystems™

-
- Präzisionswischtücher, Kimtech Science; Kimberly-Clark® Professional – Kimberly-Clark® Worldwide Inc.
 - Reaktionsgefäße 1,5 ml; Sarstedt AG & Co.
 - Reaktionsgefäße 2,0 ml; Sarstedt AG & Co.
 - Reaktionsgefäß-Ständer; Carl Roth GmbH & Co. KG
 - Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$, M121,1g/mol; Serva Electrophoresis GmbH
 - Canine Panel 1.1, Finnzymes™
 - Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck™
 - Equine Panel 1.1, Finnzymes™
 - Etiketten Endlosrolle DK 11209, brother
 - Etiketten Endlosrolle DK 22214, brother
 - Forensic Swab L, sarstedt™
 - Forensic Swab XL, sarstedt™
 - GeneScan™ ROX500™ Size Standard; Applied Biosystems™
 - GeneScan™ LIZ500™ Size Standard; Applied Biosystems™
 - Hyperladder I, Bioline
 - Hyperladder IV, Bioline
 - Immolase Kit, Bioline™
 - ImmoMix®, Bioline™
 - InviMag® KF Blood 96, stratec™
 - InviMag® KF Plant 96, stratec™
 - KingFisher® DNA Purification Kit for Plant material, Thermo Scientific™
 - Markus Kaffee, Aldi Nord
 - PCR stripe, 8-fach, nerbe plus™
 - Primer, diverse, Biomers™
 - Stockmarks™ Genotyping for Dogs Kit Canidae, Applied Bioscience™
 - Stockmarks™ Genotyping for Horses Kit Equidae, Applied Bioscience™
 - Zeolith Abstrichtupfer forensix kurz, Prionics™
 - Zeolith Abstrichtupfer forensix lang, Prionics™

12. Danksagung

Diese Arbeit wurde von März 2012 bis Juli 2014 im Rahmen eines Kooperationsprojekts des Instituts für Rechtsmedizin und des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums S.-H. durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen danken, die unmittelbar am Gelingen und der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren:

Frau PD Dr. rer. nat. von Wurmb-Schwark für die Vergabe des Themas, die freundschaftliche Betreuung und die Möglichkeit diese Promotionsarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Dittmar. möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. med. Ralf Junker und Dr. Imke Stausberg für die anregenden Gespräche und die Unterstützung während des gesamten Projekts.

Meiner Frau, Antje, für die tägliche moralische Unterstützung und das offene Ohr in allen Lebenslagen.

Dr. Thorsten Schwark, Dr. Andrea Preuße-Prange und Dipl. Biol. Johannes Hasse für die stets kompetente, freundschaftliche und nette Zusammenarbeit.

Meinen Masterstudentinnen Sabin Kornell, Elisabeth Richert und Elena Steinmeier sowie meinen Medizindoktoranden Christin Enzenauer, Vera Hessling, Marcus Klein und Christian Ohm für die schöne Zeit, die (Fach-) Gespräche, Tipps und Anregungen.

Frau Ingrid Wessel und Frau Stefanie Petzel für die Hilfe, Einweisung in die Geräte und die netten Stunden im Institut.

Meinen (Schwieger-) Eltern und Geschwistern danke ich für ihr stets offenes Ohr und die Unterstützung über das gesamte Studium hinweg.

Ich bedanke mich bei allen Tierärzten, die mich mit stetigem Probennachschub unterstützt haben. Hier sind namentlich zu nennen: Dr. Anja Gold, Dr. Dirk Stoppelhaar, Dr. Cornelia Martens und Dr. Susanne Gäbken.

Unserem Familienhund „Feldmann“ für die immer bereitwillig geleisteten DNA-Proben für die Positivkontrollen und Validierungen.

13. Lebenslauf

Praxiserfahrung

-
- | | |
|-----------------|--|
| seit 03/2012 | Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Institut für Rechtsmedizin <ul style="list-style-type: none"> • wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand • EDV- und Datenschutzbeauftragter |
| 06/2006-03/2012 | Filiago GmbH & Co. KG <ul style="list-style-type: none"> • Technik & Support, Projektmanager/Projektleitung VoIP • Technischer Support, Email-Bearbeitung, Systemadministration, Softwareentwicklung, Projektmanagement, technische Entwicklung |
| 10/2003-06/2005 | Freiwilliger Ersatzdienst beim Deutschen Roten Kreuz <ul style="list-style-type: none"> • Sanitätsausbildung A, B, C • Ausbildung zum Rettungshelfer |

Ausbildung

-
- | | |
|-----------------|--|
| seit 03/2012 | Doktorarbeit
Institut für Rechtsmedizin/Institut für klinische Chemie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Titel der Promotionsarbeit: Entwicklung molekularbiologischer Methoden und Programmierung einer Datenbank zur Abstammungsanalyse ausgewählter Tierarten |
| 09/2005-08/2011 | Studium der Biologie
Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Schwerpunkt: Zellbiologie, Rechtsmedizin und Zoologie
Titel der Diplomarbeit: Expression von HSP70 und Alterationen der mitochondrialen DNA im menschlichen Gehirn als Biomarker in der forensischen Diagnostik |
| 06/2003 | Abitur
Städtisches Gymnasium, Bad Segeberg, Schleswig-Holstein |

Kiel, den 22.07.2014



14. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig angefertigt habe.

Ich versichere an Eides statt, dass ich die Inanspruchnahme fremder Hilfen aufgeführt habe, sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Ich versichere, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde.

Ich versichere, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Ich bin damit einverstanden, dass meine Promotionsarbeit in der Bibliothek der Christian-Albrechts- Universität ausgestellt wird.

Kiel, 22. Juli 2014

Ort, Datum

Unterschrift