

**DNA-Analyse an tierischem Spurenmaterial -
Etablierung einer Methode zur
molekulargenetischen Untersuchung von
Tierhaarspuren in der Fallarbeit,
insbesondere der Katzen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Natalie Schury
geb. am 22.09.1982 in Wiesbaden

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Arbeitsschwerpunkt	1
1.2 Bedeutung der Hauskatze (<i>F. s. catus</i>) und Ähnlichkeiten zur Europäischen Wildkatze (<i>F. s. silvestris</i>)	3
1.3 Übertragungsspur Haar	6
1.4 Das Katzen genom und Entwicklung von Untersuchungsansätzen.....	8
1.5 DNA-Polymorphismen.....	10
1.6 Charakterisierung von Mikrosatelliten-DNA (STRs).....	11
1.7 Nomenklatur und allelische Leitern	13
1.8 Artefakte bei der STR-Analyse	15
1.8.1 Stotterprodukte.....	15
1.8.2 Non-Template Adenylierung und DNA-Überschuss.....	16
1.8.3 Peak-Imbalance und Allel-Dropout	17
1.9 Multiplex-PCR-Analyse.....	19
1.10 Mitochondriale DNA - Ein alternativer Untersuchungsansatz.....	20
1.10.1 Mitochondriale DNA und Kern-DNA im Vergleich	22
2 MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Eingesetztes Material und verwendete Software.....	24
2.1.1 Probenmaterial	24
2.1.2 Verbrauchsmaterial	26
2.1.3 Kits.....	27
2.1.4 Chemikalien und Lösungen	27
2.1.5 Geräte.....	29
2.1.6 Software und Datenbanken	30
2.2 Methoden zur DNA-Isolierung	32
2.2.1 DNA-Extraktion aus Mundschleimhautzellen und Geweben mittels des QIAamp [®] DNA Mini Kits	32
2.2.2 DNA-Extraktion aus Haaren.....	34
2.2.2.1 Reinigung von Haaren	35
2.2.2.2 Lyse des Haarmaterials.....	35
2.2.2.3 DNA-Isolierung mittels organischer Extraktion.....	37
2.3 DNA-Quantifizierung.....	38
2.3.1 DNA-Quantifizierung mit dem VersaFluor [™] Fluorometer (BIO-RAD).....	38

2.4 Systemauswahl und Primerdesign	40
2.4.1 STR-Marker	40
2.4.2 mtDNA-Marker	43
2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.5.1 Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der AmpliTaq Gold [®] DNA-Polymerase	45
2.6 Detektion von PCR-Produkten.....	50
2.6.1 Kapillarelektrophorese	50
2.7 Herstellung von Allelleitern	51
2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten	52
2.8.1 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels illustra ExoStar 1-Step.....	52
2.8.2 Aufreinigung der Allelleitern mittels Microcon [®] Centrifugal Filter Devices.....	53
2.9 Isolierung von PCR-Produkten	53
2.9.1 Isolierung mittels Spreadex [®] Mini-Gelen	53
2.10 Sequenzierung	56
2.10.1 Didesoxyribonukleotid-Sequenzierung nach F. Sanger	56
2.10.2 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mit Centri•Sep Spin Columns und anschließende Kapillarelektrophorese.....	57
2.11 Datenanalyse	59
2.11.1 Erstellung einer Populationsdatenbank	59
2.11.2 Berechnung der Heterozygotie und des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes	59
2.12 mtDNA-Analyse	59
2.12.1 Haplotypisierung der Hauskatze	60
2.12.2 Artspezifität	61
2.12.2.1 Primer MM - Kontrollregion.....	61
2.12.2.2 Tobe und Linacre - Cytochrom b.....	61
2.13 Besondere Methoden der DNA-Extraktion.....	63
2.13.1 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mittels Magnetpartikelseparatoren	63
2.13.1.1 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mittels Maxwell [®] 16 (Promega).....	63
2.13.1.2 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mithilfe des King Fisher [™] Duo (Thermo Scientific).....	65
2.13.1.3 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mithilfe des EZ1 Advanced (Qiagen)	67
3 ERGEBNISSE	70
3.1 Auswahl geeigneter STR-Markersysteme	70
3.1.1 Optimierungsbeispiele ausgewählter STR-Markersystemen	71
3.1.1.1 STR-Marker F42	72

3.1.1.2 STR-Marker F141_vkz.....	75
3.2 Geschlechtsbestimmung bei der Hauskatze.....	77
3.2.1 SRY.....	77
3.2.2 Amelogenin.....	78
3.3 Elektrophoretisches Laufverhalten von PCR-Produkten	81
3.4 Sequenzanalyse zur Beschreibung von Repeatmustern und Allel-Nomenklatur....	82
3.4.1 Kategorie: „Einfache Repeats“	83
3.4.1.1 STR-Marker F42_vkz_neu	83
3.4.1.2 STR-Marker FCA441_vkz	85
3.4.1.3 STR-Marker FCA730_vkz	87
3.4.1.4 STR-Marker FCA734	90
3.4.1.5 STR-Marker FCA740_vkz	92
3.4.1.6 STR-Marker FCA744_vkz	95
3.4.2 Kategorie: „Komplexe Repeats“	97
3.4.2.1 STR-Marker F27	97
3.4.2.2 STR-Marker F141_vkz3.....	99
3.4.2.3 STR-Marker FCA747_vkz2	104
3.4.3 Kategorie: „Komplexe hypervariable Repeats“	106
3.4.3.1 STR-Marker F37_vkz5.....	106
3.4.3.2 STR-Marker FCA559	109
3.4.3.3 STR-Marker FCA733	111
3.4.3.4 STR-Marker FCA742_vkz	114
3.4.3.5 STR-Marker FCA749_vkz	116
3.4.4 Allelleiter des geschlechtsspezifischen Markers Amelogenin.....	120
3.5 Datenanalyse anhand der Frequenzdaten.....	120
3.5.1 Heterozygotie.....	120
3.5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	121
3.5.2 Frequenzanalyse.....	122
3.6 Erstellung von Multiplexen	123
3.6.1 Duplex Duplex-1 (D1)	125
3.6.2 Tetraplex Quadro-6_Primer3 (Q6-P3).....	126
3.6.3 Tetraplex Quadro-10 (Q10)	128
3.6.4 Pentaplex Penta-6 (P6).....	129
3.7 Sensitivitätstest	131
3.7.1 Duplex-1 (D1).....	133
3.7.2 Multiplex Quadro-10 (Q10).....	134
3.7.3 Quadro-6_Primer3 (Q6-P3)	136
3.7.4 Penta-6 (P6)	137
3.8 Artspezifitätstest.....	138

3.9 Analyse von Mischspuren	144
3.10 STR-Typisierung von unterschiedlichen Geweben und Haaren.....	145
3.11 Untersuchung auf DNA-Anhaftungen an Haaren und Haarschaftmaterial.....	147
3.12 Optimierung der Haar-DNA-Extraktion	147
3.13 Untersuchung der mtDNA	151
3.13.1 mtDNA - Haplotypen-Verteilung nach Tarditi	151
3.13.2 mtDNA - Haplotypen-Verteilung nach RS2	153
3.13.3 Haplotypen-Verteilung nach Kombination des Tarditi- und RS2-Systems	155
3.13.4 Sensitivitätsstudie.....	156
3.13.5 Test auf Artspezifität	157
3.14 Artbestimmung mit Hilfe der mtDNA	158
3.14.1 Primer MM - Kontrollregion.....	158
3.14.2 Tobe und Linacre - Cytochrom b	159
3.15 Falldarstellung	162
4 DISKUSSION	165
4.1 Auswahl und Optimierung geeigneter STR-Markersysteme	167
4.2 Eigenschaften der untersuchten Markersysteme	170
4.2.1 Unterschiede zwischen beschriebenen und ermittelten Sequenzen	170
4.2.2 Elektrophoretisches Laufverhalten.....	171
4.3 Standardisierung.....	172
4.4 Homoplasien und mögliche Beeinträchtigungen	173
4.5 Chromosomale Lage der STR-Marker.....	174
4.6 Allelverteilung und Frequenzen	175
4.7 Multiplexe	177
4.8 Validierung.....	178
4.8.1 Multiplexanalyse und Sensitivitätstest.....	179
4.8.2 Artspezifität	180
4.8.3 DNA-Mischspuren, Speichel an Haaren und Kontinuität.....	181
4.9 Vergleich der Allelverteilungen zwischen Haus- und Europäischer Wildkatze... 	181
4.10 Optimierung der Haar-DNA-Extraktion	183
4.11 Untersuchung der mtDNA	183
4.11.1 Validierung.....	184
4.11.1.2 Sensitivitätstest.....	184
4.11.1.3 Artspezifität	184

4.12 Artbestimmung mit Hilfe der mtDNA	186
4.13 Analysen auf Basis der Kern- und mitochondrialen DNA - ein Ausblick.....	186
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	189
6 LITERATURVERZEICHNIS	190
7 PUBLIKATIONEN	201
8 DANKSAGUNG	202
9 LEBENSLAUF	203
10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	205
11 ANHANG	206
11.1 Abkürzungsverzeichnis.....	206
11.2 Manuskript	210
11.3 Elektronischer Anhang.....	244

1 Einleitung

1.1 Arbeitsschwerpunkt

Das Spurenaufkommen an einem Tatort umfasst neben humanen oft auch eine Vielzahl anderer biologischer Spuren. Zu diesen zählen u. a. pflanzliches und tierisches Material, das überwiegend indirekt übertragen oder am Tatort zurückgelassen wird. In den letzten Jahren haben diese Spuren immer mehr an Beachtung erfahren und an Bedeutung dazu gewonnen, da diese nicht selten in laufenden Verfahren mit in die Beweiskette aufgenommen werden und zu einem Urteilsspruch beitragen können [1,16,126,127].

Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Bearbeitung von tierischem Spurenmaterial, insbesondere das der Hauskatze (*Felis silvestris catus*). Da bei diesen Tieren hauptsächlich mit der Übertragungsspur Haar und nicht wie bei Hunden mit Beißattacken gerechnet werden kann, sollte die zu etablierende Methode auf diese Spur ausgelegt und entsprechend optimiert werden. Ziel war es hierbei eine Individualisierung durchzuführen und so die Spur über bestimmte genetische Marker (sog. Mikrosatelliten) einem Individuum zuordnen zu können.

Viele Wissenschaftler und Arbeitsgruppen haben sich in den vergangenen Jahren mit der Erforschung des Katzenenoms beschäftigt, sodass bereits eine ausreichend große Anzahl an geeigneten hypervariablen Markern (STRs; Short Tandem Repeats) der Kern-DNA zur Verfügung stehen [34,46,52,53,54,55]. Es erfolgte jedoch weder eine optimale Auslegung der Marker-Systeme auf forensisch relevantes Probenmaterial (geringste Mengen an DNA bzw. degradierte DNA, die nur noch in kleinsten Bruchstücken vorhanden ist), noch wurde eine Standardisierung nach den Richtlinien der ISFG (International Society for Forensic Genetics) [72,73,74,75] eingeführt.

Die Optimierung umfasste zum einen, aufgrund der zu erwartenden fragmentierten DNA, die Reduktion der Produktgrößenbereiche jedes einzelnen STR-Markersystems auf maximal 300 bp. Eine Korrektur von STR-Markern mit Größenbereichen > 400 bp hin zu sog. „Mini-STRs“ erwies sich in anderen Untersuchungsansätzen als erfolgreich, um Informationen aus altem Spurenmaterial, das unter Umständen sehr wenig und zudem degradierte DNA beinhaltet, erhalten zu können [87,88,89,90,91]. Zum anderen wurden PCR-spezifische Einstellungen (Temperaturprofil, MgCl₂-Konzentration, PCR-Zyklen) variiert, die Ergebnisse miteinander verglichen und die Bedingungen entsprechend optimiert. Des Weiteren fand die Zusammenfassung aller Markersysteme in Multiplexe statt, um bei der Analyse nicht nur

Ausgangsmaterial zu sparen, sondern auch um den Zeitaufwand für die Bearbeitung zu minimieren.

Zur Standardisierung der STR-Markersysteme erfolgte die exakte Beschreibung der jeweiligen Markerstruktur (Sequenzanalyse) mit der gleichzeitigen Identifizierung aller sich tandemartig wiederholender Sequenzabschnitte (Repeateinheiten). Anlog zu der Anzahl der sich wiederholenden Repeateinheiten wurde eine Nomenklatur entwickelt, sodass die unterschiedlichen Produkte (Allele) eines jeden Markers benannt werden konnten. Als Standard zur exakten Größen- bzw. Allelbezeichnung von amplifizierten Produkten stehen nun sog. Alleleitern zur Verfügung, um eine basenpaargenaue Zuordnung zu gewährleisten. Durch Austausch dieser Standards mit anderen Institutionen und Laboratorien wird so eine Vereinheitlichung der gesammelten Daten und ein direkter Abgleich ermöglicht. Auch die Erstellung von Datenbanken für Vergleichsanalysen und deren Verwendung ist somit erstmals möglich.

Mit den erfolgten Anpassungen und Standardisierungen sind die Marker so optimiert, dass diese in der Fallarbeit angewendet werden können. Doch auch die beste Anpassung der STR-Markersysteme kann bei sehr stark fragmentierter und einer sehr geringen Menge an DNA keine oder nur unzulängliche Ergebnisse liefern. Alternativ bieten sich Analysen der mitochondrialen DNA (mtDNA) an, da ihre genetische Information im Vergleich zur Kern-DNA in einer weitaus höheren Kopienzahl in einer Zelle vorhanden ist [21,26,111]. Die Individualisierung einer Probe oder Spur ist hierbei nicht zu gewährleisten, jedoch kann eine Gruppenzugehörigkeit (Haplotyp) angegeben werden, mit der sich anhand von einer Datenbank Ausschlusswahrscheinlichkeiten berechnen lassen.

Die Arbeitsgruppe um Tarditi et al. [121,122] hat sich mit der Haplotypisierung von Hauskatzen beschäftigt und ein System etabliert, das eine gute Verteilung liefert. Jedoch zeigte sich bei der Verteilung die Ausprägung eines unter den Katzen stark repräsentierten Haplotyps. Im Rahmen einer Masterarbeit wurde nach alternativen Bereichen auf der mtDNA gesucht, um eine bessere Differenzierung speziell dieses Haplotypen zu gewährleisten. Auch hier fanden Optimierungen innerhalb der PCR-Methodik und der Elektrophorese statt, sodass letztendlich zwei Bereiche in Kombination dazu genutzt werden können, um eine im Vergleich zur Ausgangssituation wesentlich verbesserte Differenzierung zu erhalten [129].

Mit den hier vorgestellten Möglichkeiten der Untersuchung der Kern- als auch mitochondrialen DNA ist eine gute und effiziente Grundlage geschaffen, den maximalen Informationsgehalt aus einer Spur erhalten zu können. Gerade im Hinblick auf Minimalspuren, wie sie z. B. Katzenhaare darstellen.

1.2 Bedeutung der Hauskatze (*F. s. catus*) und Ähnlichkeiten zur Europäischen Wildkatze (*F. s. silvestris*)

Eines der beliebtesten Haustiere in Deutschland ist die Hauskatze (*Felis silvestris catus*). Mit rund 12,3 Mio. Individuen ist sie in 16,5 % der Haushalte das am häufigsten vertretene Haustier. Nachfolgend ist der Hund mit 7,4 Mio. Individuen in 13,4 % der Haushalte repräsentiert [2].

Die Familie der Katzen (*Felidae*) umfasst 37 Arten, deren Stammbaum sich anhand von genetischen Analysen in acht Linien aufspalten ließ [3]. Diese Einteilung in Gruppen zeigte zudem häufig, dass sich die morphologischen, biologischen sowie physiologischen Eigenschaften der Arten einer Gruppe durchaus untereinander ähnelten und nur in dieser Gruppe vertreten waren. Die Fähigkeit des Brüllens ist z. B. eine Eigenschaft, die nur der Linie der Panther, zu der Löwe, Tiger, Jaguar, Leopard und Schneeleopard zählen, vorbehalten ist. Ausnahmen bilden hierbei zwei Nebelparder-Arten, aufgrund einer etwas anderen Knochenstruktur des Rachenraumes.

Wissenschaftler spekulierten lange über die Herkunft der Hauskatze und wie ihre Domestikation ihren Ursprung fand. Relativ sicher war, dass ihr Urahn nur einem der fünf Unterarten der Wildkatze (*Felis silvestris*; *F. s.*) entsprechen konnte.

Zu diesen Unterarten zählen:

- die Falbkatze (*F. s. lybica*; Naher und Mittlerer Osten)
- die Steppenkatze (*F. s. ornata*; Zentralasien)
- die Europäische Wildkatze (*F. s. silvestris*; Europa)
- die Grau- oder Gobikatze (*F. s. bieti*; China)
- die Südafrikanische Wildkatze (*F. s. cafra*; südl. Afrika)

Doch erst die Studie von Discroll et al. (2007) [4] konnte über molekulargenetische Untersuchungen mit Markern der mitochondrialen sowie genomischen DNA belegen, dass sich die Hauskatze in das gleiche genetische Cluster wie die Falbkatze (*F. s. lybica*) einordnen lässt (Abb. 1).



Abb. 1: Die Falbkatze (*F. s. lybica*)

(Bildquelle: [1])

Man geht heute davon aus, dass sich durch die Entstehung der ersten Siedlungen und Dörfer vor rund 10.000 Jahren im Nahen Osten und die damit verbundene Lagerung von Nahrungsmitteln ebenso Schädlinge ansiedelten. Diese sowie die anfallenden Abfälle wurden von den Falbkatzen nur allzu gerne als Nahrungsquelle angenommen und der Mensch ließ sie gewähren. Somit fanden die Katzen wahrscheinlich freiwillig den Anschluss an den Menschen, da sie von dessen Existenz in ihrem Gebiet profitierten und so im Laufe der Zeit immer zutraulicher wurden [4].

Die Verbreitung der Hauskatze in andere Regionen fand meist über See- und Handelswege statt. Im alten Ägypten wurden diese im großen Maßstab gezüchtet, verehrt und sogar mumifiziert. Die meisten der heutigen Rassen entstanden jedoch im 19. Jh. in England, wo auch im Jahr 1871 die erste Rassenausstellung stattfand [5].

Die Zentralverbände unterscheiden etwas über 100 Rassen, von denen 69 anerkannt und 37 zugelassen sind (Angaben laut dem Dachverband WCF; World Cat Federation [6]). Ihre Unterteilung findet aufgrund ihrer Felleigenschaften in vier Gruppen statt: Kurzhaar (z. B. British Kurzhaar), Halblanghaar (z. B. Maine Coon), Langhaar (z. B. Perser) und Siam-Orientalisch Kurzhaar (z. B. Siam).

Eine große Ähnlichkeit zu der gemeinen Hauskatze zeigt die Europäische Wildkatze (*F. s. silvestris*). Die beiden Subspezies sind rein vom äußeren Erscheinungsbild oft nur schwer voneinander zu unterscheiden (Abb. 2).



Abb. 2: Die Hauskatze und die Europäische Wildkatze im Vergleich

Allein von ihrem Erscheinungsbild ähneln sich die Hauskatze (*F. s. catus*) (a) und die Europäische Wildkatze (*F. s. silvestris*) (b) sehr und sind nur schwer auseinanderzuhalten. (Bildquellen: [ii,iii])

Die Europäische Wildkatze wirkt oft massiger und größer als die Hauskatze. Sie weist einen fleischfarbenen (rosa) Nasenspiegel auf, als auch einen dickeren und kürzeren Schwanz, der durch mehrere schwarze Ringe und einer stumpf endenden schwarzen Schwanzspitze gekennzeichnet ist. Zudem wirkt die Zeichnung des meist durch einen ockerfarbenen Grundton geprägten Fells von *F. s. silvestris* insgesamt verwaschen [7]. Eine sichere Bestimmung der Subspezies kann zum einen morphologisch z. B. über die Darmlänge oder zum anderen über genetische Marker erfolgen.

Im 19. Jahrhundert wurde die Europäische Wildkatze als gefährliches Raubtier eingestuft und zum Schutze der Nutztiere bis in die 1930er Jahre bejagt und fast vollständig ausgerottet. Erst im Jahr 1934 wurde vom Reichsjagdgesetz ein ganzjähriger Schutz verordnet [8]. Weitere wichtige Abkommen, wie das Washingtoner Artenschutzabkommen (1973) oder die Bremer Konvention (1979) folgten sowie die Aufnahme auf die rote Liste Deutschlands als stark gefährdete Art [9]. Durch gezielte Artenschutzprogramme und die bundesweite Aktion „Rettungsnetz Wildkatze“, in der Wanderkorridore und Habitate durch Grundstückkauf und Bepflanzung artgerecht aufgebaut werden, hat sich der Bestand inzwischen auf 5.000 - 7.000 Individuen in Deutschland erholt [7].

Die Fortpflanzung zwischen *F. s. catus* und *F. s. silvestris* ist anatomisch als auch genetisch möglich [10,11]. Die Jungtiere, in der Jägersprache Blendlinge genannt, sind überlebensfähig und können selbst Nachkommen produzieren. Die Hybride kommen jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz vor [10]. Wildkatzen meiden die Nähe des Menschen und leben sehr

zurückgezogen. Im Gegensatz hierzu scheuen verwilderte Hauskatzen die menschliche Umgebung nicht, weshalb sich ihre Reviere nur selten kreuzen.

Mittels baldriangetränkter Lockstöcke werden in unterschiedlichen Gebieten in Deutschland Haarproben frei lebender Wildkatzen gesammelt, um deren genetischen Status zu erheben. Sehr häufig werden dazu auf Kern-DNA Ebene hypervariable Marker (sog. Mikrosatelliten) bevorzugt, die u. a. gute Resultate bei der Differenzierung von Haus- und Wildkatzen versprechen [12]. Des Weiteren werden diese auch für die Unterscheidung einzelner Individuen eingesetzt. Während es bei *F. s. silvestris* meist um eine Bestandsaufnahme der jeweiligen Individuen, die Populationsgröße oder -zugehörigkeit und die Aufklärung ihres Wanderverhaltens geht, werden mit diesen Markern bei *F. s. catus* z. B. Abstammungsbegutachtungen durchgeführt. Hierbei spielt das verbreitete Interesse des Menschen an *F. s. catus* eine große Rolle. Ihr überdurchschnittlich hohes Vorkommen und das enge Zusammenleben mit dem Menschen machen die Katze zu einem potentiell wichtigen Kandidaten für morphologische als auch molekulargenetische Untersuchungen.

Im Hinblick auf die Verbrechensaufklärung erhalten tierische Spuren mit den zur Verfügung stehenden Untersuchungsmöglichkeiten immer mehr Beachtung. Eine große Rolle dabei spielen überwiegend die Haare von Tieren, im speziellen der Katze.

1.3 Übertragungsspur Haar

Das Haar stellt eine leicht zu übertragende Spur dar, die für die fallbezogene Untersuchung an einem Tatort herangezogen werden kann. Studien haben bereits eindrucksvoll dargestellt, dass menschliche als auch tierische Haare leicht übertragen werden können und an den unterschiedlichsten Oberflächen haften bleiben [13,14,15]. Gerade das enge Zusammenleben von Mensch und Tier macht das Haar als Übertragungsspur so interessant und unabdingbar für eine Untersuchung. Die Übertragung erfolgt meist sekundär, d.h. nicht durch den Haardonor selbst, sondern indirekt durch einen Überträger ohne dessen wissentliches Zutun. So können beispielsweise die Haare einer Katze an der Kleidung oder an Gegenständen (z. B. der Fußmatte des Autos oder dem Autositz) eines mutmaßlichen Täters einen Hinweis auf dessen Tatbeteiligung liefern, sofern diese der Katze des Opfers zugeordnet werden können. Umgekehrt ist es auch denkbar, dass Haare eines Tieres, welches der Täter besitzt durch

Körperkontakt auf das Opfer übertragen oder in der Wohnung bzw. am Tatort hinterlassen werden können.

In den Laboren des BKA konnte bisher lediglich eine morphologische Untersuchung derartiger Haarspuren über das Mikroskop durchgeführt werden. Hierbei erfolgt eine Bestimmung der Spezies u. a. über die Breite und den Aufbau der Medulla. Weitere Merkmale, wie die Farbe oder die Pigmentverteilung des Haares, können für einen Vergleich mit Haaren eines fraglichen Tieres als Spureenträger herangezogen werden. Die morphologische Untersuchung bietet nur die Möglichkeit eines Ausschlusses oder einer Zuordnung des Haarmaterials. Eine individuelle Zuordnung ist grundsätzlich nicht möglich.

Der erste Fall, in dem Katzenhaare als Beweismittel in einer Gerichtsverhandlung akzeptiert wurden und maßgeblich zur Verurteilung des Angeklagten beitrugen, ist als der Fall „Snowball“ bekannt. Im Jahr 1994 galt es den Mord an einer jungen Frau in Kanada aufzuklären. Ein Beweismittel stellte u. a. eine Männerlederjacke dar, die mit Blut der Toten besprenkelt war. In deren Innenfutter fanden sich weiße Katzenhaare, deren Herkunft mittels einer DNA-Analyse unter Verwendung von 10 STR-Markern geklärt werden konnte. Die Haare stammten von einer Katze namens „Snowball“, die den Eltern des Ehemannes der Toten, des Haupttatverdächtigen, gehörte. Der Ehemann lebte zum Zeitpunkt des Verschwindens seiner Frau bei seinen Eltern, da diese im Begriff war, sich von ihm zu trennen. Das Gericht sah seine Täterschaft unter Abwägung aller Beweismittel als bewiesen an und verurteilte ihn wegen Totschlags [16].

Bei sichergestellten Haaren handelt es sich meist um ausgefallene, sog. telogene Haare. Telo gene Haare haben ihr Wachstum bereits komplett eingestellt und befinden sich in einer Ruhephase. Die Haar papille erneuert sich und der Haar follikel wird regeneriert, sodass ein neues Haar ausgebildet werden kann. Ist dies geschehen, wird das telogene Haar abgestoßen. Die menschlichen Haare befinden sich ungefähr 3 Monate in der Telogen-Phase [17]. So verliert ein Mensch im Laufe eines Tages ungefähr 100 Haare. Bei Katzen sollen es je nach Jahreszeit 160 - 480 mg Fell pro Tag sein [18]. Das sehr dichte Fell unterliegt einem saisonalen Wechsel. So weisen die Tiere im Winter eine wesentlich höhere Felldichte als im Sommer auf [19,20].

Der Kern-DNA-Gehalt in telogenen Haaren ist, aufgrund des eingestellten Wachstums und der Zelldegradation im Wurzelbereich, sehr gering. Zudem sind hauptsächlich nur noch kleine DNA-Bruchstücke im Wurzelbereich als auch im Haarschaft selbst vorhanden, die eine molekulargenetische Untersuchung erschweren [21,22,23]. Man spricht in diesem

Zusammenhang auch von Minimal Spuren [24]. Diese kann ebenso durch Umwelteinflüsse bedingt werden, indem biochemisch induzierte oder oxidative Prozesse stattfinden [25].

Neben der Kern-DNA findet sich zusätzlich mitochondriale DNA (mtDNA) im gesamten Haar. Diese liegt nicht nur im Haar in einer wesentlich höheren Kopienanzahl pro Zelle vor. Je nach stoffwechselaktivem Gewebe kann die mtDNA in ~ 200 - 1.700-facher Kopienzahl vertreten sein [26] und eignet sich gerade dadurch für einen alternativen Untersuchungsansatz, falls eine STR-Analyse nicht mehr möglich ist.

Des Weiteren enthalten Haare Stoffe, die eine Vervielfältigung der DNA während der PCR stören könnten. Hierzu zählt u. a. das dem Haar seine Farbe verleihende Melanin [27,28,29]. Von diesem Pigment sind zwei Arten vorhanden: das gelb-rötliche Phäomelanin und das schwarz-braune Eumelanin. Das Mischungsverhältnis dieser beiden Pigmenttypen bedingt die jeweilige Haarfarbe [30].

Unterschiedlichste Untersuchungsmethoden und Versuchsansätze stehen sowohl auf Kern-DNA als auch auf mitochondrialer Ebene zur Verfügung, um aus einer vorliegenden Spur oder auch Minimalspur das Maximum an Informationen erhalten zu können.

1.4 Das Katzen genom und Entwicklung von Untersuchungsansätzen

Im Jahr 2006 gelang es das Katzen genom vollständig zu sequenzieren. Hierfür wurde die DNA einer weiblichen Abessinier-Katze namens „Cinnamon“ genutzt [31].

Die Gesamtgenomsequenz der Katze wurde u. a. neben weiteren 23 Gesamtgenomen anderer Säugetiere dazu verwendet, die evolutionäre Aufspaltung zwischen den heute noch lebenden Säugern zu erforschen [32].

Der diploide Chromosomensatz der Katzen setzt sich aus 38 Chromosomen (18 Autosomen und 2 Geschlechtschromosomen) zusammen, die morphologisch in A1-3, B1-4, C1-2, D1-4, E1-3, F1-2 und X/Y unterteilt sind [33,34] (Abb. 3).

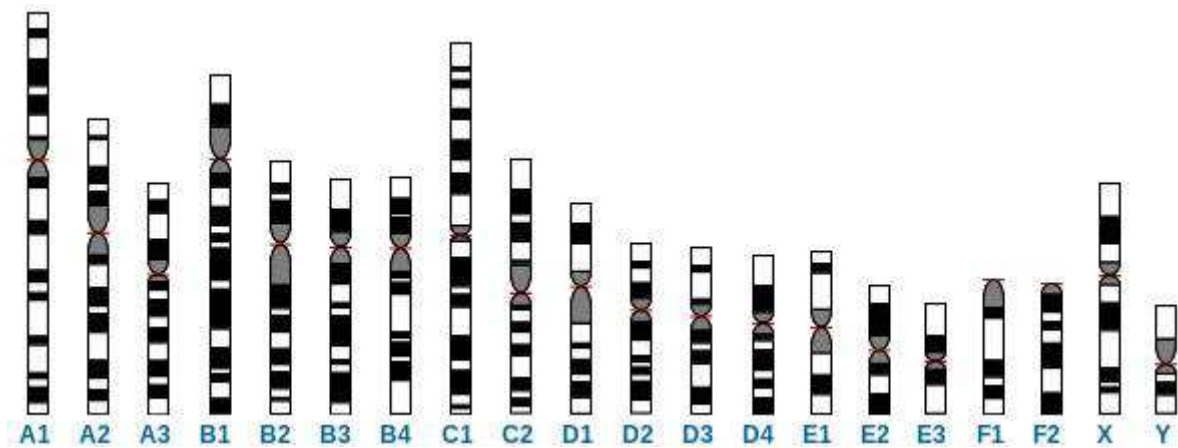


Abb. 3: Chromosomen der Katze (*F. s. catus*)

Die morphologische Verteilung der Chromosomen erfolgt nach A1-3, B1-4, C1-2, D1-4, E1-3, F1-2 (Autosomen) und X/Y (Geschlechtschromosomen; Gonosomen).

(Bildquelle: [iv])

Des Weiteren wurden die genetisch vererbten Krankheiten der Katzen genauer untersucht und boten ein gutes Model, um den genauen Mechanismus ähnlich vererbter Krankheiten beim Menschen verifizieren zu können [35].

Innerhalb dieser Jahre entwickelte sich speziell die Technik zur Individualisierung des Menschen anhand von Untersuchungen der Erbinformation rasant. Schon im Jahr 1984 erkannte Sir Alec Jeffreys, dass variable Regionen innerhalb der DNA vorhanden sind, die sich tandemartig wiederholen. Diese Minisatelliten (VNTRs; Variable Number of Tandem Repeats) variieren zwischen einzelnen Individuen und können so für eine Identitätsbestimmung herangezogen werden [36,37]. Die erstmalige Anwendung dieser Methode in der Kriminalistik erfolgte 1986 bei der Aufklärung eines Mord- und Vergewaltigungsdeliktes an zwei Mädchen in Leicestershire, England. Eine zu unrecht beschuldigte Person konnte hierdurch entlastet sowie der wahre Täter identifiziert werden [38].

Nur wenige Jahre später begann durch die Beschreibung von Mikrosatelliten, den Short Tandem Repeats (STRs), in Kombination mit der entwickelten Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) eine rasante Weiterentwicklung in der forensischen Molekulargenetik [39,40]. Es wurde so die Möglichkeit geschaffen, geringste Mengen an Ausgangsmaterial (0,1 - 0,5 ng) untersuchen zu können, wo zuvor mindestens die 10-fache Menge an DNA nötig war. Auch war es nun möglich, Ergebnisse aus der DNA zu erhalten, die degradiert oder nur in geringsten Mengen vorlag [41].

Diese Entwicklungen in der Humangenetik machten sich Wissenschaftler zu Nutze, die sich mit der Untersuchung tierischer Genome beschäftigten. Auch im tierischen Genom wurden Mikrosatelliten durch Genkartierungen beschrieben [42,43,44,45,46]. So wurde eine Grundlage geschaffen, die vorhandenen STR-Marker für genetische Analysen zu nutzen. Waren u. a. bei den Katzen zunächst Aufschlüsse von Verwandtschaftsverhältnissen, des genetischen Status von gefährdeten Arten oder speziell die Abstammungsbegutachtung für die Züchtung von Bedeutung [10,47,48,49,50,51], wuchs schnell auch das Interesse, diese Marker für Individualisierungen in forensischen Ansätzen zu verwenden [34,52,53,54,55].

Auch auf Ebene der mitochondrialen DNA (mtDNA) wurden im humanen und tierischen Bereich die Untersuchungen vorangetrieben und neben phylogenetische Studien [10,56,57,58] immer häufiger forensische Ansätze verfolgt [14,26].

Bei den beschriebenen Untersuchungsansätzen der genomischen und mitochondrialen DNA werden sich sog. Polymorphismen zu Nutze gemacht, die im nachfolgenden Abschnitt erläutert werden sollen.

1.5 DNA-Polymorphismen

Per Definition handelt es sich in der Genetik bei einem Polymorphismus um unterscheidbare Homologe eines Chromosoms oder um verschiedene Allele eines Gens, die unterschiedliche DNA-Sequenzen zueinander aufweisen [59]. Erst wenn die Häufigkeit der auftretenden Variation größer als 1 % in der betrachteten Population ist, kann von einem Polymorphismus gesprochen werden. Ansonsten handelt es sich um eine Mutation.

DNA-Polymorphismen können entweder durch Veränderungen in der Sequenzabfolge (Sequenzpolymorphismus) oder in der Sequenzlänge (Längenpolymorphismus) definiert sein.

Die Entstehung eines Polymorphismus ist auf den Austausch, die Insertion oder die Deletion von Basen in der DNA-Sequenz zurückzuführen. Ist nur eine einzelne Base in einer DNA-Sequenz betroffen, handelt es sich um einen Single Nucleotide Polymorphism (SNP).

Treten hingegen Variationen in der Anzahl von Repeateinheiten in einem repetitiven Bereich der DNA auf, bedingen diese einen Längenpolymorphismus (z. B. bei STRs).

Die beschriebenen Sequenzvariationen sind häufig genetisch neutral, da sie überwiegend in nicht-kodierenden Regionen auftreten. Somit unterliegen sie keiner Selektion und bleiben meist im Genom enthalten [59].

Über die Generationen hinweg werden diese Variationen im Genom angehäuft und nach den Mendelschen Regeln zu gleichen Teilen von der elterlichen Seite an die Nachkommen vererbt. Sequenzvariationen können in identischer Form auf beiden homologen Chromosomen vorliegen oder sich voneinander unterscheiden. Gerade im Fall der Längenpolymorphismen werden diese, analog zu den Genen, als homo- bzw. heterozygot bezeichnet. Auch spricht man in diesem Zusammenhang von Allelen [41].

Betrachtet man sich die Allele an einem bestimmten Genort auf den homologen Chromosomen und diese unterscheiden sich voneinander, handelt es sich um einen heterozygoten Genotyp. Ein homozygoter Genotyp hingegen, weist zueinander identische Allele auf.

1.6 Charakterisierung von Mikrosatelliten-DNA (STRs)

Bei der Mikrosatelliten-DNA handelt es sich um hochrepetitive Sequenzabschnitte, die mit bis zu 10.000 Kopien im Genom vertreten sind. Diese liegen meist in nicht-kodierenden Bereichen und kommen gehäuft in einer sog. ‚Tandem-Anordnung‘ vor [60].

Die Sequenzwiederholungen (Repeateinheiten) setzen sich aus 2 - 6 Basenpaaren (bp) zusammen und werden als Short Tandem Repeats (STRs) bezeichnet.

Die Anzahl, der sich direkt wiederholenden Sequenzabschnitte, liegt meist unter 100 Repeat-einheiten, wodurch die mittels PCR vervielfältigten Produkte überwiegend eine Länge zwischen ~ 100 - 400 bp aufweisen [41].

Aufgrund ihres hochpolymorphen Charakters, ihrer relativ kurzen Fragmentlänge und einer daraus resultierenden Sensitivität und Degradationsunempfindlichkeit (z. B. gealtertes bzw. degradiertes DNA-Material) zählen STRs zu den momentan wichtigsten und am besten validierten Markern für eine Individualisierung [61,62].

Die Entstehung der großen Vielfalt an STR-Markern ist bedingt durch Strangverschiebungen, die während der Replikation auftreten. Diese führen zu Fehlpaarungen bei gleichzeitiger Ausbildung eines Loops. Je nachdem welcher Strang (der zu synthetisierende oder der abzulesende Strang) betroffen ist, erhöht oder erniedrigt sich die Anzahl der repetitiven Einheiten.

Diese Art der Strangverschiebung kann auch bei der Amplifikation von STR-Markern die Entstehung von biologischen Artefakten während der PCR begünstigen [63,64]. Weitere Erläuterungen hierzu sind in Abschnitt 1.8 gegeben.

Prozesse, die ähnlich einer Rekombination ein ungleiches Crossover zwischen homologen Chromosomenpaaren sowie zwischen Schwesterchromatiden bedingen, führen zu Variationen innerhalb von Minisatelliten [65]. Dies konnte für Mikrosatelliten (STRs) nicht bestätigt werden. Ein Zusammenhang zwischen der Rekombinationsrate und der Mikrosatellitendichte ließ sich nicht feststellen [66,67]. Wahrscheinlicher ist, dass sie in Rekombinationsprozesse integriert sind, als dass sie daraus hervorgehen [68,69].

Unter den zahlreich vorhandenen und beschriebenen STR-Markersystemen werden Tetranukleotid-Repeats zur Erstellung von DNA-Profilen bevorzugt. Im Gegensatz zu Di- und Trinukleotid-Repeats neigen diese kaum zur Bildung von sog. Stotterprodukten (siehe hierzu Abschnitt 1.8.1), wodurch die Auswertung der Produkte sowohl in einer Einzelspur als auch in einer Mischspur erheblich erleichtert wird [24].

Die Einteilung von STR-Markersystemen in Kategorien erfolgt nicht nur über die Länge und die enthaltene Anzahl an Nukleotiden innerhalb eines jeden Repeats, sondern auch über das Repeatmuster, welches die sich wiederholenden Einheiten an einem Genort bilden [70,71].

STR-Kategorien:

- einfache Repeats:

setzen sich aus Repeateinheiten mit identischer Länge und Sequenz zusammen

- zusammengesetzte Repeats:

enthalten zwei oder mehr in ihrer Sequenz unterschiedliche einfache Repeateinheiten

- komplexe Repeats:

setzen sich aus mehreren Repeateinheiten mit unterschiedlicher Länge und Sequenz zusammen, die sich von dem zugrunde liegenden Repeatmuster unterscheiden

Die letzte Kategorie der komplexen Repeats wird in Fällen, die sehr komplexe und häufig wechselnde Repeatsequenzen als auch Längen zwischen den unterschiedlichen Produkten eines Markers aufweisen, weiter in komplexe hypervariable Repeats unterteilt.

1.7 Nomenklatur und allelische Leitern

Um eine einheitliche Benennung von STR-Markern und somit einen sicheren Datenaustausch zwischen Untersuchungsstellen zu gewährleisten, wurden durch die International Society for Forensic Genetics (ISFG; früher: International Society for Forensic Haemogenetics (ISFH)) Empfehlungen für deren Bearbeitung im Jahre 1994 und 1997 festgelegt [72,73]. Neben den Richtlinien, die sich mit der Beschreibung der humanen DNA befassen, wurden mit dem Aufkommen der Untersuchung von nicht-humaner DNA, speziell im tierischen Bereich, Richtlinien zu deren Beschreibung und Verwendung in der Forensik verfasst [74,75].

Hiernach soll innerhalb von proteinkodierenden Regionen oder Introns eines Gens der kodierende Strang in 5'- 3'-Richtung für die Beschreibung verwendet werden. Bei Markern nicht-kodierender Bereiche ist die als erstes in der Literatur bzw. mit einem entsprechenden Datenbankeintrag beschriebene Sequenz für alle danach folgenden Beschreibungen zu verwenden.

Die Grundstruktur eines STR-Markers wird mit der Basenpaarabfolge festgelegt, die im Bereich des 5'-Endes des vorliegenden DNA-Stranges die sich tandemartig wiederholenden Einheiten vollständig beschreibt und gleichzeitig die größtmögliche Anzahl an Repeatereinheiten umfasst.

Im nachfolgenden Beispiel wird deutlich, dass die zugrunde liegende Repeatstruktur demnach mit der Sequenz (TCAT) und nicht mit den Basen (CATT) beschrieben werden muss.

5'- TTCC TCATTCATTCATTCAT CCAGGTTA -3' 4 Repeatereinheiten

Zum einen liegt der (TCAT)-Repeat näher in Richtung des 5'-Endes der Sequenz und zum anderen ergeben sich vier anstatt nur drei aufeinander folgende Repeatwiederholungen.

Neben Allelen, die vollständige Repeatereinheiten beinhalten, können auch sog. Mikrovarianten innerhalb eines STR-Markers auftreten. Diese Mikrovarianten beinhalten meist eine unvollständige Repeatereinheit, die sich im Falle eines Tetranukleotid-Repeats aus einer bis drei Basen zusammensetzen kann. Um eine Mikrovariante kenntlich zu machen, soll die Anzahl der kompletten Repeatereinheiten nachfolgend durch einen Punkt von der Anzahl der Basen des unvollständigen Repeats abgesetzt dargestellt werden.

5'- TTCC TCATTCATTCATCAT CCAGGTTA -3' z. B. Allel 3.3

Um eine sichere Benennung der Allele (Mikrovarianten eingeschlossen) gewährleisten zu können, ist es sinnvoll auf Allelleitern zurückzugreifen. Die Allelleiter gewährleistet eine Allelzuordnung anhand der in einem Produkt enthaltenen Repeatenheiten und nicht anhand einer durch eine Software gemessenen Produktgröße. Durch Kombination genomischer DNA oder markerspezifischer PCR-Produkte von unterschiedlichen Individuen einer Population und deren Re-Amplifikation werden die verschiedenen Allele, die repräsentativ für den jeweiligen STR-Marker sind, vereint [77,78]. Hierzu sollten die am häufigsten vorkommenden Allele verwendet werden und diese im Idealfall in einen Abstand von 4 bp aufeinander folgen (unter Verwendung von Tetranukleotid-Repeatmotiven) [79]. Häufig vertretene Mikrovarianten können und sollten für die Allelleiter berücksichtigt werden, wobei hierdurch der Abstand zwischen den Allelen variiert; z. B. beträgt der Abstand zwischen den Allelen je nach Mikrovariante (.1-, .2- oder .3) eine bis drei Basen zueinander [74]. Aufgrund ihrer Struktur kommen die Mikrovarianten zwischen den vollständigen Allelen in der Allelleiter zum liegen und werden deshalb auch als Zwischenallele bezeichnet.

Die Signalstärken der kombinierten PCR-Produkte sollten entsprechend angeglichen werden, sodass bei einer späteren Vervielfältigung der Allelleiter alle Produkte reamplifiziert und in gleichem Maße erhalten bleiben. Ein zusätzlich wichtiger Punkt ist, dass alle in der Leiter enthaltenen Allele sequenziert und ihre Repeatstruktur bekannt ist. Etwaigen Differenzen in der Allelbezeichnung wird dadurch entgegengewirkt. Die Allelleiter kann in dieser Form als Referenz für den Datenaustausch zwischen verschiedenen Institutionen angesehen werden. Hierbei muss immer ein Austausch der Allelleitern erfolgen bzw. ein Abgleich der enthaltenen Allele und deren Bezeichnungen stattfinden, falls unterschiedliche Leitern verwendet werden.

Auch bei abweichenden Laborausstattungen und unter Verwendung von unterschiedlichen Geräten zur Größenbestimmung werden durch die Zuhilfenahme von Allelleitern für jeden STR-Marker zuverlässige und vor allem identische Ergebnisse gewährleistet. Des Weiteren wird empfohlen bei jedem Lauf eine Kontroll-DNA mitzuführen [75]. Zu weiteren Standards bei der PCR zählen das Mitführen einer Extraktions- und Wasserkontrolle, um den PCR-Erfolg dokumentieren zu können.

1.8 Artefakte bei der STR-Analyse

Während der Amplifikation von STR-Markern können sowohl technisch als auch biologisch bedingte Artefakte auftreten, die eine Interpretation der Ergebnisse (anhand von Elektropherogrammen) erschweren. Im weiteren Verlauf sollen einige Artefakte beschrieben und deren Entstehung erläutert werden.

1.8.1 Stotterprodukte

Die Elektropherogramme von STR-Markern können neben den Produktpeaks der sog. Hauptallele auch in ihrer Intensität schwächere Peaks aufweisen. Diese sind meist um eine oder mehrere Repeateinheiten kürzer oder länger als das dazugehörige Hauptallel und werden als Stotterprodukte bezeichnet [41]. Stotterprodukte sind die am häufigsten vertretenen Zusatzprodukte in einem Elektropherogramm und entstehen, wie bereits in Abschnitt 1.6 beschrieben, durch eine Strangverschiebung während der Replikation [63,64,80]. Findet während dieses Prozesses die Deletion einer Tetranukleotid-Repeateinheit statt, spricht man in diesem Zusammenhang von einem (n-4)-Stotterprodukt. Die Insertion einer solchen Repeateinheit bedingt hingegen ein (n+4)-Stotterprodukt (Abb. 4). Diese treten im Vergleich zu (n-4)-Stotterprodukten jedoch weitaus seltener in Erscheinung.

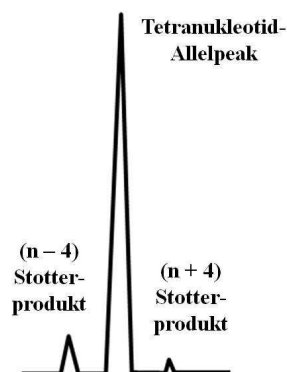


Abb. 4: Auftretende Stotterprodukte am Beispiel eines Tetranukleotid-Repeatmarkers

Amplifikate, die mit einer Länge von einer Repeateinheit vor dem Hauptallel-Peak liegen, werden als (n-4)-Stotterprodukte bezeichnet. Liegen diese um eine Repeateinheit hinter dem Hauptallel-Peak handelt es sich um (n+4)-Stotterprodukte.

(Bildquelle: verändert [41])

Für die Erstellung von STR-Profilen werden Tetranucleotid-Repeatmarker bevorzugt (siehe auch Abschnitt 1.6). Die Peakintensität der Stotterprodukte dieser Marker liegt i. d. R. unter 15 % des Hauptallelpeaks, dessen Intensität mit 100 % bewertet wird [41].

Die Entstehung von Stotterprodukten steht im direkten Zusammenhang mit der Repeatstruktur. Je kürzer sich die Repeateinheiten darstellen, desto anfälliger sind diese für eine Strangverschiebung während der Replikation oder Amplifikation. Gerade bei Di- und Trinukleotid-Repeats führt dies zu Stotterprodukten mit Intensitäten $\geq 30\%$ gegenüber dem Hauptallepeak. Dadurch wird die Interpretation von Mischspuren mit solchen Markern erheblich erschwert, da diese Stotterprodukte zu dem Hauptprofil eine Nebenkompente vortäuschen können [81]. Auch die Interpretation von Markern, die heterozygote Produkte mit nur einer Repeateinheit Unterschied amplifizieren, kann bei den kurzen Repeateinheiten problematisch sein. Da das Stotterprodukt des größeren Produktes im Größenbereich des kleineren liegt, addieren sich deren Intensitäten, sodass das Signal des kleineren Produktes im Elektropherogramm überhöht dargestellt wird.

Des Weiteren beeinflusst die Anzahl, der sich tandemartig wiederholenden Einheiten die Entstehung von Stotterprodukten. Je mehr Repeateinheiten aufeinander folgen, desto wahrscheinlicher wird eine Strangverschiebung.

1.8.2 Non-Template Adenylierung und DNA-Überschuss

Einige *Taq*-DNA-Polymerasen hängen während der Amplifikation nach der Verlängerung des PCR-Produktes eine zusätzliche Base, meist ein Adenosin, an dessen 3'-Ende an [82]. So auch die in dieser Arbeit verwendete AmpliTaq Gold[®]-Polymerase (Applied Biosystems[®]). Die Adenylierung findet ohne Vorlage eines zu amplifizierenden Produktes statt, wodurch die PCR-Produkte um 1 bp länger als das Ausgangsprodukt sind.

Der Vorgang der Adenylierung kann sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden. Wird zu viel DNA in die PCR eingesetzt, entstehen sog. Split-Peaks (-A/+A-Peaks), da die Adenylierung aufgrund des Produktüberschusses nicht vollständig erfolgen kann [24]. Im Extremfall können Verunreinigungen auch dazu führen, dass nur der entsprechende (-A)-Peak einer Spur amplifiziert wird und daraus Fehlinterpretationen entstehen.

Diese Splitpeaks können auch aufgrund der Basenpaarzusammensetzung der verwendeten Primer zustande kommen. Durch Modifikation der Primerenden, z. B. durch Hinzufügen der Basen (GTTT) oder (AG) am 5'-Ende des unmarkierten Primers, kann die Entstehung dieser Produkte unter Umständen vermieden werden [83].

Eine zu hohe DNA-Konzentration in der PCR kann neben Split-Peaks auch Produkte mit einer sehr hohen Intensität hervorrufen, die außerhalb der zu erfassenden Skala liegen. Die sog. „off-scale“-Peaks werden im Elektropherogramm nach oben hin flach abgerundet

dargestellt. Diese können auch zu Fehlinterpretationen führen, da sich die amplifizierten Produkte breiter darstellen und somit aus der bekannten Größenordnung fallen können.

Beispiele für Split- und „off-scale“-Peaks finden sich in der Abb. 5.

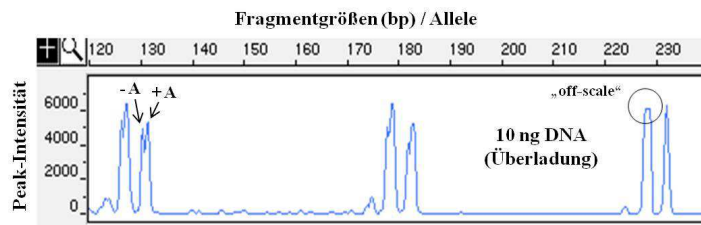


Abb. 5: Adenylierung und „off-scale“-Peaks

Auf der linken Seite sind Split-Peaks, d.h. Produktpeaks mit (+A) und ohne (-A) Adenylierung dargestellt. Auf der rechten Seite befindet sich ein „off-scale“-Peak, der sich infolge einer zu hohen DNA-Menge in der PCR flach abgerundet darstellt (siehe Kreis). Die Produktpeaks mittig repräsentieren beide Artefaktbildungen.

(Bildquelle: verändert [41])

Das Verwenden von geeigneten Mengen an DNA für die PCR kann solche Produktpeaks verhindern. Ebenso begünstigt meist eine Verlängerung der finalen Extension des PCR-Programms die Adenylierung von amplifizierten Produkten, falls nicht, wie oben beschrieben, einer der Primer die Ursache für die Entstehung der Split-Peaks darstellt [24,82].

1.8.3 Peak-Imbalance und Allel-Dropout

Weitere biologisch als auch technisch bedingte Artefakte, können die Interpretation von Produktpeaks in Elektropherogrammen erschweren.

Hierzu zählt u. a. die Peak-Imbalance. Von balancierten Allelen spricht man, wenn an einem Genort die heterozygoten Allele homologer Chromosomen während der PCR in gleichem Umfang amplifiziert werden und sich somit im Elektropherogramm mit nahezu identischen Peakhöhen darstellen. Die auf dem Markt zur Verfügung stehenden Typisierungskits sind i. d. R. so entwickelt, dass eine Imbalance nicht auftritt.

Jedoch kann eine Mutation in der Primerbindestelle bei einigen Individuen dazu führen, dass der Primer nicht vollständig an die Sequenz bindet und so die Effizienz der Amplifikation des Produktes herabgesetzt wird. Daraus ergibt sich im Elektropherogramm ein Ungleichgewicht der Peakhöhen der heterozygoten Allele zueinander (Abb. 6).

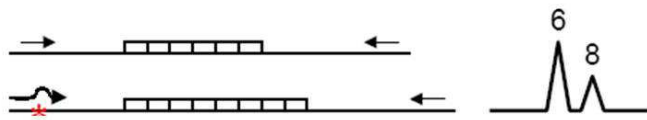


Abb. 6: Entstehung einer Peak-Imbalance

Der obere Genbereich wird korrekt amplifiziert (Allel 6). Der untere Genbereich des homologen Chromosoms trägt eine Mutation in der Primerbindestelle (*), sodass das Allel 8 nicht in demselben Umfang amplifiziert werden kann.

(Bildquelle: verändert [41])

Gerade die an den Tatorten gesicherten Spuren, aber auch Haare, weisen meist eine stark degradierte DNA auf. Je nach den gegebenen Bedingungen (z. B. längeres Aussetzen von Hitze oder Umweltbedingungen (UV-Strahlen/Sonneneinstrahlung, Witterung)) kann diese ohnehin schon geschädigte DNA in noch kleinere Stücke fragmentiert werden.

Die Verwendung solcher DNA kann ebenfalls zu einer Imbalance zwischen heterozygoten Allen führen, wenn ein Allel präferenziell amplifiziert wird [84]. Aufgrund der meist kurzen Fragmentgrößen, handelt es sich hierbei überwiegend um das von der Größe her kleinere Allel.

Ein weiterer stochastischer Effekt, der durch eine zu geringe DNA-Konzentration (< 100 pg) begünstigt wird, macht sich durch einen Allel-Dropout bemerkbar. Bei einem Allel-Dropout wird eines der Allele an einem heterozygoten Genort aufgrund der fehlenden Amplifikation im Elektropherogramm nicht dargestellt und es entsteht der Eindruck einer „falschen Homozygotie“ [85].

Studien haben gezeigt, dass STR-Marker mit Produktgrößen > 250 bp unzulängliche Ergebnisse zeigen und verstärkt zu Dropout-Erscheinungen neigen [86]. Sowohl die Reduktion der amplifizierten Produktgrößen durch das Versetzen der Primer näher oder direkt an die Repeatstruktur („Mini-STRs“) [87,88,89,90,91] als auch die Erhöhung der Zyklenanzahl während der PCR kann einem Allel-Dropout entgegenwirken und so die Amplifikation beider Allele begünstigen [92,93].

Jedoch zeigte sich auch, dass die Erhöhung der Zyklenanzahl über 34 Zyklen (unter Verwendung von DNA mit einer Konzentration < 100 pg) die Bildung von Stotterprodukten, die bevorzugte Amplifikation eines Allels und somit die Peak-Imbalance begünstigt [94].

Des Weiteren kann ein Allel-Dropout durch eine Mutation am oder nahe des 3'-Endes der Primerbindestelle verursacht werden, die bedingt, dass der Primer nicht mit dem zu amplifizierenden Strang hybridisieren kann und zu einem sog. „Null-Allel“ führt.

Ist ein Dropout durch eine Mutation verursacht, kann die Amplifikation des betroffenen Allels nur durch einen Primer erfolgen, der an eine Stelle in der Sequenz bindet, die keine Mutation aufweist.

1.9 Multiplex-PCR-Analyse

Für die Erstellung eines DNA-Profiles mit einer hohen Diskriminierungsrate, ist die Untersuchung von mehr als einem STR-Markernsystem nötig. Diese Systeme werden nicht alle einzeln, sondern gemeinsam in einem Multiplex-Ansatz amplifiziert. Entsprechende Kits können im Handel erworben werden oder werden entsprechend den eigenen Bedingungen zusammengestellt [95]. Multiplex-PCRs bieten gegenüber Einzelsystem-PCRs neben einer enormen Zeitersparnis einen weitaus wichtigeren Vorteil. Es wird wesentlich weniger DNA für die Untersuchung benötigt. Dies spielt gerade im Bereich der Minimalspuren eine große Rolle. Meist sind nach der DNA-Isolierung nur geringe Mengen und kleinste Volumina an DNA vorhanden, die lediglich für eine geringe Anzahl von PCR-Reaktionen ausreichen.

Die gleichzeitige Amplifikation mehrerer STR-Markernsysteme löst dieses Problem, bedingt aber die Kompatibilität der verwendeten Primerpaare pro System untereinander. Hierbei müssen mehrere Parameter berücksichtigt werden (z. B. Verhinderung der Bildung von Primer-Dimeren, vergleichbare Annealingtemperaturen der Primer oder die gleichstarke Sensitivität der Markernsysteme untereinander) [24,96].

Die parallele Analyse von mehreren Markernsystemen kann zum einen mit Multiplexen nach Fragmentgröße und zum anderen mit Multiplexen nach Farbe erfolgen.

Die meisten Multiplexe enthalten eine Kombination dieser beiden Varianten. Markernsysteme mit definierten Größenbereichen, die weit genug auseinander liegen, erhalten denselben Farbstoff für eine Fluoreszenzmarkierung, während sich überlappende Markernsysteme mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert werden. Mit den gängigen Elektrophoresesystemen ist der Einsatz von 4 bis max. 5 unterschiedlichen Farbstoffen in einem Analysengang möglich.

1.10 Mitochondriale DNA - Ein alternativer Untersuchungsansatz

Im Jahr 1996 wurde das mitochondriale Genom der Hauskatze (*F. s. catus*) von Lopez et al. [97] vollständig sequenziert. Der Aufbau entspricht im Allgemeinen dem bisher untersuchten mitochondrialen Genom der Säugetiere (Mammalia).

Das ringförmige mtDNA-Genom der Hauskatze setzt sich aus insgesamt 17.009 bp zusammen und beinhaltet 13 proteincodierende Gene (13 open reading frames (ORF's)), 22 tRNA-Gene, die große und kleine Untereinheit der rRNA-Gene und eine regulatorische Region, die Kontroll-Region (auch als D-Loop bezeichnet) (Abb. 7).

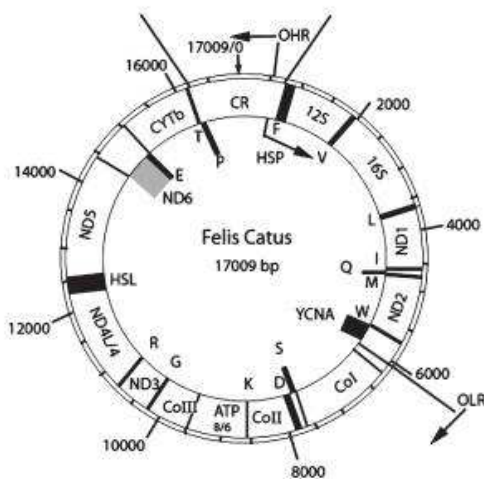


Abb. 7: Schematische Darstellung der mtDNA von *F. s. catus*

Die Karte des mtDNA-Genoms von *F. s. catus* zeigt die Lage der kodierenden Gene und tRNA-Gene (grau schattierte Box). Der innere Kreis spiegelt den L-Strang (L; light) wider, während der äußere Ring den H-Strang (H; heavy) kennzeichnet.

OHR origin of heavy-strand replication

OLR origin of light-strand replication

(Bildquelle: [121])

Die nicht-kodierende Kontrollregion (CR; control region) ist aufgrund ihrer auftretenden Sequenzunterschiede und Längenvariationen eine besonders geeignete Region um die Variabilität innerhalb einer Spezies zu untersuchen [98]. Die relative Größe der Kontrollregion beträgt insgesamt 1559 bp und ist damit um 447 bp länger als die D-Loop-Region des Menschen. Allgemein ist die Kontrollregion von *F. s. catus* um einige Nukleotide länger als die der anderen Carnivoren. Diese Größenvarianz ist auf zwei an den gegenüberliegenden Enden der Kontrollregion gelegene repetitive Elemente (RS2 und RS3) zurückzuführen [97].

Der RS3-Repeat befindet sich am 3'-Ende des L-Stranges (L; light) und ist reich an den Basen (C) und (A). Die insgesamt ca. 294 bp große Sequenz setzt sich aus einem 6 - 8 bp langen Hauptrepeat (*ACACACGT*) zusammen, der bis zu 37-fach imperfekt wiederholt wird [97].

Im Gegenzug ist der RS2-Repeat am 5'-Ende des L-Stranges gelegen und besteht aus drei 80 - 82 bp langen Repeateinheiten. Diese sind untereinander hoch konserviert und besitzen eine Ähnlichkeit von 91 - 98 %. Durch mehrere palindromische Motive innerhalb der Sequenz können Sekundärstrukturen ausgebildet werden, die potentiell eine terminierende Funktion bei der D-Loop-Replikation ausüben können [98,99,100]. Die RS2-Region ist hoch variabel, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass Heteroplasmien innerhalb eines Individuums und ebenso in anderen Felidae-Spezies auftreten können, begünstigt wird [97].

Eine Heteroplasmie beschreibt u. a. den Zustand des Vorhandenseins von mtDNA-Molekülen mit Sequenzunterschieden in ein und demselben Individuum. Die Ausprägung von Heteroplasmien gestaltet sich vielfältig [24]. Weisen zum einen verschiedene Gewebe oder Haare eines Individuums unterschiedliche mtDNA-Sequenzen auf, können diese auch durchaus innerhalb eines Gewebes oder eines Haares vorhanden sein [101,102,103]. Meist häufen sich Heteroplasmien an bestimmten Stellen im mtDNA-Genom und bieten nicht nur Nachteile. Der Vergleich von Proben mit identischen Heteroplasmien kann die Beweiskraft einer Aussage zusätzlich stärken [104].

In vielen eukaryotischen Genomen wurden zudem Pseudogene der Kern-DNA, sog. *Numts* (Nuclear Mitochondrial sequences) identifiziert [24,105,106]. Hierbei handelt es sich um mtDNA-Sequenzabschnitte, die durch Transposition in die genomische DNA integriert wurden. So auch bei *F. s. catus*: ein 7.946 bp langer Bereich der mtDNA (Teile des RS3-Repeats als auch des angrenzenden COII-Gens umfassend) findet sich als homologer, sich tandemartig wiederholender Bereich mit 38 - 76 Kopien auf dem Chromosom D2 wieder [97,107]. Die Amplifikation solcher Bereiche kann neben einer präferentiellen Vervielfältigung der Sequenzabschnitte der Kern-DNA zu Sequenzüberlagerungen führen, die bei der Auswertung der mtDNA-Sequenzen eine Interpretation zusätzlich erschweren [108].

1.10.1 Mitochondriale DNA und Kern-DNA im Vergleich

Von den Nachteilen, die sich bei der Untersuchung der mtDNA im forensischen Kontext ergeben, wiegen folgende Punkte am schwersten [30,109,110]:

- die rein maternale Vererbung und somit die fehlende Unterscheidung zwischen Individuen aus derselben mütterlichen Linie
- das Auftreten von Heteroplasmien im mtDNA-Genom
- die wesentlich niedrigere Diskriminierungsrate im Vergleich zu STR-Profilen
- fehlender Abgleich mit nationalen und internationalen Datenbanken

Doch auch die Verwendung von Kern-DNA und damit die STR-Analyse unterliegen limitierenden Faktoren. Hier zeigt die mtDNA ihren Vorteil, der vor allem in der hohen Kopienzahl der Moleküle pro Zelle liegt [21,26,111]. Gerade die Verwendung des Spurenmaterials Haar und damit der Einsatz von degradiertem und limitierter Kern-DNA birgt mehrere Hürden, die selbst mit den verkürzten „Mini-STRs“ oder Multiplex-Analysen in nur einem geringen Umfang bzw. nicht überwunden werden können. Ein Großteil der Haare, die an Tatorten gefunden werden, besitzt telogene Wurzeln oder besteht nur noch aus dem Haarschaft (keine Wurzel vorhanden) [112]. Hier kann die mtDNA nicht nur allein aufgrund ihrer hohen Kopienzahl, sondern auch aufgrund ihrer daraus resultierenden höheren Sensitivität gegenüber der Kern-DNA entscheidende Ergebnisse liefern [113].

Die an die Kontrollregion angrenzenden Bereiche des Cytochrom b-Gens, der Cytochromoxidase- (I - III) und der 12S- und 16S-rRNA-Gene werden häufig für eine Speziesidentifizierung verwendet [114,115,116,117,118]. Wichtig ist hierbei, dass diese Bereiche Variationen zwischen unterschiedlichen Spezies aufweisen und gleichzeitig innerhalb einer Spezies konserviert vorliegen [119,120].

Einen anderen Ansatz verfolgt die Haplotypisierung von Individuen. Hier sind Variationen innerhalb einer Spezies erwünscht. Hypervariable und nicht-kodierende Bereiche der Kontrollregion werden u. a. dazu genutzt, um in forensischen Fragestellungen eine Zuordnung einzelner Individuen gewährleisten zu können [121,122]. Da sich die Individuen einer Spezies aufgrund der maternalen Vererbung jedoch nur in Haplotypen und diese wiederum in Unterhaplotypen klassifizieren lassen, kann mittels der mtDNA-Untersuchung nicht wie bei der STR-Analyse eine eindeutige Individualisierung stattfinden. Vielmehr findet die zu treffende Aussage darüber, ob eine untersuchte Probe einem Vergleichsmaterial zugeordnet werden kann oder nicht, über die Berechnung einer sog. Ausschlusswahrscheinlichkeit statt.

Erkenntnisse hierzu wurden von mehreren Wissenschaftlern u. a. für die Hunde (Canidae) evaluiert, die gerade auch im forensischen Bereich ihre Anwendung fanden [123,124] und in der Fallarbeit eingesetzt wurden [125].

Im Jahr 2013 wurden in England erstmals Katzenhaare und deren mitochondriales Profil in einem Tötungsdelikt als Beweismittel herangezogen. Die Haare konnten auf der Leiche eines Mannes sichergestellt werden. Schnell fand sich ein Tatverdächtiger, der im Besitz einer Katze namens „Tinker“ war. Die mtDNA sowohl der Katze als auch der am Tatort gefundenen Haare wurde untersucht und mit einer für England erstellten Datenbank (auf Basis von 152 Katzen aus England) abgeglichen. Zum einen stimmte der ermittelte Haplotyp der Katzenhaare mit dem der Katze „Tinker“ überein und zum anderen passte dieser Haplotyp zu einem eher seltenen Haplotypen der Datenbank, der für drei weitere Individuen beschrieben wurde. Aufgrund der Tatsache, dass es sich hier um einen eher „seltenen“ Haplotypen in England handelte und die Haplotypen von „Tinker“ und den sichergestellten Katzenhaaren übereinstimmten, wurde es als bewiesen angesehen, dass die Katzenhaare mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Katze des Tatverdächtigen stammten. Weitere Beweise, wie Blutspuren und DNA-Nachweise, erhärteten den Verdacht auf eine Täterschaft, sodass der Tatverdächtige des Totschlags für schuldig befunden wurde [126,127].

Dieser Fall sowie der Fall „Snowball“ zeigen eindrucksvoll, dass die Untersuchung tierischer Spuren, sei es auf Ebene der genomischen als auch der mitochondrialen DNA wichtige Hinweise für die Aufklärung liefern können. Besonders in Fällen, wo keine menschliche DNA angetragen oder diese als berechtigt und somit nicht als tatrelevant eingestuft wurde, können diese Spuren oft noch entscheidende Ergebnisse liefern und maßgeblich zu der Verurteilung eines Straftäters beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Eingesetztes Material und verwendete Software

2.1.1 Probenmaterial

Für die DNA-Extraktion wurde überwiegend Probenmaterial verwendet, das sich aus Blut-, Gewebe-, Haar- oder Speichelproben zusammensetzte. Diese Proben wurden zu einem großen Teil von Katzenhaltern freiwillig zur Verfügung gestellt. Die Probensammlung erfolgte hierbei selbstständig durch die Besitzer. Von diesen wurde eine Speichel- als auch Haarprobe pro Tier und falls vorhanden eine fotografische Dokumentation des Farbverlaufs des Fells der Tiere übergeben. Des Weiteren erfolgten Angaben über das Geschlecht, das Alter und die Rassenbezeichnung des Tieres.

Durch Herrn Dr. Hecht des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen wurden unterschiedliche Gewebe ein und derselben Katze (Herz, Hirn, Leber, Lunge, Niere, Milz, Muskelgewebe und Zunge) als auch weitere bereits extrahierte und aliquotierte DNA-Proben von Haus-/Wildkatzen und Zellkulturen der Hauskatze zur Verfügung gestellt.

Weitere Hauskatzenproben wurden von dem Tierheim in Wiesbaden erhalten. Diese Proben waren bereits im Jahr 2010 im Rahmen der Diplomarbeit „Etablierung einer Multiplex-PCR zur Unterscheidung verschiedener Tierarten“ [128] als Speichelproben bezogen worden und lagen als extrahierte DNA vor. Des Weiteren wurde DNA aus Speichel- und Gewebeproben eingesetzt, die von Privatpersonen im Zeitraum der genannten Diplomarbeit bezogen wurden. Die Auskunft über die Rassenzugehörigkeit als auch das Alter und das Geschlecht der Tiere lag in fast allen Fällen vollständig vor.

Für die Untersuchung der Artspezifität der verwendeten STR-Markersysteme wurde neben der DNA aus Speichel- und Haarproben von Katzenartigen, die aus den Zoos in Frankfurt und in Kronberg im Taunus bezogen wurden, auch weitere bereits extrahierte DNA-Proben aus der DNA-Sammlung des BKA Wiesbaden eingesetzt. Die Bezugsquellen sind je nach Tierart unterschiedlich. In Tabelle 1 sind die für die Artspezifität eingesetzten Proben aufgelistet.

Tabelle 1: Spezies der Klasse Mammalia (Säugetiere)/Überordnung: Eutheria (höhere Plazentatiere), die für den Artspezifitätstest zum Einsatz kamen.

Ordnung	Familie	Gattung	Art
Artiodactyla (Paarhufer)	Bovidae (Hornträger)	<i>Ovis</i>	<i>Ovis aries</i> - Hausschaf
			<i>Ovis orientalis orientalis</i> - Mufflon
		<i>Capra</i>	<i>Capra hircus</i> - Hausziege
	Suidae (Echte Schweine)	<i>Sus</i>	<i>Sus scrofa domestica</i> - Hausschwein
Perissodactyla (Unpaarhufer)	Equidae (Pferde)	<i>Equus</i>	<i>Equus caballus</i> - Hauspferd
Lagomorpha (Hasenartige)	Leporidae (Hasen)	<i>Oryctolagus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> - Wildkaninchen
Rodentia (Nagetiere)	Caviidae (Meerschweinchen)	<i>Cavia</i>	<i>Cavia porcellus</i> - Meerschweinchen
Carnivora (Raubtiere)	Ursidae (Bären)	<i>Ursus</i>	<i>Ursus arctos</i> - Braunbär
	Mustelidae (Marder)	<i>Martes</i>	<i>Martes martes</i> - Baummarter
		<i>Melinae</i>	<i>Meles meles</i> - Europäischer Dachs
	Canidae (Hunde)	<i>Vulpini</i>	<i>Vulpes vulpes</i> - Rotfuchs
		<i>Nyctereutes</i>	<i>Nyctereutes procyonoides</i> - Marderhund
		<i>Canis</i>	<i>Canis mesomelas</i> - Schabrackenschakal
			<i>Canis lupus familiaris</i> - Haushund
	Felidae (Katzen)	<i>Panthera</i>	<i>Panthera leo</i> - Löwe
		<i>Lynx</i>	<i>Lynx lynx</i> - Eurasischer Luchs
		<i>Prionailurus</i>	<i>Prionailurus rubiginosus phillipsi</i> - Rostkatze
<i>Felis</i>		<i>Felis silvestris silvestris</i> - Europäische Wildkatze	
Primates (Primaten)	Hominidae (Menschenaffen)	<i>Homo</i>	<i>Homo sapiens</i> - Mensch

Die in der Populationdatenbank enthaltenen Merkmalskombinationen von 340 Hauskatzen stammen alle von unverwandten Tieren. Daten von Geschwistertieren sowie Elternteilen oder Nachkommen wurden in einer separaten Liste aufgenommen und für spezielle Fragestellungen aufbewahrt.

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Katzen- und Wildkatzenproben sowie weitere Angaben über deren DNA-Konzentration, die verwendete Extraktionsmethode (falls bekannt) und Bezugsquelle findet sich in den Populationsdatenbanken der Haus- und Wildkatzen im elektronischen Anhang (Ordner 1 und 2).

MATERIAL UND METHODEN

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Die im Rahmen der durchgeführten Doktorarbeit verwendeten Hilfsmaterialien bzgl. der DNA-Extraktion, der DNA-Quantifizierung, der PCR, der Aufreinigung von PCR- und Sequenzierprodukten sowie der Trennung von heterozygoten PCR-Produkten sind in der nachfolgenden Tabelle 2 vermerkt.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial, welches für die Durchführungen von DNA-Extraktion, DNA-Quantifizierung, PCR, Aufreinigung von PCR- als auch Sequenzierprodukten und Trennung heterozygoter PCR-Produkte eingesetzt wurde

Material	Typbezeichnung	Hersteller/Firma
sterile Wattetupfer	4021006	Heinz Herenz GmbH
sterile Skalpellklingen	Sterile Surgical Blade 28	C. Bruno Bayha® GmbH
Microcon® Centrifugal Filter Devices	Ultracel YM-30	EMD Millipore Corporation
DNA IQ™ Spin Basket	V1221	Promega GmbH
Einmalküvetten	Standard, 3,5 ml	Bio-Rad Laboratories
Spreadex® Mini-Gele	EL 600 EL 1200	Elchrom Scientific AG
BandPick™	k.A.	Elchrom Scientific AG
Centri•Sep Spin Columns	k.A.	Princeton Separations, Inc.
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG
PCR-Reaktionsgefäße	PCR Soft Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH
PCR-Reaktionsgefäßplatte	Thermo-Fast® 96, Semi Skirted	Thermo Fisher Scientific Inc.
PCR-Reaktionsgefäßplatte	96-Well	Biozym Scientific GmbH
PCR-Gefäßhalterung	MicroAmp™ 24 & 96 Well Tray/Retainer Set	Applied Biosystems®
Verschlusskappen	Flat Cap Stripes, 8 & 12	Thermo Fisher Scientific Inc.
Verschlusskappen	MicroAmp™ 8 & 12 Cap Strip	Applied Biosystems®
Falcon-Röhrchen	Nunc™ 15 ml	Thermo Fisher Scientific Inc.
Falcon-Röhrchen	Nunc™ 50 ml	Thermo Fisher Scientific Inc.
Rundfilter	weiß und schwarz Ø 90 mm / 70 mm	Schleicher & Schüll

k.A. = keine Angabe seitens des Herstellers

2.1.3 Kits

Folgende Kits fanden ihre Anwendung für die DNA-Extraktion (manuell/automatisch), DNA-Quantifizierung, PCR-Aufreinigung und Sequenzierung (Tabelle 3):

Tabelle 3: Für unterschiedliche Methodenanwendungen eingesetzte Kits

Kit	Hersteller/Firma
QIAamp [®] DNA Mini Kit (250)	Qiagen GmbH
nexttec [™] 1 ^{-step} DNA Isolation Kit for Tissue & Cells + Zusatzprotokoll "Hair"	nexttec [™] Biotechnologie GmbH
innuPREP Forensic DNA Kit-IP-C16	Analytik Jena AG
DNA IQ [™] Casework Pro Kit	Promega GmbH
Maxwell [®] 16 LEV Blood DNA Kit	Promega GmbH
Thermo Scientific KingFisher Cell and Tissue DNA	Thermo Fisher Scientific Inc.
InviMag [®] Tissue DNA Mini Kit/KF96	STRATEC Biomedical AG
Crime Prep Adem-Kit	Ademtech
EZ1 [®] QIAamp DNA Investigator Kit (48)	Qiagen GmbH
Quant-iT [™] PicoGreen [®] dsDNA Assay Kit	Invitrogen [™]
AmpliTaq Gold [®] with Gene Amp [®]	Applied Biosystems [®]
illustra [™] ExoStar 1-Step	GE Healthcare
Big Dye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems [®]

2.1.4 Chemikalien und Lösungen

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungen sind der Tabelle 4, den verwendeten Methoden entsprechend geordnet, zu entnehmen.

Die Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit sterilem pyrogenfreien Ampuwa-H₂O (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) angesetzt.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Lösungen - nach Methoden geordnet

Material	Zusammensetzung	Hersteller/Firma
<i>DNA-Extraktion:</i>		
10x TNCa-Puffer	100 mM Tris 1000 mM NaCl 10 mM CaCl ₂	selbst hergestellt
10x TNE-Puffer	100 mM Tris 1000 mM NaCl 100 mM EDTA	selbst hergestellt

MATERIAL UND METHODEN

Material	Zusammensetzung	Hersteller/Firma
Lysepuffer	1x TNCa 2 % SDS 39 mM DTT 250 µg/ml Proteinase K	selbst hergestellt
Tris	pH 8,0 / 1M	AppliChem GmbH
NaCl	5M	AppliChem GmbH
CaCl ₂	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Merck
EDTA-Lösung	pH 8,0 / 0,5 M	AppliChem GmbH
Proteinase K	10 mg/ml	AppliChem GmbH
DTT	1 M / ml 10 mM NaAcetat	AppliChem GmbH
Na-Acetat	pH 5,2 / 3 M	Fluka TM
SDS	10 %	AppliChem GmbH
Phenol /Wasser/Chloroform	k.A.	Applied Biosystems [®]
Isopropanol	100 %	AppliChem GmbH
EtOH	≥ 99,8 %	AppliChem GmbH
Ampuwa-H ₂ O	Spüllösung	Fresenius Kabi Dtl. GmbH
<i>Produktaufreinigung und -trennung mittels Spreadex[®] EL Mini-Gelen:</i>		
TAE-Puffer	40x / 1,2 M	Elchrom Scientific AG
Destaining Solution (DST)	100x	Elchrom Scientific AG
HyperLadder V	10.000x	Bioline GmbH
Ladepuffer	5x 1 Dye BDB	Elchrom Scientific AG
Sybr [®] Gold	10.000x	Invitrogen TM
<i>Kapillarelektrophorese und Sequenzierung (ausgenommen der Standards):</i>		
Hi-Di TM Formamide	100 %	Applied Biosystems [®]
GeneScan [®] Size Standard	400HD [ROX]	Applied Biosystems [®]
GeneScan TM Size Standard	500 LIZ TM	Applied Biosystems [®]
GeneScan TM Size Standard	1200 LIZ [®]	Applied Biosystems [®]
3730 Buffer mit EDTA	10x	Applied Biosystems [®]
310 Polymer	POP-4 TM	Applied Biosystems [®]
3130 Polymer	POP-4 TM	Applied Biosystems [®]

k.A. = keine Angabe seitens des Herstellers

2.1.5 Geräte

Die für die Laborarbeiten verwendeten Geräte sind in der nachfolgenden Tabelle 5 vermerkt.

Tabelle 5: Im Laborbereich verwendete Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller/Firma
Sicherheitswerkbank	UVF 4.06 Z	BDK - Luft- und Reinraumtechnik GmbH
PCR-Arbeitskabine	PCR Chamber	BÄRO Technology
Vortexer	REAX control	Heidolph
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Kleinstzentrifuge mit Vortexfunktion	CM-70M	neoLab®
Kleinstzentrifuge mit Vortexfunktion	Sky Line - CM70M.09	ELMI
Kleinstzentrifuge mit Vortexfunktion	Combi-Spin FVL-2400	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Tischzentrifuge	5424	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	5415C	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	2-16	SIGMA Laborzentrifugen GmbH
Vakuumpumpe	Speed Vac® SPD D111V	Savant
Membran-Vakuumpumpe	MZ 2C	Vacuubrand GmbH + Co KG
Rotationsschüttler	Intelli-Mixer	neoLab®
Schüttler	3016	GFL mbH
beheizbarer Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Thermoblock	Metallblock-Thermostat	Liebisch GmbH & Co. KG
Elektroforese-Apparatur	SEA 2000®	Elchrom Scientific AG
Thermostat	Multi Temp II	Pharmacia Biotech
Transilluminator	Dark Reader™ DR-88M	MoBiTec GmbH
Dunkelhaube	RH-2.1	Herolab GmbH
Kamera	CoolPix 990	Nikon
Fluorometer	VersaFluor™	Bio-Rad Laboratories
Extraktionsroboter	InnuPure® C16	Analytik Jena AG
Extraktionsroboter	Maxwell® 16	Promega GmbH
Extraktionsroboter	King Fisher™ Duo	Thermo Fisher Scientific Inc.
Extraktionsroboter	EZ1 Advanced	Qiagen GmbH
Thermocycler	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems®

MATERIAL UND METHODEN

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller/Firma
Thermocycler	GeneAmp® PCR System 2400	Applied Biosystems®
Thermocycler	Genius	Techne
Kapillarelektrophorese	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems®
Kapillarelektrophorese	ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems®
Wasserbad	AUQAline AL 5	LAUDA
Binokular	MZ16	Leica
Lichtquelle	KL1500 LCD	Leica

2.1.6 Software und Datenbanken

Die in den Tabellen 6 und 7 enthaltene Software als auch die webbasierten Programme fanden in dieser Arbeit u. a. Anwendung bei der Analyse von Rohdaten, deren Aufarbeitung sowie der Untersuchung sequenzbezogener Abschnitte, z. B. für die Erstellung von Oligonukleotid-Primern.

Tabelle 6: Installierte Software und verwendete Programme

Software/Programme	Anbieter
GeneScan® 3.7.1	Applied Biosystems®
GeneMarker® HID V1.95	Soft Genetics
Sequencing Analysis v5.4	Applied Biosystems®
Sequencher™ 5.0	Gene Codes Corporation
analySIS docu 5.0	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
Cervus 3.0.6	Download von der Internetseite: http://www.fieldgenetics.com/pages/login.jsp

Tabelle 7: Im Internet vorhandene Datenbanken und Anwendungsprogramme

Bezeichnung	Internetadresse
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Primer3Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/
Oligo Analyzer	http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
Oligo Calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html
DNA Sequence Reverse and Complement Online Tool	http://www.cellbiol.com/scripts/complement/dna_sequence_reverse_complement.php
ElQuant TM Software	http://www.elchrom.com/index.php?id=elquantsoftware
MEGA 5	http://www.megasoftware.net/

2.2 Methoden zur DNA-Isolierung

2.2.1 DNA-Extraktion aus Mundschleimhautzellen und Geweben mittels des QIAamp[®] DNA Mini Kits

Der an Wattetupfern anhaftende Speichel enthält u. a. Mundschleimhautzellen. Diese als auch die Zellen von Gewebestückchen werden unter denaturierenden Bedingungen enzymatisch lysiert, was eine mechanische Homogenisierung des Materials nicht notwendig macht. Die anschließende Aufreinigung der DNA findet über eine Silika-Membran statt, die die DNA-Moleküle bindet. Das Waschen mit speziellen Puffern entfernt Proteasen, Nukleasen sowie etwaige Inhibitoren, die nicht von der Membran gebunden werden. Die DNA-Elution erfolgt entweder mit dem in dem Kit enthaltenen Niedrigsalzpuffer oder mit Ampuwa-H₂O.

Dieses Verfahren eignet sich u. a. für Gewebeproben, Tupferproben, Blut als auch Körperflüssigkeiten [130].

Vorgehensweise:

Das vom Hersteller empfohlene Protokoll für Tupferproben fand in abgewandelter Form Anwendung. Das Protokoll wurde den Bedingungen von Spurenmaterial angepasst.

Zum Einsatz kamen Wattetupfer mit anhaftendem Speichel, Blut sowie unterschiedlichste Gewebe von Hauskatzen. Von diesen Geweben wurde je ein kleines Stück (Ø von ca. 0,3 mm) mit einem Einmalskalpell entfernt.

Das zu untersuchende Material wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 180 µl ATL-Puffer versetzt, gemischt und für 10 Minuten bei 85 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation, um Kondensat im Deckelinneren zu entfernen, erfolgte die Zugabe von 20 µl Proteinase K. Nach mehrmaligem kurzen Mischen wurden die Proben für 1 Stunde bei 56 °C auf dem Thermomixer mit 800 rpm inkubiert (Wattetupfer) bzw. solange bis die Gewebestückchen vollständig lysiert waren. Danach fand ebenfalls eine kurze Zentrifugation statt, bevor 200 µl AL-Puffer zugegeben wurden (evtl. in dem Puffer entstandene Präzipitate wurden vorher durch Erwärmen im Wasserbad gelöst). Nach erneutem Mischen erfolgte wiederum eine Inkubation von 10 Minuten bei 56 °C im Thermomixer mit 800 rpm. Das im Deckelinneren entstandene Kondensat wurde durch kurzes Zentrifugieren entfernt.

Bei Speichelproben wurden die Wattetupfer anschließend aus dem Probengemisch in ein Spin-Basket überführt und dieses in das jeweilige Eppendorf-Gefäß eingesetzt. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei RT und 14.000 rpm wurden die Spin-Baskets mit dem trockenen Wattetupfer entsorgt.

Alle Proben wurden nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96 - 100%) sofort für 15 Sekunden gemischt, das Gemisch auf die Extraktionssäule des Kits überführt und im weiteren Verlauf für 1 Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Extraktionssäule in ein neues Sammelgefäß transferiert. Es folgten die Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW1 auf die Säule und eine erneute Zentrifugation bei 8.000 rpm für 1 Minute. Das Zentrifugat wurde anschließend erneut verworfen und die Extraktionssäule in ein neues Sammelgefäß überführt. Ein weiterer Waschschrift erfolgte mit 500 µl Waschpuffer AW2 und einer 3-minütigen Zentrifugation mit 14.000 rpm. Danach wurde das Zentrifugat erneut verworfen und die Säule wiederum in ein neues Sammelgefäß verbracht, um anschließend bei 14.000 rpm für 1 Minute trocken zentrifugiert zu werden.

Die Extraktionssäule wurde nach diesem Schritt in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingesetzt. Die Elution erfolgte bei Speichelproben mit 50 µl Ampuwa-H₂O bzw. mit 100 µl Ampuwa-H₂O bei Blut- und Gewebeproben. Das Ampuwa-H₂O wurde mittig auf die Säule aufgebracht. Es fand eine Inkubation für 5 Minuten bei RT statt. Nach erfolgter Zentrifugation für 1 Minute bei 8.000 rpm befand sich die eluierte DNA in dem Reaktionsgefäß.

Zur weiteren Aufbewahrung verblieben die Proben bei -20 °C.

2.2.2 DNA-Extraktion aus Haaren

Bei den für die Untersuchung verwendeten Haaren handelte es sich um ausgekämmte Haare. Die jeweiligen Besitzer sollten, ohne übermäßigen Druck auszuüben, mit einem Kamm oder einer Bürste leicht durch das Fell streichen. So konnte in den jeweiligen Haarbüscheln mit einem hohen Prozentsatz an Haaren gerechnet werden, die sich zum Zeitpunkt des Auskämmens in einem telogenen Stadium befanden. Eine Übersicht, der aus den Haarbüscheln herausgesuchten Haare, ist in der nachfolgenden Abb. 8 gegeben.

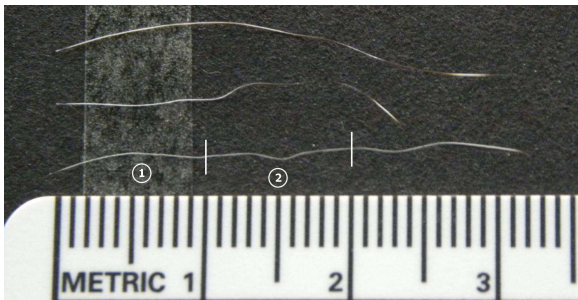


Abb. 8: Für die Untersuchung eingesetzte telogene Haare

Von oben nach unten sind ein starkes, ein mittelstarkes und ein eher feines Katzenhaar auf schwarzem Filterpapier aufgebracht. Bereich ① umfasst die Haarwurzel als auch 1 cm des Schaftes, während Bereich ② direkt an den ersten Bereich anschließt und 1 cm des Haarschaftes kennzeichnet.

Die im nachfolgenden als „Haarwurzeln“ und „Haarschäfte“ bezeichneten Begriffe sollen für das bessere Verständnis kurz erläutert werden.

Der Begriff „Haarwurzeln“ schließt den Bereich des Haares ein, der den Wurzelbereich als auch 1 cm des darauf folgenden Teils des Haarschaftes umfasst (siehe Bereich ① in Abb. 8).

Die Bezeichnung „Haarschaft“ beschreibt im nachfolgenden Text den Bereich des Haares, der sich direkt dem Wurzelbereich mit 1 cm Schaft anschließt und ebenfalls 1 cm misst (siehe Bereich ② in Abb. 8).

Für die Untersuchung kamen überwiegend Haare zum Einsatz, die denen in Abb. 8 dargestellten ähnelten. Es wurde jedoch vermieden zu viele starke Haare zu verwenden, da es sich bei den übertragenen Haarspuren sehr häufig um mittelstarke bis sehr feine Haare handelt. Um einen viel versprechenden Untersuchungsansatz mit einer hohen Sensitivität gegenüber Haarspuren zu etablieren, wurden aus diesem Grund mittelstarke Haare bevorzugt eingesetzt.

Die verwendeten Haarwurzeln gestalteten sich unterschiedlich, wie in Abb. 9 dargestellt.

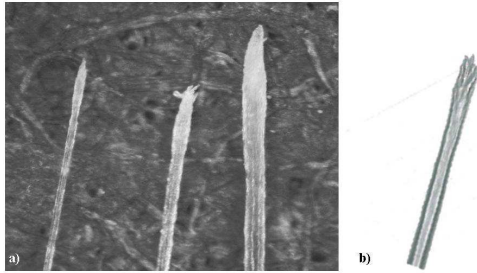


Abb. 9: Unterschiedliche Darstellungsformen von Haarwurzeln der Katze

- a) Von links nach rechts sind Haarwurzeln eines feinen, eines mittelstarken und eines starken Haares beispielhaft dargestellt. Die linke als auch die mittlere Haarwurzel zeigen eine pinselförmige Struktur, während die rechte Wurzel eine fast glatte Spitze als auch eine länglich bauchige Struktur aufweist (Vergrößerung: 10x).
- b) Eine als charakteristisch beschriebene Wurzel für Katzen [131].

Sehr häufig wurden bei starken und mittelstarken Haaren längliche, etwas bauchige Wurzeln gesichtet. Es waren aber auch pinselförmig aufgesplittete Haarwurzeln vorhanden. Beide Arten von Wurzeln wurden in unterschiedlicher Anzahl für die Untersuchung herangezogen.

2.2.2.1 Reinigung von Haaren

Durch das Putzverhalten von Katzen kann es durchaus vorkommen, dass sich an den Katzenhaaren Speichel befindet. Um zu testen, ob sich an den Katzenhaaren Speichel des jeweiligen Individuums oder der einer anderen Katze befindet, wurden 10 Haare der Katze Ktz009_Ha mit SDS (10 %) gewaschen. Hierzu wurde pro Haar ein Wattetupfer mit der Lösung getränkt, kurz ausgeschüttelt und anschließend das Haar in Wuchsrichtung (d.h. zur gedachten Spitze hin) unter Drehbewegungen abgerieben. Nach dem Trocknen der Wattetupfer erfolgte die DNA-Extraktion unter Zuhilfenahme des QIAamp[®] DNA Mini Kits (siehe Abschnitt 2.2.1).

2.2.2.2 Lyse des Haarmaterials

Die Zusammensetzung des verwendeten TNCA-Puffers erlaubt die vollständige Lyse der Haarstrukturen, so dass diese nach Ablauf von ca. 2 Stunden meist vollständig abgeschlossen ist. Der für eine optimierte Haarlyse entwickelte Puffer wurde gemäß den Vorgaben in der Literatur zusammengestellt [91].

MATERIAL UND METHODEN

Vorgehensweise:

Verwendet wurde sowohl Haarwurzel- als auch Haarschaftmaterial. Die Haarwurzeln wurden ausschließlich ungewaschen den Untersuchungsansätzen zugeführt, während die Haarschäfte auch gewaschen zum Einsatz kamen. Pro Haar kam je ein Wattetupfer zum Einsatz, dessen Baumwollummantelung mit einem sterilen Skalpell entfernt, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß verbracht und mit 100 µl TNCA-Puffer getränkt bzw. überschichtet wurde.

Für Lyseansätze, mit denen nachfolgend kein vergleichender Untersuchungsansatz durchgeführt wurde, wurden je 100 µl des TNCA-Puffers in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt, bevor eine bestimmte Anzahl an Haarwurzeln und Haarschäften unter Zuhilfenahme einer Pinzette zugegeben wurde. Die Anzahl der Haarwurzeln schwankte zwischen einem Haar und 6 Haaren, während von den Haarschäften konsequent nur ein Haar eingesetzt wurde.

Bei Ansätzen, die für einen Methodenvergleich bzgl. des Extraktionsverfahrens herangezogen wurden, erfolgte die Erhöhung des Puffervolumens auf 220 µl bis hin zu 660 µl. Je nach Lysevolumen und Untersuchungsansatz wurden daraufhin 4 - 36 Haarwurzeln, die für die jeweiligen Ansätze gepoolt verwendet wurden, der Lyse zugeführt. Ziel war es sowohl gleiche Grundbedingungen als auch möglichst gleiche DNA-Mengen in den jeweiligen Lyseansätzen zu erhalten, um die Ergebnisse anschließend miteinander vergleichen zu können.

Hierzu wurden den Lyseansätzen jeweils so viele Haarwurzeln zugefügt, dass sich nach Teilung der Ansätze auf je 100 µl-Volumina ein DNA-Gehalt von umgerechnet 2 bzw. 6 lysierten Haarwurzeln ergab. Dies soll beispielhaft nachfolgend erläutert werden.

- Drei miteinander zu vergleichende Methodenansätze:

6 Haarwurzeln in 330 µl Lysat \equiv DNA-Menge von ~ 2 Haaren in je 100 µl Lysat bzw.

18 Haarwurzeln in 330 µl Lysat \equiv DNA-Menge von ~ 6 Haaren in je 100 µl Lysat

- Sechs miteinander zu vergleichende Methodenansätze:

12 Haarwurzeln in 660 µl Lysat \equiv DNA-Menge von ~ 2 Haaren in je 100 µl Lysat bzw.

36 Haarwurzeln in 660 µl Lysat \equiv DNA-Menge von ~ 6 Haaren in je 100 µl Lysat

Pro 100 µl Lyseansatz wurden 10 µl Volumenverlust u. a. wegen der Schaumbildung des verwendeten SDS und wegen einer möglichen Volumenreduktion in Form einer Verdunstung durch das Erwärmen der Lysate mit einbezogen.

Die Lyse erfolgte für max. 2 Stunden im Thermomixer bei 800 rpm. Nach jeweils 20 Minuten wurde der Haaraufschluss visuell kontrolliert und die Probe auf dem Vortexer gemischt, bevor sie wieder in den Thermomixer hineingestellt wurde. Waren nach einer Stunde immer noch deutliche Haarstrukturen sichtbar, wurden zusätzlich 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben.

2.2.2.3 DNA-Isolierung mittels organischer Extraktion

Die an die Lyse anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Trennung von Proteinen, Lipiden, DNA und RNA. Durch Bildung eines Zwei-Phasen-Systems werden die zu extrahierenden Substanzen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit, voneinander getrennt. Anwesende Proteine und Kontaminationen werden durch Phenol und Chloroform denaturiert und sammeln sich in der Interphase zwischen der oberen hydrophilen und unteren hydrophoben Phase an. Die Nukleinsäuren befinden sich in der hydrophilen Phase.

Vorgehensweise:

Nach vollständiger Lyse erfolgte eine kurze Zentrifugation der Proben, um speziell am Deckel entstandenes Kondensat in die Lösung zurückzuführen.

Ein zum Lysepuffer äquivalentes Volumen an Phenol/Wasser/Chloroform-Lösung (Applied Biosystems®) wurde zugegeben, die Proben vorsichtig gemischt und auf dem Rotationsschüttler für ca. 2 Minuten schüttelnd immer wieder invertiert. Zur anschließenden Phasentrennung erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm. Die DNA-haltige hydrophile Oberphase wurde möglichst vollständig abgenommen.

Aufreinigung mittels Microcon® Centrifugal Filter Devices (PC-M)

Die DNA-haltige Oberphase der Haarwurzel- und Haarschaftproben wurde zur Aufreinigung auf ein Microcon® Centrifugal Filter Device (Ultracel YM-30) überführt. Die anschließende Zentrifugation fand bei 12.500 rpm für 6 Minuten statt. Es wurden 200 µl Ampuwa-H₂O auf den Filter pipettiert und dieser für 9 Minuten wiederum bei 12.500 rpm zentrifugiert. Zur Gewinnung der DNA wurden 50 - 100 µl Ampuwa-H₂O dazu verwendet die Filtermembran mit einer Pipette zu spülen. Ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde über Kopf auf den Filter

gestülpt und die Konstruktion so auf den Vortexer gesetzt. Die Probe wurde daraufhin für 15 Sekunden bei 2.500 rpm gemischt. Für die nachfolgende 6-minütige Zentrifugation bei 7.000 rpm wurde das Reaktionsgefäß umgedreht, so dass der Filter invertiert in dem Gefäß saß, und der Deckel geschlossen. Nach der Zentrifugation befand sich die extrahierte DNA in dem Eluat.

Bis zur weiteren Verwendung verblieben die Proben bei -20 °C.

2.3 DNA-Quantifizierung

2.3.1 DNA-Quantifizierung mit dem VersaFluor™ Fluorometer (BIO-RAD)

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt über Fluoreszenzfarbstoffe, die in die DNA interkalieren. Diese nehmen Energie in Form von Licht einer bestimmten Wellenlänge auf und geben dieses als Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Das Lichtsignal korreliert direkt mit der in der Lösung vorhandenen DNA-Menge [133].

Der in dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit verwendete Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® bindet doppelsträngige DNA-Moleküle und besitzt gegenüber einzelsträngigen DNA-Molekülen als auch RNA eine nur geringe Affinität.

Vorgehensweise:

Das Versa Fluor™ Fluorometer musste mindestens 20 Minuten vor Gebrauch eingeschaltet werden, um betriebsbereit zu sein.

Herstellung des 1x TE-Puffers

Der 1x TE-Puffer wurde aus der im Kit enthaltenen Stammlösung (20x) hergestellt und entsprach jeweils der doppelten Probenanzahl, die quantifiziert werden sollte. Die Volumina der Leerkontrolle als auch der Eichlösung wurden mit einberechnet.

Herstellung der PicoGreen®-Lösung

Dasselbe galt für die Herstellung der PicoGreen®-Lösung. Auch hier wurden die Volumina der Leerkontrolle und der Eichlösung berücksichtigt. Die Hälfte des im ersten Arbeitsschritt erstellten 1x TE-Puffers wurde mit einer entsprechenden Menge an PicoGreen® gemischt, um eine 200-fache Verdünnung der PicoGreen®-Stammlösung zu erhalten.

Die Berechnung der jeweils benötigten Volumina zur Erstellung des 1x TE-Puffers als auch der PicoGreen[®]-Lösung erfolgte über eine in Excel hinterlegte Rechentabelle, in der die entsprechenden Formeln hinterlegt waren.

Herstellung der Messlösungen

In eine 1,5 ml Einmalküvette wurden 499 µl des 1x TE-Puffers vorgelegt, 1 µl der zu quantifizierenden DNA-Lösung zugegeben und mit 500 µl PicoGreen[®]-Lösung aufgefüllt und gemischt. Bis zur vollständigen Interkalation des Farbstoffs in die doppelsträngige DNA wurden die Proben für 15 Minuten bei RT unter Lichtausschluss stehen gelassen.

Die Erstellung der Eichlösung erfolgte analog zu der Herstellung der Messlösungen. Lediglich wurde hierzu 1 µl des DNA-Standards λDNA (100 µg/ml TE) verwendet.

Für die Leerkontrolle wurden 500 µl 1x TE-Puffer mit 500 µl PicoGreen[®]-Lösung versetzt.

Durchführung der Messung

Einstellung des Gain-Wertes über das Tastenfeld auf „LOW“

Nullwert einstellen: - die 1,5 ml Einmalküvette, die die Leerkontrolle enthielt, wurde in das Fluorometer eingesetzt und der Deckel verschlossen.

- Die Range wurde auf „00000“ eingestellt und „SET ZERO“ gedrückt.

- Das Display sollte anschließend „0“ (+/- 2) anzeigen.

Eichung: - Die Küvette mit der Eichlösung wurde in das Fluorometer eingesetzt und der Deckel verschlossen

- Die Range wurde anschließend auf „15000“ eingestellt.

- Das Display sollte „15000“ anzeigen.

Messung:

Die Küvetten mit den fertigen Messlösungen wurden in das Fluorometer eingesetzt, der Deckel verschlossen und der auf dem Display angezeigte Wert notiert.

Bestimmung der DNA-Konzentration:

Die abgelesenen rfu-Werte (rfu = relative fluorescent units) wurden in ein Excel-Datenblatt übertragen und mittels einer dort hinterlegten Eichgerade, die jeweiligen DNA-Konzentrationen ermittelt.

Die Daten der Eichgerade wurden in regelmäßigen Abständen überprüft und gegebenenfalls laut Herstellerangaben neu aufgenommen.

2.4 Systemauswahl und Primerdesign

2.4.1 STR-Marker

Der Fokus bei der Auswahl an geeigneten STR-Markern für eine Individualzuordnung von *F. s. catus* lag zum einen auf dem Repeatmuster, welches auf Tetranukleotid-Repeateinheiten basieren sollte, und zum anderen auf der Länge der amplifizierten Produkte, die eine Länge von über 300 bp nicht überschreiten sollten (siehe Abschnitt 1.1).

In der Literatur ließ sich eine ausreichende Anzahl an Markern ausfindig machen, denen eindeutig ein Tetranukleotid-Repeatmuster zugewiesen wurde. Die Markergrößen lagen jedoch teils über einer Produktlänge von 300 bp, wodurch schon vor der ersten Untersuchung alternative Primer zu wählen waren.

Insofern die Primersequenzen nicht direkt aus den jeweiligen Publikationen übernommen werden konnten oder eine Amplifikation der Primer sich als nicht erfolgreich erwies, erfolgte deren Design mit Hilfe der Primer3Plus-Software anhand von spezifischen Sequenzabschnitten der ausgewählten STR-Marker, die in der NCBI-Datenbank hinterlegt sind.

Die jeweiligen Primer wurden von der Fa. TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen. Eine Ausnahme hierzu bildeten die Primer der STR-Marker, die in dem Multiplex Quadro-6_Primer3 enthalten sind (F27, FCA730_vkz, FCA742_vkz und FCA744_vkz). Diese Primer wurden lediglich für die Verwendung im Multiplex von der Fa. biomers.net (Ulm) bezogen. Alle Primer lagen lyophilisiert vor. Die Herstellung von Stammlösungen mit einer Molarität von 20 µM für die PCR und von 10 µM für die Sequenzierung erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller mit den entsprechenden Volumina an Ampuwa-H₂O.

Die F-Primer lagen alle fluoreszenzmarkiert vor, um eine Detektion mittels der Kapillarelektrophorese zu gewährleisten. Bei den verwendeten Farbstoffen handelt es sich um

- FAM** (6-Carboxyfluorescein; Absorption: 495 nm/Emission: 520 nm),
- HEX** (4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-carboxyfluorecein; Absorption: 535 nm; Emission: 556 nm),
- BoTMR** (Boron-Dipyrromethen-Derivat (Bodipy); Absorption: 560 nm, Emission: 580 nm),
- Atto 550** (verwandt mit Rhodamine 6G; Absorption: 554 nm, Emission: 576 nm) und
- Atto 565** (Familie der Rhodaminfarbstoffe; Absorption: 563 nm, Emission: 592 nm)

(Informationen finden sich hierzu unter: <http://www.eurofinsgenomics.eu/de/dna-rna-oligonucleotides/customised-dna-oligos/modifizierte-dna-oligos/fluoreszenzfarbstoffe.aspx>;
<http://www.tib-molbiol.de/de/oligonucleotides/properties/5-modifications/botmr.html>; [62]).

Eine Auflistung aller abschließend verwendeten STR-Marker mit den jeweiligen Angaben zur Primersequenz, Farbmarkierung, Systemgröße sowie weitere Spezifikationen zur PCR ist in Tabelle 8 gegeben.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 8: Primersequenzen der STR-Markersysteme

Marker	Farbstoff	Primersequenz (5'- 3')	Produktbereich (bp)	Annealing-temperatur (°C)	Arbeitskonzentration (µM)	Accession N ^o	Quelle
F27	Atto 550	△F- CAGATCACAGTCTTACTGAT △R- CATTAAATGAGGAAGTACTG	103 – 196	56	0,6 0,6	AY988114	[53,138]
F37_vkz5	6-FAM	△F- CGCCTTTCTCACATTACCAT *R- AGCCTGCTTCGGATTCTGT	199 – 232	56	0,4 0,4	AY988115	[53,138]
F42_vkz_neu	6-FAM	*F- TGAGTGATAATTATGAGGTGCTTTT *R- (GTT)TCCTCTTTCCCTTCCTCCTC	86 – 122	56	0,4 0,4	AY988117	[53,138]
F141_vkz3	6-FAM	△F- GAGACTAGATGGAAGGATGAAG *R- AGTACCATGTCTCTCTCAACT	193 – 255	56	0,4 0,4	AY988111	[54]
FCA441_vkz	6-FAM	△F- GTGTCTTGATCGGTAGGTAGGTAGATATAG *R- AGCCTTGAAGCAAACCTATCATT	95 – 125	56	0,4 0,4	AF130626	[53,138]
FCA559	HEX	△F- GCCAAAATGTTCAAGAGTGG △R- (G)TTTTGGCTTGATGAGCATCA	103 – 195	56	0,4 0,4	AF130659	[53,138]
FCA730_vkz	HEX	*F- GGAATTGTAGCCAAGGCAGA *R- (GT)TTATAGCACAGCGCCTGTTAC	118 – 158	56	0,8 0,8	AY988131	[53]
FCA733	BoTMR	△F- GAAGATGTGGGATAGATACACCAA △R- CTGAGTAATATTCCACTGTCTCTC	101 – 202	56	0,4 0,4	AY988134	[54]
FCA734	6-FAM	△F- TGCTAGCTTCCTTCCTTGACA △R- ACTGGAGGGGTCAGGACTTT	142 – 190	52	0,4 0,4	AY988135	[53,138]
FCA740_vkz	HEX	*F- GAGTGATTTCTCTATCCTTTTGTCG △R- AACCAAATGGGAGTTTGTGG	147 – 174	52	0,4 0,4	AY988141	[53,138]
FCA742_vkz	6-FAM	*F- TGACAACGCATAAGAACCTTTC *R- AGGAACACCATGTTGGGCTA	103 – 152	56	0,4 0,4	AY988143	[53,138]
FCA744_vkz	Atto 565	*F- CCACAAGATTAGGTGTTTCAATG *R- AGCCTACAGCCTACTTGAAGATTG	115 – 139	56	0,4 0,4	AY988145	[53,138]
FCA747_vkz2	HEX	*F- CCATTAGTCTACTTTCTGTTTCTAAGG *R- CCTGGTAAACAACCTCAGTAAAAGATG	100 – 134	56	0,4 0,4	AY988147	[53,138]
FCA749_vkz	BoTMR	*F- AGCATGCGTTCTCTGTCTCTC *R- GCAGTGATTCCTTCAGACTGC	84 – 259	56	0,4 0,4	AY988149	[54]

* neu synthetisierte Primer

△ Primer aus der Literatur

2.4.2 mtDNA-Marker

Die Primer zur artspezifischen Bestimmung über die mtDNA wurden aus der Literatur entnommen und bei der Fa. TIB MOLBIOL (Berlin) bestellt. Die Stammlösungen mit einer Molarität von 20 μM wurden mit der vom Hersteller angegebenen Menge an Ampuwa- H_2O erstellt.

Die drei universellen F-Primer waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen FAM, HEX und BoTMR markiert.

Ein Großteil der Primer zur Haplotypisierung einzelner Katzenindividuen wurde im Rahmen der Masterarbeit „Etablierung einer Methode zur genetischen Untersuchung der hypervariablen Bereiche der D-Loop-Region bei Katzen für den Einsatz in der kriminaltechnischen Fallarbeit“ [129] ebenfalls mit der Software Primer3Plus anhand der in der NCBI-Datenbank hinterlegten mitochondrialen Sequenz der Katze komplett neu designt. Die Parameter wurden zusätzlich mit den Programmen Oligo Calc und Oligo Analyzer überprüft.

Die Primerbestellung erfolgte bei der Fa. biomers.net (Ulm). Laut den vorgegebenen Angaben des Herstellers wurden mit den entsprechenden Volumina an Ampuwa- H_2O Stammlösungen mit einer Molarität von 100 μM erstellt.

Die Farbmarkierung erfolgte hierbei an den R-Primern. Bei den verwendeten Fluorophoren handelte es sich um FAM und HEX.

In Tabelle 9 ist eine Auflistung der für die mtDNA-Untersuchung eingesetzten Primer, deren Sequenz, Farbmarkierung, die jeweils amplifizierten Produktgrößen sowie die Bezugsquellen angegeben.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 9: Primersequenzen der mtDNA-Systeme

System	Farbstoff	Primersequenz (5'- 3')	Amplifikatgröße (bp)	Annealing- temperatur (°C)	Arbeits- konzentration (µM)	Quelle
Tarditi	6-FAM	ΔF- GATAGTGCTTAATCGTGC	492	59	0,4	[121,122]
		ΔR- GTCCTGTGGAACAATAGG				
RS2	HEX	*F- CACAATGTAAAATCACTCTATTAACCAC	330/410/490	59	0,4	[129]
		*R- GCACGATTAAGCACTATC				
Primer MM	HEX	ΔF- ACCATCAGCACCCAAAGCTGA	variabel	59	0,4	Dr. Hecht
		ΔR- GCCCTGAAGTAAGAACCAGATGC				
Tobe und Linacre						[114]
<i>Universal 1</i>	6-FAM	ΔF- GACCAATGATATGAAAAACCATCGTTGT		59	0,8	
<i>Universal 2</i>	HEX	ΔF- TGAGGACAAATATCATTYTGAGGRGC		59	0,8	
<i>Universal 3</i>	BoTMR	ΔF- TTTTTTTTTTTTCGVTCHATYCCHAAAYAACTAGG		59	0,8	
<i>E. caballus 1</i>		ΔR- TACGTATGGGTGTTCCACTGGC	208		0,4	
<i>E. caballus 2</i>		ΔR- AGAATAATACTAGAGTTAGTAGGAGCAAGATC	333		0,4	
<i>F. s. catus 1</i>		ΔR- TTTCCCTCAGATYCATTCTACTAGTTCAGTC	89		0,4	
<i>F. s. catus 2</i>		ΔR- GATTCATGTTAGGGTTAGGAGATCC	180		0,4	
<i>C. l. familiaris 1</i>		ΔR- CAAGCATACTCCTAGTAAGGATCCG	170		0,4	
<i>C. l. familiaris 2</i>		ΔR- GAGTAGGAGTAAGGCTCCTAGGATA	303		0,4	
<i>B. taurus 2</i>		ΔR- GTGTGTAGTAGGGGGATTAGAGCA	93		0,4	
<i>S. scrofa 2</i>		ΔR- TCTGATGTGTAATGTATTGCTAAGAAC	219		0,4	
<i>C. hircus 1</i>		ΔR- GCCATAATTTACATCTCGACAAATGTGAGTT	273		0,4	
<i>O. aries 1</i>		ΔR- GCTTTGATGTATGGAGGAGGGGTATAATT	98		0,4	

* neu synthetisierte Primer

Δ Primer aus der Literatur entnommen/zur Verfügung gestellt

Pro verwendetem System entsprechen die Annealingtemperaturen der R-Primer denen der dazugehörigen F-Primer.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei den meisten Untersuchungsmöglichkeiten, die nach erfolgter DNA-Isolierung angewandt werden, wird auf die Amplifikation spezieller Bereiche der vorhandenen DNA zurückgegriffen.

Die spezifische Vermehrung der zu untersuchenden Bereiche erfolgt mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Grundlage der Methode bildet häufig ein Enzym, die *Taq*-Polymerase, welches aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Benötigt werden zudem mindestens zwei Oligonukleotid-Primer, die jeweils komplementär zu Sequenzen auf gegenüberliegenden Strängen der DNA sind.

Während der Bearbeitung des Projektes wurden mehrere Bereiche und Markersysteme auf der Kern- als auch mitochondrialen DNA untersucht. Um eine korrekte, spezifische und bestmögliche Amplifikation zu gewährleisten, wurden hierzu unterschiedliche Konzentrationen an $MgCl_2$ als auch verschiedene Amplifikationsprotokolle getestet. Im weiteren Verlauf werden nur die Protokolle aufgeführt, die zu einer erfolgreichen Vervielfältigung der entsprechenden Bereiche beitrugen.

2.5.1 Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der AmpliTaq Gold[®] DNA-Polymerase

Die AmpliTaq Gold[®] DNA-Polymerase ist ein „hot start“-Enzym. In seinem inaktiven Zustand ist es an eine chemische Einheit gebunden, die durch einen hitzeaktivierten Schritt abgespalten wird. Erst dadurch entfaltet das Enzym seine Aktivität. Die Polymerase fügt zudem am 3'-Ende des PCR-Produktes einen Überhang in Form eines Adenins (A) an, was bei der Berechnung der Basenpaaranzahl innerhalb einer Sequenz zu berücksichtigen ist [134].

Vorgehensweise:

Alle zu verwenden DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge an Ampuwa-H₂O auf eine Konzentration von 1 ng/μl verdünnt. Die Einzel- als auch Multiplex-PCR-Ansätze erfolgten mit 1 μl an eingesetzter DNA für die STR-Analyse oder mit einem Volumen von 5 μl für die Amplifikation der mtDNA.

MATERIAL UND METHODEN

DNA-Extrakte, die aus Haaren gewonnen wurden, wurden unverdünnt zu je 1 µl und je 5 µl (bei einem Elutionsvolumen von 50 µl) bzw. zu je 2 µl und je 10 µl (bei einem Elutionsvolumen von 100 µl) in die Multiplex-PCR-Ansätze eingesetzt.

Für die Sensitivitätstests wurden Verdünnungsreihen der drei Proben Genom. DNA D-2915, Zellkultur 4083 und Ktz4_Gew erstellt. Die eingesetzten DNA-Mengen betragen 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,1 ng, 50 pg, 25 pg und 12,5 pg, die mit je 1 µl dem PCR-Ansatz zugeführt wurden.

Re-Amplifikationen von PCR-Produkten und Allelleitern (in Verdünnungsstufen von 1:100, 1:1.000 und 1:10.000) erfolgten mit einem Volumen von 5 µl.

Ein Test auf Kreuzreaktivität wurde mit DNAs von verschiedenen Spezies durchgeführt, die auf eine Konzentration von 1 ng/µl eingestellt waren. Von diesen wurde je 1 µl für die PCR verwendet.

Ansätze für Mischungen erfolgten mit Proben der Genom. DNA D-2915, der Zellkultur 4083 und der humanen Kontroll-DNA K 562. Diese lagen in Konzentrationen zu 10 ng/µl und 1 ng/µl (Human), 1 ng/µl und 500 pg/µl (Genom. DNA D-2915) und 2 ng/µl, 1 ng/µl, 500 pg/µl und 200 pg/µl (Zellkultur 4083) vor. Bei der konstanten Komponente der Mischungen handelte es sich um die Probe Genom. DNA D2915. Folgende Mischungen wurden erstellt:

<u>Katze - Katze:</u>	1 ng - 2 ng	500 pg - 2 ng
	- 1 ng	- 1 ng
	- 500 pg	- 500 pg
	- 200 pg	- 200 pg
<u>Katze - Mensch:</u>	1 ng - 10 ng	500 pg - 10 ng
	- 1 ng	- 1 ng

Jeweils 1 µl der zu mischenden DNA-Lösungen wurden im PCR-Ansatz vereint.

DNA-Extrakte aus der Reinigung von Haaren wurden zu je 5 µl eingesetzt.

Einzel-PCR (STR-Marker/Re-Amplifikation/mtDNA-Marker)

Pro PCR-Ansatz wurde ein Mastermix erstellt, dessen Volumen sich nach der Anzahl der zu untersuchenden Proben richtete und in PCR-Gefäße vorgelegt. Die Menge an zugesetztem Ampuwa-H₂O variierte je nach verwendeter DNA-Menge. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge an DNA, sodass sich ein Gesamt-PCR-Volumen von 25 µl ergab. Die Erstellung der Mastermixe berücksichtigte eine zusätzliche Probe ((+1)), damit trotz eventueller Pipettierungenauigkeiten die vorzulegende Menge an Mastermix pro zu untersuchender Probe erhalten wurde.

In Abb. 10 ist ein Screenshot der Berechnungstabelle aus Excel für den Einzel-PCR-Ansatz dargestellt. Das PCR-Gesamtvolumen, die Probenanzahl als auch die zu verwendende DNA-Menge können variiert werden, wodurch sich die zu pipettierenden Volumina und die Angaben zur Arbeitskonzentration durch hinterlegte Berechnungsformeln automatisch anpassen.

PCR-Volumen:	25 µl
Probenanzahl:	1
Max. DNA	1 µl

Arbeits-Konzentration:	Primer	je	25 pmol / 50µl PCR
	Taq-Gold		2,5 U / 50µl PCR
	dNTP's	je	200 µM

	Stamm-Lösung	Arbeits-Konzentration	1 Probe	1 (+1) Proben
PCR Puffer	10 x	1 x	2,5 µl	5 µl PCR Puffer
dNTPs	je 10 mM	je 5 nmol 200 µM	0,5 µl	1 µl dNTPs
Primer-Mix	je 10 µM	je 12,5 pmol 0,5 µM	1,25 µl	2,5 µl Primer F+R
Taq-Gold	5 U/µl	1,25 U	0,25 µl	0,5 µl Taq-Gold
		pro 25 µl PCR	19,5 µl	39 µl H ₂ O

MgCl ₂ (PCR-Puffer)	15 mM	1,5 mM
KCl (PCR-Puffer)	500 mM	50 mM
Tris-HCl	100 mM	10 mM

Abb. 10: Einzel-PCR-Ansatz für eine Probe mit anschließendem DNA-Einsatz von 1 µl

Eine Einzelprobe beinhaltete somit 2,5 µl 10x AmpliTaq Gold[®] Puffer (Applied Biosystems[®]), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1,25 µl F- und R-Primer (je 10 µM) sowie 0,25 µl AmpliTaq Gold[®]-Polymerase (5 U/µl, Applied Biosystems[®]) und ein gegebenes Volumen an Ampuwa-H₂O, das entsprechend der DNA-Menge angepasst wurde.

MATERIAL UND METHODEN

Multiplex-PCR

Folgende Multiplexe wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt:

Tabelle 10: Verwendete Multiplex-Ansätze

Multiplex-Bezeichnung	enthaltene Primersysteme
<i>STR-Analyse</i>	
Duplex-1	FCA734 FCA740_vkz
Quadro-10	F37_vkz5 FCA441_vkz FCA733 FCA747_vkz2
Quadro-6_Primer3	F27 FCA730_vkz FCA742_vkz FCA744_vkz
Penta-6	Amel F42_vkz_neu F141_vkz3 FCA559 FCA749_vkz
<i>mtDNA-Analyse</i>	
HoCaDo	Pferd (Horse = Ho) Katze (Cat = Ca) Hund (Dog = Do)
CoPiGoSh	Kuh (Cow = Co) Schwein (Pig = Pi) Ziege (Goat = Go) Schaf (Sheep = Sh)

Die Menge an zugesetztem Ampuwa-H₂O richtete sich auch hier nach der pro PCR-Ansatz eingesetzten DNA-Menge. Zusätzlich musste die Anzahl der im Multiplex enthaltenen Primer beachtet werden.

Analog zu den Einzel-PCR-Ansätzen wurden auch für die Multiplexansätze bei einem höheren Probenumsatz Mastermixe erstellt und eine Berechnungstabelle in Excel verwendet.

Im Gegensatz zu den Einzelansätzen wurden nur je 1 µl der zu verwendenden Primer (je 10 µM) eingesetzt.

Der PCR-Ansatz des Tetraplexes „Oquadro6-Primer3“ beinhaltet unterschiedliche Mengen an Primer-Mixen. Während die Primer der Systeme FCA742_vkz und FCA744 zu je 1 µl eingesetzt wurden, erfolgte die Zugabe der Primer des Markers F27 zu 1,5 µl und die des Markers FCA730_vkz zu 2 µl (alle je 10 µM).

Die beiden mtDNA-Multiplexansätze erfolgten mit je drei universellen F-Primern (Universal 1-3) und jeweils zwei spezifischen R-Primern pro Spezies für den Multiplex „HoCaDo“ bzw. mit je einem spezifischen R-Primer pro Spezies für den Multiplex „CoPiGoSh“.

Von den universellen Primern wurden je 2 µl und von den einzusetzenden R-Primern je 1 µl pro Ansatz verwendet (alle je 10 µM), während die anderen Bedingungen im Vergleich zu dem Einzel-PCR-Ansatz konstant gehalten wurden.

Der Ablauf des Amplifikationsprotokolls ist in Tabelle 11 wiedergegeben. Dieses galt für alle Einzel- als auch Multiplex-PCR-Ansätze.

Amplifikationsprotokoll:

Tabelle 11: PCR-Amplifikationsprotokoll

Programmschritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Aktivierung	95	10‘	1
Denaturierung	94	45“	30 / 34
Annealing	52 / 56 / 59	45“	
Elongation	72	45“	
Finale Extension	60	45‘	1

Die Annealingtemperatur lag für die Amplifikation der STR-Bereiche bei 52 °C oder 56 °C, während für die mtDNA-Bereiche eine Temperatur von 59 °C verwendet wurde.

Nach Ende des PCR-Programms wurden die Proben automatisch auf 4 °C abgekühlt und verblieben bis zur Entnahme aus dem Thermocycler bei dieser Temperatur.

Die Zyklenanzahl während der PCR richtete sich nach dem verwendeten DNA-Material. Minimalspuren (Haarproben) wurden generell mit 34 Zyklen vervielfältigt. Weitere Proben, die einer späteren STR-Analyse unterlagen, wurden meist mit 30 Zyklen amplifiziert. Bei mtDNA-Proben richtete sich die Zyklenanzahl nach verwendetem System. Einzelansätze wurden mit 30 Zyklen vervielfältigt, während Multiplexansätze häufig 34 Zyklen benötigten.

Re-Amplifikationen der Kern- als auch der mitochondrialen DNA wurden mit einer Anzahl von 15 Zyklen durchgeführt.

2.6 Detektion von PCR-Produkten

2.6.1 Kapillarelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe erfolgt durch Anlegung eines elektrischen Feldes. Die Fragmente sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der die Detektion ermöglicht. Besitzen die Produkte unterschiedlicher Marker einen überlappenden Größenbereich, können mehrere verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, um eine Zuordnung dennoch zu ermöglichen.

Ein als Trägermaterial dienendes Polymer befindet sich im Inneren einer Kapillare, die einen Innendurchmesser von 20 - 100 μm besitzt. Die angelegte Spannung an die Kapillare erzeugt ein homogenes elektrisches Feld, durch das die Produkte entsprechend ihrer Ladung und Größe entlang der Kapillare zu wandern beginnen. Am Ende der Kapillare befindet sich ein eingearbeitetes Fenster, durch das über einen Laser die Fluoreszenzfarbstoffe der PCR-Produkte angeregt und mittels eines Fluoreszenz-Detektors als Lichtsignal erfasst werden können. Anschließend erfolgt die Übertragung der Daten an eine Software, die mit Hilfe entsprechender Standards die Daten auswertet und die Größenordnungen der PCR-Produkte angibt (Abb. 11) [133,135].

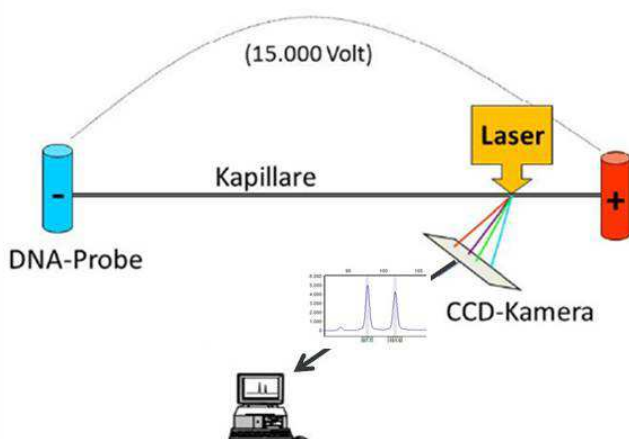


Abb. 11: Prinzip der Kapillarelektrophorese (verändert nach Applied Biosystems®)

Vorgehensweise:

Standardmäßig wurde von den zu analysierenden PCR-Produkten 1 µl sowohl für die Kapillarelektrophorese unter Verwendung des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (1-Kapillarsystem) als auch des ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (4-Kapillarsystem) eingesetzt (beide Applied Biosystems®).

ABI 310: In 0,2 ml Einzelgefäße wurden je 19,6 µl Hi-Di™ Formamide mit 0,4 µl Größenstandard (ROX 400HD oder 1200 LIZ®; alles Applied Biosystems®) vorgelegt. Für die Analyse mehrerer Proben wurde ihrer Anzahl entsprechend ein Mastermix erstellt und je 20 µl vorgelegt.

ABI 3130: In die 0,2 ml Einheiten einer 96er Reagenzplatte (ABI 3130) wurde ein Gesamtvolumen von 9 µl vorgelegt, welches sich aus 8,5 µl Hi-Di™ Formamide und 0,5 µl Größenstandard (ROX 400HD oder 500 LIZ™; alles Applied Biosystems®) zusammensetzte. Auch hier fand für die Auftrennung mehrerer Proben die Erstellung von Mastermixen statt, die zu 9 µl vorgelegt wurden.

Anschließend wurden die zu untersuchenden Proben hinzupipettiert, die Gefäße mit den entsprechenden Abdeckungen verschlossen und für ca. 15 Sekunden bei 1.000 rpm zentrifugiert. Die Denaturierung der Produkte erfolgte für 2 Minuten bei 94 °C im Genus Thermocycler (Techne) mit einer direkt angeschlossenen Abkühlung der Proben auf 4 °C. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte in einem der ABI Genetic Analyzer, wurden die Rohdaten mit der Gene Scan® 3.7- (Applied Biosystems®) oder der GeneMarker® HID V1.95-Software (Soft Genetics) analysiert.

Ein Großteil der Proben zur STR-Analyse wurde mit dem ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer aufgetrennt.

2.7 Herstellung von Alleleitern

Zum Zeitpunkt der Erstellung der Alleleitern waren 125 Individuen typisiert. Anhand der mit diesen Proben erfassten Populationsdaten wurden sowohl häufige als auch seltene Allele berücksichtigt. Ein Abstand von 4 bp wurde, aufgrund der Tetrarepeat-Struktur, zwischen den einzelnen Allelen bevorzugt. Nicht in allen Fällen konnte dies realisiert werden, da des

Öfteren nicht direkt aufeinander folgende Allele erhalten wurden. Zudem traten für viele der Markersysteme Zwischenalle auf (.1-, .2- und .3-Zwischenallele). Diese wurden, falls sie für eine sichere Zuordnung notwendig waren, ebenso in die Allelleitern aufgenommen.

Die jeweils pro Allelleiter verwendeten Proben bestanden meist aus Tieren mit heterozygoten Produkten, die ausbalancierte Allelpeaks aufwiesen. So wurde zum einen das Pipettieren erleichtert als auch der Verdünnungsfaktor beim Pipettieren niedrig gehalten, sodass zueinander recht gut ausbalancierte Allele innerhalb der Leitern erhalten wurden. Da jedoch nicht alle Proben dieselben Produktausbeuten und somit Peakhöhen aufwiesen, wurde anhand der vom Auswerteprogramm (GeneScan 3.7.1, Applied Biosystems®) errechneten rfu-Einheiten ein Verdünnungsfaktor bestimmt, der beim Erstellen der Leitern berücksichtigt wurde.

Die so zusammengestellten Allelleitern wurden mittels Kapillarelektrophorese nochmals auf ausbalancierte Produktpeaks hin überprüft. Anschließend erfolgte die Herstellung von drei Verdünnungsstufen (1:100; 1:1.000 und 1: 10.000), die für die Re-Amplifikation eingesetzt wurden.

2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

2.8.1 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels illustra ExoStar 1-Step

Die Kombination aus Exonuclease 1 und der illustra Alkalischen Phosphatase ermöglicht es in Lösungen von PCR- als auch Sequenzierprodukten überschüssige Primer und Nukleotide abzubauen.

Dieses Verfahren eignet sich besonders für kleinere PCR-Produkte, die teils nur schwer über Silika-Membranen zu reinigen sind und für Ansätze mit geringen PCR-Ausbeuten aufgrund der verlustfreien Reinigung der DNA. Nach der enzymatischen Behandlung können die Produkte direkt weiter verwendet werden.

Vorgehensweise:

Zur Aufreinigung wurden re-amplifizierte homozygote PCR-Produkte (STR-Marker) als auch mtDNA-Produkte (teils re-amplifiziert) verwendet, die für eine spätere Sequenzierung vorgesehen waren.

Während des ganzen Pipettiervorgangs wurde die Enzymlösung auf Eis belassen. Pro Ansatz wurden 10 µl Produkt mit 4 µl ExoStar 1-Step-Lösung vorsichtig gemischt und bei 37 °C für

15 Minuten im Thermocycler Genuis (Techne) inkubiert. Die enzymatische Inaktivierung erfolgte im Anschluss bei 80 °C für 15 Minuten.

2.8.2 Aufreinigung der Alleleiten mittels Microcon[®] Centrifugal Filter Devices

Der Filter der Microcon[®] Centrifugal Filter Devices besteht aus einer anisotropen und hydrophilen Cellulose-Membran (*Ultracel YM-30*), mit der Makromolekül-Lösungen (Volumina von 50 - 500 µl) effizient aufgereinigt und aufkonzentriert werden können [136].

Vorgehensweise:

Das gesamte Volumen der 1:100-Verdünnungen von Alleleiten oder einem Gemisch aus Alleleiter-Verdünnungen (1:100 und 1:1.000) wurde auf einen Filter aufgebracht.

Die anschließende Vorgehensweise entsprach exakt denen unter Abschnitt 2.2.2.3 aufgeführten Arbeitsschritten. Die Rückgewinnung der Alleleiten erfolgte in jeweils 50 µl Ampuwa-H₂O.

2.9 Isolierung von PCR-Produkten

Um die Nukleotidabfolge von amplifizierten DNA-Fragmenten bestimmen zu können, müssen diese sequenziert werden. Liegen diese für eine Probe in heterozygoter Form (zwei unterschiedlich große Produkte; STR-Analyse) oder mit einer höheren Anzahl an unterschiedlich langen Amplifikaten (mtDNA) vor, müssen die zu untersuchenden Fragmente vor der Sequenzierung voneinander getrennt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Länge und Basenpaarabfolge der Fragmente würde es sonst zu Sequenzüberlagerungen kommen, sodass die Sequenzen nicht ausgewertet werden können.

2.9.1 Isolierung mittels Spreadex[®] Mini-Gelen

Spreadex[®]-Gele (Elchrom Scientific AG) sind „ready-to-use“-Gele. Sie werden aus dem Acryl-Monomer NAT (N-acryloyl-tris(hydroxymethyl)-aminomethan) hergestellt und besitzen verschiedene Ausschlussgrenzen (exclusion limit, EL). Je nach Fragmentgröße, der zu isolierenden PCR-Produkte wird ein Gel mit entsprechender EL gewählt. Heterozygote Fragmente mit mindestens einem 4 bp Längenunterschied können sicher aufgetrennt werden. Die Fragmente werden mittels des fluoreszierenden Farbstoffs Sybr[®] Gold im Gel sichtbar gemacht. Der unsymmetrische Cyaninfarbstoff interkaliert in die Nukleinsäure und färbt

MATERIAL UND METHODEN

einzel- sowie doppelsträngige DNA und RNA-Moleküle. Durch Beleuchtung mit ultraviolettem Licht bei 300 nm fluoresziert Sybr[®] Gold hellgolden und macht die Fragmente im Gel sichtbar [137].

Das Ausstanzen der Banden aus dem Gel erfolgt mithilfe des BandPick[™]-Systems (Elchrom Scientific AG). Ein anschließendes Aufreinigen der Produkte ist nicht erforderlich, da die Gele eine aufreinigende Wirkung besitzen. Die isolierten Gelstücke können direkt für die weitere Bearbeitung (z. B. Sequenzierung) eingesetzt werden.

Vorgehensweise:

Für die Auftrennung von heterozygoten PCR-Produkten aus der STR-Analyse wurden Spreadex[®] EL 600 Mini-Gele (Auftrennungsbereich zwischen 150 - 350 bp) und für die Auftrennung mitochondrialer Fragmente Spreadex[®] EL 1200 Mini-Gele eingesetzt (Auftrennung im Bereich von 250 - 800 bp).

Der TAE-Elektrophoresepuffer wurde aus 50 ml der Stammlösung (40x; 1,2 M) aufgefüllt auf 2 l mit entmineralisiertem H₂O hergestellt. Die SEA 2000[®] Elektrophorese-Apparatur (Elchrom Scientific AG) als auch das Thermostat Multi Temp II (Pharmacia Biotech) wurden etwa eine halbe Stunde vor dem Lauf eingeschaltet. Die verwendete Temperatur lag bei 55 °C. Das zu beladende Gel wurde während dessen auf die Apparatur gelegt, damit es ebenfalls vorgewärmt wurde, bevor es anschließend in die Elektrophorese-Apparatur transferiert wurde. Das Volumen der aufzutrennenden Produkte lag bei 8 µl, die mit 2 µl des den Gelen beiliegenden 5x-Ladepuffers (1 Dye BDB, Elchrom Scientific AG) versetzt und in die Geltaschen pipettiert wurden. Als Größenstandard kam die HyperLadder V 100 Lanes (Bioline GmbH) zum Einsatz (Abb. 12). Von dieser wurden 5 µl mit 2 µl desselben 5x-Ladepuffers versetzt und in eine der äußeren Geltaschen pipettiert.

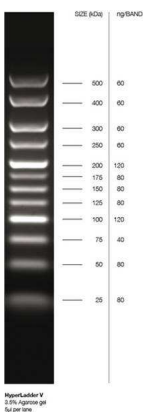


Abb. 12: DNA-Größenstandard HyperLadder V 100 Lanes (Bioline GmbH)

(Bildquelle: [v])

Die Trennung heterozygoter Produkte erfolgte für ca. 2 Stunden bei 120 V, während die Produkte der mtDNA für 3,5 Stunden aufgetrennt wurden. Nachdem die Produktlösungen nach dem Start der Elektrophorese etwas in das Gel gewandert waren, wurde die Umwälzpumpe auf 1,5 min delay eingestellt.

Die anschließende Färbung der aufgetrennten Banden erfolgte mittels Sybr[®] Gold. Hierzu wurden 50 ml TAE-Puffer (10 mM) mit 5 µl Sybr[®] Gold (10.000x) versetzt und das Gel unter einer lichtundurchlässigen Abdeckung für 30 Minuten in der Lösung schütteln lassen. Die Entfärbung erfolgte zunächst ebenfalls für 30 Minuten in einer Destaining Solution (100x, ElchromScientific AG) von der 500 µl auf 50 ml mit entmineralisiertem H₂O aufgefüllt wurden. Damit der Hintergrund des Gels nicht zu hoch war, erfolgte daraufhin ein weiterer Entfärbeschritt in entmineralisiertem H₂O über Nacht.

Das Ausstanzen der PCR-Produkte fand mithilfe des BandPick[™]-Systems (Elchrom Scientific AG) statt. Während das Gel auf dem Transilluminator (Dark Reader[™], MoBiTec GmbH) lag, wurde eine Detektorbrille aufgezogen, mit der die Banden zu sehen waren. Das Gel wurde vorsichtig mit einem Tuch trockengetupft, damit die späteren Volumina übereinstimmen.

Der Stanzstempel des Stanzröhrchens wurde mit H₂O angefeuchtet und in dieses eingeführt, sodass der Stempel einige Millimeter zurückgezogen von der Öffnung des Röhrchens zum Liegen kam. Durch eine Drehbewegung wurde das Stanzröhrchen direkt an der Stelle in das Gel eingestochen, wo das zu analysierende Fragment am stärksten leuchtete. Der Stempel wurde langsam zurückgezogen, damit durch den entstehenden Unterdruck das herausgetrennte Gelstück in das Stanzröhrchen hochgezogen wurde. Dieses wurde in ein 0,2 ml PCR-Gefäß durch Herunterschieben des Stempels überführt. Das BandPick[™]-Prinzip ist in Abb. 13 dargestellt.



Abb. 13: BandPick[™]-System (Elchrom Scientific AG)

Links ist ein Ausschnitt aus einem Speadex[®] Mini-Gels zu sehen. Aus der unteren Bande wurde ein Gelstück ausgestanzt.

Rechts sind das Ausstanzen eines Gelstücks und der anschließende Transfer in ein PCR-Gefäß schematisch dargestellt.

(Bildquelle: [vi])

Aus jeder Bande wurden jeweils zwei Gelstücke ausgestanzt und für die Sequenzierung mittels F- und R-Primer eingesetzt.

Die Vorgehensweise der Sequenzierung wird in dem nachfolgenden Abschnitt 2.10.1 erläutert.

2.10 Sequenzierung

2.10.1 Didesoxyribonukleotid-Sequenzierung nach F. Sanger

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz einzelner amplifizierter DNA-Fragmente erfolgt durch die von F. Sanger und seinen Mitarbeitern entwickelte Didesoxyribonukleotid-Sequenzierung. Zur Synthese des DNA-Stranges ist am 3'-Ende des zuletzt angefügten 2'-Desoxyribonukleotidtriphosphats (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) eine OH-Gruppe erforderlich. Ist diese OH-Gruppe nicht vorhanden, kann keine Phosphodiesterbindung mit einem anderen dNTP mehr eingegangen werden und die Synthese bricht ab. Dies macht sich die Didesoxyribonukleotid-Sequenzierung unter Einsatz von fluoreszenzmarkierten 2',3'-Didesoxyribonukleotiden (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) zu Nutze und wird dementsprechend auch als Kettenabbruchmethode bezeichnet [59].

Vorgehensweise:

Zur Sequenzierung wurde das Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[®]) verwendet. Eingesetzt werden jeweils die unmarkierten F- und R-Primer der zu untersuchenden Marker (STR-Marker als auch Marker der mtDNA).

Direkt in die Sequenzierung konnten die aufgereinigten Lösungen re-amplifizierter homozygoter PCR-Produkte und die Lösungen mit nur je einem mtDNA-Produkt zu jeweils 5 µl eingesetzt werden.

Bei Markern mit heterozygoten Produkten und Markern der mtDNA, die mehrere Produkte amplifizierten, wurden ausgestanzte Gelstücke der zu untersuchenden Fragmente in die Sequenzierung eingesetzt. Die Gelstücke entsprachen einem Volumen von ca. 5 µl.

Der Sequenzieransatz, wie er für alle verwendeten Proben angesetzt wurde, ist in Abb. 14 wiedergegeben. Auch hier wurde auf eine in dem Programm Excel hinterlegte Rechnungstabelle zurückgegriffen, die sich bei Veränderungen des Sequenziervolumens, der Probenanzahl als auch des einzusetzenden PCR-Produktes automatisch aktualisierte.

Seq. Volumen 10 µl
 Probenanzahl 1
 PCR-Produkt/Gelstück 5 µl
 Arbeitskonzentration: F- bzw. R-Primer je 10 µM

Reagenzien	1 Probe	1 (+1) Proben
Seq.Mix	4 µl	8 µl
F- bzw. R-Primer	1 µl	2 µl

Abb. 14: Sequenzieransatz einer Einzelprobe mit anschließendem Produkteinsatz von 5 µl

Um Pipettierungenauigkeiten zu vermeiden wurde bei der Erstellung des Sequenzieransatzes bzw. bei der Erstellung von Mastermischen (unter Verwendung eines größeren Probenumsatzes) eine Probe zusätzlich angesetzt ((+1)).

Der Verlauf des Amplifikationsprotokolls ist in Tabelle 12 dargestellt und wurde für alle untersuchten Marker (STRs als auch mtDNA) angewandt.

Amplifikationsprotokoll:

Tabelle 12: Amplifikationsprotokoll der Sequenzierung

Programmschritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Aktivierung	96	30“	1
Denaturierung	96	30“	25
Annealing	50	15“	
Extension	60	4‘	

Nach dem Programmende wurden die Proben automatisch auf 4 °C abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei dieser Temperatur im Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (Applied Biosystems®) belassen.

2.10.2 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mit Centri•Sep Spin Columns und anschließende Kapillarelektrophorese

Die Centri•Sep Spin Columns (Princeton Separations, Inc.) wurden dazu konzipiert schnell und effizient überschüssige Dye-Terminatoren, Salze, dNTPs und andere niedermolekulare Komponenten nach einer erfolgten Sequenzierungsreaktion aus der Lösung zu entfernen. Die Verunreinigungen adsorbieren an eine Gelmatrix, während das aufgereinigte Sequenzierprodukt in H₂O oder einem ausgewählten Puffer eluiert wird.

MATERIAL UND METHODEN

Vorgehensweise:

Alle aus Abschnitt 2.10.1 erhaltenen Sequenzierprodukte wurden mit dieser Methode aufgereinigt.

Die trockene Matrix eines Spin Columns wurde in der Säule nach unten geklopft und mit 800 µl Ampuwa-H₂O aufgeschwemmt, woraufhin die Säule invertiert wurde. Die aufquellende Matrix wurde durch Anschnippen an den Deckel gleiten gelassen und die Säule anschließend nochmals invertiert, so dass die Matrix wieder zum Boden der Säule zurück glitt. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen in der Matrix verblieben. Etwaige Blasen wurden durch Anschnippen der Säule entfernt. Die Säulen wurden für mind. 30 Minuten quellen gelassen.

Nacheinander wurden der Deckel und der Stopfen am Boden der Säule entfernt, um anschließend mit einem Pipettenball für Pasteurpipetten durch leichten Druck von oben auf die Säule vier Tropfen H₂O aus der Matrix zu entfernen. Die Säule wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und für 2 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert, um interstitielles H₂O aus der Matrix zu entfernen.

Die Sequenzierprodukte wurden mit 10 µl Ampuwa-H₂O gemischt, mittig auf die Matrix der Säule gegeben und diese in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 2 Minuten bei 3.000 rpm.

Die aufgereinigten Produkte befanden sich nach der Zentrifugation in den 1,5 ml Reaktionsgefäßen, welche anschließend zum Einengen in der Vakuumzentrifuge Speed Vac[®] SPD D111V (Savant) für 40 Minuten bei 35 °C im Vakuum zentrifugiert wurden.

Für die nachfolgende Kapillarelektrophorese wurden die eingengten Proben in 20 µl Hi-Di[™] Formamide aufgenommen und ausschließlich mit dem ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mittels der Software Sequencing Analysis v5.4 (alles Applied Biosystems[®]) und die anschließende Auswertung mittels der Sequencher[™] 5.0-Software (Gene Codes Corporation).

2.11 Datenanalyse

2.11.1 Erstellung einer Populationsdatenbank

Die Populationsdatenbank findet sich in einem Excel-Dokument wieder und beinhaltet mehrere Tabellenblätter. Diese umfasst u. a. ein Tabellenblatt mit einer Liste aller Katzenindividuen sowie den Angaben über Geschlecht, Bezugsquelle, Extraktionsmethode und Konzentration der DNA-Probe (falls bekannt).

Des Weiteren sind durch Berechnungsformeln untereinander verknüpfte Listen enthalten. Anhand der Typisierungsergebnisse aller Individuen werden die Frequenzen der Allele pro STR-Markersystem und deren Häufigkeitsverteilungen automatisch berechnet und in Diagrammen dargestellt. Weitere Informationen zu Systemeigenschaften und Markergrößen sind in separaten Tabellenblättern enthalten.

2.11.2 Berechnung der Heterozygotie und des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes

Die Berechnung der beobachteten und erwarteten Heterozygotie (H_o und H_e) eines jeden Markers wurde mit der frei im Internet zugänglichen Software Cervus 3.0.6 durchgeführt (<http://www.fieldgenetics.com/pages/login.jsp>). Diese stellt ein Maß für die Diversität innerhalb der untersuchten Population dar. Zusätzlich erfolgte unter Verwendung der Software eine Überprüfung dahingehend, ob eine unabhängige Verteilung der Merkmale nach Hardy-Weinberg erfüllt ist. Hierbei wird berechnet, inwieweit die beobachteten Genotypfrequenzen von den zu erwarteten signifikant abweichen.

2.12 mtDNA-Analyse

Bei der Untersuchung der mtDNA kann auf verschiedene Bereiche zurückgegriffen werden. Hauptsächlich werden hierbei die Bereiche der Kontrollregion und des Cytochrom b-Gens berücksichtigt. In dieser Arbeit als auch im Rahmen einer Masterarbeit [129] wurden diese beiden Bereiche auf der mtDNA verwendet, um entweder einen spezifischen Artnachweis oder eine Haplotypisierung speziell an Hauskatzen durchzuführen. Die beiden Methoden sollen im Nachfolgenden erläutert werden.

2.12.1 Haplotypisierung der Hauskatze

Eine durch Tarditi et al. veröffentlichte Studie von 2011 [121] wurde im Rahmen einer Masterarbeit auf ihre Korrektheit und Effizienz hin überprüft und durch die Untersuchung angrenzender Bereiche auf der mtDNA ausgebaut [129].

Die Studie beschäftigte sich im Detail mit der Untersuchung der Kontrollregion von *F. s. catus*. Die als Vergleich dienende Referenzsequenz des mtDNA Genoms [97] war aufgrund ihrer Einzigartigkeit (Haplotyp 33) in dieser Studie zum Abgleich der erhaltenen Mitotypen nicht geeignet. Deshalb generierten die Autoren aus 1315 mtDNA Kontrollregion-Sequenzen eine eigene Referenzsequenz, die als Sylvester reference Sequence (SRS) bezeichnet wurde.

Im selben Jahr führten Grahn et al. [122] eine weiterführende Studie des durch Tarditi et al. [121] untersuchten Bereiches durch. Die zuvor von Tarditi et al. [121] erhaltenen Ergebnisse wurden in diese Studie miteinbezogen.

Insgesamt konnten 12 universelle Haplotypen A - L (Genbank: EU864495 – EU864506) typisiert werden (83,6 %), die wiederum 30 Unterhaplotypen bilden, die durch 8 % der Katzen repräsentiert wurden. Die Frequenzen der Haplotypen aller kombinierter Populationen lagen bei > 1 %. Einzigartige Haplotypen, die durch jeweils ein Individuum repräsentiert wurden, traten zu 7,5 % (n = 104) auf. Insgesamt 0,9 % der Mitotypen (n = 3) konnten keinem Haplotyp oder einer Haplogruppe zugeordnet werden und wiesen zudem keine entsprechenden Frequenzen auf. Diese wurden als sogenannte Outliners (OL) bezeichnet.

Zusammengefasst wurden 149 Haplotypen identifiziert, die eine Ähnlichkeit von 98,4 % zueinander aufwiesen, die universellen Haplotypen mitberücksichtigt.

Vier Haupthaplotypen A - D, die durch 60 - 70 % der Katzen repräsentiert wurden, waren in allen untersuchten Populationen vertreten. Keine der Populationen wies jedoch alle 12 universellen Haplotypen gleichzeitig auf. Vergleicht man die häufigsten Haplotypen der Studie von Grahn et al. [122] mit denen der Studie von Tarditi et al. [121] lassen sich Übereinstimmungen feststellen. Folgende Zuordnungen können durchgeführt werden:

Mitotyp A	≡	Mitotyp 2
Mitotyp B	≡	Mitotyp 1
Mitotyp C	≡	Mitotyp 3
Mitotyp D	≡	Mitotyp 4

In der Masterarbeit [129] wie auch in der vorliegenden Arbeit wurde auf die von Grahn et al. [122] verwendete Nomenklatur zurückgegriffen.

2.12.2 Artspezifität

2.12.2.1 Primer MM - Kontrollregion

Durch Herrn Dr. Hecht (Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen) wurden ursprünglich spezifische Primer für den Dachs (*Meles meles*) in der Kontrollregion der mtDNA generiert (Primer MM). Die Überprüfung der Artspezifität zeigte jedoch, dass die synthetisierten Primer für alle getesteten Spezies Produkte spezifischer Länge amplifizierten, die sich voneinander unterscheiden ließen. Somit konnte dieses Primersystem dazu genutzt werden, um mittels der Kontrollregion einen Artnachweis durchzuführen.

Spezifische Produkte einer Länge mit 440 bp werden für Pferd, mit 684 bp für Katze, mit 393 bp für Hund, mit 538 bp für Rind, mit 484 bp für Schwein und mit 540 bp für Mensch erhalten.

Die Affinität der Primer MM zur mtDNA des Menschen ist nur sehr gering, weshalb die Amplifikation des menschenpezifischen Produktes nur bei sehr hohen Konzentrationen erfolgt. Dies ist durchaus sinnvoll, da tierische Spuren häufig an Kleidungsstücken sichergestellt werden, die erfahrungsgemäß stark mit menschlichen Epithelien behaftet sind.

Aufgrund der RS2-Region in der Kontrollregion der Katze treten gehäuft Heteroplasmien auf, wobei meist neben dem 684 bp-Produkt weitere Produkte im Abstand von ca. 80 bp erhalten werden.

2.12.2.2 Tobe und Linacre - Cytochrom b

Die Wissenschaftler Tobe und Linacre [114] entwickelten einen Multiplexansatz mit dem 18 europäische Spezies der Säugetiere (Mammalia) anhand der mtDNA parallel voneinander unterschieden und auch Mischungen dieser Spezies erkannt und identifiziert werden können.

Der Untersuchungsschwerpunkt lag auf der Sequenz des Cytochrom b-Gens. Mittels drei universeller F-Primer und je zwei speziesspezifischer R-Primer wurden pro Spezies zwei Produktpeaks bekannter und unterschiedlicher Größe amplifiziert. Eine Ausnahme bildete der Igel; für diesen war nur ein spezifischer R-Primer in dem Multiplexansatz enthalten (Abb. 15).

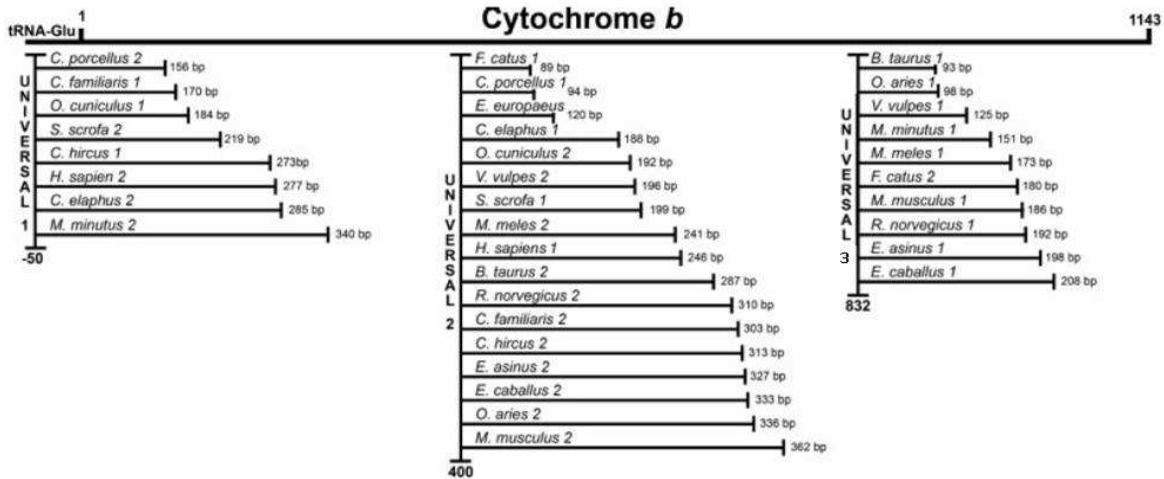


Abb. 15: Schematische Darstellung der Sequenz des Cytochrom b-Gens

Die senkrechten Balken stellen die Lage der drei universellen F-Primer in der Sequenz des Cyt b-Gens dar. Die jeweils hierzu waagerechten Linien zeigen die speziesspezifischen R-Primer der im Multiplex enthaltenen Säugetierspezies, die mit den jeweiligen universellen F-Primern ein Produkt amplifizieren. Für jede Spezies werden somit zwei Produkte spezifischer Größe erhalten (Größenangabe am Ende der Balken in bp). Eine Ausnahme bildet der Igel, da im Multiplex nur ein igelspezifischer R-Primer enthalten ist.

(Bildquelle: [114])

Aufgrund des Spurenaufkommens wurden die Primer der Spezies Pferd (*Equus caballus*), Katze (*F. s. catus*) und Hund (*Canis lupus familiaris*) zu dem Multiplex „HoCaDo“ (Abkürzungen für die englischen Bezeichnungen von **H**orse, **C**at und **D**og) vereint als auch die Spezies Kuh (*Bos taurus*), Schwein (*Sus scrofa*), Ziege (*Capra hircus*) und Schaf (*Ovis aries*) zu dem Multiplex „CoPiGoSh“ (Abkürzungen für die englischen Bezeichnungen von **C**ow, **P**ig, **G**oat und **S**heep).

2.13 Besondere Methoden der DNA-Extraktion

2.13.1 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mittels Magnetpartikelseparatoren

Zur Optimierung der DNA-Extraktion aus Haaren wurden drei Geräte getestet, die sich zurzeit auf dem Markt befinden. Folgende Geräte kamen in Frage:

- ◆ Maxwell[®] 16 der Fa. Promega
- ◆ King Fisher[™] Duo der Fa. Thermo Scientific
- ◆ EZ1 Advanced der Fa. Qiagen

Im Fachbereich KT31 (Humanspuren) waren zwei Geräte des EZ1 Advanced der Fa. Qiagen vorhanden. Freundlicherweise stand eines dieser Geräte für die Testreihe zur Verfügung. Die anderen Geräte wurden von den oben genannten Firmen für einen Zeitraum von 2 - 3 Wochen mit den entsprechenden Kits ebenfalls zur Verfügung gestellt und in den Laboren von KT32 im BKA Wiesbaden getestet.

Als Referenzmethode für die Extraktion galt die in der Fallarbeit eingesetzte Phenol/Chloroform-Methode. Diese wurde bei jedem Versuchsansatz zusätzlich durchgeführt. Eine ausführliche Darstellung der Versuchsbedingungen und Vorgehensweisen erfolgt gerätespezifisch in den nachfolgenden Abschnitten.

2.13.1.1 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mittels Maxwell[®] 16 (Promega)

Der Magnetpartikelseparator Maxwell[®] 16 der Fa. Promega ist dazu ausgelegt bis zu 16 Proben gleichzeitig zu bearbeiten (Abb. 16).



Abb. 16: Magnetpartikelseparator Maxwell[®] 16 (Promega)

(Bildquelle: [vii])

Mittels des auf Magnetpartikel basierenden Systems können selbst aus schwierigen Proben, die nur minimale Mengen an DNA enthalten, hohe Ausbeuten reiner DNA erzielt werden. Der Transport der DNA innerhalb des Gerätes erfolgt nicht in Pipetten, sondern über Plunger. Dies sind Stößel, in die der Magnet hinein fährt und diese während des gesamten Extraktionsvorgangs nicht abstößt. Die Magnetpartikel mit der gebundenen DNA lagern sich mittels der Magneten außen an den Plungern an und werden so zu den jeweiligen Kavitäten transportiert.

Auf forensisch relevante Proben ist speziell das „DNA IQ™ Casework Pro Kit“ ausgelegt.

Vorgehensweise:

Die Lyse der Haarwurzeln erfolgte mit der Originalchemie der Fa. Promega aus dem Kit „DNA IQ™ Casework Pro Kit“ unter Verwendung des TNCa-Puffers.

Die unterschiedlichen Versuchsansätze wurden mit Haaren der Katzen Ktz001_Ha, Ktz020_Ha und Ktz137_Ha durchgeführt. Neben denen unter Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Haaren fanden zudem auch sehr feine Haare der Katze Ktz137_Ha in einem separaten Ansatz Verwendung.

Die in den Kits enthaltenen Kartuschen sind für die Bearbeitung von jeweils einer Probe ausgelegt. Die Versiegelung einer Kartusche wurde komplett entfernt, so dass die einzelnen Kavitäten komplett offen waren.

„DNA IQ™ Casework Pro Kit“:

Um die 100 µl des TNCa-Lysates auf das gleiche Volumen zu bringen, wurden 300 µl des Casework-Puffers als auch 200 µl des Lysepuffers hinzupipettiert (beide Lösungen sind im Kit enthalten) und anschließend in die erste Kavität einer Kartusche übertragen (TNCa-iQ).

Bevor die Kartuschen und 0,5 ml Elutionsgefäße in das Gerät eingesetzt werden konnten, mussten die Elutionsgefäße mit einem entsprechenden Volumen an Elutionspuffer oder Ampuwa-H₂O aufgefüllt werden. Für die Originalansätze beider Kits wurden die enthaltenen Elutionspuffer und für die kombinierten TNCa-Ansätze Ampuwa-H₂O verwendet. Das vorzulegende Volumen liegt für den verwendeten LEV-Modus (LEV = Low Elution Volume) zwischen 50 - 100 µl. In allen Versuchsansätzen wurden Volumina von 50 µl gewählt und vorpipettiert. Nach dem Einsetzen der Kartuschen als auch der Elutionsgefäße in das Gerät

erfolgte die DNA-Aufreinigung vollautomatisch nach Ablauf des ausgewählten Programmes („FFPE/Cells LEV Modus“).

Bis zur weiteren Verwendung verblieben die Proben bei -20 °C.

2.13.1.2 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mithilfe des King Fisher™ Duo (Thermo Scientific)

Mit dem Magnetpartikelseparator King Fisher™ Duo der Fa. Thermo Scientific können in einem Arbeitsdurchgang bis zu 12 Proben gleichzeitig bearbeitet werden (Abb. 17).



Abb. 17: Magnetpartikelseparator King Fisher™ Duo (Thermo Scientific)

(Bildquelle: [viii])

Ein großer Umfang an unterschiedlichsten Proben kann mit diesem Gerät in kürzester Zeit flexibel bearbeitet werden. Die Extraktion, Aufreinigung und der Transport der DNA erfolgt mittels Magnetpartikeln, die von Außen an Stößel über Magnete angezogen werden. Die Magnete fahren in die Stößel hinein, halten diese während des Programmablaufs fest und transportieren so die Magnetpartikel zu den jeweiligen Kavitäten der Reagenzplatte.

Für das System, das mit 12 Magneten ausgestattet ist, wird eine 96er-Platte angeboten, die individuell und je nach verwendetem Kit mit den Chemikalien und Waschlösungen eigenhändig bestückt wird. Auch ist es möglich Kits anderer Firmen auf dem Gerät zu verwenden und ein Programm für diese zu erstellen. Es wurde u. a. das „**Crime Prep Adem-Kit**“ von Ademtech getestet. Speziell das letzte Kit ist auf Problem- und Minimal Spuren ausgelegt.

Vorgehensweise:

Unter Verwendung des Kits von Ademtech fand die Lyse ausschließlich unter Zuhilfenahme des TNCA-Puffers statt, da mit der Lyse der Haare nach Herstellerangaben keine vollständige

MATERIAL UND METHODEN

Lyse erfolgt wäre. Nach ca. 1 Stunde waren die Haare meist vollständig verdaut, sodass die Lysate weiterverarbeitet werden konnten.

Für die unterschiedlichen Versuchsansätze wurden Haare der Katzen Ktz001_Ha, Ktz020_Ha und Ktz137_Ha eingesetzt. Ein Versuchsansatz bedingte, dass neben denen unter Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Katzenhaaren auch weitaus dünnere Haare der Katze Ktz137_Ha eingesetzt wurden.

Das Bestücken der 96er-Platte mit der jeweiligen Chemie (Bindepuffer, Magnetpartikel, Waschlösungen etc.) erfolgte nach den Vorgaben der Kits und war zusätzlich den gespeicherten Programmabläufen auf dem King Fisher™ Duo selbst zu entnehmen.

„Crime Prep Adem-Kit“:

Zu dem TNCA-Lysat wurden 300 µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers hinzupipettiert, bevor dieses mit dem Puffergemisch, das die Magnetpartikel enthielt, vereint wurde (TNCA-Ademtech).

Die Elution erfolgte in einem separaten Elutionsstreifen mit offenen Kavitäten. Für die Originalansätze und den „TNCA-Stratec“-Ansatz wurden je nur 50 µl Elutionspuffer verwendet und vorpipettiert. Die Elution erfolgte sowohl in 50 µl als auch in 100 µl Ampuwa-H₂O.

Nach der Bestückung des Gerätes mit der 96er-Reagenzplatte als auch dem Elutionsstreifen, wurde das zu dem Kit entsprechende Programm auf dem Gerät ausgewählt und gestartet. Hierbei wurde in jedem verwendeten Programm eine für die Elution festgelegte Temperatur von ca. 70 °C gewählt. Nach Ablauf des jeweiligen Programms wurden die DNA-Lösungen aus den offenen Gefäßen in verschließbare Reaktionsgefäße überführt.

Bis zur weiteren Verwendung verblieben die Proben bei -20 °C.

2.13.1.3 DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mithilfe des EZ1 Advanced (Qiagen)

Der Magnetpartikelseparator EZ1 Advanced der Firma Qiagen kann parallel bis zu 6 Proben aufarbeiten (Abb. 18).



Abb. 18: Magnetpartikelseparator EZ1 Advanced (Qiagen)

(Bildquelle: [ix])

Zwei dieser Geräte befanden sich im Fachbereich KT31 (Humanspuren). Die Versuchsreihen fanden an nur einem der beiden Geräte statt, so dass die gleichen gerätespezifischen Voraussetzungen für unterschiedliche und miteinander zu vergleichende Läufe gegeben waren.

Die Lösungen als auch die Magnetpartikel mit der an ihnen gebundenen DNA werden bei dem EZ1 Advanced in Pipetten transportiert. Ein starker Magnet zieht gegen Ende der DNA-Extraktion die Magnetpartikel innerhalb der Pipetten an deren Wand, so dass die im Elutionpuffer gelöst vorliegende DNA in die zuvor bereitgestellten Elutionsgefäße abgegeben wird. Das Prinzip der Magnetpartikelseparation des EZ1 Advanced ist in Abb. 19 schematisch dargestellt.

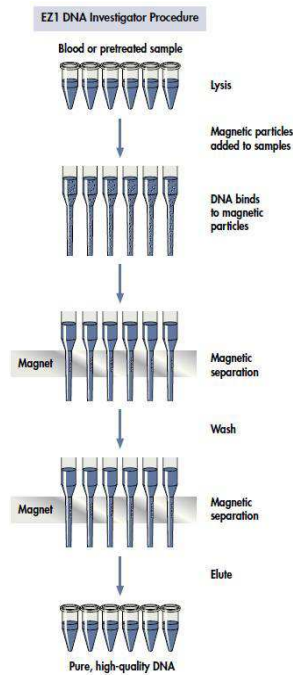


Abb. 19: DNA-Isolierung mittels Magnetpartikelseparation [132]

Mit Hilfe des EZ1 Advanced erfolgt die DNA-Isolierung aus unterschiedlichsten Spurenmaterialien in fünf Schritten (Lyse, Binden an Magnetpartikel, Waschen, Separation der Magnetpartikel und Elution).

Mit dem „EZ1[®] QIAamp DNA Investigator Kit“ kann eine große Bandbreite an Proben untersucht werden. Ausschlaggebend ist die Auslegung auf forensische Spurenträger. Zudem ist eine carrier RNA (cRNA) vorhanden, die es ermöglicht selbst geringste Mengen an DNA aus den Proben isolieren zu können.

Es besteht die Möglichkeit, auch in Verbindung mit dem Kit, drei von ihrem Ablauf her unterschiedliche Protokolle zu verwenden. Das „Trace-Protokoll“ (TP) ist für die Isolierung von totaler DNA aus forensischen Proben (Kern-DNA als auch mitochondriale DNA) entwickelt worden. Auch das „TipDance-Protokoll“ (TD) ist auf dieselben Proben ausgelegt. Der Unterschied besteht darin, dass sich während der Pipettiervorgänge die Spitzen in den Kavitäten nach vorne und hinten bewegen. Das macht es nicht mehr notwendig Wattestäbchen, Zigarettenstummel oder andere Materialien vor der Probenbearbeitung an den Gefäßboden zu zentrifugieren. Bei dem dritten Protokoll handelt es sich um das „LargeVolume-Protokoll“ (LV). Es ist ebenfalls auf die oben genannten Proben ausgelegt jedoch liegen die Probenstartvolumina bei bis zu 500 µl.

Vorgehensweise:

Der dem Kit beiliegende Lysepuffer wurde nicht verwendet, da die Lyse je nach Haarmaterial mehr als 8 Stunden in Anspruch genommen hätte. Es wurde auf den TNCa-Puffer zurückgegriffen (TNCa-TP).

Es wurden ausschließlich Haare der Katze Ktz137_Ha für die Versuchsansätze verwendet.

Die im Kit enthaltenen sog. Cartridges enthalten die Chemie für die DNA-Aufreinigung und die dazugehörige Magnetpartikelsuspension. Je ein Cartridge ist für die Bearbeitung einer Probe ausgelegt. Vor dem Gebrauch wurden diese mehrere Male über Kopf invertiert, um die Magnetpartikel zu resuspendieren und in das Cartridge-Rack geschoben. Für die Bestückung des Tip-Holders erfolgte das Einsetzen von Filterpipetten, der Elutionstubes und der 2 ml Reaktionsgefäße, in denen die Lyse stattgefunden hat. Die Lysate wurden ohne jeglichen Zusatz (Ausnahme „*LargeVolume-Protokoll*“ und die Zugabe von cRNA, s. o.) sofort weiterverarbeitet. Das Cartridge-Rack als auch der Tip-Holder wurden in den EZ1 Advanced eingesetzt, eines der drei Programme („*Trace-Protokoll*“, „*TipDance-Protokoll*“ oder „*LargeVolume-Protokoll*“) ausgewählt und gestartet. Die Cartridges wurden anschließend durch das Gerät selbst perforiert und die Aufreinigung bis hin zur Elution vollautomatisch durchgeführt.

Die Elution der DNA fand in 50 µl H₂O statt, welches sich in den Cartridges befand. Das Volumen wurde vor Programmstart festgelegt. Nach Beendigung des jeweiligen Programms konnten die Elutionsgefäße entnommen und mit einem Schraubdeckel verschlossen werden. Der Rest der Materialien wurde komplett verworfen.

Bis zur weiteren Verwendung verblieben die Proben bei -20 °C.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl geeigneter STR-Markersysteme

Aus der Vielzahl, der in der Literatur beschriebenen STR-Markersysteme für *F. s. catus*, wurden speziell Tetranukleotid-Repeatmarker ausgewählt. Diese sind im Gegensatz zu Di- und Trinukleotid-Markern unempfindlicher gegenüber einer Strangverschiebung und erleichtern durch die Bildung von niedrigen Stotterprodukten die Interpretation der jeweiligen Produktpeaks erheblich (siehe hierzu Abschnitt 1.8.1).

Insgesamt wurden 20 STR-Markersysteme ausgewählt und entweder mit den in der Literatur beschriebenen Primerpaaren getestet oder es erfolgte schon vor der ersten Testphase eine Reduktion des Produktgrößenbereichs durch die Neusynthese geeignet erscheinender Primer. Bei einigen Markern kamen sowohl die Originalprimer als auch neu generierte Primer zum Einsatz.

Alle 20 getesteten Markersysteme sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Verwendete Tetranukleotid-Markersysteme

System	verwendete Primer	Referenz
F27	aus der Literatur	[53,138]
F37	aus der Literatur + neu designt	[53,138]
F41	aus der Literatur	[54]
F42	aus der Literatur + neu designt	[53,138]
F53	aus der Literatur	[53]
F85	aus der Literatur	[54]
F141	neu designt	[54]
FCA441	aus der Literatur + neu designt	[53,138]
FCA559	aus der Literatur	[53,138]
FCA723	neu designt	[53,138]
FCA730	neu designt	[53]
FCA733	aus der Literatur	[54]
FCA734	aus der Literatur	[53,138]
FCA736	neu designt	[53]
FCA739	neu designt	[53,138]
FCA740	neu designt	[53,138]
FCA742	aus der Literatur + neu designt	[53,138]
FCA744	aus der Literatur + neu designt	[53,138]
FCA747	aus der Literatur + neu designt	[53,138]
FCA749	neu designt	[54]

Die STR-Marker F41, F53, F85, FCA723, FCA736 und FCA739 lieferten nur unzulängliche Ergebnisse. Neue Primer wurden bei vielen nach den ersten Testversuchen synthetisiert, aber auch diese zeigten nach Amplifikation nicht den gewünschten Erfolg. Bei einigen Systemen wurde aufgrund der umliegenden Sequenz davon abgesehen neue Primer zu designen, da entweder so der Produktgrößenbereich über 300 bp lag oder sich aber ein A-Stretch, d.h. mehrere aufeinander folgende (A)-Basen, direkt vor bzw. nach der Repeatsequenz befand. Als Beispiel hierfür sei das Markersystem F41 dargestellt. Nach Amplifikation zeigten sich Produkte, die gespaltene Signale aufwiesen. Diese setzten sich aus meist sechs Strukturen zusammen, die sich jeweils um ein Basenpaar voneinander unterschieden. Es wurden pro Allel zwei der Strukturen sehr stark repräsentiert. Jedoch konnte nicht differenziert werden, bei welchem es sich um den Hauptallel-Peak handelte, da deren Höhen variierten und mal das vordere oder das hintere Signal verstärkt amplifiziert wurde (siehe Abb. 20).

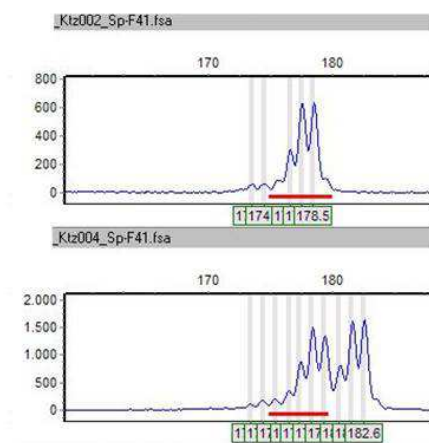


Abb. 20: System F41

Dargestellt sind die Produkte der Proben Ktz002_Sp (homozygot) und Ktz004_Sp (heterozygot).

Aufgrund von unumgänglichen Schwierigkeiten bei der Amplifikation der oben genannten Markersysteme (nicht alle Daten gezeigt) wurden diese von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Die verbliebenen 14 STR-Systeme aus Tabelle 13 schienen für weitere Untersuchungen geeignet. Falls nötig wurden weitere Optimierungsschritte durchgeführt, bei denen es sich in erster Linie um die Reduktion des Produktgrößenbereichs handelte.

3.1.1 Optimierungsbeispiele ausgewählter STR-Markersystemen

Im weiteren Verlauf sind die Marker, bei denen eine Anpassung des Produktgrößenbereichs vorgenommen wurde, mit dem Zusatz „_vkz“ gekennzeichnet (z. B. FCA441_vkz) und grenzt diese klar von den Systemen ab, die mit den Originalprimern aus der Literatur verwendet werden. Bei den Markern, für die mehrere Neusynthesen eines Primers nötig waren, ist der Zusatz „_vkz X“ gegeben, wobei „X“ für die Anzahl der durchgeführten Neusynthesen steht (z. B. F141_vkz3 - drei Primerkombinationen waren nötig, um die gewünschte Amplifikation zu erreichen).

Lediglich die Markersysteme F27, FCA559, FCA733 und FCA734 wurden mit den Originalprimern aus der Literatur verwendet. Bei den restlichen 10 STR-Markern erfolgten Optimierungen, die nachfolgend an zwei repräsentativen Beispielen erläutert werden.

3.1.1.1 STR-Marker F42

Die Primer zur Amplifikation dieses Markersystems wurden zunächst aus der Literatur entnommen [53,138]. Der beschriebene Produktgrößenbereich sollte einen Bereich von 202 - 238 bp umfassen. Nach Untersuchung von 36 Individuen konnte ein Produktbereich von 194 - 230 bp erfasst werden, der durch insgesamt 12 Allele repräsentiert wurde.

Bei der Amplifikation mit einer Annealingtemperatur von 56 °C zeigten sieben heterozygote Proben eine sehr starke Imbalance, wobei einer der beiden Peaks teilweise nur bis zu 1/6 der Höhe des anderen Peaks erreichte. Eine Erniedrigung der Temperatur bis auf 52 °C verbesserte die Amplifikation des geringer repräsentierten Peaks der heterozygoten Proben (Daten nicht gezeigt). Da eine Mutation in einer der beiden Primerbindestellen vermutet wurde, wurden neue Primerpaare synthetisiert.

F42 vkz: Sowohl der F- als auch der R-Primer wurden für das verkürzte System näher an die Repeatstruktur heran gesetzt. Somit sollte sich ein um ca. 100 bp kleinerer Produktbereich (76 - 112 bp) ergeben.

Getestet wurden zunächst vier Individuen (Ktz012_Sp_neu, Ktz014_Sp, Ktz025_Sp und Ktz027_Sp). Die Amplifikation erfolgte mit einer Annealingtemperatur von 56 °C. Im Gegensatz zu dem unverkürzten Markersystem F42 konnten mittels der neuen Primer die heterozygoten Produkte der verwendeten Proben meist gleichstark amplifiziert werden. Lediglich Ktz014_Sp wies eine Imbalance auf. Diesmal war jedoch nicht das Produkt betroffen, welches bei dem unverkürzten System in einem geringeren Umfang amplifiziert wurde und nur mit einer Temperatur von 52 °C dem anderen Peak annähernd angeglichen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigte Ktz012_Sp_neu (-A)-Peaks. Die

heterozygoten Produkte unterschieden sich um 1 bp voneinander, wodurch durch die Bildung von (-A)-Produkten der Peak bei 95 bp höher ausfiel als der Peak bei 96 bp (Abb. 21). Daneben traten bei ~ 62 bp Dye-Blobs auf, die durch freien Farbstoff verursacht wurden. Diese stören die Interpretation der Produkte jedoch nicht, da sie sich nicht in dem zu erwartenden Größenbereich befanden und sich zudem durch ihre hügelige Form von den eigentlichen Peaks unterschieden (siehe ebenfalls Abb. 21).

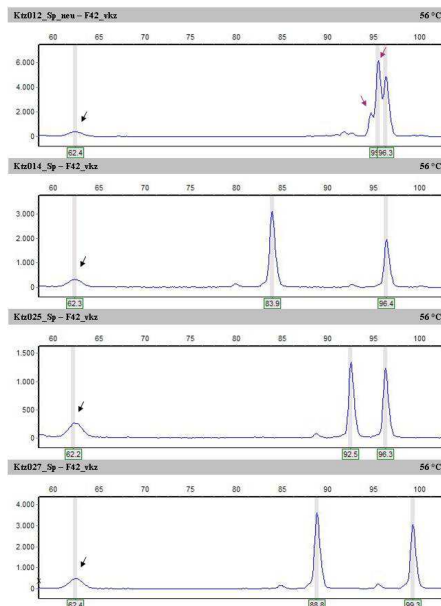


Abb. 21: System F42_vkz

Dargestellt sind die amplifizierten Produkte der Proben Ktz012_Sp_neu, Ktz014_Sp, Ktz025_Sp und Ktz027_Sp (von oben nach unten). Bei einer Annealingtemperatur von 56 °C erfolgt eine teils gleichstarke Amplifikation der heterozygoten Produkte. Die Probe Ktz012_Sp weist (-A)-Peaks auf (rote Pfeile), wodurch die Intensität des Allelpeaks bei 95 bp durch den (-A)-Peak des 96 bp-Produktes verstärkt wird. Ferner sind Dye-Blobs zu erkennen, die sich von den eigentlichen Peaks aufgrund ihrer Form und Lage abgrenzen (schwarze Pfeile).

Zur weiterführenden Untersuchung des Systems wurden zunächst 15 Proben getestet. Diese wiesen teilweise deutliche (-A)-Peaks auf. Häufiger waren jedoch schulterartige Strukturen am Peakbeginn zu erkennen, die ebenfalls auf eine fehlende Adenylierung durch die AmpliTaq Gold[®]-Polymerase zurückgeführt werden könnten (Abb. 22).

ERGEBNISSE

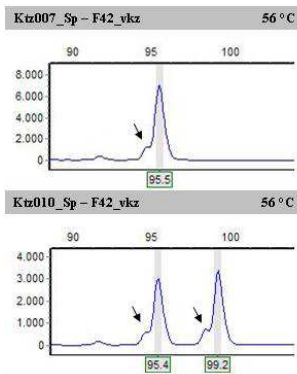


Abb. 22: (-A)-Artefakte des Systems F42_vkz

Dargestellt sind die Produkte der Proben Ktz007_Sp und Ktz010_Sp, die am vorderen Teil ihrer Peaks deutlich schulterartige Strukturen aufweisen (schwarze Pfeile).

Der direkte Vergleich der Produktgrößen des Markersystems F42 mit denen des verkürzten Markers F42_vkz zeigte einige Unstimmigkeiten. Umgerechnet sollte das zuvor 222 bp große Produkt eine Länge von 95 bp aufweisen. Diese Größenzuordnung ergab sich jedoch auch für Produkte, die zuvor bei einer Länge von 201 bp und 206 bp detektiert wurden. Des Weiteren konnten dem 222 bp langen Produkt des Systems F42 ebenso Produkte mit einer Länge von 99 bp zugewiesen werden. Diese Produktzuordnung erfolgte jedoch gleichzeitig auch für das zuvor 226 bp lange Produkt. Dies macht deutlich, dass durch die Verkürzung des Produktgrößenbereichs auch eine Reduzierung der Anzahl der vorher repräsentierten Allele und damit ein Informationsverlust stattgefunden hat.

Unter Verwendung des verkürzten Markersystems müsste mit (-A)-Strukturen bei der Auswertung gerechnet werden. Um dem vorzubeugen, wurde der unmarkierte Primer des verkürzten Systems F42_vkz mit einem (GTT)-Tail versehen. Laut Brownstein et al. [83] kann so die Bildung von (-A)-Peaks vermieden werden.

F42_vkz_neu:

Für das Markersystem F42_vkz_neu wurde der R-Primer des Markers F42_vkz mit einem (GTT)-Tail modifiziert. Der Produktgrößenbereich vergrößerte sich um drei bp und sollte nun einen Produktbereich von 79 - 115 bp abdecken.

Getestet wurden wiederum zunächst vier Proben (Ktz007_Sp, Ktz010_Sp, Ktz012_Sp_neu und Ktz014_Sp), die bei vorherigen Amplifikationen (-A)-Peaks und/oder hügelige Strukturen am Peakbeginn aufwiesen. Nach Amplifikation mit einer Annealingtemperatur von 56 °C konnten weder (-A)-Peaks noch andere Strukturen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Durch das Hinzufügen der drei Basen (GTT) an den unmarkierten Primer wurde die

Peakstruktur deutlich verbessert. Lediglich fiel eine Imbalance bei Probe Ktz014_Sp auf, die sich jedoch im Vergleich zu vorherigen Versuchen weniger stark ausprägte. Der niedrigere Peak erreichte eine Höhe, die ungefähr 2/3 der Höhe des zweiten Peaks entsprach.

Wie unter F42_vkz bereits beschrieben, fanden durch die Neusynthese des R-Primers Umstrukturierungen in den detektierten Produktgrößen statt, weshalb teilweise Doppelzuweisungen von Produktgrößen des Systems F42 zu Produktgrößen des Systems F42_vkz_neu erfolgten.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde das Markersystem F42_vkz_neu für weiterführende Untersuchungen verwendet.

3.1.1.2 STR-Marker F141_vkz

Das Markersystem F141 wurde sowohl von Menotti-Raymond et al. [53,138] als auch von Müller et al. [54] für Untersuchungen verwendet. Entsprechend der vorliegenden Sequenz aus NCBI wurden mittels des Programms Primer3Plus ein neuer F- als auch R-Primer erstellt. Der ursprüngliche Größenbereich lag für das System laut Müller et al. [54] bei 215 - 271 bp.

Mit den neu verwendeten Primern wurde das System auf einen Bereich von 155 - 211 bp verkürzt. Durch die Untersuchung von 35 Proben konnte ein Produktbereich von 155 - 191 bp detektiert werden, der neun Allele beinhaltete. Insgesamt konnten mit diesem Markersystem acht Individuen mit heterozygoten Produktpeaks gegenüber 27 Individuen mit homozygoten Produkten erfasst werden.

Für fünf Proben stellte sich nur eine schwache (Ktz017_Sp, Ktz018_Sp, Ktz022_Sp, Ktz028_Sp) bis gar keine Amplifikation (Ktz025_Sp) ein. Wiederholungsansätze führten zu ähnlichen Ergebnissen. Wahrscheinlich liegt auch hier eine Mutation in einer der Primerbindestellen vor.

F141 vkz2: Für das System F141_vkz2 wurde ein neuer R-Primer designt. Da der zuvor verwendete R-Primer an einer Stelle saß, die einen Tetrarepeat der Repeatstruktur beinhaltete, wurde dieser etwas weiter nach außen gesetzt (in 3'-Richtung). Der neu berechnete Produktgrößenbereich lag bei 158 - 214 bp.

Zunächst wurden neben Proben, die eine erfolgreiche Amplifikation bei Verwendung des Systems F141_vkz zeigten, auch die Proben getestet, deren Produkte nicht oder nur in einem geringen Umfang amplifiziert wurden (Ktz017_Sp und Ktz025_Sp).

ERGEBNISSE

Auch mit dem neu synthetisierten R-Primer zeigte sich keine Verbesserung der Amplifikation des Systems. Die beiden oben genannten Proben, die Probleme bei der vorherigen Amplifikation aufwiesen, zeigten diese weiterhin (Daten nicht gezeigt).

Anhand dieses Ergebnisses war davon auszugehen, dass möglicherweise der F-Primer an einer Stelle in der Sequenz bindet, in der Variationen vorhanden sind. Bei genauerer Betrachtung der Sequenz fielen unterbrochene Sequenzwiederholungen auf, die Tetranukleotid-Repeateinheiten entsprechen könnten.

F141_vkz3: Für weitere Tests wurde der F-Primer, der von Müller et al. [54] für deren Untersuchungen eingesetzt wurde, verwendet. Dieser wurde äquimolar mit dem R-Primer des verkürzten Systems F141_vkz2 gemischt. Mit dieser Primerkonstellation sollte nun ein Produktgrößenbereich von 195 - 251 bp detektiert werden.

Wie zuvor wurden für den ersten Test zum einen Proben verwendet, die erfolgreich amplifiziert wurden (Ktz012_Sp_neu und Ktz027_Sp) und zum anderen Proben, die nur eine geringe oder gar keine Amplifikation aufwiesen (Ktz017_Sp und Ktz025_Sp).

Reproduzierbare Ergebnisse konnten für alle Proben erhalten werden. Selbst die Proben, die zuvor kaum oder gar nicht detektiert wurden, ließen von der Intensität her starke Produktpeaks erkennen.

Die Probe Ktz012_Sp_neu wies nach Amplifikation mit der neuen Primerkonstellation heterozygote Produkte auf, die ca. 40 bp weit auseinander lagen (205 bp und 244 bp). Für die Systeme F141_vkz und F141_vkz2 konnten bei 56 °C nur homozygote Produkte detektiert werden (163 bp bzw. 166 bp). Jedoch fielen bei genauerer Betrachtung kleinere Strukturen ca. 40 bp weit entfernt auf (bei ~ 202 bp bzw. 205 bp; Abb. 23).

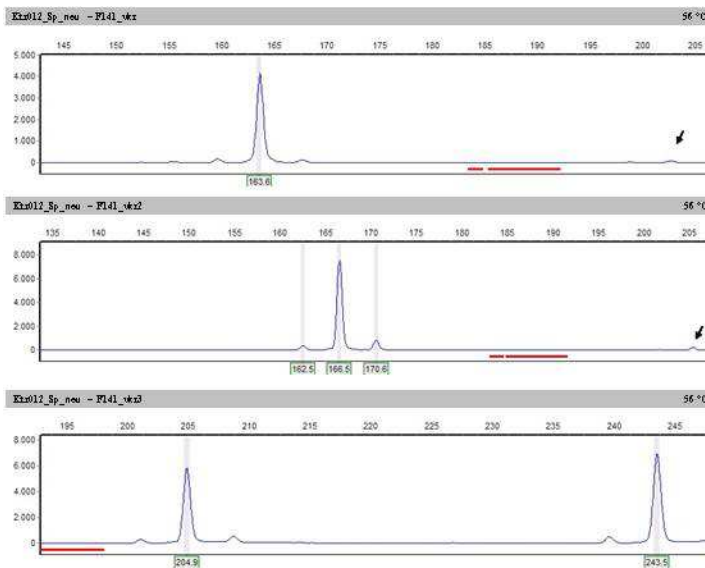


Abb. 23: Amplifikate der verkürzten Systeme F141_vkz, F141_vkz2 und F141_vkz3

Von oben nach unten sind die amplifizierte Produkte der Systeme F141_vkz (homozygot), F141_vkz2 (homozygot) und F141_vkz3 (heterozygot) dargestellt. Die heterozygoten Produkte liegen ca. 40 bp weit auseinander. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Erhebungen liegen ebenfalls ~ 40 bp von den vermeintlich homozygoten Produkten entfernt.

Der überwiegende Anteil an Individuen, die zuvor homozygote Produkte aufwiesen, zeigte nach Amplifikation mit dem System F141_vkz3 nun eine heterozygote Produktamplifikation.

Das System F141_vkz3 wurde, aufgrund seiner höheren Sensitivität und der korrekten Amplifikation heterozygoter Produkte, in die weiterführende Untersuchung einbezogen.

3.2 Geschlechtsbestimmung bei der Hauskatze

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Systeme zur Geschlechtsbestimmung bei *F. s. catus* angewandt und auf eine korrekte Amplifikation hin untersucht.

Es standen zum einen das männchen-spezifische System SRY (Sex-determining Region of the Y) und zum anderen der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin zur Verfügung.

3.2.1 SRY

Das geschlechtsbestimmende Gen SRY liegt auf dem Y-Chromosom, wodurch männliche Individuen identifiziert werden können. Die Primer des SRY-Systems wurden aus der Literatur entnommen [53]. Die amplifizierte Produktlänge lag bei ~ 95 bp.

ERGEBNISSE

Es zeigten sich sehr hohe Peaks, die sich meist abgeschnitten darstellten (> 10.000 rfu; „off-scale“-Peaks) und in diesen Fällen zusätzlich eine kleinere peakähnliche Struktur bei 88/89 bp aufwiesen. Diese Struktur kann als ein Artefakt eingestuft werden, welche bei einer zu hohen Menge an DNA im PCR-Ansatz auftritt (Abb. 24).

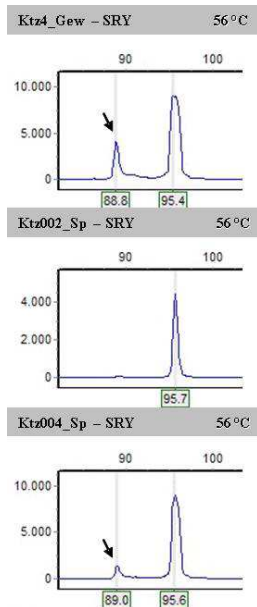


Abb. 24: Männchen-spezifisches System SRY

Dargestellt sind die Produkte der Proben Ktz4_Gew, Ktz002_Sp und Ktz004_Sp (von oben nach unten). Die männchenspezifischen Peaks der Proben Ktz4_Gew und Ktz004_Sp weisen „off-scale“-Peaks auf, was darauf hindeutet, dass zuviel DNA in dem Ansatz vorhanden war bzw. das System sehr empfindlich ist. Die peakähnliche Struktur bei ca. 89 bp kann als Artefakt betrachtet werden (schwarze Pfeile). Weisen die Peaks eine Intensität unterhalb von 10.000 rfu auf, fehlt diese Struktur (siehe Ktz002_Sp).

3.2.2 Amelogenin

Gene, die für Amelogenin kodieren, befinden sich auf dem X- und dem Y-Chromosom. Die aus der Literatur verwendeten Primer [139] amplifizierten Produkte mit einer Länge von ~ 193 bp und 214 bp für männliche Individuen und für weibliche Individuen, dem X-Chromosom entsprechend, nur das 214 bp-Fragment.

Allgemein zeigte das System eine geringe Sensitivität. Diese stellte sich bei einer Annealingtemperatur von 56 °C mit maximalen Höhen von 400 rfu dar. Unter Verwendung einer Annealingtemperatur von 51 °C, wie sie in der Literatur angegeben wurde und nach dem dort beschriebenen Temperaturprofil, konnten Peakhöhen mit max. 3.000 rfu erreicht werden (Abb. 25). Meist lagen die Peakintensitäten jedoch um die 1.000 rfu und darunter.

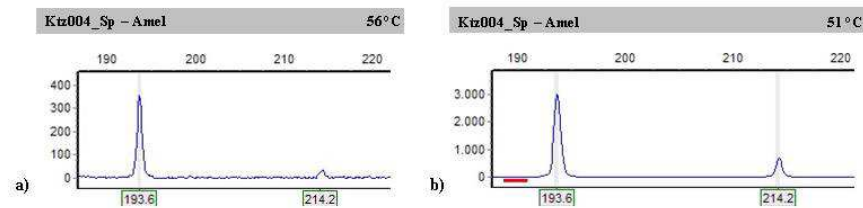


Abb. 25: Geschlechtsspezifischer Marker Amelogenin

- a) Nach Amplifikation bei 56 °C stellen sich im Elektropherogramm des männlichen Individuums Ktz004_Sp die beiden detektierten Produkte (X,Y) unterschiedlich stark dar.
 - b) Mit einer Annealingtemperatur von 51 °C erhöht sich die Sensitivität der detektierten Produkte. Jedoch bleibt die Höhendiskrepanz zwischen diesen erhalten.
- (X ≡ 214 bp-Produkt / Y ≡ 193 bp-Produkt)

Trotz dieser Verbesserung stellte sich bei männlichen Individuen das Fragment des X-Chromosoms (214 bp) im Vergleich zum Y-Chromosom (~ 193 bp) nur sehr schwach dar (siehe Abb. 25). Für weibliche Individuen wurde das 214 bp-Fragment mit höherer Intensität dargestellt, da es aufgrund des X/X-Genotyps in doppelter Ausführung vorhanden ist (Daten nicht gezeigt).

Infolgedessen wurden nach der Sequenzierung, der mit diesen Primern amplifizierten Produkte, neue Primer synthetisiert. Für männliche und weibliche Individuen wurde ein identischer F-Primer gewählt. Der R-Primer für weibliche Individuen lag in einer Region, die bei männlichen Individuen aufgrund einer Deletion von 19 bp nicht vorhanden ist. Für die männlichen Individuen wurde der R-Primer so gewählt, dass dieser direkt über dem Bereich der Deletion zum Liegen kam (Abb. 26).

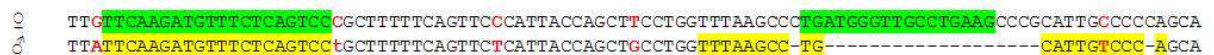


Abb. 26: Männchen- und weibchenspezifische Sequenz des Amelogenins

Der F-Primer liegt für männliche als auch weibliche Individuen in einer für beide Geschlechter konservierten Region. Der weibchen-spezifische R-Primer findet sich in einer Region, die bei männlichen Individuen fehlt (rechts; in grün hervorgehoben). Der männliche R-Primer erstreckt sich über diese Deletion (lückenhaft in gelb dargestellt). Basenpaarunterschiede zwischen den Sequenzen sind in rot hervorgehoben und Deletionen durch Striche kenntlich gemacht.

Anhand dieser neuen Primer wurden für männliche Individuen Produkte mit 66 bp und ~ 76 bp detektiert, wobei letzteres Produkt das X-Chromosom repräsentiert. Für weibliche

ERGEBNISSE

Individuen wurde dementsprechend nur das 76 bp lange Produkt erhalten (Annealingtemperatur von 56 °C). Mit der neuen Primerkombination stellten sich die Intensitäten der Produkte des X- und Y-Chromosoms für männliche Individuen ausgeglichen zueinander dar. Zudem wurde eine deutliche Reduktion der Produktgrößen erreicht (um ca. 130 bp).

Im Elektropherogramm war bei ~ 60 bp ein Dye-Blob erkennbar, der sich durch seine hügelige Form deutlich von den eigentlichen Produktpeaks unterscheiden ließ (Abb. 27).

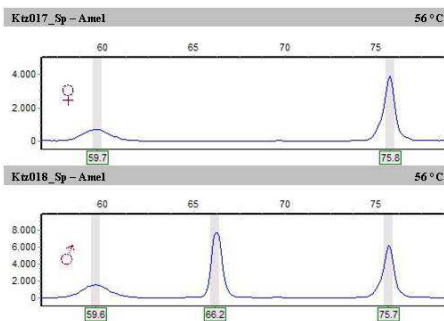


Abb. 27: Geschlechtsspezifischer Marker Amelogenin – neu designte Primer

Für den sowohl weibchen- (oben) als auch männchen-spezifischen (unten) Marker Amelogenin konnte mit den neu synthetisierten Primern ein verbessertes Produktergebnis erzielt werden. Die amplifizierten X- und Y-Produkte stellen sich zueinander annähernd gleichstark dar. Der sich als hügelige Form darstellende Dye-Blob (bei ~ 60 bp) kann von den eigentlichen Produkten gut abgegrenzt werden.

Die amplifizierten Produkte wiesen eine hohe Intensität auf und stellten sich im Elektropherogramm oftmals als „off-scale“-Peaks dar, sodass nur eine geringe Menge an DNA für eine Amplifikation nötig war (< 1 ng/μl).

Mit Hilfe des geschlechtsspezifischen Markers Amelogenin können sowohl weibliche als auch männliche Individuen identifiziert werden. Die Untersuchung von 340 Katzen (166 Weibchen und 174 Männchen) führte in keinem der Fälle zu Diskrepanzen zwischen ermitteltem und bekanntem Geschlecht.

Demgegenüber wird mit dem SRY-System lediglich ein männchenspezifisches Signal erhalten. Für das Weibchen erfolgt die Interpretation eines negativen Ergebnisses. Dieses könnte jedoch auch durch eine zu geringe Menge an DNA oder eine Mutation in der Primerbindestelle bedingt sein. Aus diesen Gründen wurde davon abgesehen, das SRY-System in der weiteren Untersuchung einzusetzen.

3.3 Elektrophoretisches Laufverhalten von PCR-Produkten

Das systemspezifische Laufverhalten der PCR-Produkte der untersuchten Tetranukleotid-STR-Marker stimmte nur bedingt mit den theoretischen Abständen von 4 bp überein. Die durch das Elektrophoresegerät wiedergegebenen apparenten Größen variierten um diesen Wert um bis zu 2 bp. Dies führte zu einem scheinbaren Größenversatz insbesondere bei den sehr kleinen oder sehr großen Produkten eines Markers. Hiervon waren alle Marker bis auf die Systeme F42_vkz_neu und FCA730_vkz betroffen.

Die Produkte des Systems F27 wiesen z. B. im mittleren Größenbereich von 113 - 129 bp überwiegend einen 4 bp-Abstand zueinander auf. Die Produkte ober- und unterhalb dieses Bereichs zeigten dagegen im direkten Vergleich zu diesen Produkten Abstände von 5 - 6 bp (Abb. 28).

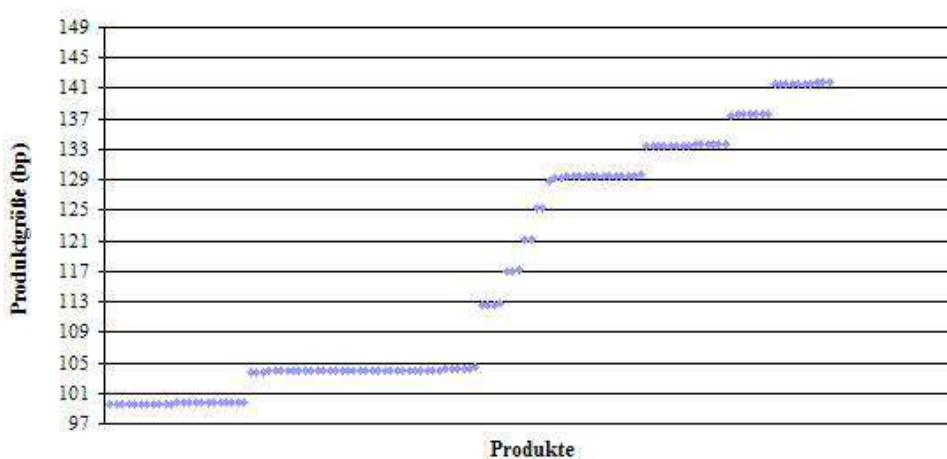


Abb. 28: Größenversatz der Produkte des Markersystems F27

Insbesondere die kleineren und größeren Produkte weisen keinen exakten 4 bp-Abstand zuden Produkten des mittleren Produktbereiches auf. Dieser Abstand steigt an den Randbereich des Systems auf einen Unterschied von bis zu 6 bp an.

Vor der Sequenzierung der Produkte eines Markers, wurden alle Produkte analog zu ihrer apparenten Größe in sog. Produktgruppen (*PG`s*) zusammengefasst. In diesem Zusammenhang fiel auf, dass auch die apparente Größe zwischen den Produkten der jeweiligen *PG`s* Schwankungen um bis zu 0,5 bp aufwies.

Die Sequenzierung zeigte häufig, dass aufgrund der enthaltenen Repeateinheiten eine Anpassung der Größenbenennungen der *PG`s* nötig war. Beispielesweise müsste im obigen Beispiel des Markers F27 die *PG* der sich mit 99 bp darstellenden Produkte analog zu den

enthaltenen Repeateinheiten als *PG* mit 101 bp bezeichnet werden. Ansonsten würde der Eindruck entstehen, dass es sich bei dieser *PG* um ein Zwischenallel handelt. Diese Korrekturen wurden im weiteren Sequenzierungsverlauf für alle betroffenen *PG*'s pro Marker vorgenommen. Im Anschluss erfolgte die Benennung der Allele.

Neben den apparenten Größen und den Größen der *PG*'s wurde des Weiteren die tatsächliche Anzahl der Basenpaare eines sequenzierten Produktes ermittelt. Diese beinhaltet neben den Primerbindestellen auch umliegende Bereiche der Repeatstruktur und ist mit dem Vermerk „tatsächlich“ gekennzeichnet (z. B. in den Tabellen des nachfolgenden Abschnitts 3.4).

Falls nicht anders vermerkt, handelt es sich im weiteren Verlauf bei den angegebenen Produktgrößen bzw. Produktgrößenbereichen um die apparenten Größen eines Produktes oder Markers. Diese berücksichtigen die durch die Adenylierung der AmpliTaq Gold[®]-Polymerase hinzugefügte Base (A) als auch Modifikationen, die an Primern stattgefunden haben, z. B. das Anfügen von Basenpaaren an das 5'-Ende eines unmarkierten Primers.

3.4 Sequenzanalyse zur Beschreibung von Repeatmustern und Allel-Nomenklatur

Zum Zeitpunkt der Sequenzanalyse und der Erstellung der Allelleitern waren 125 Individuen der Hauskatze typisiert.

Sowohl homo- als auch heterozygote Produkte ausgewählter Proben wurden für die Aufnahme der Sequenzdaten verwendet. Pro Allel wurden teilweise bis zu drei Produkte sequenziert. Anhand der Sequenzanalyse und Darlegung der Repeatstruktur, konnten die Markersysteme anschließend einer der drei Kategorien an STR-Markern zugeordnet werden (einfache, zusammengesetzte und komplexe Repeats). Die Eingruppierung in die Kategorie „zusammengesetzte Repeats“ erfolgte jedoch für keines der hier untersuchten Systeme.

Im Verlauf der Untersuchung wurden weitere Typisierungen an insgesamt 340 Hauskatzen vorgenommen. Für die Darstellung der Allelfrequenzdaten wurde dementsprechend auf die größere Stichprobe zurückgegriffen.

Im elektronischen Anhang findet sich eine genaue Darstellung aller Sequenzdaten pro Allel und Markersystem (Ordner 3).

In den nachfolgenden Abschnitten werden die erhaltenen Sequenzdaten (kombiniert), Frequenzen und Allelleitern pro Markersystem dargestellt.

ERGEBNISSE

F-Primer

TGAGTGATAATTATGAGGTGCTTTTTAA(GAAA)_dA_e(GAAA)_fAGAGGAGGAAGGGAAAGAGG

A

R-Primer

Anhand des Allels 12.1 soll die Allelbenennung beispielhaft erläutert werden:

$$11 \text{ (GAAA)} + 1 \text{ (A)} + 1 \text{ (GAAA)} = 11 + 0.1 + 1 = 12.1$$

Diese Vorgehensweise wurde bei allen Markersystemen angewandt und wird im weiteren Verlauf nicht näher erwähnt.

In Tabelle 14 sind die detektierten Repeateinheiten pro Allel aufgelistet.

Tabelle 14: Allelnomenklatur des STR-Markers F42_vkz_neu

Allel	d	e	f	Anzahl bp (tatsächlich)
10	10			89
11	11			93
11.1	11	1		94
12	12			97
12.1	11	1	1	98
13	13			101
13.1	13	1		102
14	14			105
14.1	13	1	1	106
	14	1		
15	15			109
17	17			117

Insgesamt konnten für das System 16 Allele detektiert werden. Deutlich zeigte sich, dass das Allel 13 im Vergleich zu den anderen Allelen am häufigsten vertreten war ($f = 0,41$). Das zweithäufigste Allel 14 trat mit einer Frequenz von 0,16 auf, gefolgt von den Allelen 12 ($f = 0,11$) und 11.1 ($f = 0,1$). Sieben detektierte Allele stellten Zwischenallele dar, bei denen es sich um sechs .1- und ein .3-Zwischenallele handelte (Abb. 29).

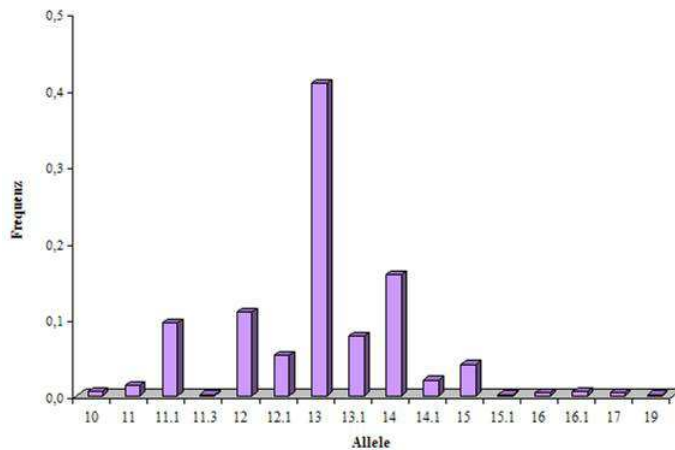


Abb. 29: Allelfrequenzen des Markersystems F42_vkz_neu

Von 16 detektierten Allelen stellen sieben Zwischenallele dar. Am häufigsten ist Allel 13 vertreten, gefolgt von den Allelen 14, 12 und 11.1, die im Vergleich zu Allel 13 weitaus geringere Frequenzen aufweisen.

Die Allelleiter des Systems beinhaltet acht der bisher 16 detektierten Allele. Da vermehrt .1-Zwischenallele auftraten, wurde eines der Allele mit in die Leiter aufgenommen (Allel 12.1) (Abb. 30).

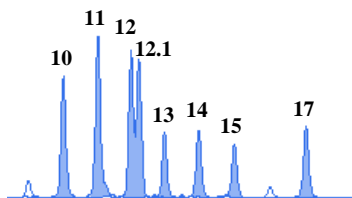


Abb. 30: Allelleiter des Systems F42_vkz_neu

Die Verdünnungsstufen von 1:100 und 1:1.000 wurden vereint und aufgereinigt.

3.4.1.2 STR-Marker FCA441_vkz

Das durch Menotti-Raymond et al. [53,138] beschriebene Markersystem FCA441 befindet sich auf Chromosom D3.

Um eine Verkürzung des Produktbereichs zu erreichen, wurde der R-Primer näher an die Repeatstruktur gesetzt. Das System wurde so um 10 bp verkürzt und umfasste nun einen Produktbereich von 95 - 125 bp. Der neu synthetisierte R-Primer ist in der aus der NCBI-Datenbank entnommenen Sequenz (Accession-N^o: AF130626) in Pink dargestellt.

GATCGGTAGGTAGGTAGATATAGATATA GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAG
 ACAGATA GATGTATAGAGATA AATGATAGTTTGCTTCAAGGCTTATGCCA

ERGEBNISSE

Das beschriebene Repeatmotiv (GATA) konnte für alle sequenzierten Produkte erhalten werden. Die Sequenz fast aller Produkte zeichnete sich jedoch durch eine Variation innerhalb des vorletzten Repeats aus. Hierbei handelte es sich um einen (GACA)-Repeat, der wahrscheinlich durch eine T → C-Transition bedingt wurde. Dieser Repeat lag in Einzelfällen kombiniert als drittletzte und vorletzte Repeateinheit vor (Allele 13 und 14). Aufgrund des Vorkommens dieser Repeateinheit wurden Homoplasien in fast allen Allelen detektiert. Des Weiteren konnte in dieser Repeateinheit die Überlagerung der Basen (C) und (T) in einigen Fällen beobachtet werden (Allele 10, 13 und 14). Ein Zwischenallel wurde erhalten, welches in seiner Sequenz direkt vor dem eigentlichen Repeatbereich nur eine von zwei (TA)-Einheiten aufwies (Allel 11.2). Diese Einheiten wurden neben den eigentlichen Tetranukleotid-Repeateinheiten für die Nomenklatur berücksichtigt.

Die Gesamtrepeatstruktur des Markersystems FCA441_vkz ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte wie folgt darstellen (kursiv/fett):

F-Primer

**GATCGGTAGGTAGGTAGATATAGA(TA)_d(GATA)_e(GA(N)A)_f(GATA)_gGATGTATAGAGATAAAAT
GATAGTTTGCTTCAAGGCT**

R-Primer

Eine Zusammenfassung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 15: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA441_vkz

Allel	d	e	f	g	N	Anzahl bp (tatsächlich)
8	2	5	1	1	C	92
10	2	7	1	1	C/T	100
11	2	10				104
	2	8	1	1	C	
11.2	1	9	1	1	C	106
12	2	11				108
	2	9	1	1	C	
13	2	9	2	1	C/T; C	112
	2	10	1	1	C	
14	2	11	1	1	C	116
	2	10	2	1	C/T; C	
15	2	12	1	1	C	120

Von den bislang 11 detektierten Allelen des Systems FCA441_vkz waren die Allele 11, 12 und 13 ($0,24 < f < 0,36$) am häufigsten vertreten. Des Weiteren wurden drei Zwischenallele erhalten, die in der Stichprobe eher selten vertreten waren (Allele 10.2, 11.2 und 12.2) (Abb. 31).

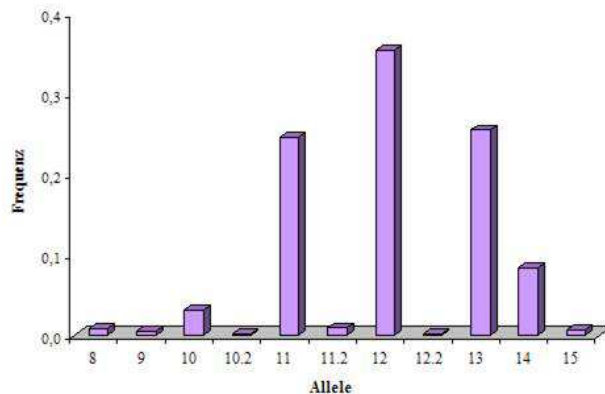


Abb. 31: Allelfrequenzen des Markersystems FCA441_vkz

Die Allele 11, 12 und 13 treten in der Stichprobe am häufigsten auf. Bei drei der etwas seltener auftretenden Allele handelt es sich um Zwischenallele.

Insgesamt wurden sieben der bisher detektierten Allele in der Alleleiter zusammengefasst (Abb. 32).

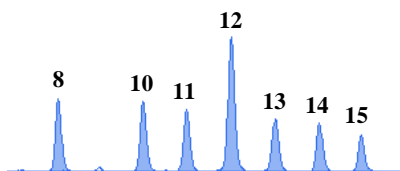


Abb. 32: Alleleiter des Systems FCA441_vkz

Die reamplifizierten Verdünnungsstufen von 1:100 und 1:1.000 wurden vereint und gemeinsam aufgereinigt.

3.4.1.3 STR-Marker FCA730_vkz

Der Marker FCA730 ist in der Literatur durch Menotti-Raymond et al. [53] beschrieben worden und befindet sich auf Chromosom B1.

Die Repeatstruktur für die in der Literatur erläuterte Sequenz lautete $(GATA)_{10}$. Um den Produktbereich des Systems zu verkürzen, wurden die Primer neu synthetisiert. Bei genauerer Betrachtung der Sequenz fielen zwei (GA)-Elementblöcke auf, die ebenfalls variieren

ERGEBNISSE

könnten. Aufgrund dieser Elemente konnte der R-Primer nur minimal in Richtung der (GATA)-Repeateinheiten versetzt werden.

Der Produktbereich wies nach der Verkürzung einen Produktbereich von 118 - 158 bp auf. Insgesamt wurde das System so um 31 bp gekürzt. Die neuen Primer sind in Pink und die (GA)-Elemente unterstrichen dargestellt (Sequenz aus der NCBI-Datenbank; Accession-N^o: AY988131).

```
TCAATAAAATTGGGAATTGTAGCCAAGGCAGATAGATTAAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
TAGATAGATAGATA TAGACAGAGAGAGACAGAGAAAGACAGAGAGAGAGAGAGAATGTTAGTAA  
CAGGCGCTGTGCTATAATAAC
```

Die Sequenzierung der Produkte zeigte neben der beschriebenen Repeatstruktur (GATA) auch die beiden separierten (GA)-Elementblöcke. Der dem R-Primer am nächsten gelegene (GA)-Block wies konstant in allen sequenzierten Produkten jeweils sechs (GA)-Einheiten auf und wurde für die Nomenklatur nicht berücksichtigt. Der (GA)-Block, der sechs Basenpaare von der Repeatregion entfernt liegt, ließ Variationen der Einheiten erkennen. Aufgrund dieses Repeatblocks wurden zwei Zwischenallele beobachtet (Allele 9.2 und 11.2). Weitere Zwischenallele wurden zwar detektiert, aber nicht sequenziert (Allele 10.2, 12.2, 13.2 und 15.2). Direkt an diese Repeats anschließend fand sich eine (CAGA)-Einheit, die bei den zuvor erwähnten Zwischenallelen fehlte. Diese Strukturen trugen zu der Längenvariation der Produkte bei und wurden neben den in der Literatur beschriebenen (GATA)-Repeats in die Nomenklatur einbezogen. Die sechs Basenpaare, die zwischen den (GA)-Einheiten und den sich tandemartig wiederholenden (GATA)-Repeat lagen, waren konstant und wurden bei der Allelbenennung vernachlässigt. In einem sequenzierten Produkt konnte bei der ersten dieser sechs Basen die Überlagerung der Basen (T) und (G) festgestellt werden. Normalerweise handelte es sich bei dieser Base um ein (T). Auftretende Homoplasien in ein und demselben Allel wurden nicht beobachtet.

Die Repeatstruktur des Markersystems FCA730_vkz ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte folgendermaßen darstellen (kursiv/fett):

F-Primer

```
GGAATTGTAGCCAAGGCAGATAGATTA(GATA)d(N)AGACA(GA)e(CAGA)fGAAAGACA(GA)6G  
GATGTTAGTAACAGGCGCTGTGCTATAA
```

R-Primer

In Tabelle 16 sind die detektierten Repeateinheiten pro Allel zusammenfassend wiedergegeben.

Tabelle 16: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA730_vkz

Allel	d	e	f	N	Anzahl bp (tatsächlich)
9.2	9	1		T	120
11	8	4	1	T/G	126
11.2	11	1		T	128
13	10	4	1	T	134
14	11	4	1	T	138
15	12	4	1	T	142
16	13	4	1	T	146
17	14	4	1	T	150

Für das Markersystem konnten 14 Allele detektiert werden, von denen vier häufig vertreten waren. Hierbei handelte es sich um die Allele 13, 14, 15 und 16 ($0,09 < f < 0,42$). Sechs Zwischenallele wurden erhalten, die mit Ausnahme der Allele 9.2 und 11.2 eher selten auftraten (Abb. 33).

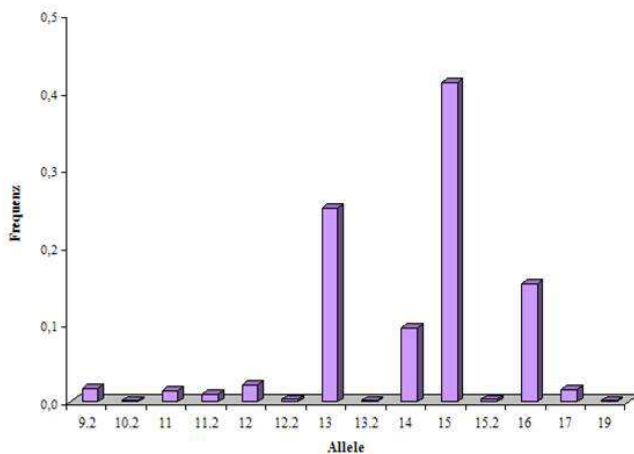


Abb. 33: Allelfrequenzen des Markersystems FCA730_vkz

Neben den häufig vertretenen Allelen 13, 14, 15 und 16 treten in der Stichprobe zudem Zwischenallele auf, die eher gering repräsentiert sind.

Die Allelleiter des Markersystems FCA730_vkz umfasst insgesamt sieben der bisher 14 detektierten Allele. Es traten bei diesem System immer wieder .2-Zwischenallele auf, woraufhin das am häufigsten vertretene Zwischenallel mit in die Leiter aufgenommen wurde (Allel 9.2; zum Zeitpunkt der Testung von 125 Katzen) (Abb. 34).

14.2 wurde diese Einheit als (G_NAA) wiedergegeben, wobei sich die Basen (T) und (A) überlagerten. Die sequenzierten Produkte der Allele 17 und 18 zeigten gegenüber den anderen Allelen eine etwas andere Basenpaarzusammensetzung innerhalb des Repeatbereiches. Zusätzliche (CA)- und (GA)-Elemente wurden in diesen Produkten detektiert. Neben Homoplasien (Allel 15.2) konnten auch Zwischenallele erhalten werden.

Die Gesamtrepeatstruktur des Markersystems FCA734 ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte wie folgt zusammenfassen (kursiv/fett):

F-Primer

ACTGGAGGGGTCAGGACTTTAACATATGGATTTTGGGGAGACAGTTCAGCCCATAACTTTATC
AAAAAAA(GAAA)_d(GA)_e(CA)_f(GA)_g(GAAA)_h(GA)_i(G(N)AA)_jTAGGAGACAGCATTCTCACTGTCA
AGGAAGGAAGCTAGCA

R-Primer

Eine zusammengefasste Darstellung zur Allelnomenklatur ist in der folgenden Tabelle 17 zu finden.

Tabelle 17: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA734

Allel	d	e	f	g	h	i	j	N	Anzahl bp (tatsächlich)
12.2	2	1			10				160
13	2	1			9	1	1	T	162
14	2	1			10	1	1	T	166
14.2	2	1			11		1	A/T	168
15	2	1			11	1	1	T	170
15.2	2	1			12		1	T	172
	2	1			13				
16	2	1			12	1	1	T	174
16.2	2	1			13		1	T	176
17	1	1	1	1	13	1	1	T	178
18	1	1	1	1	14	1	1	T	182
18.2	1	1			16		1	T	184

Die Allele 12.2, 15 und 15.2 wiesen ähnliche Frequenzen zueinander auf und waren am häufigsten in der untersuchten Stichprobe vertreten ($0,16 < f < 0,26$). Das System zeigte eine hohe Dichte an Zwischenallelen, wobei es sich jeweils um .2-Zwischenallele handelte.

ERGEBNISSE

Insgesamt konnten acht der bisher 17 erfassten Allele als Zwischenallel bestätigt werden (Abb. 35).

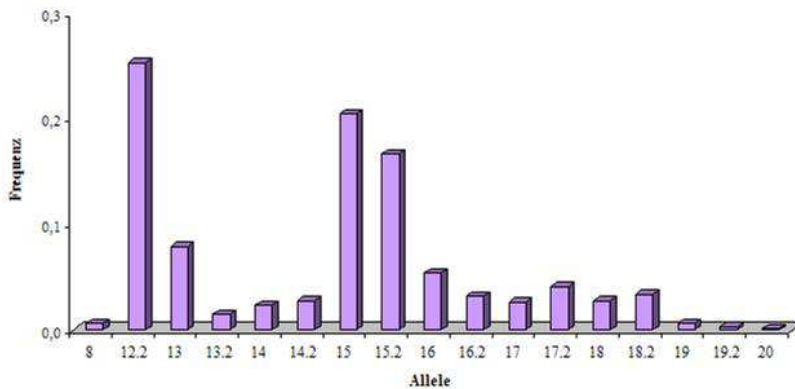


Abb. 35: Allelfrequenzen des Markersystems FCA734

Fast jedes zweite der 17 detektierten Allele des Markers FCA734 stellt ein Zwischenallel dar. Hierbei handelt es sich durchweg um .2-Zwischenallele. Auch unter den am häufigsten vertretenen Allelen in der Stichprobe sind diese vertreten (Allele 12.2, 15 und 15.2).

Neun Allele wurden in der Allelleiter zusammengeführt. Von diesen stellen drei Zwischenallele dar, die in einem Abstand von drei Allelen zueinander liegen (12.2, 15.2 und 18.2) (Abb. 36).

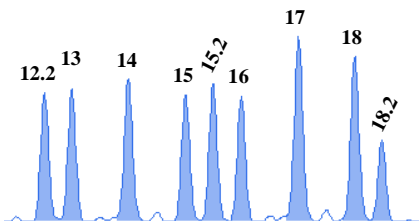


Abb. 36: Allelleiter des Systems FCA734

Die Produkte der reamplifizierten 1:100- und 1:1.000-Verdünnungsstufen der Allelleiter wurden vereint und aufgereinigt.

3.4.1.5 STR-Marker FCA740_vkz

Das Markersystem, welches durch Menotti-Raymond et al. [53,138] beschrieben wurde liegt auf dem Chromosom C1.

Die dargelegte Repeatstruktur lautet (GATA)₁₁. Die Sequenz zeigte jedoch den reverse-komplementären Strang und somit die Repeatstruktur (TATC)₁₁. Um eine einheitliche

Nomenklatur und Beschreibung der jeweiligen Systeme zu erhalten, wird im weiteren Verlauf die in der Literatur verwendete Bezeichnung bevorzugt.

Durch die Neusynthese eines F-Primer, der dem Repeatbereich um 52 bp angenähert wurde, stellte sich ein Produktbereich von 147 - 174 bp dar (neu synthetisierter Primer in Pink dargestellt). Die Sequenz stammt aus der NCBI-Datenbank (Accession-N^o: AY988141).

CATCAACCAAATGGGAGTTTGTGGTAAAGATTTTTCAAACACTGAAGAAAAAGAAAGATGATAGATAGATAGACAGATAGATATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATATTTATCGACAAAAGGATAGAGAAATCACTCTAA

Neben dem beschriebenen (GATA)-Repeatmotiv konnten weitere Elemente, die vor diesem Repeatbereich lagen, identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um (GACA)-, (TA)- und (GA)-Strukturen als auch die Base (A). Diese befanden sich in dem Bereich, der in der oberen Sequenz unterstrichen dargestellt ist und die weitere (GATA)-Repeats von dem zusammenhängenden (GATA)-Repeatblock separierten. Die Elemente (GA)_d und (GATA)_e wiesen keine Variation in ihrer Anzahl auf, wurden jedoch mit in die Nomenklatur einbezogen. Hierdurch wurde die Anzahl an Zwischenallelen deutlich reduziert. Nach dieser Nomenklatur wurden fünf Zwischenallele detektiert, bei denen es sich um .3-Allele handelte (u. a. Allele 19.3 und 20.3). Homoplasien konnten zwischen den Produkten der Allele 18 und 19 beobachtet werden.

Die Gesamtrepeatstruktur des Markersystems FCA740_vkz ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte folgendermaßen darstellen (kursiv/fett):

AACCAAATGGGAGTTTGTGGTAAAGATTTTTCAAACACTGAAGAAAAAGAAA(GA)_dT(GATA)_e(GACA)_f(GATA)_g(TA)_h(GA)_i(A)_j(GATA)_kATTTATCGACAAAAGGATAGAGAAATCACTC

Eine zusammenfassende Darstellung zur Allelnomenklatur ist in Tabelle 18 gegeben.

ERGEBNISSE

Tabelle 18: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA740_vkz

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	Anzahl bp (tatsächlich)
16	1	3	2			1		10	148
17	1	3	2			1		11	152
18	1	3	2			1		12	156
	1	3	2	1		1		11	
19	1	3	1	2	1			12	160
	1	3	2	1		1		12	
19.3	1	3	2	3	1	1	1	10	163
20.3	1	3	2	3	1	1	1	11	167

Von insgesamt 10 detektierten Allelen waren die Allele 17, 18 und 19.3 am häufigsten vertreten ($0,20 < f < 0,37$). Die Hälfte der Allele des Markersystems konnte als Zwischenallele identifiziert werden, die gehäuft durch größere Produkte repräsentiert wurden. Speziell die Zwischenallele 18.3, 21.3 und 22.3 waren in der Stichprobe jedoch nur geringfügig vertreten ($f = 0,001 - 0,003$) (Abb. 37).

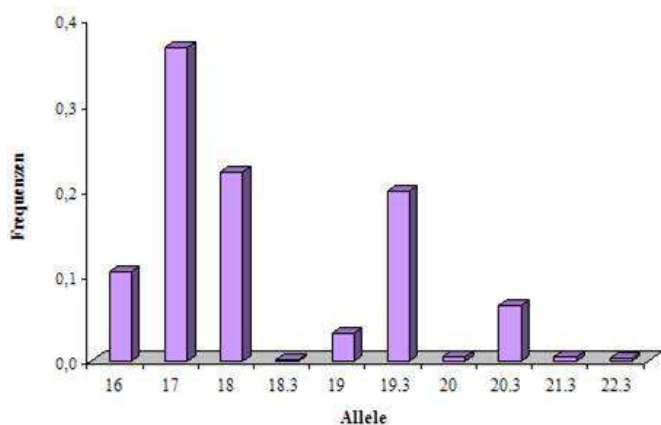


Abb. 37: Allelfrequenzen des Markersystems FCA740_vkz

Gerade die größeren Produkte des Markersystems FCA740_vkz bilden Zwischenalle aus. Die am häufigsten vertretenen Allele sind die Allele 17, 18 und 19.3.

Insgesamt wurden sechs Allele in der Allelleiter vereint. Bei zwei Allelen handelt es sich um Zwischenallele (19.3 und 20.3). Diese wurden berücksichtigt, da diese Zwischenallele gehäuft bei den größeren Produkten des Systems in Erscheinung traten (Abb. 38).

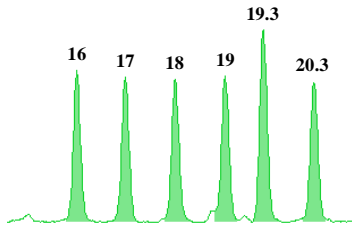


Abb. 38: Allelleiter des Systems FCA740_vkz (Verdünnungsstufe 1:100)

Die erhaltenen Produkte der reamplifizierten Allelleitern in den Verdünnungsstufen 1:100- und 1:1.000 wurden separat aufgereinigt. Gezeigt ist die Allelleiter der 1:100-Verdünnungsstufe.

3.4.1.6 STR-Marker FCA744_vkz

Das aus der Literatur [53,138] entnommene Markersystem FCA744 befindet sich auf Chromosom D4.

Die beschriebene Repeatstruktur lautete (GATA)₉. Um das System zu verkürzen, wurden neue Primer synthetisiert, die die Länge der amplifizierten Produkte um ca. 40 bp reduzierten (Lage der Primer in Pink dargestellt) und einen Produktbereich von 115 - 139 bp amplifizierten. Die aufgeführte Sequenz wurde aus der NCBI-Datenbank entnommen (Accession-N^o: AY988145).

```
CACATTGGGCCTACAGCCTACTTGAAGATTGTAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA
GATAGGATAGATAATAAAAGTTTAAAAAGAAAAGAAGACATCATTGAAACACCTAATCTTGTGGTC
AAGA
```

Die in der oberen Sequenz dargestellte und unterstrichene (GGTA)-Struktur gefolgt von einem (GATA)-Repeat konnte in keinem der hier sequenzierten Produkte detektiert werden. Es stellte sich lediglich ein reiner, sich tandemartig wiederholender (GATA)-Repeatbereich dar, dem sich die Basen (ATAAAA...) anschlossen. Somit handelt es sich in der oberen Sequenz bei dem (GGTA)-Element wahrscheinlich um eine Sequenzvariation, die für die beschreibende Repeatstruktur hätte berücksichtigt werden müssen. Es konnten keine Homoplasien für dieses Markersystem beobachtet werden.

Ein Zwischenallel wurde bei der Erweiterung der Stichprobe detektiert. Eine nachträgliche Sequenzierung des Allels erfolgte hierbei nicht.

Die Repeatstruktur des Markersystems FCA744_vkz ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte wie folgt darstellen (kursiv/fett):

ERGEBNISSE

F-Primer

GCCTACAGCCTACTTGAAGATTGTA(GATA)_dATAAAAAGTTTAAAAAGAAAAGAAGACATCATTG
AAACACCTAATCTTGTGG

R-Primer

Eine zusammenfassende Darstellung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 19 wiedergegeben.

Tabelle 19: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA744_vkz

Allel	d	Anzahl bp (tatsächlich)
9	9	112
10	10	116
11	11	120
12	12	124
13	13	128
14	14	132
15	15	136

Acht Allele wurden für das Markersystem FCA744_vkz detektiert, von denen die Allele 11, 12 und 13 am häufigsten vertreten waren ($0,25 < f < 0,41$). Das Zwischenallel 14.3 konnte bisher nur für ein Individuum nachgewiesen werden (Abb. 39).

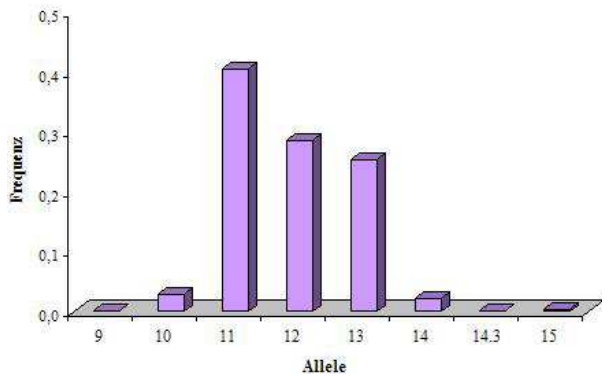


Abb. 39: Allelfrequenzen des Markersystems FCA744_vkz

Die drei Allele 11, 12 und 13 stellen sich für dieses System in der untersuchten Stichprobe am häufigsten dar. Unter den insgesamt acht Allelen wurde ein Zwischenallel detektiert (Allel 14.3).

Alle Allele bis auf das Zwischenallel 14.3 wurden in die Allelleiter aufgenommen (Abb. 40).

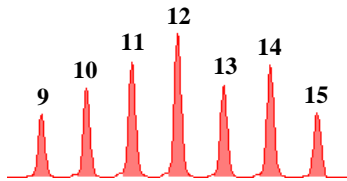


Abb. 40: Allelleiter des Systems FCA744_vkz (Verdünnungsstufe 1:100)

Die reamplifizierten Verdünnungsstufen von 1:100 und 1:1.000 wurden getrennt voneinander aufgereinigt. Dargestellt ist die Allelleiter der 1:100-Verdünnung.

3.4.2 Kategorie: „Komplexe Repeats“

3.4.2.1 STR-Marker F27

Die von Menotti-Raymond et al. [53,138] beschriebene Sequenz zur Repeatstruktur des Markersystems F27, welches sich auf Chromosom B1 befindet, lautete (GAAA)₁₄. Mit den Primern aus der Literatur wurde ein Produktbereich von 103 - 196 bp erhalten. Die aus der NCBI-Datenbank entnommenen Sequenz beinhaltet anstatt der in der Literatur dargelegten 14 Repeateinheiten lediglich 13 Repeats (Primer in Türkis markiert; Accession-N^o: AY988114).

```
TCCCCATTAAATGAGGAAGTACTGTGAGAAAGAAAGAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAA
GAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAGAAAGAAAAGAGAAAGAAAAAGTTATCAGTAA
GACTGTGATCTGAAA
```

Die Sequenzanalyse zeigte, dass die Base (G) am 3'-Ende des R-Primers Teil der Repeatstruktur ist. Die Basen (TGA), die in der in NCBI dargestellten Sequenz direkt nach dem Primer folgen, konnten für die hier sequenzierten Produkte nicht erhalten werden. Die beschriebene (GAAA)-Repeatstruktur fand sich in allen Produkte wieder. Diese stellte sich in nur zwei Produkten als reiner (GAAA)-Repeat dar (Allele 12 und 15). Sehr häufig wurde die tandemartige Repeatstruktur jedoch durch unterschiedlichste Elemente wie (GCAA), (GAAAAAA), (GAA) und der Base (A) unterbrochen. All diese Strukturen wurden für die Nomenklatur berücksichtigt. Neben einem Zwischenallel (Allel 18.3) konnten für die Allele 12 und 13 Homoplasien beobachtet werden. Eine variable Base außerhalb der Repeatregion konnte festgestellt werden, die normalerweise durch die Base (A) repräsentiert wurde. In zwei Fällen wurde an dieser Position stattdessen die Base (G) erhalten.

ERGEBNISSE

Die Gesamtrepeatstruktur des Markersystems F27 ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte folgendermaßen darstellen (kursiv/fett):

CATTAAATGAGGAAGTACT(GAAA)_d(A)_e(GAAAAAAA)_f(GAAA)_g(GCAA)_h(GAA)_i(GAAA)_j
(GAA)_k(GAAA)_mAGAGAAAGAA(N)AAGTTATCAGTAAGACTGTGATCTG

Eine Zusammenfassung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 20 gezeigt.

Tabelle 20: Allelnomenklatur des STR-Markers F27

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	m	N	Anzahl bp (tatsächlich)
12	12									G	103
	3	1		6				1	2	A	
13	4	1	1	2				1	4	A	107
	4	1		3	1		2	1	2	A	
15	15									G	115
16	3	1		10		1	2			A	119
18	4	1		11				1	2	A	127
18.3	4	1		8		1	3	1	2	A	130
19	4	1		12				1	2	A	131
20	4	1		13				1	2	A	135
21	4	1		14				1	2	A	139
22	4	1		15				1	2	A	143
28	12	1		13				1	2	A	167
33	14	1		16				1	2	A	187

Das System F27 wies nach Untersuchung der Stichprobe von 340 Katzen 22 Allele auf. Zum einen ließen sich bei rund der Hälfte der Allele höhere Frequenzen nachweisen. Die Allele 12 ($f = 0,2$) und 13 ($f = 0,4$) wurden durch besonders viele Individuen repräsentiert. Zum anderen zeigten gerade die größeren Allele des Systems sehr niedrige Frequenzen ($f = 0,001 - 0,009$). Daneben konnte unter all den Allelen nur ein Zwischenallel beobachtet werden (Abb. 41).

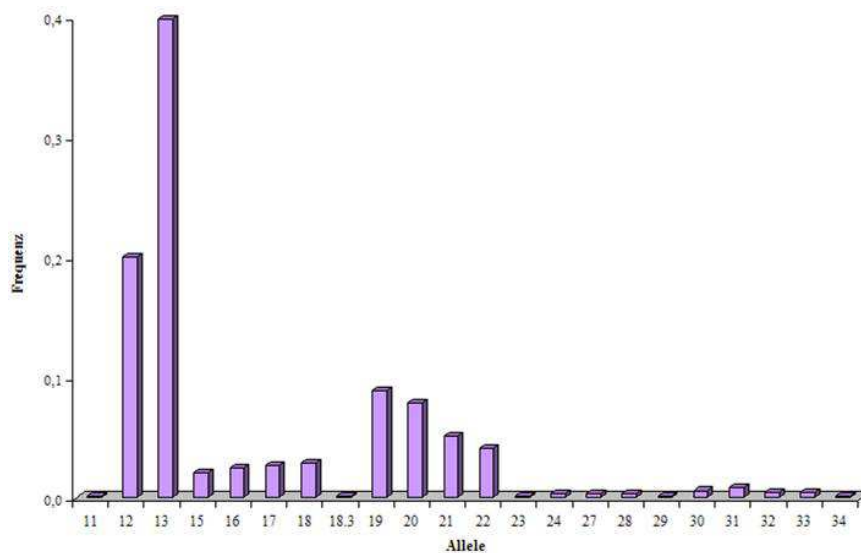


Abb. 41: Allelfrequenzen des Markersystems F27

Die kleineren Allele des Systems werden überwiegend stark repräsentiert, während die größeren Allele in der getesteten Stichprobe eher selten in Erscheinung treten. Unter 22 Allelen konnte ein Zwischenallel detektiert werden (Allel 18.3).

In der Allelleiter des Systems F27 sind 11 der detektierten Allele enthalten (Abb. 42).

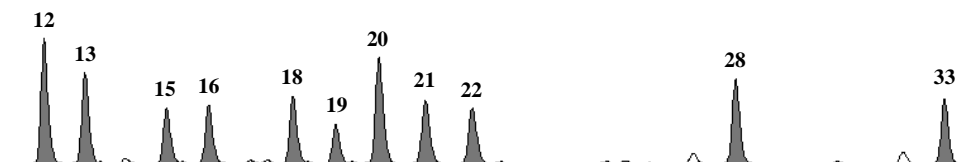


Abb. 42: Allelleiter des Systems F27 (Verdünnungsstufe 1:1.000)

Die reamplifizierten 1:100- und 1:1.000-Verdünnungsstufen der Allelleiter wurden separat aufgereinigt. Dargestellt ist die Allelleiter der 1:1.000-Verdünnung.

3.4.2.2 STR-Marker F141_vkz3

Das Markersystems F141_vkz3, welches u. a. durch Müller et al. [54] beschrieben wurde, ist auf Chromosom A1 zu finden.

Die Reduktion des Produktbereiches um 85 bp erfolgte durch einen neu synthetisierten R-Primer. Der Produktbereich lag bei 193 - 255 bp. Die Lage des R-Primers ist in der unten dargestellten Sequenz aus der NCBI-Datenbank in Pink hervorgehoben (Accession-N^o: AY988111).

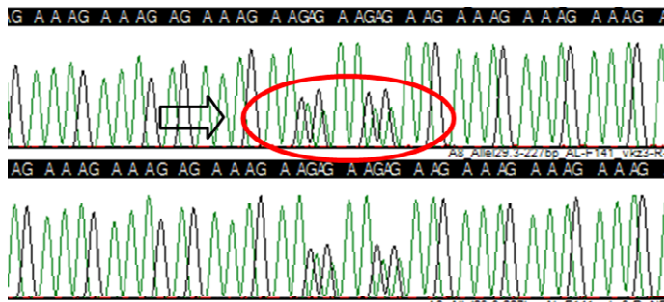


Abb. 43: Teilabschnitt aus der Sequenz des Allels 29.3 (Markersystem F141_vkz3)

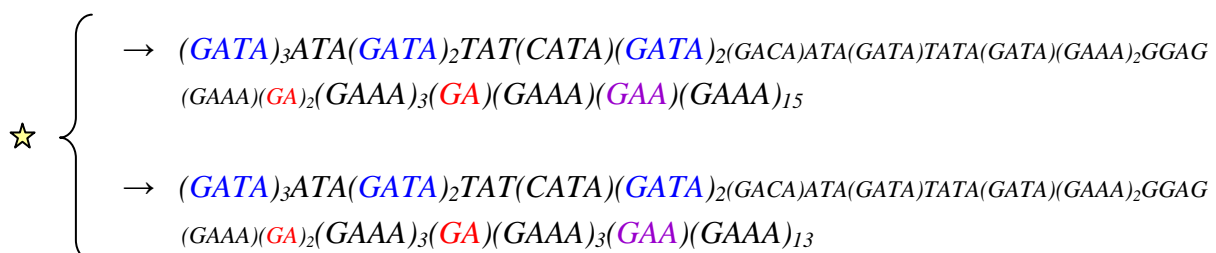
Ein Einschub der zusätzlichen Basen (A) und (G) ist bei der Sequenz des Allels 29.3 ab der Base 148 und 154 zu erkennen (rotes Oval). Diese Überlagerung stört das sonst gleichmäßige Bild der umliegenden Basen, die eindeutig detektiert und zugeordnet werden konnten.

Die Berücksichtigung aller detektierten Basen hätte dazu geführt, dass das Produkt der Katze Ktz017_Sp um zwei Basen zu lang für das entsprechende Allel gewesen wäre. Im Vergleich zu der durch die Elektrophorese erfassten Produktgröße und den anderen Produkten des Systems konnte dies jedoch nicht übereinstimmen.

Die Sequenzierung wurde daraufhin insgesamt vier Mal wiederholt und jeweils darauf geachtet, dass ein neues PCR-Produkt für jeden Ansatz verwendet wurde. Das in Abb. 43 dargestellte Bild des Elektropherogramms zeigte sich in allen Ansätzen und lag in beiden Strängen vor (Sequenzierung sowohl mit dem F-Primer als auch mit dem R-Primer).

Unter Einbeziehung aller Sequenzen der bisher sequenzierten Allele des Systems konnte schließlich die Überlagerung zweier Sequenzen mit unterschiedlichen Repeatzusammensetzungen identifiziert werden, die nachfolgend dargestellt ist.

Ktz017_Sp → 227,49 bp → ☆



Somit konnte eine Homoplasie in einem sonst homozygot erscheinenden Allel identifiziert werden.

Die Gesamtrepeatstruktur des Markersystems F141_vkz3 ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte folgendermaßen darstellen (kursiv/fett):

ERGEBNISSE

GAGACTAGATGGAAGGATGAAGATATATAGATGATTAGATGCATGGGTG(GATA)_d(ATA)_e
 (GATA)_f(TAT)(CATA)_g(GATA)_h(GACA)ATA(GATA)(TA(N)A)(GATA)(GAAA)₂GGAG(GAAA)(GA)₂
 (GAAA)_i(GA)_j(GAAA)_k(GAA)_m(GAAA)_n(GTAA)_oGTTAGTTGAGAGAGACATGGTACT

Eine Zusammenfassung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 21 gegeben.

Tabelle 21: Allelnomenklatur des STR-Markers F141_vkz3

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	m	n	o	Anzahl bp (tatsächlich)
22	2	1	1	1	2	2	1	12				200
23	2	1	1	1	2	2	1	13				204
	3	1	2	1	1	3	1	10			1	
23.2	3	1	2	1	2	14						206
24	2	1	1	1	2	2	1	14				208
	3	1	2	1	1	3	1	11			1	
25	2	1	1	1	2	2	1	15				212
	3	1	2	1	2	3	1	12				
25.2	3	1	2	1	2	16						214
26	2	1	1	1	2	2	1	16				216
27	3	1	2	1	1	3	1	15				220
	2	1	1	1	2	2	1	17				
28	3	1	2	1	1	3	1	16				224
28.3	3	1	2	1	2	3	1	3	1	12		227
29	3	1	2	1	2	3	1	16				228
	3	1	2	1	1	3	1	17				
29.3	3	1	2	1	2	3	1	1	1	15		231
	3	1	2	1	2	3	1	3	1	13		
30.3	3	1	2	1	2	3	1	1	1	16		235
	3	1	2	1	2	3	1	3	1	14		
31.3	3	1	2	1	2	3	1	3	1	15		239
32.3	3	1	2	1	2	3	1	3	1	16		243
	3	1	2	1	2	3	1	3	1	16		
33.3	3	1	2	1	2	3	1	3	1	17		247
36.3	3	1	2	1	2	3	1	3	1	20		259

Das Markersystem F141_vkz3 wies 24 Allele auf, von denen 13 Zwischenallele darstellten (insgesamt vier .2-Zwischenallele und neun .3-Zwischenallele). Die am häufigsten vertretenen Produkte der Stichprobe waren die Allele 23, 24, 25, 26 und 27 ($0,07 < f < 0,23$). Auch für dieses System wurden die größeren Allele im Vergleich zu den kleineren Allelen mit einer geringeren Frequenz erhalten (Abb. 44).

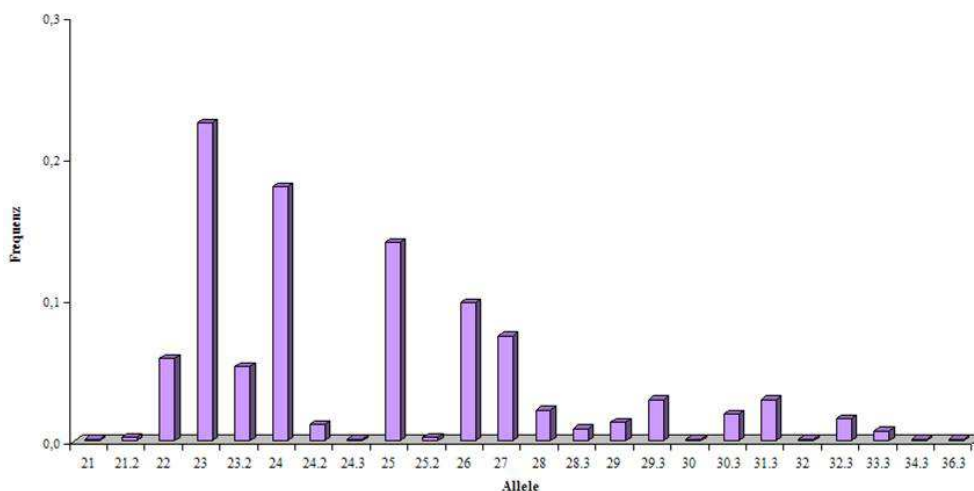


Abb. 44: Allelfrequenzen des Markersystems F141_vkz3

Die Allele 23, 24, 25, 26 und 27 treten von den 24 Allelen des Markers am häufigsten auf. Insgesamt wurden 13 Zwischenallele erhalten, die sich über den gesamten Produktbereich erstrecken.

In der Allelleiter sind 16 Allele enthalten. Da die größeren Produkte des Systems hauptsächlich Zwischenallele darstellen, wurden diese weitestgehend für die Leiter berücksichtigt (Allele 23.2, 28.3, 29.3, 30.3, 31.3, 32.3, 33.3 und 36.3) (Abb. 45).

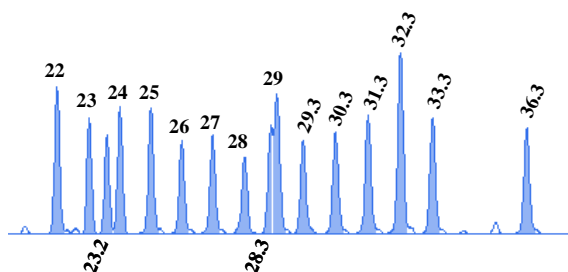


Abb. 45: Allelleiter des Systems F141_vkz3

Die reamplifizierten 1:100- und 1:1.000-Verdünnungsstufen wurden vereint und gemeinsam aufgereinigt.

3.4.2.3 STR-Marker FCA747_vkz2

Das Markersystem FCA747_vkz2, das durch Menotti-Raymond et al. [53,138] beschrieben wurde, ist auf Chromosom D4 lokalisiert.

Das System wies mit den in der Literatur angegebenen Primern nur eine sehr schwache bis gar keine Amplifikation auf. Um diese Probleme bei der Amplifikation zu umgehen und um das System zu verkürzen, wurden sowohl der F- als auch der R-Primer näher an die Repeatstruktur herangesetzt. Mit den neu synthetisierten Primern (in Pink dargestellt, s. u.) wurde ein um 34 bp verkürzter Produktbereich von 100 - 134 bp detektiert. Die dargestellte Sequenz wurde aus der NCBI-Datenbank entnommen (Accession-Nº: AY988147).

```
TTACT CCTGGTAAACA ACTCAGTAAAAGATGTA GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
GATAGATA GACAGACAGACAAAGGAAAT CCTTAGAAACAGAAAGTAGACTAATGGT
```

Die beschriebene (GATA)-Repeatstruktur wurde in allen sequenzierten Produkten beobachtet. Weitere variierende Elemente traten nach dem eigentlichen (GATA)-Repeatblock auf und wurden mit in die Nomenklatur einbezogen. Eine (GACA)-Einheit konnte in allen Produkten erhalten werden. Folgte zwei dieser Einheiten aufeinander, trat direkt nachfolgend ein (GGTA)-Element auf. Das Produkt des Allels 13.1 zeigte eine Abwandlung, indem auf zwei (GACA)-Einheiten eine Struktur aus den Basen (GGA(N)A) folgte. Die Base (N) weist darauf hin, dass an dieser Position die Basen (T) und (C) überlappend dargestellt wurden. Die nachfolgend zusätzliche Base (A) bedingte das detektierte Zwischenallel. Homoplasien wurden innerhalb der Allele 12, 13 und 14 festgestellt, die meist eine unterschiedliche Anzahl an (GA)-Elemente beinhalteten, die in der Sequenz vor den (GACA)-Einheiten in Erscheinung traten.

Die Repeatstruktur des Markersystems FCA747_vkz2 ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte wie folgt darstellen (kursiv/fett):

F-Primer

```
CCTGGTAAACA ACTCAGTAAAAGATGTA(GATA)d(GA)e(GACA)f(GGA(N)A)g(GGTA)hAAGGA  
AATCCTTAGAAACAGAAAGTAGACTAATGG
```

R-Primer

Eine Zusammenfassung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 22 zu finden.

Tabelle 22: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA747_vkz2

Allel	d	e	f	g	h	N	Anzahl bp (tatsächlich)
10	9		1				103
11	10		1				107
12	10	2	1				111
	11		1				
13	10	4	1				115
	11	2	1				
13.1	10		2	1		T/C	116
14	12	2	1				119
	11	4	1				
15	12		2		1		123
16	13		2		1		127
17	14		2		1		131

Für das Markersystem F747_vkz2 konnten 10 Allele detektiert werden. Das häufigste Allel stellte Allel 11 dar ($f = 0,26$), gefolgt von den untereinander relativ gleichhäufig verteilten Allelen 12, 13, 14, 15 und 16 ($f = 0,12 - 0,15$). Ein Zwischenallel wurde beschrieben, welches in der Stichprobe selten auftrat (Allel 13.1) (Abb. 46).

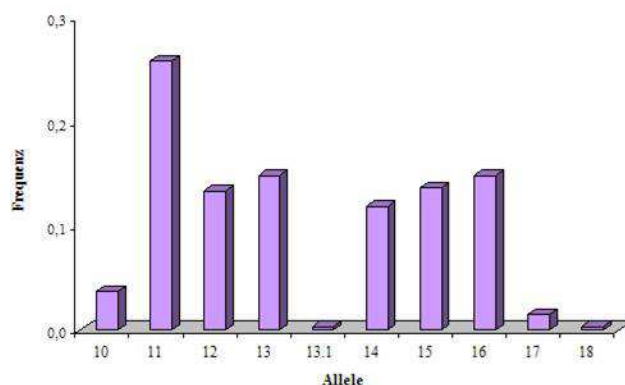


Abb. 46: Allelfrequenzen des Markersystems FCA747_vkz2

Das häufigste Allel des Markers ist durch das Allel 11 repräsentiert. Fünf weitere Allele wiesen eine in etwa gleichhäufige Verteilung auf (Allele 12, 13, 14, 15 und 16), während das Zwischenallel 13.1 des Systems nur selten in Erscheinung tritt.

Acht der insgesamt 10 detektierten Allele wurden für die Allelleiter des Systems berücksichtigt. (Abb. 47).

Repeatsequenz hinzuzufügen, da auch diese Variationen aufwiesen. Ein in allen sequenzierten Produkten vorhandener (TTTTT)-Stretch, der in der oberen Sequenz mit (TTTGT) beschrieben ist, trennte den (TTTA)-Repeatblock mit seinen Varianten von den (GA)/(GC)-Repeateinheiten. Dieser Stretch wurde trotz seiner Konstanz mit in die Nomenklatur einbezogen, da so die Anzahl an Zwischenallelen reduziert werden konnte.

Zudem konnten Unterschiede in der Basenpaarzusammensetzung außerhalb der beiden Repeatregionen beobachtet werden. Nahe des R-Primers fanden sich entweder vier aufeinander folgende (GA)-Einheiten oder die Kombination (GA)GAAA(GA). Des Weiteren wurden drei Positionen, die Basenpaaraustausche aufwiesen (N), detektiert. Die erste Position wies überwiegend die Base (C) auf, wurde aber auch durch die Base (T) repräsentiert. Die zweite Position variierte zwischen den Basen (A) oder (G), wobei letztere häufiger in Erscheinung trat. Die dritte Position wurde entweder hauptsächlich durch die Base (G) repräsentiert oder durch die Basen (G/C), wobei sich diese nur überlappend darstellten. Diese Variationen und Nukleotidaustausche wurden registriert, aber nicht weiter berücksichtigt.

Alle Varianten von möglichen Zwischenallelen konnten detektiert (z. B. 26.1, 24.2 und 21.3) und Homoplasien in mehreren Allelen beschrieben werden.

Die Gesamtrepeatstruktur des Markersystems F37_vkz5 ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte folgendermaßen zusammenfassen (kursiv/fett):

F-Primer

**CGCCTTTCTCACATTACCATTCATCCTGCCAACCCAGAGTGGG(N)₁CATTCAGAAGGTGATA
GGA(TTTG)_d(TTTA)_e(TTTTA)_f(TTTA)_g[(CTTA)(TTCA)]_h(TTTA)_i(TGTA)_j(TTTA)_k[TG(TTTA)₂]_m
(TTTT)_n(GA)_o(GC)_p(GA)_q(GC)_rATGAGCAGGGGAGGGGCAGAGA(N)₂AGAGGGA(N)₃AC**ACAG**
AATCCGAAGCAGGCT**

R-Primer

Eine zusammenfassende Darstellung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 23 gegeben.

ERGEBNISSE

Tabelle 23: Allelnomenklatur des STR-Markers F37_vkz5

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	m	n	o	p	q	r	Anzahl bp (tatsächlich)
21	1	1	1	9					1	1	9	1			200
21.3	1			9					1	1	12	2	1	1	203
22	1	1	1	10					1	1	9	1			204
22.2	1	1	1	9					1	1	12	1			206
23	1	1	1	10					1	1	11	1			208
24	1	1	1	11					1	1	11	1			212
	1	1	1	11					1	1	11	1			
24.2	1	1	1	8					2	1	13	1			214
	1	1	1	9					1	1	16	1			
	1		1	9					1	1	17				
24.3	3			10					1	1	12	2	1	1	215
25.3	1	1	4	1	1	1	1	4	1	1	11	1			219
26.1	1	1	4	1	1	1	1	4	1	1	12	1			221
	1	1	4	1	1	1	1	4	1	1	12	1			
26.2	1	1	1	9					2	1	15	1			222
27.2	1	1	1	10					2	1	15	1			226

Der Marker wies für die vorliegende Stichprobe 16 Allele auf, von denen 10 Zwischenallele darstellten. Bei den Allelen 22 ($f = 0,36$) und 25.3 ($f = 0,20$) handelt es sich um die am häufigsten vertretenen Allele. Die dazwischen liegenden Allele traten im Gegensatz dazu in einem geringeren Umfang auf (Abb. 48).

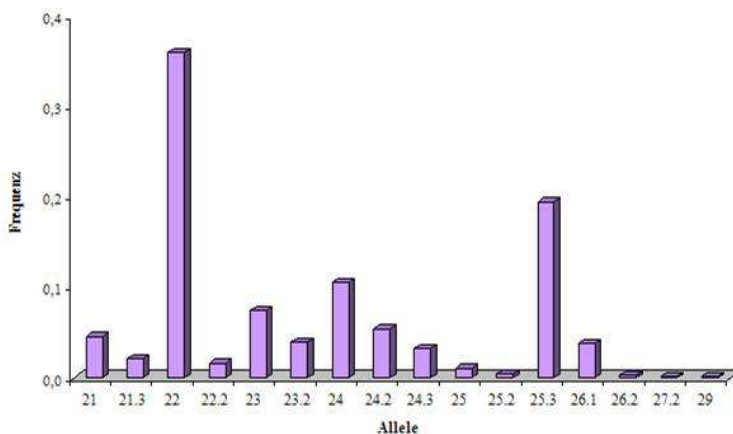


Abb. 48: Allelfrequenzen des Markersystems F37_vkz5

Die beiden am häufigsten repräsentierten Allele 22 und 25.3 liegen in der Nähe der Randbereiche des Systems. Gerade die größeren Allele mit Ausnahme von Allel 25.3 sind im Vergleich zu den restlichen Allelen in der Stichprobe in einem weitaus geringeren Umfang vertreten.

In der Allelleiter des Systems sind acht der bisher 16 detektierten Allele enthalten. Da unterschiedliche Zwischenallele auftraten, wurden diese ebenfalls für die Leiter berücksichtigt (Allele 24.2, 25.3, 26.1 und 27.2) (Abb. 49).

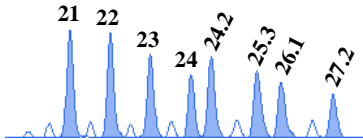


Abb. 49: Allelleiter des Systems F37_vkz5

Die reamplifizierten 1:100- und 1:1.000-Verdünnungen wurden vereint und zusammen aufgereinigt.

3.4.3.2 STR-Marker FCA559

Das Markersystem FCA559 ist auf dem Chromosom B1 lokalisiert. Die in der NCBI-Datenbank hinterlegte Sequenz des Markers stellt sich folgendermaßen dar (F- und R-Primer in Türkis hervorgehoben; Accession-N^o: AF130659):

```
GGTAAAAAGAAATATGCCAAAATGTTCAAGAGTGGTTATCACTAGAAAGAAAGAAAGAAAGGA
AGAAAGAAAGCAAGAAAGCAAGAAAGCAAGAAAGCAAGAAAACAAAGAAAGCAAGAAAGCAAGA
AAGAAAANAGAAAGAAAGANAGANAGAAAATAAGANAGGAAATGTTGATGCTCATCAAGCCAA
AACTTA
```

Die Repeatstruktur wurde mit (GAAA)_{compl} beschrieben [53,138], was eine Variation des (GAAA)-Repeats durch unterschiedliche Basenaustausche voraussetzt (siehe die farblich markierten Repeateinheiten in der oberen Darstellung).

Der beobachtete Produktgrößenbereich des Systems lag bei 103 - 195 bp.

Lediglich die sequenzierten Produkte der Allele 12, 13, 14 und 16 wiesen einen reinen, sich tandemartig wiederholenden (GAAA)-Repeat auf. Das Repeatmuster der übrigen Allele stellte sich mit zahlreiche Varianten des Grundmusters dar. Elemente wie (GGAA)- oder (GCAA)-Einheiten unterbrachen auf unterschiedlichste Weise immer wieder die zusammenhängende Sequenz der (GAAA)-Grundmotivs, sodass eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Allelen beobachtet werden konnte.

In den sequenzierten Produkten der Allele 28 - 32 wurde eine (ACAA)-Struktur detektiert, die nur in diesen Alleln vertreten war und ebenfalls in der Sequenz der NCBI-Datenbank zu

ERGEBNISSE

finden ist. Homoplasien konnten nicht festgestellt werden. Ein Zwischenallel wurde aufgrund einer Variation an der Position der zuvor genannten (ACAA)-Einheit erhalten. Das Allel 18.2 wies an deren Stelle einzig die Basen (AA) auf. Im weiteren Verlauf wurde ein weiteres Zwischenallel detektiert, das jedoch nicht sequenziert wurde (Allel 19.2).

Der Repeatbereich des Markersystems FCA559 ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte wie folgt zusammenfassen (kursiv/fett):

F-Primer

**GCCAAAATGTTCAAGAGTGGTTATCACTA(GAAA)_d(GGAA)_e(GAAA)_f(GCAA)_g(GAAA)_h
 [(GCAA)(GAAA)]_i(AA)_j(ACAA)_k[(GAAA)(GCAA)]_m(GAAA)_nATAAGAAAGGAAATGTTGATGCTC
 ATCAAGCCAAAA**

R-Primer

Eine Darstellung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 24 wiedergegeben.

Tabelle 24: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA559

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	m	n	Anzahl bp (tatsächlich)
12	12										113
13	13										117
14	14										121
16	16										129
18	3	1	2	1	11						137
18.2	4	1	2	2	5		1			4	139
25	3	1	2			5				8	165
28	4	1	2			4		1	2	8	177
29	4	1	2			4		1	2	9	181
30	6					4		1	2	11	185
31	6					4		1	2	12	189
32	6					4		1	2	13	193
33	6					7				13	197
34	12					6				10	201

Für das Markersystem FCA559 wurden 21 Allele erhalten, von denen zwei Produkte Zwischenallele darstellten (Allele 18.2 und 19.2). Bei denen am häufigsten in der Stichprobe vertretenen Allelen handelte es sich um die Allele 28 ($f = 0,28$) und 30 ($f = 0,26$). Insgesamt wurden acht Allele erfasst, die nur in einer geringen Anzahl unter den getesteten Individuen auftraten und sporadisch zwischen den häufigeren Allelen verteilt lagen (Abb. 50).

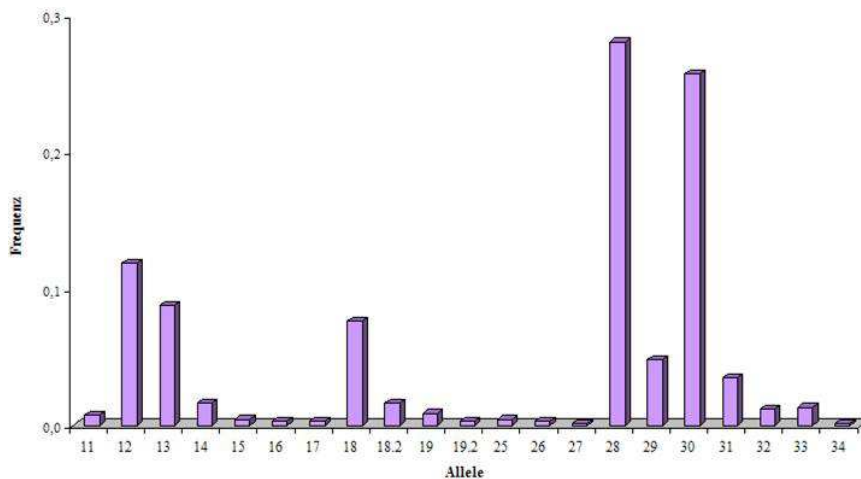


Abb. 50: Allelfrequenzen des Markersystems FCA559

Die Allele 28 und 30 stellen die beiden am häufigsten detektierten Allele des Systems dar.

Die beiden beobachteten Zwischenallele liegen im mittleren Größenbereich des ermittelten Produktbereichs.

Die Allelleiter des Systems beinhaltet insgesamt 13 Allele (Abb. 51).

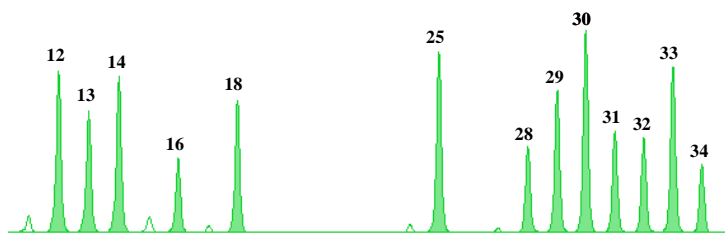


Abb. 51: Allelleiter des Systems FCA559

Die Verdünnungsstufen von 1:100 und 1:1.000 wurden vereint und gemeinsam aufgereinigt.

3.4.3.3 STR-Marker FCA733

Das Markersystem FCA733 befindet sich auf Chromosom B2. Die Primersequenzen in der unteren Sequenz entsprechen denen nach Müller et al. [54] (in Türkis hervorgehoben). Die Sequenz wurde aus der NCBI-Datenbank entnommen (Accession-N^o: AY988134).

AAA **GAAGATGTGGGATAGATACACCAATA** **GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA**
GATAGATA CATA CATA CATA CATA GATAGATACATAGATAGATA CATA GATACATAGATAGATAC
 ATAGATAGACAGACT **GAGAGACAGTGGGAATATTACTCAG**CCAT

Mittels dieser Primer wurde ein Produktgrößenbereich von 101 - 202 bp detektiert.

ERGEBNISSE

Der in der Literatur beschriebene Repeat lautete (GATA)_x. Die Sequenzanalyse ergab zum einen eine reine tandemartige Abfolge von (GATA)-Einheiten gefolgt von Bereichen, in denen diese Abfolge durch Elemente wie (CATA) oder (GA) unterbrochen wurde (in der oberen Sequenz unterstrichen dargestellt). Dies geschah auf unterschiedlichste Weise, sodass zwischen den Allelen verschiedenste Kombinationen zu finden waren. Zwischenallele wurden detektiert und basierten auf einer sich dem reinen (GATA)-Repeatbereich anschließenden (GA)-Einheit (Allele 29.2 – 32.2). Homoplasien innerhalb der sequenzierten Allele wurden nicht festgestellt.

Die Repeatstruktur des Markersystems FCA733 ließ sich nach Analyse der sequenzierten Produkte folgendermaßen darstellen (kursiv/fett):

F-Primer

**GAAGATGTGGGATAGATACACCAATA(GATA)_d(GA)_e(CATA)_f(GATA)_g(CATA)_h(GATA)_i
 [(CATA)(GATA)_j](GATA)_k[(CATA)(GATA)₂]_l[(CATA)(GATA)_n](CATA)_o(GATA)_p(GA)_qGACAGAC
 TGAGAGACAGTGGGAATATTACTCAG**

R-Primer

Eine Zusammenfassung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 25 wiedergegeben.

Tabelle 25: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA733

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	m	n	o	p	Anzahl bp (tatsächlich)
11	9		1									2	102
12	10		1									2	106
13	11		1									2	110
15	13		1									2	118
22	9		1	1	1	2				2	1	2	146
23	10		1	1	1	2				2	1	2	150
24	11		1	1	1	2				2	1	2	154
25	10		3	2	1	1		1		1	1		158
26	11		3	2	1	1		1		1	1		162
27	11		4	2	1	1		1		1	1		166
28	13		3	2	1	1		1		1	1		170
29	14		3	2	1	1		1		1	1		174
29.2	9	1		3				3	2	2	1	2	176
30.2	10	1		3				3	2	2	1	2	180
31.2	11	1		3				3	2	2	1	2	184
32.2	12	1		3				3	2	2	1	2	188
34	11					3	3	2	2	2	1	2	194
35	12					3	3	2	2	2	1	2	198

Das Markersystem wies in der vorliegenden Stichprobe insgesamt 31 Allele auf. Zwischenallele traten ab dem Allel 26 auf und waren bei jedem der größeren Allele vertreten (Ausnahme Allel 35). Die Allele 23, 26 und 27 wurden durch die meisten Individuen repräsentiert ($0,13 < f < 0,17$), wobei die Allele 23 und 26 identische Frequenzen aufwiesen (Abb. 52).

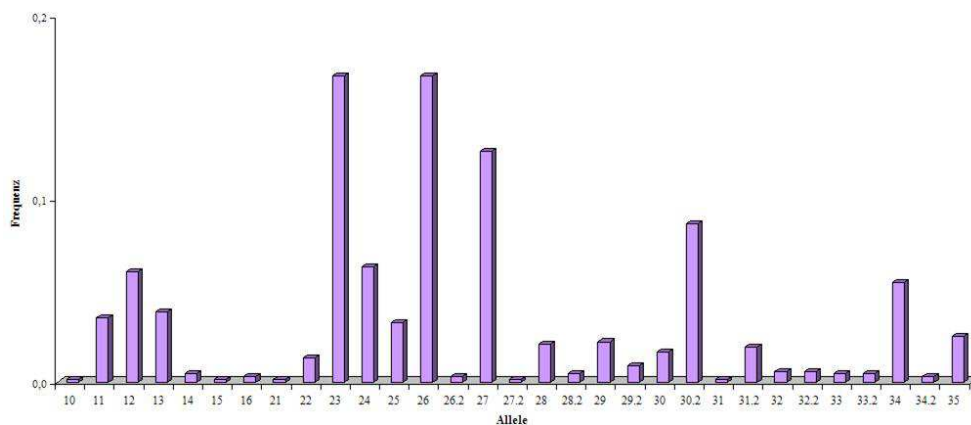


Abb. 52: Allelfrequenzen des Markersystems FCA733

Das Markersystem stellt sich mit 31 Allelen dar. Zu den häufigsten Allelen zählen die Allele 23, 26 und 27. Insgesamt neun Zwischenallele treten auf, die durchweg durch die größeren Allele repräsentiert werden.

In die Allelleiter wurden 15 Allele aufgenommen. Unter den größeren Allelen traten gehäuft Zwischenallele auf, die entsprechend berücksichtigt wurden, um eine korrekte Zuordnung gewährleisten zu können (Allele 29.2, 30.2, 31.2 und 32.2) (Abb. 53).

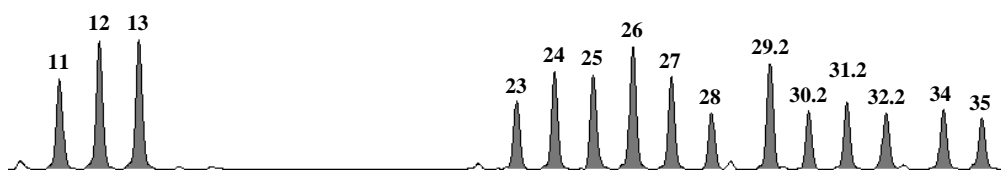


Abb. 53: Allelleiter des Systems FCA733

Die reamplifizierten Verdünnungen von 1:100 und 1:1.000 wurden vereint und aufgereinigt.

R-Primer

GGAACACCATGTTGGGCTATTGTTAGA(A)_d(GAAA)_e[(GAAAAA)(GAAA)]_f(GA)_g(GAAAAAAA)_h
(GAAA)_i(GAA)_j(GAAA)_k(GAA)_m(GAAA)_nGAAAGGTTCTTATGCGTTGTCA

F-Primer

Eine Zusammenfassung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 26 wiedergegeben.

Tabelle 26: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA742_vkz

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	m	n	Anzahl bp (tatsächlich)
15.1	1	2	1	1		10					106
17.1	1	2	1	1		12					114
18	1	2	1	1			1	12			117
18.1	1	2	1	1		13					118
18.2	1	2	1		1	7	1	4			119
19	1	2	1	1			1	13			121
19.1	1	2	2			12					122
20	1	2	2			8	1	4			125
21	1	2	2			9	1	4			129
22	1	2	2			10	1	4			133
23	1	2	2			11	1	4			137
24	1	2	2			12	1	4			141
25	1	2	2			13	1	4			145
26	1	2	2			14	1	4			149
26.3	1	2	1	1		1	1	15	1	4	152

Von den 24 detektierten Allelen des Systems FCA742_vkz stellten 12 Zwischenallele dar, die in der Stichprobe unterschiedlich stark vertreten waren ($0,001 = f < 0,070$). Das Allel 21 war am häufigsten vertreten ($f = 0,26$), gefolgt von den ungefähr gleichstark repräsentierten Allelen 20, 22 und 23 ($0,10 < f < 0,14$) (Abb. 54).

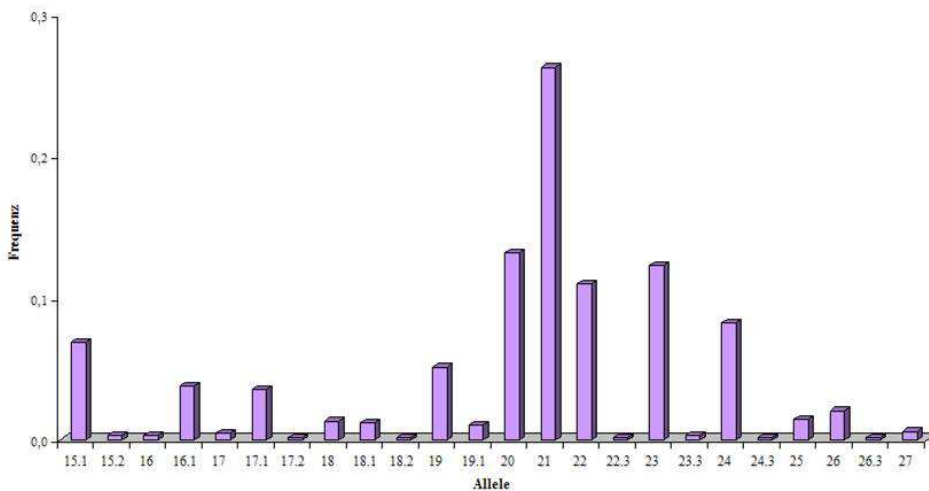


Abb. 54: Allelfrequenzen des Markersystems FCA742_vkz

Das Markersystem weist 22 Allele und davon 12 Zwischenallele auf. Deutlich zeigt sich, dass Allel 21 am häufigsten vertreten ist. Nachfolgend mit relativ einander angeglichenen Frequenzen sind die Allele 20, 22 und 23 zu nennen.

Für die Allelleiter dieses Markersystems wurden 12 Allele ausgewählt. Da gehäuft Zwischenallele auftraten, wurden einige von diesen mit in die Leiter aufgenommen (Allele 15.1, 18.1 und 26.3) (Abb. 55).

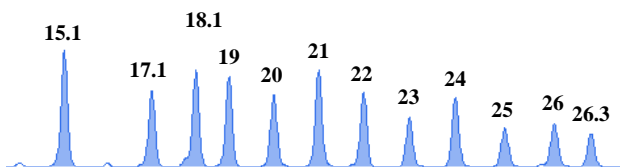


Abb. 55: Allelleiter des Systems FCA742_vkz

Von den reamplifizierten Verdünnungen war nur die 1:1.000-Verdünnungsstufe für die weitere Bearbeitung geeignet und wurde aufgereinigt.

3.4.3.5 STR-Marker FCA749_vkz

Das Markersystem FCA749 wurde sowohl von Menotti-Raymond et al. [53] als auch von Müller et al. [54] beschrieben und befindet sich auf Chromosom F2.

Die Repeatstruktur wurde in der Literaturstelle mit $((GATA)_{10}/(GATA)_6)$ beschrieben. Vergleicht man diese Angabe mit der unten dargestellten Referenzsequenz aus der NCBI-Datenbank (Accession-N^o: AY988149), stimmt diese Beschreibung mit dieser nur bedingt

ERGEBNISSE

Eine Darstellung der Allelnomenklatur ist in Tabelle 27 zu finden.

Tabelle 27: Allelnomenklatur des STR-Markers FCA749_vkz

Allel	d	e	f	g	h	i	j	k	m	n	o	p	N ₁	N ₂	Anzahl Bp (tatsächlich)
7.3	7											1		A	81
22	10			1	7							1		A	138
26	11			1	10							1		A	154
30	11			1	10						1	1	C	G	170
	10		1	1	8						1	1	C	G	
31	11			1	11						1	1	C	G	174
33	8		2	1	10						1	1	G	G	182
34	11		1	1	10			1			1	1	G	G	186
35	9		2	1	11						1	1	G	G	190
36	10	1	1	1	10			2			1	1	G	G	194
37	12		1	1	12			1			1	1	G	G	198
	11		2	1	10			1			1	1	G	G	
38	11		2	1	11			1			1	1	G	G	202
	10		2	1	12			1			1	1	G	G	
39	11		2	1	12			1			1	1	G	G	206
40	11		2	1	13			1			1	1	G	G	210
	15		1	1	12			1			1	1	G	G	
42	13		2	1	13			1			1	1	G	G	218
48.1	7		1	1	10	2	1	1	1	9	1	1	C	G	243
49.1	7		1	1	11	2	1	1	1	9	1	1	C	G	247
	7		1	1	10	2	1	1	1	10	1	1	C	G	
50.1	7		1	1	12	2	1	1	1	9	1	1	C	G	251

Das Markersystem FCA749_vkz wies für die vorliegende Stichprobe 27 Allele auf. Insgesamt wurden neun Zwischenallele detektiert, bei denen es sich im kleineren Produktbereich um .3-Zwischenallele und im größeren um .1-Zwischenallele handelte. Das Allel 38 ist am häufigsten vertreten ($f = 0,31$), gefolgt von den Allelen 39 ($f = 0,17$) und 40 ($f = 0,10$). Auffällig ist, dass die Allele 7.3 bis 32.1 überwiegend selten repräsentiert sind (Allele 30 und 31 ausgenommen) (Abb. 56).

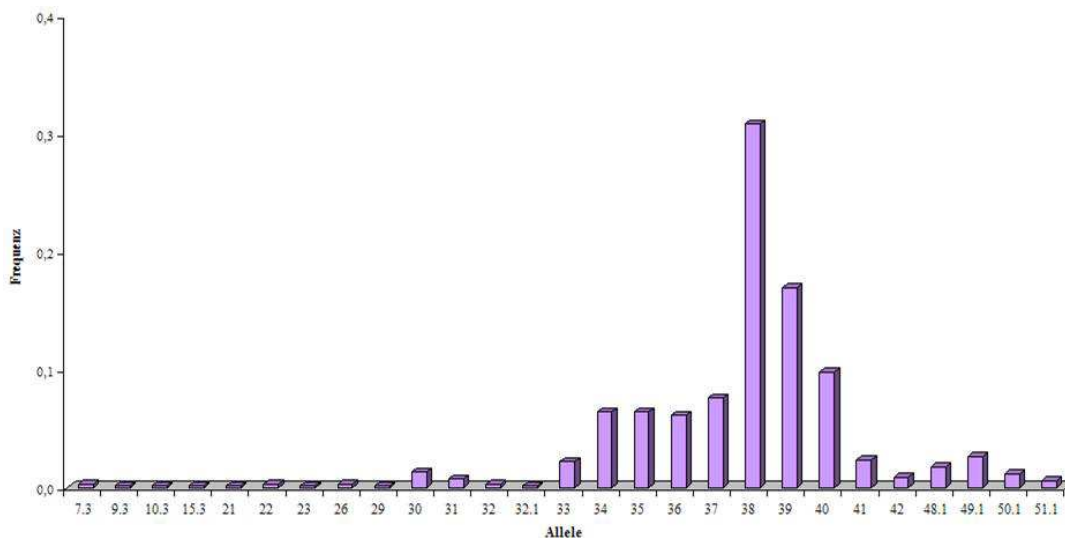


Abb. 56: Allelfrequenzen des Markersystems FCA749_vkz

Von den insgesamt 27 Allelen stellen neun Zwischenallele dar. Am häufigsten vertreten ist Allel 38. Nachfolgend sind die Allele 39 und 40 zu nennen. Gerade die kleineren Allele bis Allel 32.1 sind in der Stichprobe überwiegend sehr selten vertreten.

Zur Erstellung der Allelleiter des Systems wurden 17 Allele verwendet. Vorhandene Zwischenallele wurden aufgrund ihres häufigen Auftretens berücksichtigt (Allele 7.3, 48.1, 49.1 und 50.1) (Abb. 57).

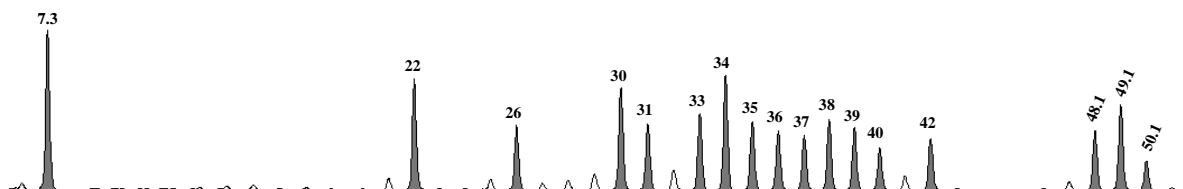


Abb. 57: Allelleiter des Systems FCA749_vkz (Verdünnungsstufe 1:1.000)

Die reamplifizierten 1:100- und 1:1.000-Verdünnungen wurden separat aufgereinigt. Dargestellt ist die Allelleiter der Verdünnungsstufe 1:1.000.

3.4.4 Allelleiter des geschlechtsspezifischen Markers Amelogenin

Der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin detektiert Sequenzabschnitte auf den Geschlechtschromosomen (X und Y). Es werden männchen- als auch weibchenspezifische Produkte detektiert (Abb. 58).

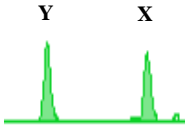


Abb. 58: Allelleiter des geschlechtsspezifischen Markers Amelogenin (Verdünnungsstufe 1:100)

Die reamplifizierten Verdünnungen von 1:100 und 1:1.000 wurden separat voneinander aufgereinigt. Zu sehen ist die Allelleiter der 1:100-Verdünnung.

3.5 Datenanalyse anhand der Frequenzdaten

Die Datenanalyse wurde mittels der Software Cervus 3.0.6 durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Optionen innerhalb des Programmes ausgewählt und eine Berechnung durchgeführt.

3.5.1 Heterozygotie

Die Merkmalskombinationen der 14 STR-Markensysteme von insgesamt 340 Hauskatzen wurden dazu verwendet, um u. a. die Frequenzdaten sowie die beobachtete Heterozygotie (H_o) und erwartete Heterozygotie (H_e) eines jeden Markers zu berechnen. Diese Werte geben an, wie häufig heterozygote Genotypen in der Population tatsächlich auftreten und wie häufig sie nach Hardy-Weinberg zu erwarten wären.

Die Werte zu den beobachteten und erwarteten Heterozygotien sind in Tabelle 28 aufgelistet.

Tabelle 28: Beobachtete und erwartete Heterozygotie aller STR-Markersysteme

System	H _o	H _e
F27	0.653	0.782
F37_vkz5	0.765	0.808
F42_vkz_neu	0.682	0.777
F141_vkz3	0.821	0.875
FCA441_vkz	0.600	0.741
FCA559	0.750	0.824
FCA730_vkz	0.668	0.734
FCA733	0.821	0.905
FCA734	0.732	0.852
FCA740_vkz	0.688	0.763
FCA742_vkz	0.759	0.870
FCA744_vkz	0.609	0.691
FCA747_vkz2	0.659	0.839
FCA749_vkz	0.694	0.848

Wie ersichtlich ist, wiesen die beobachteten Heterozygotien im direkten Vergleich zu den erwarteten Heterozygotien durchweg niedrigere Werte auf. Die minimalste Abweichung wurde für das System F37_vkz5 mit einem Wert von 0,043 erhalten, während das System FCA747_vkz2 eine maximale Abweichung von 0,180 zeigte.

3.5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes erfolgte sowohl unter Einbeziehung eines χ^2 -Tests und von p-Werten, anhand derer eine Aussage über die Erfüllung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes getätigt werden konnte. Betragen die Werte $p > 0,05$ liegen die untersuchten Systeme im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Sind p-Werte $< 0,05$ vorhanden, werden diese durch ein '*' gekennzeichnet. Je niedriger sich die Werte darstellen, desto mehr 'Sterne' treten auf ($p < 0,01$ '**', $p < 0,001$ '***') und desto weiter weichen die Systeme vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab.

Unter Berücksichtigung der Gesamtpopulation mit 340 Tieren lag bei sechs der Markersysteme keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vor (F37_vkz5, F141_vkz3, FCA559, FCA733, FCA740_vkz und FCA742_vkz). Vier der Systeme zeigen Hinweise auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit Werten von $p < 0,001$ ('***'; FCA441_vkz, FCA734, FCA747_vkz2 und FCA749_vkz). Für weitere drei Systeme wurden lediglich Werte von $p < 0,01$ berechnet ('**', F27, F42_vkz_neu und

FCA730_vkz). Das System FCA744_vkz zeigte mit einem Wert von $p < 0,05$ nur einen geringen Hinweis auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

In der Stichprobe von 340 Hauskatzen sind neben Daten von Mischlingen auch Daten reinrassiger Tiere enthalten, darunter eine Perser-Population, die 29 Tiere umfasst. Diese Daten wurden für eine erneute Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes herausgenommen und die Berechnung nunmehr mit 311 Hauskatzen durchgeführt. Dies bewirkte eine sichtliche Verbesserung der p-Werte, sodass anschließend das Markersystem FCA744_vkz_neu keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erkennen ließ. Das System F42_vkz_neu wies zudem nur noch eine geringe Abweichung (** (p < 0,05)) auf.

3.5.2 Frequenzanalyse

Die Software berechnete mittels der erhaltenen Frequenzdaten der 340 Katzen ebenfalls die Wahrscheinlichkeit für die zufällige Identität von nicht verwandten Individuen (combined non-exclusion probability for identity). Diese lag bei der Betrachtung von Merkmalskombinationen zweier zufällig aus der Population herausgezogenen Katzen bei $2,2 \times 10^{-18}$.

Des Weiteren wurde die Wahrscheinlichkeit für die zufällige Identität von Geschwistern (combined non-exclusion probability for sib-identity) angegeben. Diese Wahrscheinlichkeit betrug laut der Berechnung $6,4 \times 10^{-7}$.

3.6 Erstellung von Multiplexen

Verschiedenste Systemkombinationen der bereits beschriebenen STR-Marker wurden auf ihre Kompatibilität untereinander untersucht und wenn möglich für jeden Ansatz dieselben zu testenden Proben verwendet. Bei diesen handelte es sich um Gewebe- und Speichelproben sowie um eine Zellkulturprobe. Dieses Spektrum wurde gewählt, um möglichst verschiedenste Ausgangsmaterialien zu berücksichtigen.

Für die Tests lagen alle Marker mit einer FAM-Markierung vor. Es wurden sowohl Duplex-, Triplex-, Tetraplex- als auch Pentaplex-Ansätze getestet.

Das Augenmerk richtete sich zum einen auf die Reinheit der Multiplexe, d.h. wie klar und einheitlich wurden die Produktpeaks in ihrer Struktur dargestellt, waren Nebenprodukte oder Artefakte vorhanden, die eine Interpretation der Ergebnisse erschweren würden. Zum anderen wurde darauf geachtet, dass die Produktpeaks eines jeden Systems keine Imbalancen zeigten und auch die kombinierten Systeme eines Multiplexes ausgeglichene Peakintensitäten zueinander aufwiesen. Des Weiteren wurden solche Multiplexe bevorzugt, deren Allelpeaks bei einer eingesetzten DNA-Menge von 1 ng hohe Intensitäten zeigten.

Anhand des Tetraplexes Quadro-7 (Q7) soll exemplarisch ein Beispiel erläutert werden, das für eine weitere Verwendung nicht geeignet war.

Tetraplex: *Quadro-7 (Q7)*

Markersysteme: *F37_vkz5*
 F42_vkz_neu
 F141_vkz3
 FCA749_vkz

Die Systemkombination des Tetraplexes Q7 führte dazu, dass sich viele Nebenprodukte während der Amplifikation bildeten (mit NP gekennzeichnet). Diese waren zwar von den Intensitäten her sehr niedrig, störten aber das Gesamtbild des Multiplexes und könnten sich negativ auf die Interpretation von Ergebnissen auswirken. Zumal das System *F37_vkz5* Produkte aufweist, die in einem Bereich von bis zu 250 bp liegen, könnten so neue Allele eventuell nicht erkannt und somit nicht in die Populationsdatenbank aufgenommen werden. Des Weiteren waren die Peakintensitäten der einzelnen Markersysteme im Vergleich

ERGEBNISSE

zueinander zu unausgeglichen und die Produkthöhen des Markers F37_vkz5 ähnelten denen der Nebenprodukte teilweise zu stark (Abb. 59).

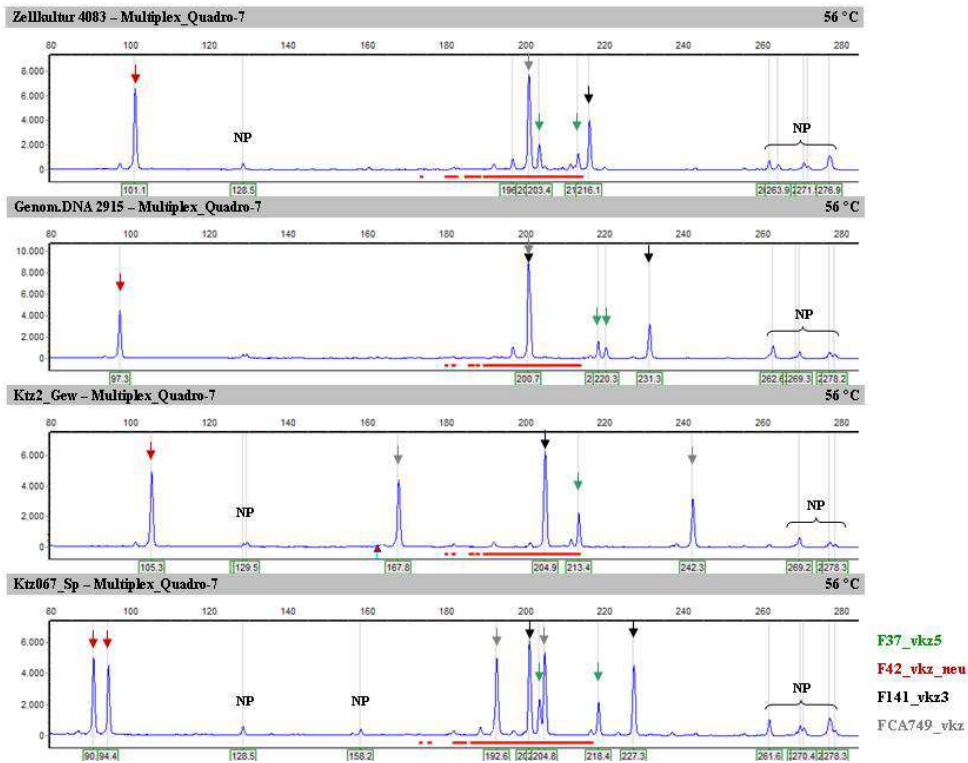


Abb. 59: Test Multiplex Quadro-7 (Q7)

Produktamplifikation unter Verwendung des Tetraplexes Quadro-7. Der Multiplexansatz zeigt viele Nebenprodukte, die von der Intensität her niedrig sind, sich jedoch störend auf die Interpretation der Ergebnisse auswirken können. Gerade auch im Hinblick auf den Marker F37_vkz5. Des Weiteren zeigen sich die Produktausbeuten der verwendeten Systeme zu unausgeglichen.

Produkte des Systems F37_vkz5 sind mit grünen, die des Systems F42_vkz_neu mit roten, die des Systems F141_vkz3 mit schwarzen und die des Systems FCA749_vkz mit grauen Pfeilen hervorgehoben.

NP = Nebenprodukt

Nachfolgend werden nur die Multiplexe beschrieben, die letztendlich für die weiterführende Untersuchung eingesetzt und in der späteren Fallarbeit Anwendung fanden. Die Auswahl fiel auf einen Duplex-, zwei Tetraplex- und einen Pentaplex-Ansatz.

Da in der Testphase alle Markersysteme mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert waren, mussten in den ausgewählten Multiplexen einige Marker aufgrund der Überschneidung von Systembereichen ummarkiert werden.

3.6.1 Duplex Duplex-1 (D1)

Markersysteme: FCA734
FCA740_vkz

Anmerkung: Die PCR wird mit einer Annealingtemperatur von 52 °C durchgeführt.

Nach der ersten Testphase zeigten die beiden Systeme ausgeglichene Produktintensitäten. Zudem waren die Produktausbeuten ausreichend hoch, um schwierigeres Spurenmaterial untersuchen zu können. Unspezifische Produkte konnten nicht beobachtet werden.

Beide Systeme wiesen einen überlappenden Produktbereich auf. Das System FCA734 behielt aufgrund der etwas geringeren Sensitivität die FAM-Markierung bei, während das System FCA740_vkz eine HEX-Markierung erhielt.

Auch nach der Ummarkierung des Systems FCA740_vkz stellten sich die beiden Systeme mit den verwendeten Testproben überwiegend ausgeglichen dar (Ausnahme: Zellkultur 4083; Abb. 60).

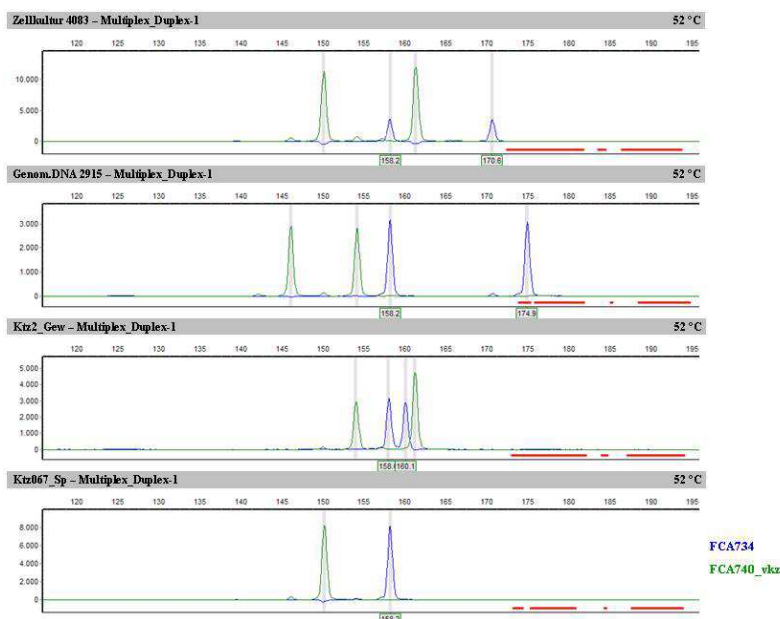


Abb. 60: Multiplex Duplex-1 (D1)

Dargestellt sind die erhaltenen Produkte nach Ummarkierung des Systems FCA740_vkz. Bis auf die Probe Zellkultur 4083 (erstes Elektropherogramm von oben) stellen sich die Allelpeaks der beiden Markersysteme ausbalanciert zueinander dar.

Blau: FCA734

Grün: FCA740_vkz

3.6.2 Tetraplex Quadro-6_Primer3 (Q6-P3)

Markersysteme: *F27*
 FCA730_vkz
 FCA742_vkz
 FCA744_vkz

Für den Multiplexansatz Q6-P3 wurden die Primerkonzentrationen der Systeme F27 und FCA730_vkz erhöht (F27: 0,6 µM; FCA730_vkz: 0,8 µM; FCA742_vkz/FCA744_vkz: 0,4 µM). Im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Tests dieses Multiplexes stellten sich die Peakintensitäten der einzelnen Marker mit Einsatz dieser Primerkonzentrationen weitaus ausbalancierter dar. Unspezifische Produkte wurden nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die vier Marker besaßen alle einen überlappenden Produktbereich, was es unumgänglich machte, auf ein 4-Farbsystem zurückzugreifen. Die verwendeten Fluorophore wurden alle bei der Fa. biomers.net bestellt, da diese im Gegensatz zu der Fa. TibMolBiol einen roten Fluoreszenzfarbstoff im Angebot führt.

Das System FCA742_vkz behielt die ursprüngliche FAM-Markierung bei. Entsprechend der steigenden Intensitäten wurde das System FCA730_vkz mit HEX markiert, das System F27 mit Atto 550 (gelbes Fluorophor) und das System FCA744_vkz mit Atto 565 (rotes Fluorophor). Der Vergleich mit dem ursprünglich blau markierten Multiplex zeigte, dass durch die Ummarkierung der F-Primer der Systeme F27 und FCA744_vkz eine Verschiebung der Produkte hin zu größeren bp-Einheiten stattgefunden hat. Die Verschiebung betrug für das gelb markierte System ca. 7 bp und für das rot markierte System ca. 5 bp. Diese variierten jedoch auch je nach Größe des Produktes. Es konnte beobachtet werden, dass sich bei größeren Produkten der Versatz der Basen verringerte.

Diese Verschiebung bewirkte, dass sich nun einzelne Allele des Systems F27 mit denen des Systems FCA742_vkz als auch mit denen des Systems FCA744_vkz direkt überlagerten (siehe Abb. 61; Zellkultur 4083, Genom. DNA 2915 und Ktz067_Sp). Bei der Auswertung muss darauf geachtet werden, dass die Auswertesoftware bei einer Produktüberlagerung alle Peaks erkennt und nicht einen fälschlicherweise als Durchschläger interpretiert (vermutlich den von der Intensität niedrigeren der beiden Peaks).

Des Weiteren wurde eine veränderte Darstellung der Peakstruktur des Systems FCA730_vkz (in grün) festgestellt. Diese zeigt zu Beginn der Peaks eine leicht hügelige Ausbuchtung. Versuche in Kombination mit den Primern der Firma TibMolBiol, mit denen der Multiplex zuvor getestet wurde (FAM-Markierung), führten zu keinem verbesserten Ergebnis. Auch eine

Erhöhung der dNTP-Konzentration von 200 μM auf 300 μM brachte keine Verbesserung. Ganz im Gegenteil, die Amplifikation wurde durch die Erhöhung sogar negativ beeinflusst. Für die Systeme F27 und FCA742_vkz wurden keine bzw. nur noch geringfügig Produkte amplifiziert (Daten nicht gezeigt). In späteren Läufen regulierte sich die Darstellung der Allelpeaks des Systems FCA730_vkz, indem diese keine Ausbuchtung mehr aufwiesen. Insgesamt stellte sich der Multiplex wie in dem Vorversuch mit hohen Peakintensitäten dar, die meist gut zueinander ausgeglichen waren (Abb. 61).

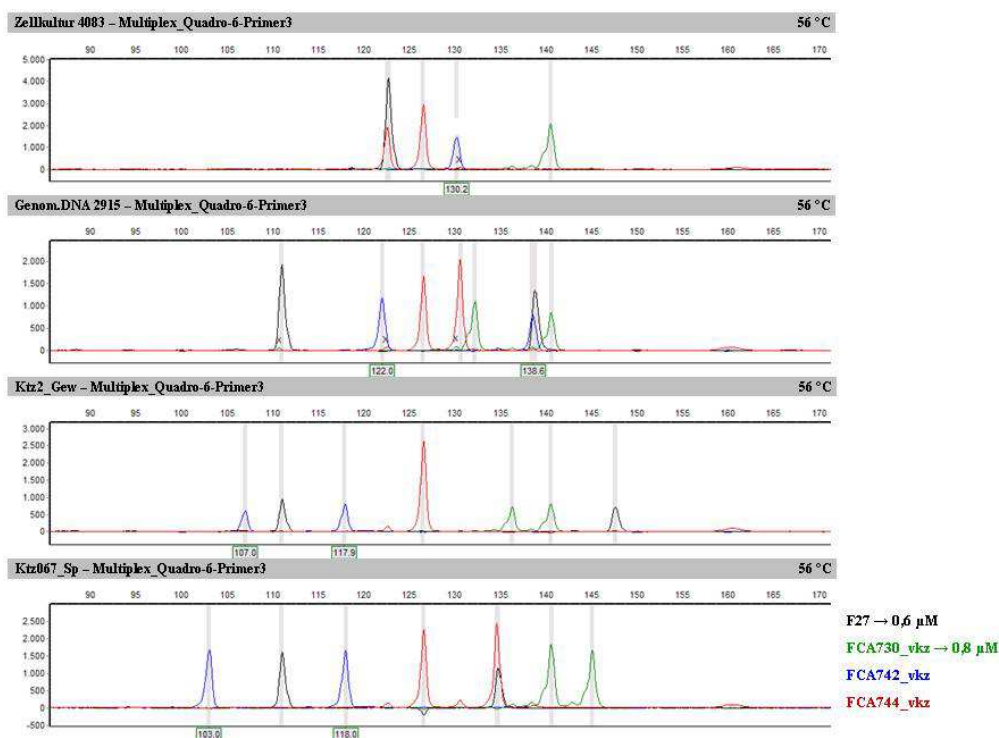


Abb. 61: Multiplex Quadro-6_Primer3 (Q6-P3)

Dargestellt sind die erhaltenen Produkte nach Ummarkierung der Systeme F27, FCA730_vkz, FCA742_vkz und FCA744_vkz. Die Ummarkierung führte zu veränderten Produktgrößen der Marker F27 und FCA744_vkz, wodurch es zu Überlagerungen von einzelnen Produktpeaks kommt (alle bis auf Ktz2_Gew; drittes Elektropherogramm von oben). Des Weiteren weisen die Peaks des Systems FCA730_vkz leicht hügelige Ausbuchtungen auf.

Eine gelbe Fluoreszenzmarkierung wird im Elektropherogramm in Schwarz dargestellt, damit diese besser erkennbar ist.

Blau: FCA742_vkz

Grün: FCA730_vkz

Schwarz: F27

Rot: FCA744_vkz

3.6.3 Tetraplex Quadro-10 (Q10)

Markersysteme: *F37_vkz5*
 FCA441_vkz
 FCA733
 FCA747_vkz2

Die in Kombination verwendeten Systeme des Multiplexes Q10 wiesen ein einheitliches Gesamtbild auf. Die Peakintensitäten als auch die Produktausbeuten lagen für alle Systeme in einem ähnlichen Bereich und waren gut zueinander ausbalanciert. Nebenprodukte wurden keine detektiert.

Drei der Markersysteme wiesen überlappende Produktbereiche auf. Aufgrund dessen wurde der Marker FCA747_vkz2 mit dem grünen Fluorophor HEX und der Marker FCA733 mit dem gelben Fluorophor BoTMR versehen.

Der Vergleich mit dem ursprünglich FAM-markierten Multiplex zeigte dieselben Ergebnisse in Bezug auf die Peakintensitäten als auch die Peakbalancen zwischen den einzelnen Systemen (Daten nicht gezeigt). Durch die farbliche Ummarkierung des Systems FCA733 mittels des gelben Fluorophors fand auch hier eine Verschiebung der Produktgrößen hin zu höheren bp-Bereichen statt (um ca. 6 bp; bei größeren Produkten nur noch um 4 - 5 bp). Trotz der Änderung der Produktgrößen konnte in den vier getesteten Proben keine Überlagerung der Allelpeaks festgestellt werden (Abb. 62).

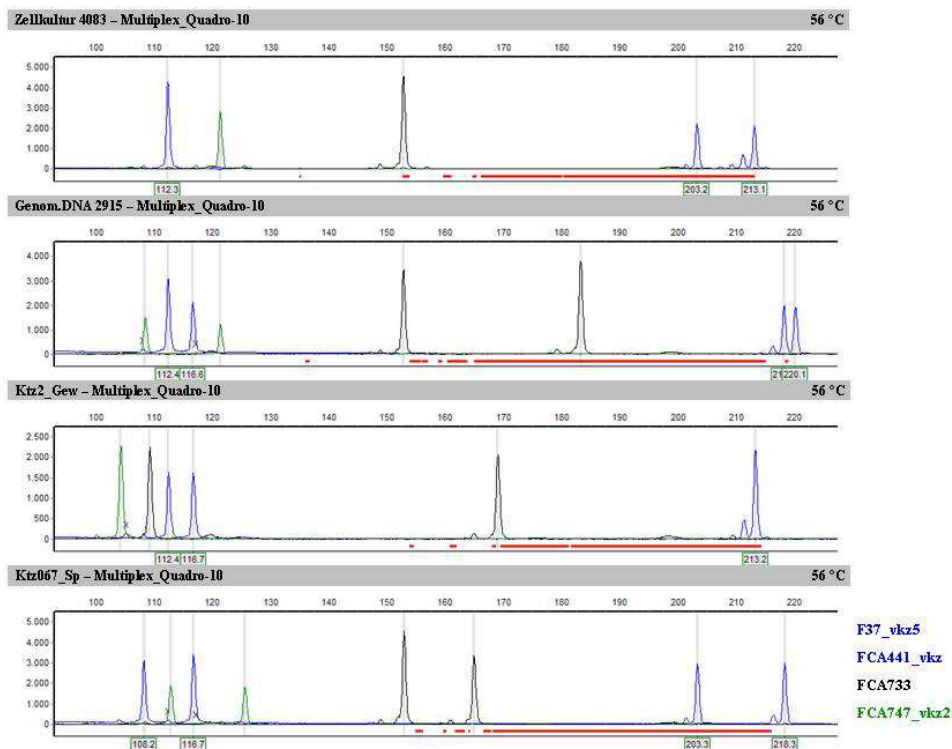


Abb. 62: Multiplex Quadro-10 (Q10)

Dargestellt sind die erhaltenen Produkte nach Ummarkierung der Systeme FCA733 und FCA747_vkz2. Die Ummarkierung des Systems FCA733 bewirkte eine Änderung der Produktgrößen, die in diesem Beispiel zu keiner Produktüberlagerung führte. Des Weiteren stellen sich die Allelpeaks der Marker überwiegend ausgeglichen dar.

Eine gelbe Fluoreszenzmarkierung wird im Elektropherogramm in Schwarz dargestellt, damit diese besser erkennbar ist.

Blau (Produkt-Peaks links): FCA441_vkz

Blau (Produkt-Peaks rechts): F37_vkz5

Schwarz: FCA733

Grün: FCA747_vkz2

3.6.4 Pentaplex Penta-6 (P6)

Markersysteme: *Amel*
F42_vkz_neu
F141_vkz3
FCA559
FCA749_vkz

Die Markersysteme des Multiplexes P6 zeigten hohe und ausgeglichene Peakintensitäten. Die Systeme F141_vkz3 und FCA749_vkz stellten sich im Vergleich zu den anderen drei

ERGEBNISSE

Markern nur minimal schwächer dar, wobei das System FCA559 die höchsten Intensitäten aufwies. Nebenprodukte wurden nicht detektiert.

Drei der fünf Markersysteme wurden farblich ummarkiert. Sowohl der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin als auch das System FCA559 erhielten eine HEX-Markierung, der Marker FCA749_vkz hingegen eine gelbe Farbmarkierung (BoTMR).

Auch hier ergab sich für das System FCA749_vkz eine Verschiebung der gelb markierten Produkte hin zu höheren bp-Bereichen (um ca. 5 bp; bei größeren Produkten nur noch ca. 4 bp). Eine Überlagerung von Allelpeaks ergab sich hierdurch nicht. Im Vergleich zu dem ursprünglich FAM-markierten Multiplex konnten für alle Marker dieselben Peakintensitäten und Systembalancen festgestellt werden (Abb. 63).

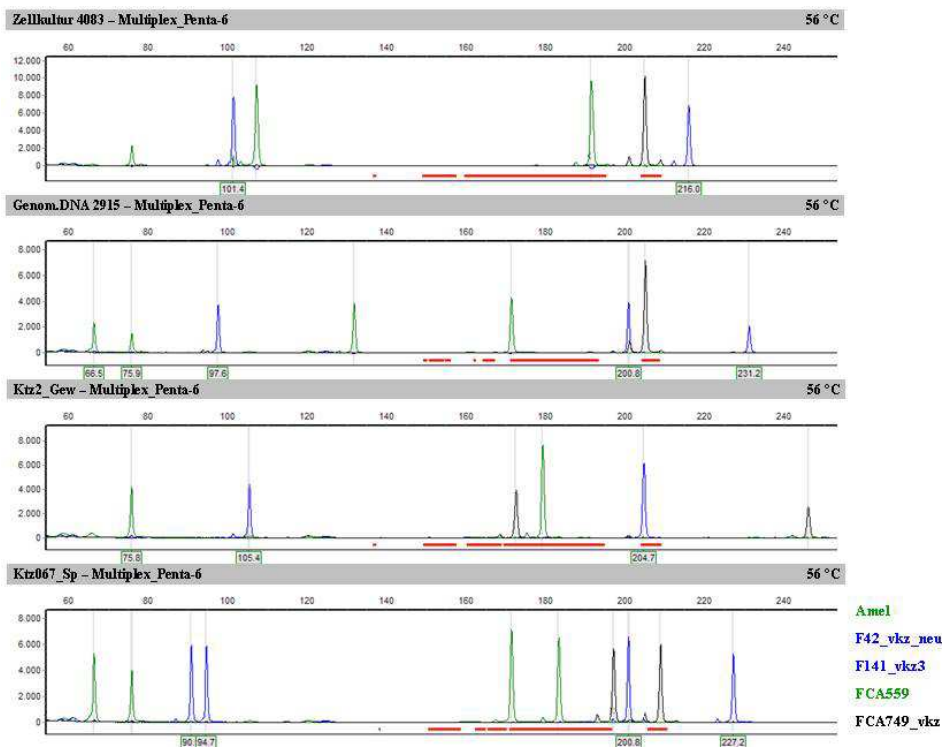


Abb. 63: Multiplex Penta-6 (P6)

Dargestellt sind die detektierten Produkte nach Ummarkierung des geschlechtsspezifischen Markers Amelogenin und der Systeme FCA559 und FCA749_vkz. Die Produktpeaks stellen sich ausbalanciert und ohne jegliche Nebenprodukte dar.

Eine gelbe Fluoreszenzmarkierung wird im Elektropherogramm in Schwarz dargestellt, damit diese besser erkennbar ist.

Blau (Produkt-Peaks links): F42_vkz_neu

Blau (Produkt-Peaks rechts): F141_vkz3

Grün (Produkt-Peaks links bis 76 bp): Amel

Grün (Produkt-Peaks rechts): FCA559

Schwarz: FCA749_vkz

3.7 Sensitivitätstest

Die Sensitivitätsstudie erlaubt es eine Einschätzung über die Nachweisgrenze, der für die Fallarbeit vorgesehenen Multiplexe durchzuführen. Auch können die Verteilungen und Intensitäten der Produkte der einzelnen Markersysteme, die in den jeweiligen Multiplexen enthalten sind, erfasst werden. Hierzu wurden DNA-Lösungen unterschiedlichen Ursprungs gewählt. Zum einen DNA, die aus Geweben gewonnen wurde (Genomische DNA D-2915 und Ktz4_Gew) und zum anderen DNA einer Zellkultur (Zellkultur 4083). Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei den verwendeten Proben um ideale, hochmolekulare DNA handelt.

Die verwendete DNA sollte in den zu testenden Markersystemen möglichst heterozygote Produkte aufweisen, um eine exakte Aussage über Imbalancen innerhalb der Systeme als auch zwischen den Systemen, die im Multiplex enthaltenen sind, treffen zu können. Dies war jedoch aufgrund der genetischen Konstellationen der verwendeten DNAs nicht möglich. Die Untersuchung und Kombination der unterschiedlichen DNAs ließ es jedoch zu, dass für jeden Multiplex mindestens eine der getesteten DNAs in allen enthaltenen Markersystemen jeweils heterozygote Produkte zeigte.

Eine Übersicht darüber, welche der verwendeten DNAs pro Multiplex und Markersysteme homo- oder heterozygote Produkte aufwiesen, ist in der nachfolgenden Abb. 64 dargestellt.

ERGEBNISSE

Duplex-1	FCA734	FCA740_vkz
Genom. DNA D-2915	heterozygot	heterozygot
Ktz4_Gew	heterozygot	homozygot
Zellkultur 4083	heterozygot	heterozygot

Quadro-10	FCA441_vkz	F37_vkz5	FCA747_vkz2	FCA733
Genom. DNA D-2915	heterozygot	heterozygot	heterozygot	heterozygot
Ktz4_Gew	homozygot	homozygot	heterozygot	homozygot
Zellkultur 4083	homozygot	heterozygot	homozygot	homozygot

Quadro-6_Primer3	FCA742_vkz	FCA730_vkz	F27	FCA744_vkz
Genom. DNA D-2915	heterozygot	heterozygot	heterozygot	heterozygot
Ktz4_Gew	homozygot	heterozygot	homozygot	homozygot
Zellkultur 4083	homozygot	homozygot	homozygot	heterozygot

Penta-6	F42_vkz_neu	F141_vkz3	Amel	FCA559	FCA749_vkz
Genom. DNA D-2915	homozygot	heterozygot	heterozygot	heterozygot	homozygot
Ktz4_Gew	heterozygot	heterozygot	heterozygot	heterozygot	heterozygot
Zellkultur 4083	homozygot	homozygot	homozygot	heterozygot	homozygot

Abb. 64: Verteilung der homo- und heterozygoten Produkte pro verwendeter DNA und Multiplex

Die vier Tabellen geben jeweils die untersuchten Multiplexe mit den enthaltenen Markersystemen wieder. Reine heterozygote Produkte pro Markersystem können für die Multiplexe Quadro-10 und Quadro-6_Primer3 nur unter Verwendung der Genomischen DNA D-2915 erhalten werden. Für den Multiplex Penta-6 ist dies nur mit der DNA von Ktz4_Gew möglich, während für den Multiplex Duplex-1 sowohl mit der Genomischen DNA D-2915 als auch mit der DNA der Zellkultur 4083 ausschließlich heterozygote Produkte amplifiziert werden.

Die Berechnung der Peak-Imbalance oder auch der heterozygoten Peak Height Ratio (PHR) erfolgt über die Peakhöhen (angegeben in rfu-Einheiten) der beiden vorhandenen Allelpeaks eines STR-Markers. Hierbei wird der höhere Allelpeak mit 100 % bewertet. Die durch die Software ermittelte rfu-Einheit des niedrigeren Allelpeaks wird zur Berechnung der PHR herangezogen und so dessen prozentualer Anteil in Bezug zu dem höheren Peak ermittelt. In der Forensik wird ein sog. Heterozygote Peak Treshold verwendet, der die Grenze widerspiegelt, anhand derer „echte“ heterozygote Allele identifiziert werden können. Diese Grenze liegt bei $\geq 70\%$.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt Multiplexbezogen. Mit den ermittelten Ergebnissen der homozygoten Produkte konnte keine Berechnung von Peak-Imbalancen erfolgen, diese

erbrachten jedoch genauso wie die heterozygoten Produkte einen Hinweis hinsichtlich der Nachweisgrenze eines jeden Systemmarkers und wurden entsprechend berücksichtigt.

Die Auswertung der Sensitivitätsstudie erfolgte mit insgesamt vier durchgeführten PCR-Ansätzen. Peakintensitäten über 7.000 rfu-Einheiten wurden für eine Berechnung der Imbalancen nicht berücksichtigt, da erfahrungsgemäß Produktpeaks ab einer Intensität > 7.000 rfu durch die Software nicht richtig wiedergegeben werden können und die Intensitäten meist oberhalb des angegebenen Wertes liegen. Durch entsprechende Verdünnungen könnten die wahren Werte nachträglich ermittelt werden. Dies war jedoch nicht das Ziel der vorliegenden Sensitivitätsstudie, da zum Teil so hohe DNA-Mengen eingesetzt wurden, dass bei diesen Konzentrationen mit einer Überladung pro injizierte Probe bei der Kapillarelektrophorese zu rechnen war. Auch können so die Produktintensitäten als auch die Peakstrukturen der jeweils enthaltenen Markersysteme zueinander und pro eingesetzter DNA-Menge besser eingeschätzt und beschrieben werden.

Die Detektionsgrenze der Auswerteprogramme lagen bei Intensitäten von 50 rfu. Sich unterhalb dieser Grenze darstellende Produktpeaks wurden nicht berücksichtigt.

3.7.1 Duplex-1 (D1)

Markersysteme: *FCA734*
 FCA740_vkz

Die Nachweisgrenze des Multiplexes Duplex-1 (D1) lag bei einer DNA-Menge von 0,1 ng. Bis zu dieser Menge konnten in allen Versuchsansätzen und mit den beiden Markern *FCA734* und *FCA740_vkz* Vollprofile für die genannten Proben erhalten werden. Bei niedrigeren DNA-Mengen traten gelegentlich Dropouts auf. Einzelnachweise mit beiden Systemen waren jedoch auch für Mengen unter 0,1 ng möglich und Allelpeaks konnten mit beiden Systemen vereinzelt bis 12,5 ng ausgewertet werden.

Das sensitivere System der beiden Marker war *FCA740_vkz*. Bis zu einer DNA-Menge von 0,5 ng wurden überwiegend Allelpeaks mit Intensitäten über 7.000 rfu erhalten. Das Markersystem *FCA734* wies Peakintensitäten oberhalb von 7.000 rfu mit Mengen von 10 ng und 5 ng auf. Die Peakstrukturen stellten sich hierbei abgeschnitten und teilweise gesplittet dar. Intensitäten nahe der 7.000 rfu konnten mit der darauf folgenden DNA-Menge von 1 ng erhalten werden.

ERGEBNISSE

Die Detektion von (-A)-Produkten erfolgte bei überladenen Proben und konnte bis zu einer DNA-Menge von 1 ng beobachtet werden. Nachfolgende Verdünnungen bis zu 0,5 ng ließen vereinzelt (-A)-Produkte für das System FCA734 erkennen.

Hauptsächlich waren (n-4)-Stotterprodukten vertreten. Dabei handelte es sich um (n-4)-Stotterprodukte, die bis zu einer DNA-Menge von 0,1 ng detektiert wurden und einen prozentualen Anteil von 1,0 % - 7,2 % am jeweiligen Hauptallelpeak einnahmen. Bei sehr stark überladenen Proben wurden (n-8)- und (n+4)-Stotterprodukte sichtbar, die aufgrund des zu hohen Wertes der Peakintensität (> 7.000 rfu) nicht zu berechnen waren.

Der Großteil der berechneten Imbalancen lag für alle eingesetzten DNA-Mengen durchweg oberhalb der 70 %-Grenze zwischen 70,2 % - 100 %. Ab einer DNA-Menge von 0,1 ng konnten auch Werte unterhalb dieser Grenze festgestellt werden. Diese bewegten sich zwischen 17,6 - 69,5 %. Insgesamt zeigten beide Systeme selbst bei gering eingesetzten Mengen an DNA eine relativ gut ausgeglichene Peakbalance.

3.7.2 Multiplex Quadro-10 (Q10)

Markersysteme: *FCA441_vkz*
 F37_vkz5
 FCA747_vkz2
 FCA733

Die Nachweisgrenze des Multiplex lag bei einer DNA-Menge von 0,1 ng. Bis zu dieser Menge konnten für alle Markersysteme sicher interpretierbare Allelpeaks erhalten werden. Bei niedrigeren Konzentrationen fanden in mehreren Systemen Dropouts statt oder aber die Intensitäten der vorhandenen Allelpeaks befanden sich unterhalb der Detektionsgrenze. Jedoch konnten mit allen Markersystemen des Multiplexes vollständige Einzelergebnisse auch unterhalb von 0,1 ng bis zu einer DNA-Menge 12,5 pg erhalten und für einen Vergleich herangezogen werden.

Den sensitivsten Marker stellte das System FCA733 dar, absteigend gefolgt von den Markern FCA747_vkz2, FCA441 und F37_vkz5. Bei fast allen Markersystemen führten Mengen von 10 ng, 5 ng und 1 ng zu Allelpeaks mit abgeschnittenen und gesplitteten Strukturen, die sich sehr häufig als (-A)-Produkte darstellten. Eine Ausnahme bildete das Markersystem F37_vkz5. Dieses zeigte lediglich bei 10 ng Peaks mit Intensitäten bis max. 4.000 rfu. Die

Intensitäten der Allelpeaks stiegen in der darauffolgenden Verdünnung von 5 ng bis auf 6.500 rfu an. Bis zu dieser DNA-Menge konnten zudem (-A)-Peaks festgestellt werden.

Das Auftreten der (-A)-Produkte gestaltete sich für die im Multiplex vertretenen Marker unterschiedlich. Während diese bei überladenen Proben für alle Systeme in Erscheinung traten, waren diese auch noch bei einem Einsatz von 50 pg für das System FCA733 detektierbar, auch wenn die Hauptallelpeaks keine sonderlich hohen Intensitäten aufwiesen (z. B. 862 rfu oder 1.679 rfu). Diese Produkte traten gehäuft bei homozygoten Proben auf, während für die heterozygote Probe (Genomische DNA D-2915) in nur einem Fall ein (-A)-Peak bei einer DNA-Menge von 0,1 ng nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Bei den detektierten Stotterprodukten handelte es sich überwiegend um (n-4)-Stotterprodukte, die sich durchweg im Vergleich zum Hauptpeak mit ~ 2,7 - 10,1 % darstellten. Diese konnten bis zu Mengen von 50 pg beobachtet werden. Auch waren (n-8)- und (n+4)- Stotterprodukte erkennbar, die meist bei überladenen Proben auftraten und nur in Einzelfällen berechnet werden konnten, in denen sie 1 - 2 % des dazugehörigen Allelpeaks ausmachten. Der Marker F37_vkz5 zeigte im Vergleich zu den anderen Markersystemen aufgrund seines Repeatmusters (sowohl Di- als auch Tetranukleotid-Sequenzwiederholungen) abgewandelte Stotterprodukte. Neben den oben erwähnten (n-4)-Stotterprodukten traten zudem (n-2)- und (n+2)-Stotterprodukte auf. Bis zu einem DNA-Einsatz von 1 ng konnten diese nachgewiesen werden. Die (n-2)-Stotterprodukte wiesen erwartungsgemäß meist einen prozentualen Gehalt über 15 % auf. Der erreichte Maximalwert dieser Stotterprodukte lag bei 38,8 %.

Die Peak-Imbalancen aller im Multiplex enthaltenen Marker bewegten sich überwiegend oberhalb oder knapp unterhalb von 70 %. Bis zu einer DNA-Menge von 50 pg konnten Werte zwischen 75 - 99,7 % erhalten werden. Mengen ab 25 pg zeigten häufig Werte zwischen 38,5 - 81 %, wobei hier der Marker FCA733 die stärksten Imbalancen aufwies. Insgesamt wiesen alle Marker zueinander gut ausbalancierte Produktpeaks auf.

3.7.3 Quadro-6_Primer3 (Q6-P3)

Markersysteme: *F27*
FCA730_vkz
FCA742_vkz
FCA744_vkz

Die Nachweisgrenze des Multiplexes lag bei einer eingesetzten DNA-Menge von 50 pg. Unterhalb dieser Menge (25 pg und 12,5 pg) waren häufig nur noch für vereinzelte Marker Allelpeaks detektier- und interpretierbar, da es zu Allel-Dropouts kam. Diese häuften sich zum Teil stark bei der geringsten DNA-Menge von 12,5 pg. Dennoch konnten bis zu dieser Menge vereinzelt Einzelnachweise für alle Systeme durchgeführt werden.

Die stärksten und gleichwertige Intensitäten wiesen die beiden Marker *F27* und *FCA742_vkz* auf. Danach folgten absteigend die Systeme *FCA744_vkz* und *FCA730_vkz*.

Allelpeaks mit Intensitäten > 7.000 rfu wurden bis zu einer eingesetzten DNA-Menge von 1 ng erhalten. Hierbei wiesen die Produktpeaks eine gesplittete und abgeschnittene Struktur auf, die sich zudem in (-A)-Peaks differenzierte.

Für den Marker *FCA742_vkz* ließen sich nicht nur bei überladenen Proben (-A)-Peaks detektieren. Diese traten auch in Verbindung mit Allelpeaks auf, die teilweise geringe Intensitäten von nur max. 1.500 rfu zeigten und bis zu einer Verdünnung von 0,1 ng nachgewiesen werden konnten.

Die Darstellung von Stotterprodukten erfolgte für die Marker des Multiplexes unterschiedlich. Die Systeme *F27* und *FCA742_vkz* wiesen überwiegend (n-4)-Stotterprodukte auf, die bis zu einer DNA-Menge von 50 pg nachgewiesen werden konnten. Deren prozentualer Anteil am jeweiligen Hauptpeak lag zwischen 1,4 - 7,1 %. Ebenfalls unter der 15 %-Grenze befanden sich die ermittelten Werte für (n-8)-Stotterprodukte, die nur bei überladenen Proben in Erscheinung traten. Die Werte betragen zwischen 0,8 - 5,4 %. Der Marker *FCA744_vkz* wies nur vereinzelt Stotterprodukte auf, die bis zu DNA-Mengen von 0,5 ng beobachtet wurden. Die Werte der (n-4)-Stotterprodukte betragen 2,1 - 13,2 %. Der Anteil vereinzelt auftretender (n-8)-Stotterprodukte konnte aufgrund der stark überladenen Hauptallelpeaks nicht berechnet werden. Die beiden Stotterprodukte der Kategorie (n-2) und (n-4) konnten für das System *FCA730_vkz* gleichhäufig beschrieben werden, die durch die in der Repeatstruktur auftretenden Dinukleotid-Repeatenheiten bedingt wurden. Der prozentuale Anteil beider Stotterprodukte lag mit Werten zwischen 1,5 - 7,6 % unterhalb der 15 %-Grenze. Stotterprodukte der Kategorie (n+4) bzw. (n+2) für den Marker *FCA730_vkz* wurden

vereinzelt bei sehr stark überladenen Proben detektiert und erreichten teilweise Werte von bis zu 5 %.

Die berechneten Peak-Imbalancen aller Markersysteme lagen überwiegend zwischen 70,3 - 99,1 %. Ab einer Verdünnung von 50 pg traten gehäuft Werte zwischen 43,2 - 69,6 % auf. Zusammenfassend liegen für den Multiplex ausgeglichene Peak-Imbalancen vor, die eine sichere Ergebnisinterpretation noch bei niedrigen DNA-Mengen gewährleisten.

3.7.4 Penta-6 (P6)

Markersysteme: *Amel*
F42_vkz_neu
F141_vkz3
FCA559
FCA749_vkz

Die Nachweisgrenze des Multiplexes reichte bis zu einer DNA-Menge von 50 pg. Bis zu dieser Menge konnten für alle Markersysteme interpretierbare Ergebnisse erhalten werden. Nicht mehr detektierbare Allelpeaks oder Dropouts wurden vereinzelt bei Mengen von 25 pg, weitaus häufiger jedoch mit Mengen von 12,5 pg erhalten. Vollständige Ergebnisse konnten vereinzelt mit allen Markern auch bei dieser Verdünnung detektiert und zuverlässig ausgewertet werden.

Die stärkste Sensitivität zeigte das Markersystem FCA749_vkz, gefolgt von dem sich geringfügig schwächer darstellenden Marker FCA559. Nachfolgend sind die Systeme F141_vkz3, F42_vkz_neu und der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin zu nennen.

Die Allelpeaks, die bei DNA-Mengen von 10 ng, 5 ng und 1 ng amplifiziert wurden, wiesen überwiegend abgeschnittene und gesplittete Strukturen mit rfu-Einheiten > 7.000 auf. Bei diesen Proben konnten aufgrund der Überladung (-A)-Peaks festgestellt werden.

Unabhängig von einer Überladung ausgehende (-A)-Produkte in Form einer hügeligen Struktur wurden sporadisch für den Marker F42_vkz_neu erhalten. Diese traten in geringem Umfang auch bei Intensitäten zwischen 2.000 - 4.000 rfu in Erscheinung und konnten bis zu einer eingesetzten DNA-Menge von 0,1 ng beobachtet werden. Der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin wies (-A)-Produkte bis zu einer Verdünnung von 1 ng auf. Hiervon betroffen war lediglich das kleinere Produkt des Y-Chromosoms. Ab einer Menge von 50 pg

bildete sich bei ~ 75 bp ein Dyeblob aus, der die Interpretation des Produktes, welches dem X-Chromosom entspricht, etwas erschwerte.

Die für alle Markersysteme auftretenden (n-4)-Stotterprodukte wiesen einen prozentualen Anteil am jeweiligen Hauptpeak von 1,8 - 13,5 % auf. Stotterprodukte der Kategorie (n-8) und (n+4) traten hauptsächlich bei sehr stark überladenen Proben auf und waren dementsprechend nicht zu berechnen. Wegen der fehlenden Repeatstruktur innerhalb der Sequenz des geschlechtsspezifischen Markers Amelogenin konnten für diesen Marker keine Stotterprodukte festgestellt werden.

Die Peak-Imbalance stellte sich für alle Marker des Multiplexes bis zu einer Verdünnung von 50 pg überwiegend mit Werten über 70 % dar. Insgesamt wurden prozentuale Anteile am jeweiligen Hauptallelpeak mit einer Spannbreite von 70,4 - 100 % erhalten. Abweichende Werte zwischen 31,7 - 68,2 % wurden vereinzelt ab 1 ng über alle Verdünnungen hinweg erhalten, prägten sich aber überwiegend ab eingesetzten DNA-Mengen von 50 pg aus. Insgesamt zeigten die Markersysteme ausbalancierte und gut interpretierbare Ergebnisse zueinander.

Von den hier verwendeten Multiplexen zählt der Multiplex Penta-6 als der empfindlichste Systemkomplex, der für die nachfolgenden Haarversuche (siehe Abschnitt 3.12) zum Einsatz kam und als Referenz für eine erfolgreiche Amplifikation und ausreichende Menge an extrahierter DNA gilt.

3.8 Artspezifitätstest

Um die Reaktivität der ausgewählten Primersysteme von *F. s. catus* zu nahe verwandten Spezies als auch Spezies anderer Ordnungen zu untersuchen, wurde ein Artspezifitätstest durchgeführt. Innerhalb der Gruppe der Mammalia (Säugetiere) und speziell der Gruppe der Carnivora (Raubtiere) wurden Spezies getestet, die in den Breitengraden von Deutschland zu erwarten sind und von denen nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie eventuell eine Rolle in Ermittlungsverfahren spielen könnten. Darüber hinaus wurde die Kreuzreaktivität mit Gattungen aus der Familie der Felidae (Katzenartige) überprüft. Aufgrund der Problematik der Kontamination mit menschlichem Material, vor allem während der Spurensicherung und anschließenden Bearbeitung, erfolgte des Weiteren ein Test mit humaner DNA.

Alle getesteten Spezies sind der Tabelle 1 (Abschnitt 2.1.1) zu entnehmen.

Alle zuvor beschriebenen Multiplexe wurden mit den oben aufgelisteten Proben getestet. Die Auswertung erfolgte jedoch bezogen auf die jeweiligen Markersysteme.

Die Spezies der Ordnungen Artiodactyla (Paarhufer), Perissodactyla (Unpaarhufer), Lagomorpha (Hasenartige), Rodentia (Nagetiere) und Primates (Primates) sowie *Martes martes* (Baummarder) aus der Ordnung der Carnivora (Raubtiere) wiesen keine Kreuzreaktionen mit irgendeinem der getesteten Marker auf.

Aus der Gruppe der Carnivora, ohne die Familie der Felidae (Katzen) einzubeziehen, konnte für alle in der Tabelle 1 gelisteten Spezies ein Produkt für den geschlechtsspezifischen Marker Amelogenin nachgewiesen werden. Das Produkt des Dachses (*Meles meles*) hatte eine durch die Software berechnete Größe von 77 bp, während das jeweilige Produkt der anderen fünf Spezies (Familie der Ursidae (Bären) und Canidae (Hunde) sowie *Martes martes*) analog zum X-Produkt von *F. s. catus* eine berechnete Größe von 76 bp aufwies.

Darüber hinaus wurde ein Produkt für das System FCA730_vkz in der Familie der Ursidae detektiert. Dieses lag mit 101 bp rund 17 bp unterhalb des bis zum jetzigen Zeitpunkt erfassten Produktbereiches von 118 - 158 bp. Des Weiteren betrug die berechnete Höhe des Peaks 146 rfu und ließ auf eine nur sehr schwache Amplifikation schließen.

Für alle anderen Markersysteme konnte keine Produktdetektion mit den getesteten Spezies festgestellt werden.

Im Vergleich hierzu wiesen die getesteten Spezies der Familie der Felidae (Katzen) zahlreiche Produkte für die verwendeten Markersysteme auf. Je drei Individuen der Spezies Löwe (*Panthera leo*) und Eurasischer Luchs (*Lynx lynx*) sowie zwei Individuen der Spezies der Rostkatze (*Prionailurus rubiginosus phillipsi*) wurden für diese Untersuchung eingesetzt.

Nur wenige Systeme zeigten keine Produktamplifikation. Hierzu zählten u. a. die Marker F27 und FCA747_vkz2, die sowohl für die Spezies *P. leo* als auch die Spezies *L. lynx* keine Produktdetektion erkennen ließen. Zusätzlich führte bei letzterer Spezies die Amplifikation der Marker FCA730_vkz und FCA749_vkz zu keinem Amplifikationserfolg. Für *P. r. phillipsi* konnte lediglich mit dem Marker FCA730_vkz keine Produktdetektion erfolgen.

Die verbliebenen Markersysteme sowie der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin ließen eine Produktamplifikation mit teils sehr hohen Intensitäten (~ 6.000 rfu) erkennen. Einige der detektierten Produkte entsprachen den Allelen von *F. s. catus*. Häufig lagen die für *P. leo* und *L. lynx* erhaltenen Produkte ober- und unterhalb des bereits detektierten Produktbereiches und

ERGEBNISSE

waren dementsprechend von den Allelen der Katze abzugrenzen. Dies war für *P. r. phillipsi* für insgesamt nur vier Markersysteme der Fall. Die meisten der amplifizierten Produkte entsprachen den Allelen von *F. s. catus*. Zudem traten für alle drei Spezies vereinzelt Produkte auf, die zwar innerhalb des Produktbereichs eines Markers lagen, aber in der verwendeten Stichprobe von *F. s. catus* noch nicht erfasst wurden.

Ein Vergleich zwischen den bereits detektierten Allelen von *F. s. catus* und den detektierten Produkten der getesteten Spezies der Familie der Felidae ist in Tabelle 29 gegeben.

Tabelle 29: Vergleich der Allelverteilung zwischen unterschiedlichen Spezies der Familie der Felidae und *F. s. catus*

Markersystem	Spezies	detektierte Produkte (bp)	Bemerkung
Amelogenin <i>F. s. catus</i> : 66/76 bp	<i>P. leo</i>	76	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	66/76	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	76	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
F27 <i>F. s. catus</i> : 103 - 196 bp	<i>P. leo</i>	-	keine Produktdetektion
	<i>L. lynx</i>	-	keine Produktdetektion
	<i>P. r. phillipsi</i>	107/111	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
F37_vkz5 <i>F. s. catus</i> : 199 - 232 bp	<i>P. leo</i>	189	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	(167)/189	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	65/73	< PB von <i>F. s. catus</i>
F42_vkz_neu <i>F. s. catus</i> : 86 - 122 bp	<i>P. leo</i>	93/97	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	101/105	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	97/101/109	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
F141_vkz3 <i>F. s. catus</i> : 193 - 255 bp	<i>P. leo</i>	<u>187/191/195</u>	< PB von <i>F. s. catus</i> / ≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	149/157/164	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	<u>215/223</u>	≡ PB; Produkte für <i>F. s. catus</i> noch nicht detektiert / ≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
FCA441_vkz <i>F. s. catus</i> : 95 - 125 bp	<i>P. leo</i>	<u>90/94/98/102</u>	< PB von <i>F. s. catus</i> / ≡ PB; Produkte für <i>F. s. catus</i> noch nicht detektiert
	<i>L. lynx</i>	82/90	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	<u>109/185</u>	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i> / > PB von <i>F. s. catus</i>
FCA559 <i>F. s. catus</i> : 103 - 195 bp	<i>P. leo</i>	87	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	103/107/111	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	107/111/119	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>

Markersystem	Spezies	detektierte Produkte (bp)	Bemerkung
FCA730_vkz <i>F. s. catus</i> : 118 - 158 bp	<i>P. leo</i>	<u>139/147/171/175</u>	≡ PB; Produkte für <i>F. s. catus</i> noch nicht detektiert / > PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	-	keine Produktdetektion
	<i>P. r. phillipsi</i>	-	keine Produktdetektion
FCA733 <i>F. s. catus</i> : 101 - 202 bp	<i>P. leo</i>	94*	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	82	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	82	< PB von <i>F. s. catus</i>
FCA734 <i>F. s. catus</i> : 142 - 190 bp	<i>P. leo</i>	171/184	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	198	> PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	150/154	≡ PB; Produkte für <i>F. s. catus</i> noch nicht detektiert
FCA740_vkz <i>F. s. catus</i> : 147 - 174 bp	<i>P. leo</i>	137	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	<u>164/168</u>	≡ PB; Produkte für <i>F. s. catus</i> noch nicht detektiert / > PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	<u>150/162/166</u>	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i> / ≡ PB; Produkte für <i>F. s. catus</i> noch nicht detektiert
FCA742_vkz <i>F. s. catus</i> : 103 - 152 bp	<i>P. leo</i>	155/159/167/176	> PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	82/86	< PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	106/110	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
FCA744_vkz <i>F. s. catus</i> : 115 - 139 bp	<i>P. leo</i>	139/143	> PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	<u>101/115</u>	< PB von <i>F. s. catus</i> / ≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
	<i>P. r. phillipsi</i>	142/151	> PB von <i>F. s. catus</i>
FCA747_vkz2 <i>F. s. catus</i> : 100 - 134 bp	<i>P. leo</i>	-	keine Produktdetektion
	<i>L. lynx</i>	-	keine Produktdetektion
	<i>P. r. phillipsi</i>	109	≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>
FCA749_vkz <i>F. s. catus</i> : 84 - 259 bp	<i>P. leo</i>	346/352/360/384	> PB von <i>F. s. catus</i>
	<i>L. lynx</i>	-	keine Produktdetektion
	<i>P. r. phillipsi</i>	148/ <u>182</u> /188/208	≡ PB; Produkte für <i>F. s. catus</i> noch nicht detektiert / ≡ Allelen von <i>F. s. catus</i>

PB → Produktbereich / ≡ → entspricht / < → unterhalb / > → oberhalb

* entspricht dem 101 bp-Produkt aufgrund der Farbummarkierung des Primers

Bei dem in Klammern gesetzten 167 bp-Produkt des Markers F37_vkz5 des Luchses konnte nicht mit Sicherheit verifiziert werden, ob es sich tatsächlich um ein Produkt oder ein Artefakt handelte. Die beiden beschriebenen Produktpeaks wurden für alle drei Proben erhalten und wiesen sehr unausgeglichene Peakhöhen zueinander auf.

ERGEBNISSE

Von den hier untersuchten Vertretern der Familie der Felidae gehört die Europäische Wildkatze (*F. s. silvestris*) zu der Subspezies, die mit der Hauskatze am nächsten verwandt ist. Insgesamt 77 Individuen dieser Spezies wurden näher untersucht.

Der Test auf Artspezifität lieferte mit allen Markersystemen interpretierbare Signale, die überwiegend den bisher erhaltenen Allen der Hauskatze entsprachen. Lediglich die Systeme F27, F37_vkz5, FCA742_vkz und FCA749_vkz wiesen Produkte auf, die bisher noch nicht für *F. s. catus* beobachtet wurden. Diese Allele lagen meist innerhalb des detektierten Produktbereiches der Hauskatze. Die Systeme FCA742_vkz und FCA749_vkz wiesen zudem Allele der Europäischen Wildkatze unterhalb der jeweiligen Produktbereiche von *F. s. catus* auf. Produkte oberhalb dieser Bereiche wurden ausschließlich für den Marker FCA749_vkz erhalten.

Im Vergleich zu *F. s. catus* konnte eine Reduktion der beobachteten Anzahl an Allelen pro Markersystem festgestellt werden. Speziell für das System FCA733 wurden nur 10 der 31 Allele der Hauskatze detektiert. Einige Marker wiesen präferentiell auftretende Allele auf, die Frequenzen zwischen 0,37 und 0,77 erreichten und somit das meist einzige am häufigsten auftretende Allel repräsentierten (F37_vkz5, FCA559, FCA730_vkz, FCA740_vkz, FCA744_vkz und FCA749_vkz; Abb. 65).

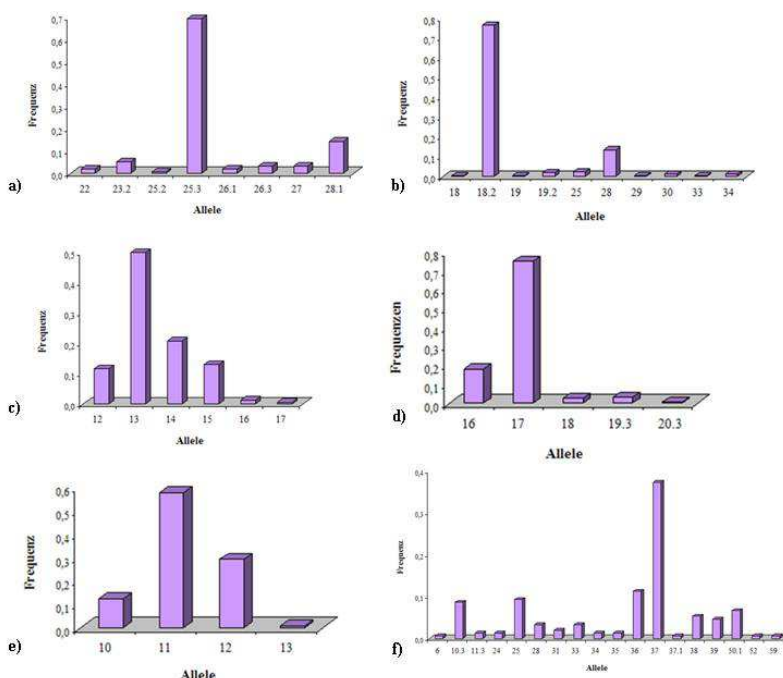


Abb. 65: Allelfrequenzen für *F. s. silvestris* mit sechs Markersystemen

Die Allelfrequenzen der sechs Markersysteme F37_vkz5 (a), FCA559 (b), FCA730_vkz (c), FCA740_vkz (d), FCA744_vkz (e) und FCA749_vkz (f) weisen jeweils Einzelallele auf, die bevorzugt in der Population vertreten sind.

Weitere Systeme zeigten dagegen eine überwiegend angegliche Frequenz von den erhaltenen Allelen, so dass die Aussage über ein häufig vertretenes Allel sich schwierig gestaltete (F141_vkz3 und FCA742_vkz; Abb. 66).

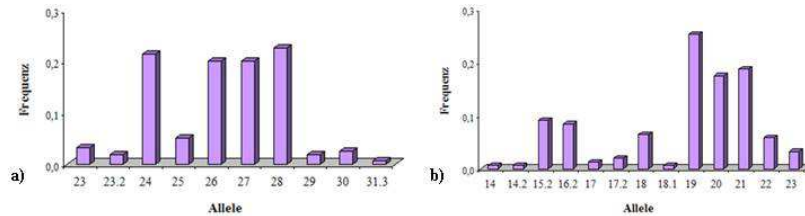


Abb. 66: Allelfrequenzen von *F. s. silvestris* anhand zweier Markersysteme

Die zwei Systeme F141_vkz3 (a) und FCA742_vkz (b) zeigen mehrere Allele, die eine in etwa gleichhäufige Verteilung aufweisen.

Daneben konnte für die Systeme F42_vkz_neu, FCA441_vkz und FCA733 (hier nur bei den kleinen Allelen 10 - 13) eine ähnliche Verteilung der Allele zu *F. s. catus* festgestellt werden (Abb. 67).

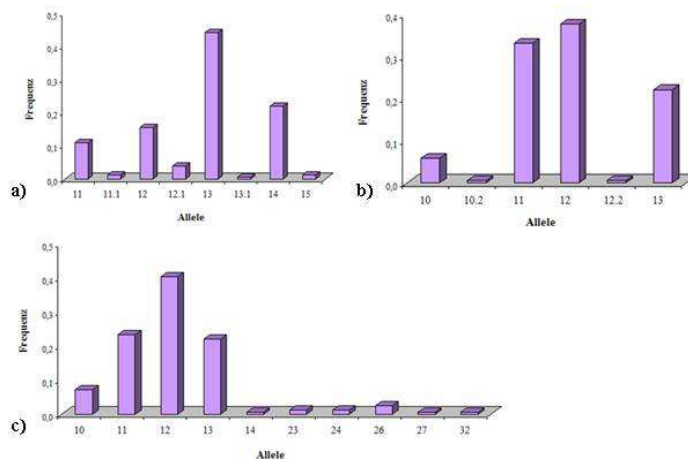


Abb. 67: Allelfrequenzen von *F. s. silvestris* unter Verwendung dreier Markersysteme

Eine ähnliche Verteilung zu *F. s. catus* konnten mit den Markern F42_vkz_neu (a), FCA441_vkz (b) und FCA733 (c) festgestellt werden.

Sehr unterschiedliche Allelverteilungen im Vergleich zu *F. s. catus* wurden dagegen für die Marker F27, FCA734 und FCA747_vkz2 erhalten (Abb. 68).

ERGEBNISSE

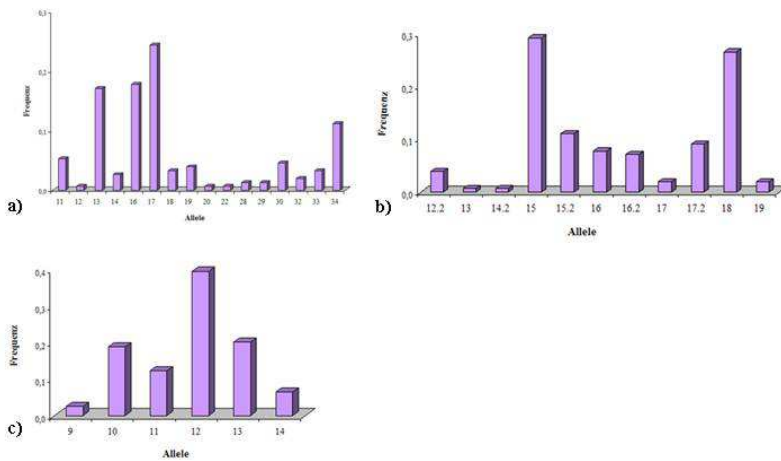


Abb. 68: Allelfrequenzen für *F. s. silvestris* unter Verwendung von drei Markersystemen

Unterschiedliche Allelverteilungen zu *F. s. catus* konnten mit den Systemen F27 (a), FCA734 (b) und FCA747_vkz2 (c) festgestellt werden.

Eine Besonderheit zeigte der Marker FCA749_vkz. Für zwei der getesteten Wildkatzenproben (FB50 und D3877) konnten keine Produkte detektiert werden. Auch mehrmalige Wiederholungen des PCR-Ansatzes, zusätzlich unter Einsatz der verdoppelten DNA-Menge, führten zu keinem Amplifikationserfolg. Dagegen zeigten diese Proben mit allen anderen Systemen auswertbare Allelpeaks in einer ausreichend hohen Intensität (Daten nicht gezeigt).

3.9 Analyse von Mischspuren

Durch die Verwendung einer konstanten und einer variablen Komponente wurden sowohl Mischungen von Katzen/Katzen-DNA als auch von Katzen/Human-DNA erstellt. Die variablen Komponenten stellten die Probe Zellkultur 4083 als auch die Human-DNA K 562 dar, während DNA der Probe Genom. DNA D2915 konstant zu 1 ng bzw. zu 500 pg eingesetzt wurde.

Mischungen mit Human-DNA, die äquivalent oder in 10-fachem Überschuss beigemischt wurde, zeigten keinen Einfluss auf die Amplifikation der Katzen-DNA. Die Intensitäten als auch die Darstellung der Allelpeaks entsprachen denen der Kontrollprobe, die jeweils mitgeführt wurde (Daten nicht gezeigt).

In allen vier Multiplexen konnten für die Mischungen aus Katzen/Katzen-DNA ähnliche Ergebnisse erhalten werden. Wurde eine Komponente mit der doppelten Menge an DNA verwendet, stellten sich die Allelpeaks dieser Probe entsprechend stärker dar und erreichten sehr häufig die doppelte Intensität. Im Vergleich zu den Kontrollproben stellten sich die

Allelpeaks der Produkte, die in beiden Proben vertreten waren, aufgrund der sich addierenden Intensitäten teilweise doppelt so hoch dar (Abb. 69).

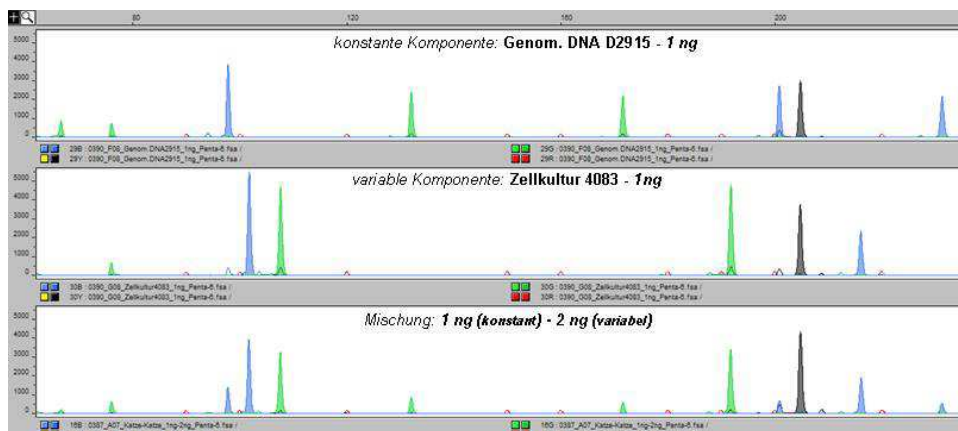


Abb. 69: Mischung Katze - Katze (1 ng - 2 ng)

In den beiden oberen Elektropherogrammen sind die Profile der konstanten (Genom. DNA D2915) und der variablen Komponente (Zellkultur 4083) unter Einsatz von 1 ng DNA dargestellt. Das untere Panel zeigt die erhaltenen Allelpeaks nach Mischung von 1 ng konstanter Komponente mit 2 ng variabler Komponente. Entsprechend der im Ansatz enthaltenen DNA-Mengen stellen sich die Produktpeaks der variablen Komponente wesentlich stärker dar.

Befanden sich äquivalente Mengen der beiden Katzen-DNAs im Ansatz wurden die Produkte gerade im Bereich von 500 pg überwiegend gleichstark amplifiziert. Eine geringe DNA-Menge von 200 pg der variablen Komponente wurde im Vergleich zu höheren DNA-Mengen ebenso effizient amplifiziert. Alle zu erwartenden Produktpeaks konnten in den jeweiligen Ansätzen eindeutig nachgewiesen und ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt).

3.10 STR-Typisierung von unterschiedlichen Geweben und Haaren

Um eine Konstanz der Ergebnisse aus der STR-Typisierung über unterschiedliche Gewebe hinweg als auch gegenüber der Haare nachzuweisen, wurden die beschriebenen Markersysteme daraufhin getestet. Hierzu kamen acht verschiedene Gewebeproben der Katze Katze_quer (Herz, Hirn, Leber, Lunge, Niere, Milz, Muskelgewebe und Zunge) sowie Blut, Speichel und Haare (mit Haarwurzeln) dieser Probe zum Einsatz.

Neben allen Geweben der untersuchten Katze konnte auch der Blut-, Speichel- und Haarprobe eine Kontinuität der Ergebnisse nachgewiesen werden. Alle Proben wiesen eine exakt

ERGEBNISSE

identische Produktamplifikation pro Markersystem auf, die sich nur hinsichtlich der Intensität der jeweiligen Allelpeaks unterschied. Die niedrigsten Produktpeaks wurden hierbei mittels der Haarprobe detektiert.

In Abb. 70 sind die Amplifikationsergebnisse für die Proben Blut, Herz, Lunge und Niere unter Einsatz der Marker F42_vkz_neu und FCA441_vkz exemplarisch wiedergegeben.

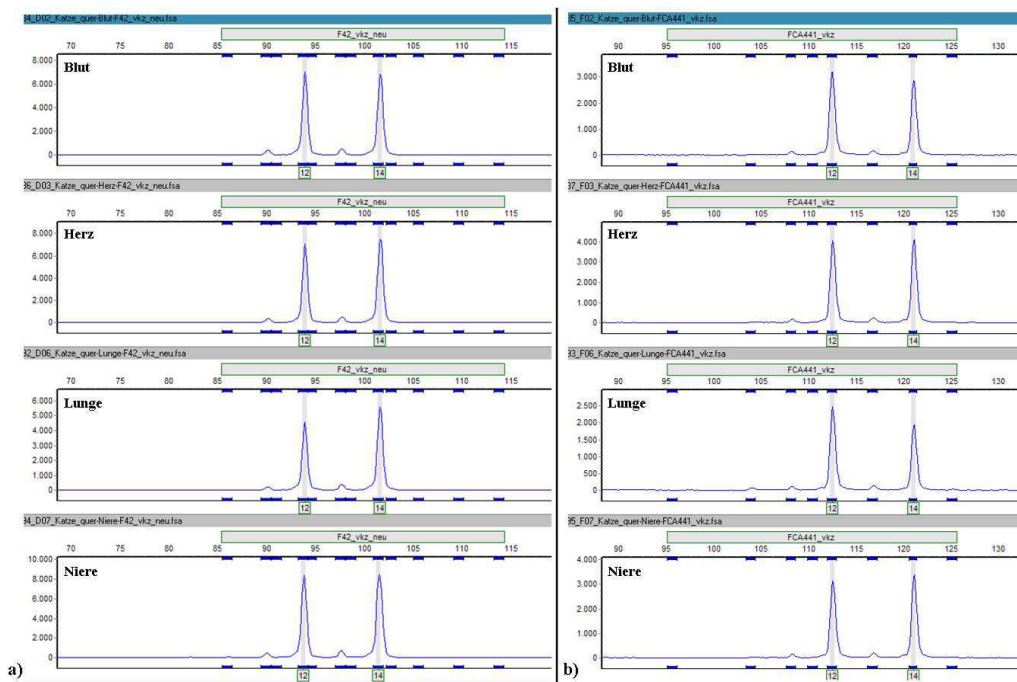


Abb. 70: Test auf Kontinuität

Dargestellt sind die Ergebnisse der Proben Blut, Herz, Lunge und Niere von Katze_quer.

a) Produktamplifikation mittels des Markers F42_vkz_neu

b) Produktamplifikation unter Verwendung des Markers FCA441_vkz

Pro Markersystem wurden zueinander identische Amplifikatlängen erhalten, die sich lediglich in ihrer Intensitäten voneinander unterschieden.

Für alle weiteren Markersysteme und Proben wurden sich ähnlich repräsentierende Ergebnisse erhalten.

3.11 Untersuchung auf DNA-Anhaftungen an Haaren und Haarschaftmaterial

Die Untersuchung auf DNA-Spuren durch mögliche Anhaftungen an den Haaren der Katze Ktz009_Ha führte in allen Untersuchungsansätzen unter Verwendung des Multiplexes Penta-6 zu keinem Ergebnis. Es konnten weder Produktpeaks der Katze Ktz009_Ha selbst oder einer der anderen Katzen nachgewiesen werden, die sich in demselben Haushalt befinden. In diesem Fall wurde keine DNA aus evtl. an den Haaren anhaftendem Speichel nachgewiesen.

Auch wurde die DNA aus Haarschaftmaterial (1 cm lang; Bereich ② in Abb. 8, Abschnitt 2.2.2) unter Verwendung des Multiplexes Penta-6 auf eine Amplifikation hin untersucht. In keinem der 10 Ansätze konnte eine Produktdetektion festgestellt werden. Eine fehlgeschlagene oder nicht optimal verlaufende PCR wurde ausgeschlossen, da für die Positivkontrolle die zu erwartenden Allele in guter Qualität nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass sich in dem verwendeten Haarschaftmaterial keine bzw. nur eine unzureichende Menge an Kern-DNA, die zudem stark degradiert war, befand.

3.12 Optimierung der Haar-DNA-Extraktion

Optimierungsversuche zur Haar-DNA-Extraktion wurden sowohl mit manuellen Kits als auch mit Magnetpartikelseparatoren durchgeführt. Da die Durchführung mit den manuellen Kits, insbesondere des „nexttecTM 1^{-step} DNA Isolation Kit for Tissue & Cells“ und dem Zusatzprotokoll “Hair” nur unzulängliche bis gar keine Ergebnisse lieferte, wird auf eine genauere Darlegung der Ergebnisse verzichtet.

Des Weiteren wurde neben den drei vorgestellten Magnetpartikelseparatoren ein weiteres Gerät der Fa. Analytik Jena getestet. Hierbei handelte es sich um den InnuPure[®] C16, dessen Versuchsreihe mit dem „*innuPREP Forensic DNA Kit-IP-C16*“-Kit durchgeführt wurde. Die erhaltenen Analysenergebnisse waren für diese Arbeit nicht verwertbar, sodass auch hier auf eine Darstellung verzichtet wird.

Die Optimierung der DNA-Extraktion aus Haaren erfolgte letztendlich unter Zuhilfenahme von drei Magnetpartikelseparatoren unterschiedlicher Firmen, die im Abschnitt 2.13 näher vorgestellt wurden. Bei diesen Geräten handelte es sich um den Maxwell[®] 16 (Promega), den King FisherTM Duo (Thermo Scientific) und den EZ1 Advanced (Qiagen).

ERGEBNISSE

Im Vorfeld wurde zu jedem einzelnen Gerät eine ausführliche Testreihe durchgeführt, bei der sowohl die Originalchemie des Herstellers als auch eine Kombination aus dem im BKA verwendeten TNCa-Lysepuffer zum Haaraufschluss und Teilen der Originalchemie verwendet wurde. So konnte die Methode ausfindig gemacht werden, die für das jeweilige Gerät letztendlich die höchste DNA-Ausbeute garantierte. Diese Methoden wurden in einem finalen Testversuch zwischen allen Geräten gegeneinander getestet.

Auf eine Darstellung der Ergebnisse aus den jeweiligen Versuchsreihen wird in diesem Kontext verzichtet.

Für den finalen Versuchsdurchlauf wurden folgende Methoden miteinander verglichen:

- TNCa → DNA IQ™ Casework Pro Kit (TNCa-iQ) (Maxwell® 16)
- TNCa → Crime Prep Adem-Kit (TNCa-Ademtech) (King Fisher™ Duo)
- TNCa → EZ1® QIAamp DNA Investigator Kit/Trace-Protokoll (TNCa-TP) (EZ1 Advanced)
- TNCa → Phenol/Chloroform → Microcon30-Filtersäulen (PC-M)

Die Referenzmethode PC-M wurde zur eindeutigen Darstellung der Effizienz der untersuchten Methoden mitgeführt.

Im direkten Vergleich zeigte der DNA-Extrakt des Magnetpartikelseparators King Fisher™ Duo, der einem DNA-Extrakt aus umgerechnet 2 Haaren entsprach, die meisten Produktpeaks. Unter Verwendung von 1 µl DNA in eine 25 µl-PCR wurden fünf von acht Allelpeaks erhalten, die Intensitäten zwischen 130 - 650 rfu erlangten. Mittels der Referenzmethode PC-M konnten lediglich zwei Produkte detektiert werden. Die Extrakte der beiden anderen Geräte (Maxwell® 16 und EZ1 Advanced) ließen bei diesem geringen DNA-Einsatz keine Produktdetektion erkennen (Daten nicht gezeigt).

Unter Verwendung von 5 µl der jeweiligen DNA-Extrakte wurde mittels des Extraktes des King Fisher™ Duos ein Vollprofil ermittelt, welches Intensitäten bis 1.900 rfu erkennen ließ. Der Referenzmethode PC-M fehlten lediglich zwei Allele, um ein vollständiges Profil zu generieren. Die Intensitäten reichten hier von 200 - 800 rfu. Mittels der Extrakte der Magnetpartikelseparatoren Maxwell® 16 und EZ1 Advanced konnten unvollständige Profile mit ein bis max. drei Allelen pro Methode detektiert werden (Abb. 71).

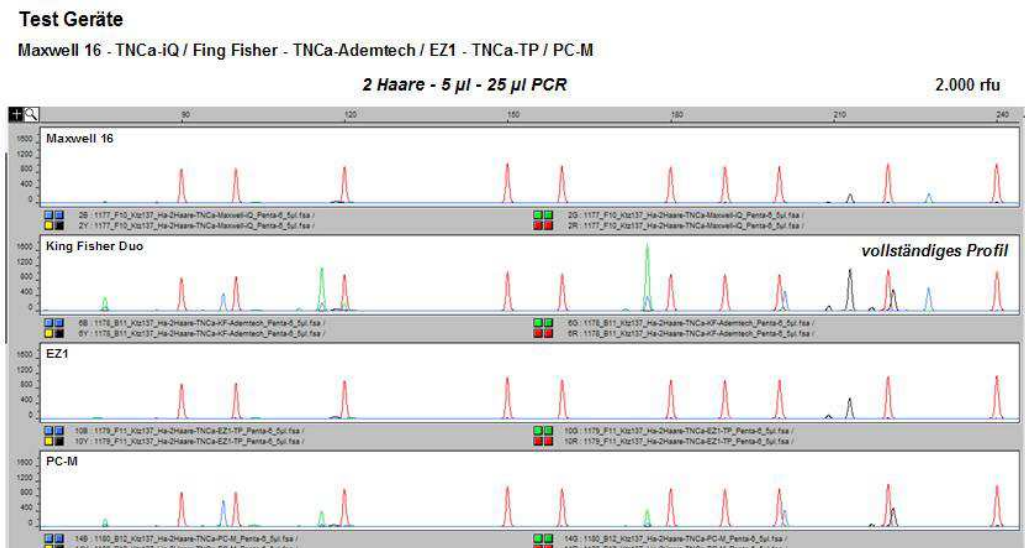


Abb. 71: Ergebnisse des Gerätevergleichs - Maxwell[®] 16, King Fisher[™] Duo und EZ1 Advanced

Dargestellt sind die Ergebnisse der PCR für die die DNA-Extrakte verwendet wurden, die aus umgerechnet 2 Haaren erhalten wurden. Es wurden 5 µl der Extrakte in eine 25 µl PCR eingesetzt.

Es kann lediglich mittels des King Fisher[™] Duos ein vollständiges Profil dargestellt werden, welches Peakintensitäten bis zu 1.900 rfu aufweist. Ein annähernd vollständiges Profil weist die Methode PC-M auf (zwei fehlende Allele). Kaum eine Produktdetektion wurde mit den Methoden des Maxwell[®] 16 und des EZ1 Advanced erhalten.

Die Skala der Intensität ist für alle Pannels auf 2.000 rfu eingestellt.

rote Peaks = Längenstandard (ROX HD400)

Der Einsatz der DNA-Extrakte aus umgerechnet 6 Haaren zeigte ein homogeneres Bild zwischen den getesteten Methoden. Je 1 µl DNA-Extrakt in den PCRs führte für jede Methode zur Darstellung eines vollständigen Profils. Die Peakintensitäten ähnelten sich pro Methode sehr und lagen meist um die 2.000 - 3.000 rfu (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls wurden durch den Einsatz von jeweils 5 µl DNA derselbigen Extrakte für alle Methoden Vollprofile erhalten. Lediglich bei dem Vergleich der Methode des Maxwell[®] 16 zeigten sich verringerte Peakintensitäten, die nur noch Werte zwischen 400 - 1.000 rfu aufwiesen. Die anderen Methoden zeigten Peakintensitäten, die meist um die 5.000 rfu lagen und max. 7.800 rfu annahmen, wobei sich die Produkte über 7.000 rfu abgeschnitten darstellten („off-scale“-Peaks). Die höchsten Peakausschläge waren für den King Fisher[™] Duo zu beobachten (Abb. 72).

Test Geräte

Maxwell 16 - TNCa-iQ / Fing Fisher - TNCa-Ademtech / EZ1 - TNCa-TP / PC-M



Abb. 72: Ergebnisse des Gerätevergleichs - Maxwell[®] 16, King Fisher[™] Duo und EZ1 Advanced

Dargestellt sind die PCR-Ergebnisse der DNA-Extrakte, die einen DNA-Gehalt von umgerechnet 6 Haaren enthalten. Es wurden 5 µl der Extrakte in eine 25 µl PCR eingesetzt.

Für alle zu testenden Methoden sind vollständige Profile zu detektieren. Die höchsten Intensitäten werden für den King Fisher[™] Duo erhalten, während die Methode des Maxwell[®] 16 nur schwache Intensitäten aufweist. Abgeschnittene Peaks von über 7.000 rfu sind gehäuft vertreten.

Die Skala der Intensität ist für alle Pannels auf 8.000 rfu eingestellt.

rote Peaks = Längenstandard (ROX HD400)

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich festhalten, dass mittels eines DNA-Extraktes aus 6 Haaren für alle getesteten Methoden aussagekräftige und verlässliche Ergebnisse in Form von Vollprofilen erhalten werden können.

Im Gegenzug hierzu waren die Ergebnisse der DNA-Extrakte, die umgerechnet die DNA aus 2 Haaren beinhalteten, ausschlaggebender. Hier lieferte lediglich die Methode des King Fisher[™] Duo ein sicheres und vor allem deutlich sensitiveres Ergebnis.

3.13 Untersuchung der mtDNA

Die vorhergehenden Abschnitte beschrieben STR-Markersysteme mit deren Hilfe auf Ebene der Kern-DNA der Hauskatze (*F. s. catus*) die Möglichkeit gegeben ist eine Differenzierung durchzuführen. Die Voraussetzung ist hierbei, dass eine ausreichende Menge an Kern-DNA vorhanden ist. Da bei *F. s. catus* hauptsächlich mit der Übertragungsspur Haar gerechnet werden kann, erfolgte hierzu die Optimierung der DNA-Extraktion. Führen all diese Methoden jedoch zu keinem Erfolg bei der Analyse der Kern-DNA, kann alternativ auf die mtDNA zurückgegriffen werden, die selbst in Haaren in einer hohen Kopienanzahl vorzufinden ist (siehe Abschnitt 1.3 und 1.10.1).

Im Rahmen einer Masterarbeit erfolgte die Überprüfung eines bereits publizierten mtDNA-Systems im Bereich der Kontrollregion der Katze und die Adaptierung dieses Systems auf Hauskatzen in Deutschland (Einteilung in Haplotypen). Nach Sichtung der Ergebnisse wurde weiteren Systeme gesucht, um die Differenzierung von *F. s. catus* gegebenenfalls zu optimieren. Da mittels der mtDNA aussagekräftige Erkenntnisse gewonnen und gerade bei einer unzureichenden oder fehlgeschlagenen STR-Analyse herangezogen werden können, sollen diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt werden. Genaue Erläuterungen zu der Vorgehensweise und zu den getesteten Systemen sind der Masterarbeit zu entnehmen [129].

3.13.1 mtDNA - Haplotypen-Verteilung nach Tarditi

Das von Tarditi et al. [121] verwendete System amplifizierte ein 492 bp langes Produkt, das anschließend auf einen auszuwertenden Bereich von 402 bp verkürzt wurde. Dieser Bereich entsprach der in der Literatur [121,122] verwendeten Sylvester-Referenzsequenz (SRS). Getestet wurden 145 Hauskatzen, deren Sequenzen insgesamt 21 SNP-Positionen aufwiesen, die zum Großteil durch Transitionen und nur vereinzelt durch Transversionen zustande kamen. Des Weiteren fand sich eine Indel-Position, bei der es sich entweder um eine Deletion oder Insertion handelte. Von den beschriebenen Haupthaplotypen A - L waren alle bis auf die Haplotypen E, G und L vertreten. Von den Unterhaplotypen, die nur eine geringe Varianz zu den jeweiligen Haplotypen zeigten, konnten A6 und B4 beobachtet werden. Weitere Haplotypen, die noch nicht beschrieben waren, wurden erhalten. Hierbei handelte es sich um neun Haplotypen, die mit X1 - X9 bezeichnet und zum Teil auch nur von einer Hauskatze repräsentiert wurden (X4 - X9) (Abb. 73).

Tarditi-System

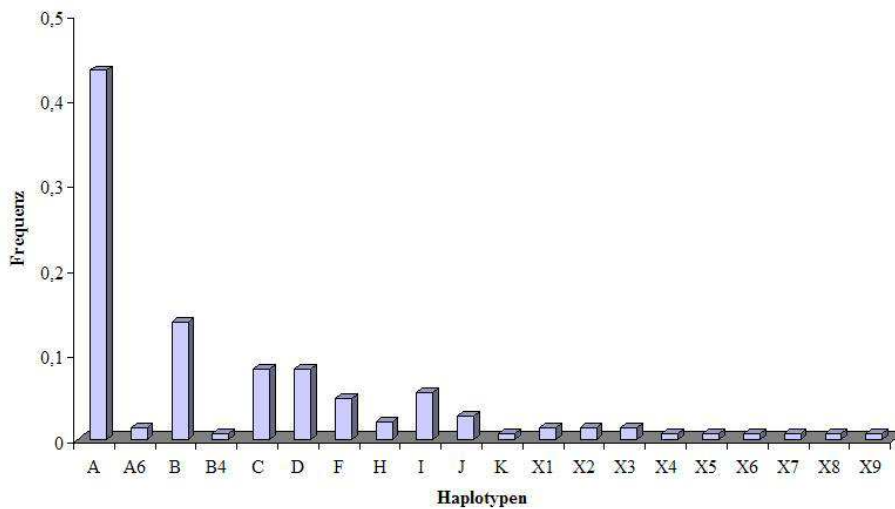


Abb. 73: Haplotypenverteilung nach Tarditi

Die durch Tarditi et. al. [121] beschriebenen Haplotypen wurden bis auf die Haplotypen E, G und L für die hier untersuchten 145 Hauskatzen erhalten. Von den Unterhaplotypen konnten lediglich A6 und B4 detektiert werden. Des Weiteren traten neun noch nicht beschriebene Haplotypen auf (mit X1 - X9 bezeichnet).

Wie in den Studien zuvor beschrieben [121,122] waren auch in dieser Stichprobe von 145 Katzen die vier Haupthaplotypen A - D am häufigsten vertreten. Der Haupthaplotyp A wurde durch 43,4 % der Individuen vertreten, gefolgt von Haplotyp B mit rund 13,8 % und den Haplotypen C und D, die jeweils durch 8,3 % vertreten waren. Somit repräsentierten rund 74 % der getesteten Hauskatzen diese vier Haupthaplotypen. Lediglich acht Haplotypen konnten beschrieben werden, die nur durch jeweils ein Individuum vertreten waren und somit für diese Stichprobe als einzigartig galten (~ 5,5 %).

Aufgrund der Tatsache, dass sich fast die Hälfte der untersuchten Hauskatzen auf nur einen Haplotypen verteilte, wurden weitere Bereiche der mtDNA auf Variationen hin untersucht. Für ein weiteres System der Kontrollregion konnten in dem gegebenen Zeitraum lediglich 92 Hauskatzen untersucht werden. Eine Anpassung der oben dargestellten Daten erfolgte auf eben diese verwendeten Individuen. Da das Augenmerk auf den Hauskatzen lag, die den Haplotypen A widerspiegeln, wurden vermehrt diese Tiere getestet. Hierdurch veränderte sich die Verteilung der Haplotypen zueinander. Weiterhin waren die Haplotypen A - D am stärksten vertreten. Haplotyp A wurde durch 50 %, Haplotyp B durch 17,4 %, Haplotyp C durch 8,7 % und Haplotyp D durch 5,4 % der Individuen repräsentiert. Diese Anteile entsprachen insgesamt 81,5 % der Gesamtstichprobe. Die herabgesetzte Stichprobe enthielt

Individuen, für die fünf noch nicht beschriebene Haplotypen beobachtet wurden. Mit 6,5 % waren diejenigen Haplotypen vertreten, die bei nur jeweils einem Individuum detektiert werden konnten (Abb. 74).

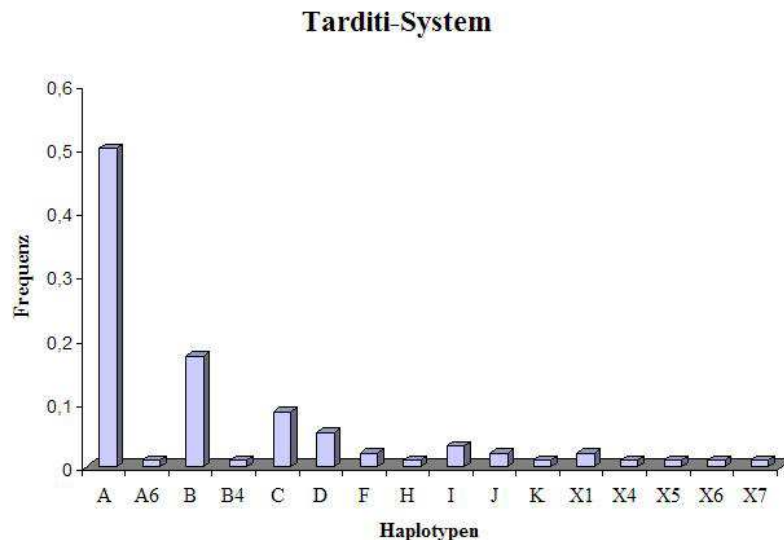


Abb. 74: Haplotypenverteilung nach Tarditi

Durch Reduktion der Stichprobe auf 92 Hauskatzen ändert sich die Verteilung der Haplotypen minimal. Weiterhin handelt es sich bei den Haplotypen A -D um die am stärksten vertretenen Haupthaplotypen. Die Anzahl der noch nicht beschriebenen Haplotypen reduzierte sich auf fünf (X1, X4 - X7).

Im nachfolgenden Verlauf galt es ein System zu etablieren, das die Haplotypenverteilung des Tarditi-Systems weiter differenzierte und die Aussagekraft des Systems verbesserte.

3.13.2 mtDNA - Haplotypen-Verteilung nach RS2

Nachdem weitere Bereiche innerhalb der Kontrollregion als auch angrenzende Regionen, wie Teile des Cytochrom b-Gens, untersucht wurden, fand sich ein System, das eine weitere Differenzierung des Haupthaplotyps A des Tarditi-Systems versprach. Hierbei handelte es sich um einen Bereich in der Kontrollregion, der Teile der RS2-Region beinhaltet und als System RS2 bezeichnet wurde. Diese Repeatregion besteht aus einem 80/82 bp-Repeat, der bis zu 3-mal wiederholt wird [97]. Nach Amplifikation wurden bis zu fünf Produkte erhalten, die in ihrer Produktlänge um ca. 80 bp zueinander schwankten und sich unterschiedlich stark darstellten (169 bp, 252 bp, 331 bp, 409 bp und 488 bp). Letztendlich wurde für die Analyse zur Haplotypenbestimmung das sich am stärksten darstellende Produkt mit 409 bp verwendet.

ERGEBNISSE

Nach erfolgter Sequenzierung wurde die zu analysierende Sequenz auf 293 bp gekürzt, um alle Basen einwandfrei identifizieren zu können. Wie in Abschnitt 3.13.1 erwähnt, wurden 92 Katzen untersucht. Mit Hilfe dieser Sequenzen konnten 28 SNP-Positionen detektiert werden, die hauptsächlich durch Transitionen verursacht wurden. Weitaus weniger traten Transversionen in Erscheinung. Zwei Indels ließen sich beobachten, bei denen jeweils 2 bp inseriert wurden oder fehlten. Insgesamt wurden 12 Haplotypen erhalten (a - l), die durch mehrere Individuen dargestellt wurden. Von diesen waren bis zu fünf Haplotypen häufiger vertreten. Der sich am stärksten darstellende Haplotyp a, wurde durch 17,4 % der getesteten Hauskatzen repräsentiert, gefolgt von den Haplotypen b und c, die mit je 13 % vertreten waren. Die Haplotypen d und e traten zu 9,8 % und 7,6 % auf. Haplotypen, die für nur je ein Individuum beobachtet wurden und somit für die Stichprobe als einzigartig galten, traten zu 18,5 % auf (Xi; insgesamt 17 Haplotypen) (Abb. 75).

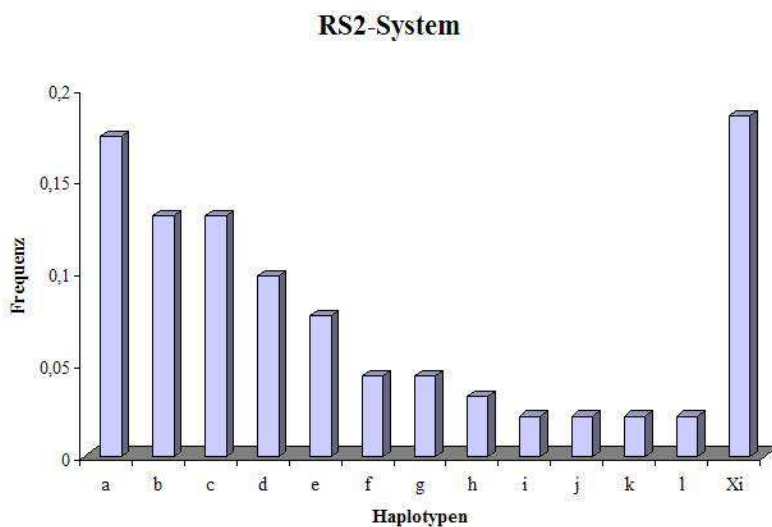


Abb. 75: Haplotypenverteilung nach RS2

Mittels 92 untersuchter Hauskatzen konnten 12 Haplotypen detektiert werden, die für mehrere Hauskatzen beschrieben werden konnten. Des Weiteren sind 17 Haplotypen vertreten, die durch nur je ein Individuum repräsentiert werden (Xi).

Diese Verteilung zeigte eine gute Differenzierung der Individuen aus der vorliegenden Stichprobe. Mit diesem System stellte sich der am stärksten vertretene Haupthaplotyp gerade mal mit 17,4 % dar.

3.13.3 Haplotypen-Verteilung nach Kombination des Tarditi- und RS2-Systems

Da das RS2-System eine hinreichend gute Verteilung der Haplotypen aufwies, wurden die Verteilungen dieses System und die des Tarditi-Systems kombiniert betrachtet. Insgesamt wurde eine Sequenz von 695 bp (das 402 bp lange Produkt von Tarditi und das 293 bp lange des RS2-Systems) auf SNPs hin untersucht und eine neue Haplotypenverteilung erstellt. Die hierbei verwendete Nomenklatur setzte sich aus der von Grahn et al. [122] und der für das RS2-System eingeführten Nomenklatur zusammen. Durch die kombinierte Betrachtungsweise konnten 13 Haplotypen erhalten werden, die durch mehrere Individuen repräsentiert wurden. Den größten Anteil an Haplotypen machten sog. einzigartige Haplotypen aus, die nur für jeweils ein Individuum beobachtet wurden (Xi) (Abb. 76).

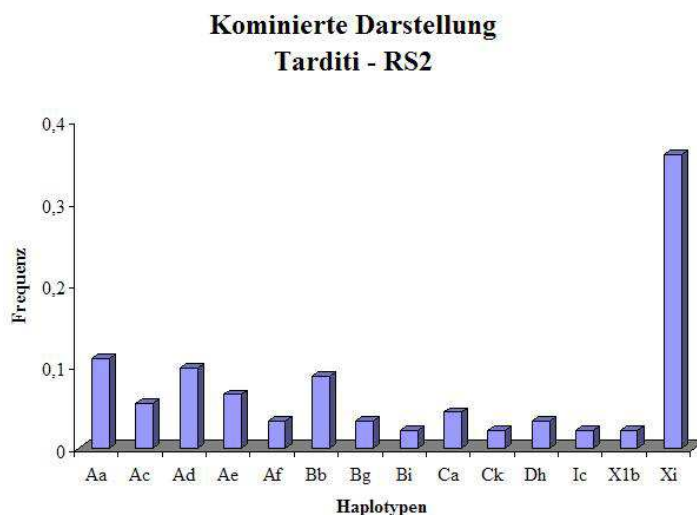


Abb. 76: Kombinierte Haplotypenverteilung des Tarditi- und des RS2-Systems

Die kombinierte Darstellung der beiden Systeme führt zur Ermittlung von 13 Haplotypen, die durch mehrere Individuen vertreten sind. Des Weiteren wurden in der Stichprobe von 92 Hauskatzen 33 einzigartig auftretende Haplotypen erhalten (Xi).

Anhand des Diagramms wird ersichtlich, dass der Haupthaplotyp A der Tarditi-Systems in insgesamt fünf Haplotypen differenziert werden konnte, die durch mehrere Individuen vertreten waren. Bei dem am häufigsten auftretenden Haplotypen handelt es sich um Haplotyp Aa, der durch 10,9 % der Individuen repräsentiert wurde. Danach folgten die Haplotypen Ad (9,8 %), Bb (8,7 %) und Ae (6,5 %). Eine weitere Differenzierung der Haupthaplotypen B, C und D konnte ebenfalls durch Kombination der beiden Systeme erreicht werden. Insgesamt wurden 33 einzigartig auftretende Haplotypen detektiert, die 35,9 % der Stichprobe ausmachten und weitere Differenzierungen der Haupthaplotypen aufwiesen.

3.13.4 Sensitivitätsstudie

Der Sensitivitätstest wurde für das Tarditi- und das RS2-System durchgeführt. Die dabei verwendeten Proben und Verdünnungsstufen entsprachen denen unter Abschnitt 2.5.1 bereits beschriebenen.

Durch alle Verdünnungsstufen hinweg konnten für beide Systeme die entsprechenden Produktpeaks erhalten werden. Bis zu einer eingesetzten Gesamt-DNA-Menge von 12,5 pg wurden für die jeweiligen Systeme noch Produktpeaks mit Intensitäten von bis zu 4.000 rfu erhalten (Abb. 77).

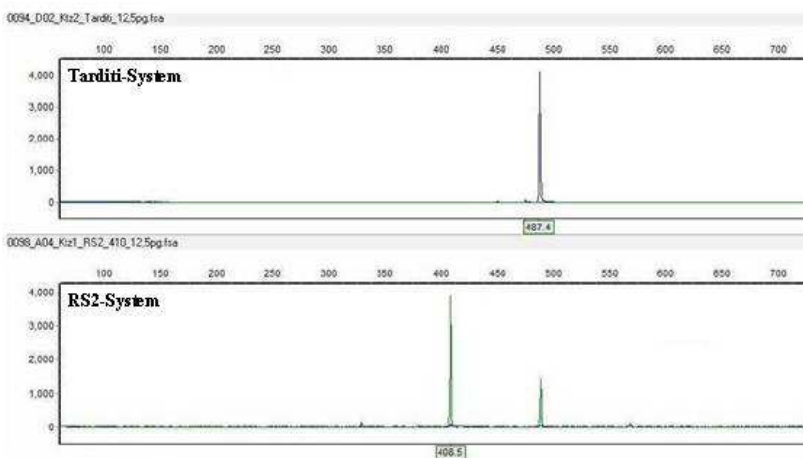


Abb. 77: Sensitivitätstest des Tarditi- und des RS2-Systems

Beide Systeme weisen bis zu einer Gesamt-DNA-Menge von 12,5 pg Produktpeaks mit Intensitäten bis zu 4.000 rfu auf.

Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, dass Produktpeaks mit einer Intensität von 4.000 rfu zu reproduzierbaren Ergebnissen bei der Sequenzierung führten (Daten nicht gezeigt). Beide Systeme wiesen somit eine hohe Sensitivität auf, die selbst mit einer Gesamt-DNA-Menge von 12,5 pg zu einer erfolgreichen Haplotypisierung führte.

3.13.5 Test auf Artspezifität

Sowohl das Tarditi-System als auch das RS2-System wurden auf ihre Artspezifität hin getestet. Unter Zuhilfenahme der in Tabelle 1 aufgeführten Spezies (Abschnitt 2.1.1) wurde der Test analog zu den STR-Markersystemen durchgeführt.

Die Spezies der Ordnungen Artiodactyla (Paarhufer), Perissodactyla (Unpaarhufer), Lagomorpha (Hasenartige), Rodentia (Nagetiere), Primates (Primaten) sowie die Familien der Ursidae (Bären), Mustelidae (Marder) und Canidae (Hunde) aus der Ordnung der Carnivora (Raubtiere) wiesen keine Kreuzreaktionen mit dem Tarditi-System auf.

Die oben genannten Spezies mit Ausnahme des Baummarders (*Martes martes*) zeigten auch unter Verwendung des RS2-Systems keine Produktamplifikation. Für *M. martes* wurden Produkte bei ca. 340 bp und 560 bp ermittelt, die eine Intensität von 1.500 rfu aufwiesen und nicht als Artefakte gewertet werden konnten.

Die Familie der Felidae (Katzen) zeigte mit beiden Systemen der mtDNA sowohl Produkte unterschiedlicher Intensität als auch mit teilweise variierender Produktgröße.

Das Tarditi-System wies keine Produktamplifikation für die Rostkatze (*P. r. phillipsi*) auf, wohingegen analoge Produkte der Hauskatze für den Löwen (*P. leo*) und die Europäische Wildkatze (*F. s. silvestris*) erhalten wurden. Der Eurasische Luchs (*L. lynx*) wies ein um 2 bp abweichendes Produkt von ca. 494 bp auf, welches zudem nur knapp oberhalb einer Intensität von 50 rfu lag und somit nur geringfügig amplifiziert wurde.

Im Vergleich hierzu wurden für alle Individuen der Felidae mit dem RS2-System eindeutige Ergebnisse erhalten, die sich ebenfalls in ihrer Größe zueinander unterschieden. Während *F. s. silvestris* identische Ergebnisse zu *F. s. catus* zeigte, unterschieden sich die Produkte der anderen drei Spezies in ihrer Länge zueinander. Das Hauptprodukt von *P. r. phillipsi* war 2 bp länger als das von *F. s. catus*, während das von *L. lynx* sich 60 bp kleiner darstellte. Alle Produkte zeigten eine starke Amplifikation mit Intensitäten > 7.000 rfu. Einzig die detektierten Produkte von *P. leo* wiesen im Vergleich hierzu eine geringe Intensität auf. Es konnten Produkte bei 571 bp, 652 bp (jeweils um die 800 rfu) und 732 bp (ca. 200 rfu) erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

3.14 Artbestimmung mit Hilfe der mtDNA

Eine sichere Artbestimmung ist die Voraussetzung für den Einsatz der zu untersuchenden Proben in die STR-Analyse, da über diese artspezifische Produkte generiert werden. Tierhaare können größtenteils morphologisch einer Spezies zugeordnet werden. Speziell bei feinen Haaren sowie Blut, Sekret oder Gewebeproben ist dies nicht möglich. Hierbei kann jedoch die Artbestimmung über die mitochondriale DNA hilfreich sein.

Nachfolgend werden die Ergebnisse zweier Systeme vorgestellt mit deren Hilfe Produkte spezifischer Länge für unterschiedliche Spezies amplifiziert werden und so ein spezifischer Artnachweis geführt werden kann.

3.14.1 Primer MM - Kontrollregion

Das Primersystem MM bindet auf der mtDNA in der Kontrollregion unterschiedlicher Spezies und amplifiziert Produkte spezifischer Länge.

Der PCR-Ansatz wurde entsprechend optimiert sowie das PCR-Protokoll dem der STR-Marker angeglichen. Die Länge der speziesspezifischen Produkte blieb auch nach den Optimierungen gleich, während die Amplifikation leicht verbessert werden konnte.

Beispiele amplifizierter Produkte mittels des Primersystems MM sind in Abb. 78 dargestellt.

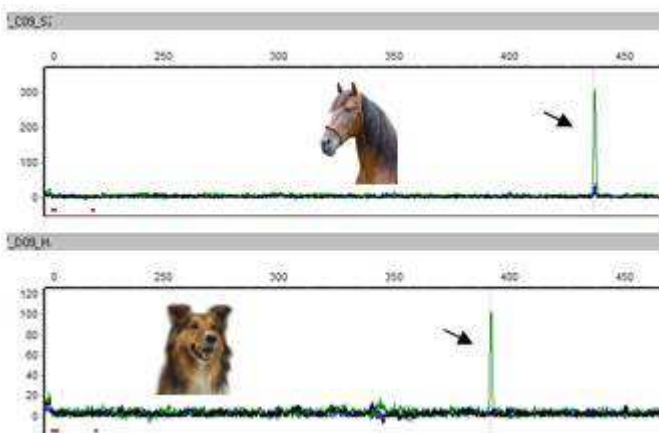


Abb. 78: Produktamplifikation mittels der Primer MM - mtDNA (Kontrollregion)

Die spezifische Produktamplifikation ermöglicht es, anhand der Produktlänge eine Aussage über die Spezies treffen zu können. Mit den Primern MM, die in der Kontrollregion unterschiedlicher Spezies binden, wird z. B. für das Pferd ein 440 bp-Produkt und für den Hund ein 393 bp-Produkt amplifiziert.

Dieses System bietet einen ersten Untersuchungsansatz, falls der Ursprung einer Spur oder Probe unbekannt oder z. B. durch morphologische Analysen (bei Haaren) nicht eindeutig zuzuordnen ist.

3.14.2 Tobe und Linacre - Cytochrom b

Für den internen Untersuchungsansatz wurden aufgrund des Spurenaufkommens die Spezies Pferd (*Equus caballus*), Katze (*F. s. catus*) und Hund (*Canis lupus familiaris*) in einem Multiplex vereint. Entsprechend der in dem Multiplex vertretenen Spezies wurde dieser als „HoCaDo“ (Abkürzungen für die englischen Bezeichnungen von *Horse*, *Cat* und *Dog*) bezeichnet.

Zunächst wurde der PCR-Ansatz des Multiplexes nach Angaben aus der Literatur zusammengestellt und das angegebene Temperaturprofil verwendet. Die Detektion der zu erwartenden Produktpeaks schwankte zwischen den Spezies sehr stark (Daten nicht gezeigt). Da zudem die angegebenen Mengen der Primer stark variierten und nur ungenau zu pipettieren waren (z. B. 0,22 µl des R-Primers 2 von *F. s. catus*), erfolgte die Korrektur der Primerkonzentrationen im Ansatz. Die universellen Primer wurden mit 0,8 µM und die jeweiligen R-Primer zu 0,4 µM eingesetzt. Des Weiteren wurde das Temperaturprofil an das der STR-Markersysteme von *F. s. catus* angeglichen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten zum größten Teil bessere Peakstrukturen, d.h. dass zuvor eher niedrig repräsentierte Peaks durch die veränderte Konzentration in ihrer Intensität stärker dargestellt wurden.

Die Ergebnisse nach Optimierung der PCR sind in Abb. 79 dargelegt. Für alle drei Spezies war durchgängig zu beobachten, dass jeweils einer der beiden speziesspezifischen Peaks schwächer amplifiziert wurde. Das Pferd wies Produkte bei ca. 215 bp und 333 bp auf, wobei das größere Produkt in einem geringeren Umfang amplifiziert wurde. Dagegen stellten sich die jeweils kleineren Produkte des Hundes und der Katze im Elektropherogramm jeweils schwächer dar. Die detektierten Produkte des Hundes lagen bei ca. 169 bp und 304 bp, während für die Katze Produkte mit einer Länge von ca. 95 bp und 184 bp amplifiziert wurden.

ERGEBNISSE

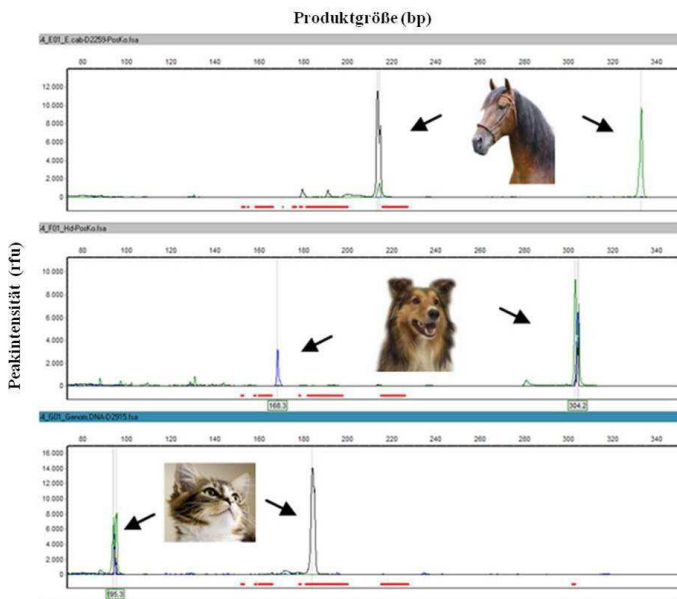


Abb. 79: Multiplexes „HoCaDo“

Je zwei speziesspezifische Produkte der Spezies *E. caballus* (ca. 215 bp und 333 bp), *C. l. familiaris* (ca. 169 bp und 304 bp) und *F. s. catus* (ca. 95 bp und 184 bp) werden mit diesem Multiplex amplifiziert. Diese lassen sich aufgrund ihrer Größe und der entsprechenden Farbmarkierung gut voneinander unterscheiden.

Die Kreuzreaktivität zu menschlicher mtDNA wurde getestet. Es konnte keine Amplifikation dieser DNA festgestellt werden, noch wurde die Amplifikation der zu erwartenden Produkte durch deren Zugabe beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Neben des „HoCaDo“-mtDNA-Multiplexes wurde ein weiterer Multiplex mit den Primern aus der Studie von Linacre et al. [114] zusammengestellt. Dieser Multiplex enthielt die sog. Nutztiere, die häufig in Deutschland vorkommen. Bei diesen Spezies handelte es sich um Kuh (*Bos taurus*), Schwein (*Sus scrofa*), Ziege (*Capra hircus*) und Schaf (*Ovis aries*). Der Multiplex wurde, den zu detektierenden Spezies entsprechend mit „CoPiGoSh“ (Abkürzungen für die englischen Bezeichnungen von *Cow*, *Pig*, *Goat* und *Sheep*) benannt.

Anstatt zweier speziesspezifischer Produkte wurde für diesen Multiplexansatz je nur ein speziesspezifisches Produkt pro Spezies gewählt. Bei den verwendeten R-Primern handelte es sich um diejenigen, die das jeweils kleinere Produkt mit einem der drei universellen Primer amplifizierten. Einzige Ausnahme stellt *S. scrofa* dar. Da sich die Längen der beiden Produkte nur unwesentlich voneinander unterscheiden (199 bp zu 219 bp), wurde auf das 219 bp-Produkt zurückgegriffen. Die Amplifikation dieses Produktes stellte sich im Vergleich zu dem 199 bp-Produkt etwas stärker dar.

Die Konzentrationsbedingungen für die PCR sowie das Temperaturprofil wurden dem des Multiplexes „HoCaDo“ angepasst.

Die Abb. 80 zeigt die jeweils amplifizierten Produkte pro Spezies im Multiplex-Ansatz. Das Produkt für die Kuh war ca. 96 bp lang, während das Produkt des Schweines eine Länge von ca. 218 bp besaß. Für die Ziege wurde ein Produkt der Länge von 274 bp amplifiziert. Das Produkt Des Schafs wies eine Länge von 103 bp auf. Die Angaben der Produktgrößen waren minimal abweichend zu denen, die in der Literatur angegeben waren [114].

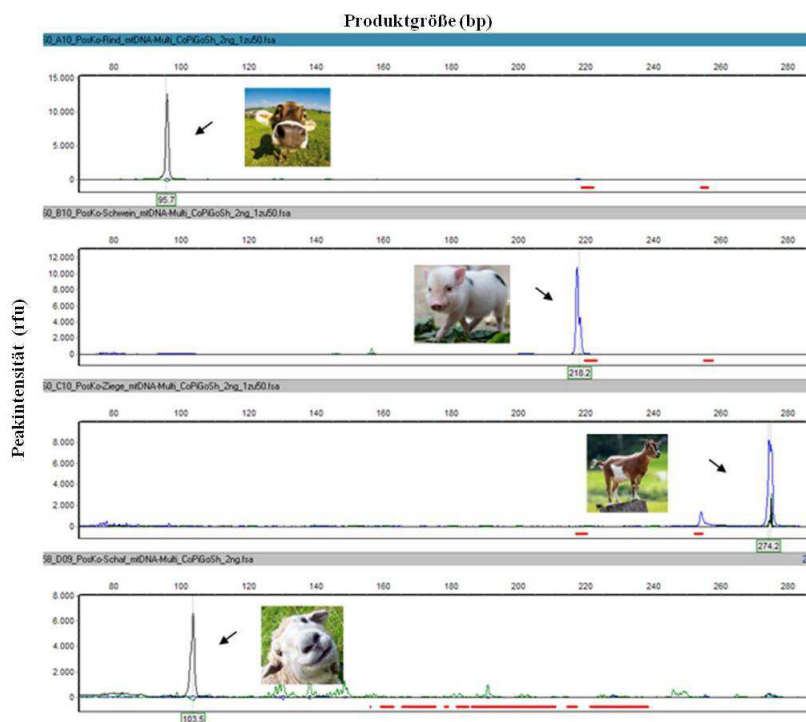


Abb. 80: Multiplexes „CoPiGoSh“

Dargestellt sind die jeweiligen Produkte, die spezifisch für die im Multiplex enthaltenen Spezies amplifiziert wurden. Von oben nach unten sind die detektierten Produkte von *B. taurus* (ca. 96 bp), *S. scrofa* (ca. 218 bp), *C. hircus* (ca. 274 bp) und *O. aries* (ca. 103 bp) wiedergegeben.

Auch bei diesem Multiplex sind die erhaltenen Produkte voneinander unterscheidbar und können eindeutig einer Spezies zugeordnet werden.

Die Kreuzreaktivität mit menschlicher mtDNA wurde ebenso getestet und führte auch hier zu keiner Amplifikation der menschlichen DNA oder einer Beeinträchtigung der Produktamplifikation (Daten nicht gezeigt).

3.15 Falldarstellung

Die in dieser Arbeit beschriebenen STR-Markersysteme von *F. s. catus* sowie die mtDNA-Multiplexe „HoCaDo“ und „CoPiGoSh“ wurden bereits in der Fallarbeit angewandt.

Ein Fall von Tierquälerei zeigte eindrucksvoll, dass die in dieser Arbeit etablierten Systeme auf Kern-DNA als auch auf mitochondrialer Ebene zu einem sicheren und aussagekräftigen Ergebnis führen und für den Einsatz in der kriminaltechnischen Arbeit geeignet sind.

Dieser Fall soll kurz vorgestellt und die Vorgehensweise werden.

Im Jahr 2012 fand die Katzenbesitzerin Frau R. ihre Katze mit diversen Verletzungen an Kiefer, Beinen und Schwanz auf der Treppe zu ihrem Haus. Diese waren so schwerwiegend, dass die Katze von einem Tierarzt eingeschläfert werden musste. Nach Ansicht des Tierarztes war es unmöglich, dass sich die Katze alleine zu der Treppe geschleppt haben könnte. Viel wahrscheinlicher sei es, dass jemand die Katze dort abgelegt habe. Röntgenaufnahmen zeigten zudem, dass ein Verkehrsunfall auszuschließen war, da keinerlei innere Verletzungen vorlagen.

In der Vergangenheit gab es mit der Nachbarin Frau S. immer wieder Streitigkeiten, die hauptsächlich die Katze von Frau R. betrafen. Der Ehemann von Frau R. konfrontierte seine Nachbarin mit den Verletzungen der Katze und wollte wissen, ob sie etwas damit zu tun hätte. Diese verneinte ein Zutun ihrerseits, noch dass sie die Katze die letzten Tage gesehen hätte. Dem Ehemann fielen bei der Befragung rötliche Tropfen auf den Stufen der Treppe zu dem Haus von Frau S. auf. Diese erklärte sie durch das Herunterfallen einer Tomate. Der Ehemann verständigte daraufhin die Polizei, die eine Abriebprobe der Tropfen nahm, welche anschließend dem BKA zur weiteren Untersuchung übersandt wurden.

Zunächst musste überprüft werden, ob es sich überhaupt um Blut handelte. Hierzu wurde eine Methode zum spezifischen Blutnachweis angewandt, die positiv ausfiel (Porphyrin-Test). Anschließend wurde getestet, ob es sich bei dem Blut speziell um Katzenblut handelte. Hierzu wurde der Multiplex „HoCaDo“ eingesetzt, dessen Ergebnis eindeutig den beiden Produkten der Katzen-Positivkontrolle zugeordnet werden konnten. Da es sich somit um Katzenblut handelte, wurde die extrahierte DNA der Spur daraufhin mit den STR-Markersystemen untersucht. Eine Vergleichsprobe der gequälten Katze war in Form von Muskelgewebe vorhanden. Zu dem Zeitpunkt als die Untersuchung anstand, lagen noch keine Multiplexe vor, weshalb die Untersuchung mit den jeweiligen Einzelsystemen erfolgte. Die Allelpeaks, die für alle Marker erhalten wurden, stimmten zwischen Spur und Vergleich eindeutig überein. Da

für die Berechnung der Häufigkeit dieses Typisierungsergebnisses eine Vergleichspopulation von nur 71 Individuen zur Verfügung stand, wurde für die Berechnung auf die theoretisch am häufigsten in der Population zu erwartende Merkmalskombination der Systeme zurückgegriffen. Hierbei erfolgte die Berechnung mit 13 der untersuchten Markersysteme, da womöglich eine Kopplung zwischen zwei Markern besteht (F42 und F141; siehe Abschnitt 4.5). Die häufigste Merkmalskombination war 1 Mal unter ca. 20 Milliarden Katzen zu erwarten. Berücksichtigt man die Individuenzahl von Hauskatzen in Deutschland, handelt es sich bei der hier untersuchten Spur und dem Vergleich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um ein und dieselbe Katze.

Ist die Zuordnung einer Haar- bzw. Sekretspur fragwürdig, kommt in der Fallarbeit häufig einer der beiden mtDNA-Multiplex zum Einsatz. Zum einen bieten sie sichere und schnellere Ergebnisse im Vergleich zu der ursprünglichen Methode der Untersuchung der mtDNA, bei der zunächst eine Amplifikation stattfand und anschließend sequenziert wurde. Zum anderen lässt sich zudem ein Eindruck über den Zustand der DNA aus der Probe gewinnen.

Die bis zum heutigen Zeitpunkt erhaltenen Ergebnisse waren zuverlässig und konnten sich durch Überprüfung in einer Eignungsprüfung im Bereich von Haarspuren bewähren.

Bei folgenden unter der Fallarbeit laufenden Vorgängen wurden die beiden Multiplexe u. a. angewendet:

Drahtschlinge-Pferd

*Es wurde mit dem Multiplex „HoCaDo“ nachgewiesen, dass es sich bei den an der Schlinge befindlichen Antragsungen um Spuren handelte, die von einem Pferd (*E. caballus*) stammten.*

Pferderipper Malberg

*Die rötliche Antragung an einer Bank auf dem Gelände eines Gnadenhofes konnte als Blut eines Pferdes (*E. caballus*) identifiziert werden (Multiplex „HoCaDo“). Mittels zwei STR-Marker, die sowohl bei Pferden als auch Eseln Produkte amplifizieren, konnte diese Antragung einem der getöteten Ponys zugewiesen werden.*

Entführung

*An einem ca. 1 cm langen Haarfragment und an einem ca. 5 cm langen Haar, welche an einem Tatort sichergestellt wurden, sollte über mtDNA eine Tierartbestimmung durchgeführt werden. Das lange Haar konnte unter Anwendung des Multiplexes „HoCaDo“ der Spezies Hund (*C. l. familiaris*) zugeordnet werden. Für das Haarfragment blieb ein Ergebnis aus. Das Haarfragment konnte jedoch der Alternativmethode Primer MM (entwickelt von Dr. W. Hecht) identifiziert und der Spezies Pferd (*E. caballus*) zugeordnet werden.*

4 Diskussion

In den letzten Jahren hat die Beachtung von biologischen Spuren in der kriminalistischen Fallarbeit erheblich zugenommen. Neben den menschlichen Spuren sind an einem Tatort zusätzlich häufig sowohl pflanzliche als auch tierische Spuren zu finden. Gerade wenn die molekulargenetische Untersuchung der menschlichen Spuren keine tatrelevanten Hinweise zur Aufklärung liefern können, gewinnen Spuren pflanzlichen oder tierischen Ursprungs an Bedeutung. So trat die Polizei in mehreren Fällen z. B. an Wissenschaftler oder Institutionen heran und bat um Unterstützung bei der Verbrechensaufklärung. Diese entwickelten mit ihren Möglichkeiten meist unter Zeitdruck eine Methode, um pflanzliches oder tierisches Material forensisch zu bearbeiten und nach Möglichkeit zu individualisieren. So geschehen u. a. im „Maricopa-Fall“ im Jahr 1992. Auf einem verlassenen Fabrikgelände, wo sich mehrere Palo Verde-Bäume (*Parkinsonia microphylla*) befanden, wurde eine Frauenleiche gefunden. Die Samenhülsen eines Palo Verde-Baumes aus dem Fahrzeug des Verdächtigen konnten mit Hilfe molekulargenetischer Methoden eindeutig einem dieser Bäume auf dem Fabrikgelände zugeordnet werden [147]. Ein weiteres Beispiel für so ein Vorgehen war der Fall „Snowball“ (siehe Abschnitt 1.3). Auch hier standen weder Voruntersuchungen noch Vergleichdaten zur Verfügung, auf die man sich hätte stützen können. Diese beiden Fälle waren die weltweit ersten, in denen Pflanzenreste und Tierhaare sowie deren molekulargenetischen Ergebnisse als Beweismittel in laufende Verfahren aufgenommen und für die Urteilsfindung berücksichtigt wurden.

Die humanen STR-Systeme stehen seit Jahren in einer stetigen Entwicklung und unterliegen strengsten Auflagen. Diese sind bestens validiert und standardisiert, sodass ein stetiger und sicherer Austausch von Daten zwischen unterschiedlichsten Institutionen stattfinden kann. Hierzu werden standardisierte Kits von Firmen angeboten, die den Normen entsprechen. Auch wurden Datenbanken auf Basis der Kern-DNA und mitochondrialen DNA aufgebaut, in die kontinuierlich neue Daten eingebracht werden. So eine strikte und zielgerichtete Vorgehensweise fehlt sehr häufig im Bereich der pflanzlichen und tierischen DNA. Bei den Tieren spielt überwiegend die Abstammungsbegutachtung eine Rolle, deren Durchführung durch eine Vielzahl von Firmen angeboten wird. Informationen über die Methoden oder Kits sind nicht frei zugänglich. Ferner eignen sich die angebotenen Kits nur bedingt für die Untersuchung von Spurenmaterial. Auch besteht unter den Firmen nicht das Interesse Ergebnisse oder Systeme auszutauschen, weshalb hier eine Standardisierung meist gänzlich fehlt.

Der Fall „Snowball“ hat eindeutig gezeigt, dass tierische Spuren von höchster Bedeutung für die Forensik sein können. Die Individualisierung im „Snowball“-Fall erfolgte mittels Dinukleotid-Repeatmarkern, die dazu neigen sehr hohe Stotterprodukte auszubilden und die Auswertung der Produktpeaks zu erschweren (siehe Abschnitt 1.8.1; [16]). Spätere Studien von Menotti-Raymond et al. zeigen, dass diese dazu übergingen die weniger artefakt-anfälligen Tetranukleotid-Repeatmarker zu verwenden. Es wurden 11 solcher Marker sowie der Geschlechtsmarker SRY in einem Multiplex vereint und ein entsprechender Artikel in dem Journal „Profiles in DNA“ der Firma Promega veröffentlicht („MeowPlex“; [34]). Dieser Multiplex wurde jedoch nie vertrieben. Im Jahr 2007 wurde eine Studie zur Validierung der Systeme des „MeowPlexes“ herausgegeben [55]. Der wichtigste Punkt zur Validierung und Standardisierung dieser Systeme und damit eine Angleichung an die Validierung der humanen Systeme wurde jedoch nicht berücksichtigt: Zur exakten Bestimmung der Produktgrößen und zum Datenaustausch fehlte die Erstellung von Allelleitern.

Die ISFG (International Society for Forensic Genetics), die Vorschläge zur Standardisierung der humanen DNA-Untersuchung herausgegeben hat, hat ebenfalls Interesse daran, die tierische DNA-Untersuchung den humanen Methoden anzugleichen. Deshalb wurden speziell für diesen Bereich Standardisierungsvorschläge formuliert [74,75] und bereits von einigen Institutionen u. a. für den Hund als auch den Dachs erfolgreich umgesetzt [141,146,148,149].

An einem Tatort handelt es sich bei tierischen Spuren häufig um Haare. Diese werden sehr leicht übertragen und bleiben an den unterschiedlichsten Oberflächen haften [13,14,15], weshalb man in diesem Zusammenhang auch von Übertragungsspuren spricht. Diese stellen besonders bei der Hauskatze das primäre Untersuchungsobjekt dar. Haare beinhalten nur sehr wenig DNA, die zusätzlich durch Abbauprozesse degradiert vorliegt. Eine Anpassung der STR-Markersysteme speziell auf diese Minimalspur sowie eine Standardisierung für *F. s. catus* erfolgte bislang nicht. Aufgrund dessen wurde mit der Durchführung dieser Arbeit eine Validierung angestrebt, die durch eine schrittweise Optimierung nach den Vorgaben der ISFG für nicht-humane Spuren realisiert wurde.

4.1 Auswahl und Optimierung geeigneter STR-Markersysteme

Zur Erstellung eines geeigneten Verfahrens zur Individualisierung von *F. s. catus* wurden aus der Literatur beschriebene Tetranukleotid-Repeatmarker ausgewählt. Anforderungen an die Systeme waren u. a. eine verlässliche Amplifikation, ein Produktbereich bis max. 300 bp sowie interpretierbare Allelpeaks, die sich ausgeglichen zueinander darstellten.

Von insgesamt 20 getesteten Markern waren letztendlich nur 14 für eine forensische Anwendung geeignet. Dies hatte unterschiedliche Gründe. Zum Teil erfolgte mit den in der Literatur beschriebenen Primern keine bzw. nur eine sporadische Produktamplifikation (z. B. F41, F53, F85, FCA723, FCA736, FCA739 und FCA747). In fast allen dieser Fälle bot die um die Repeateinheiten liegende Sequenz keine Möglichkeit neue Primer zu synthetisieren, da diese entweder einen zu großen Produktbereich von über 300 bp einschlossen oder Einzelbasen in Form eines Stretches direkt an den Repeatbereich angrenzten.

Wie bei der Untersuchung der Markersysteme gezeigt, kann das Vorhandensein solcher tandemartig wiederholten Einzelbasen in bestimmten Fällen zu Problemen führen. Die Amplifikation des Systems F41 zeigte bis zu sechs Signale pro zu erwartendem Produkt (siehe Abb. 20; Abschnitt 3.1). Die eigentümliche Peakstruktur kann durch einen (A)-Stretch erklärt werden, der sich unmittelbar vor dem Repeatbereich befindet. Dieser setzt sich aus 13 hintereinander geschalteten Adeninbasen zusammen (laut der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz und [53]). Während der Amplifikation entstehen aufgrund dieses Stretches wahrscheinlich Strangverschiebungen, die bedingen, dass nicht alle Adeninbasen korrekt in das Produkt integriert werden. Dies führt dazu, dass im Falle des Systems F41 bei der Amplifikation bis zu fünf Adenine überlesen werden können, was diese Signalmuster erklären würde. Dieses Phänomen wurde ebenso bei der Synthese von Produkten des Markersystems PEZ 10 bei den Hunden beobachtet und beschrieben [146]. Dort zeigten einzelne Allele ähnliche Peakstrukturen (Allele 16.3, 17.3, 18.3 und 22.2). Nach diesen Untersuchungen kann man davon ausgehen, dass eine Sequenzabfolge vor der eigentlichen Repeatstruktur von mindestens 10 aufeinander folgenden Einzelbasen gleicher Art unter Verwendung der AmpliTaq Gold[®]-Polymerase dieses Phänomen bedingt. Tritt dagegen eine geringere Anzahl dieser Einzelbasen in Erscheinung, werden reguläre Peaks generiert. Beweis hierfür stellt das System FCA734 dar, das vor dem eigentlichen Repeatbereich sieben sich wiederholende Adenin-Basen zeigt. Diese geringe Anzahl an Basen wirkt sich nicht negativ auf die Amplifikation der Produkte aus und führt zu keiner abnormalen Peakstruktur.

DISKUSSION

Die Optimierung des Markers F42 zeigte nach Neusynthese der Primer Unstimmigkeiten bei der Zuordnung der Produktgrößen des alten zu dem neuen Produktgrößenbereich. So wies z. B. das ursprünglich 222 bp-Produkte mit den neuen Primern eine Größe von 95 bp auf. Diese Größe wurde jedoch auch von den ursprünglich 201 bp- und 206 bp-Produkten wiegegeben. Des Weiteren konnte dem 222 bp-Produkt eine Größe von 99 bp zugewiesen werden, die ebenso für das ursprünglich 226 bp-Produkt erhalten wurde. Die Betrachtung der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz des Markers F42 legt nahe, dass der Marker zwei durch eine konstante Region getrennt voneinander liegende Repeatblöcke aufweist, die beide durch die in der Literatur beschriebenen Primer erfasst wurden. Durch die Neusynthese der Primer, speziell des R-Primers, wurde einer der Repeatbereiche ausgeschlossen, so dass ein Informationsverlust stattgefunden hat. Durch unterschiedliche Variationen innerhalb des ersten und zweiten Repeatblocks kann so die Doppelbestimmung der erwähnten Produkte erklärt werden. Dies sei am Beispiel der Produkte mit 201 bp, 206 bp und 222 bp erläutert. Wahrscheinlich ist, dass die beiden Produkte mit 201 bp und 206 bp im Vergleich zu dem 222 bp-Produkt ausschließlich eine Variation im zweiten Repeatblock aufwiesen (Reduktion um 16 bp bzw. 21 bp im Vergleich zum 222 bp-Produkt). Durch den Ausschluss dieses Repeatsblocks mittels des neu synthetisierten Primers wurden diese Variationen nicht detektiert und aufgrund derselben Basenpaaranzahl im vorderen Repeatblock Produkte mit identischen Größe erhalten (Abb. 81).

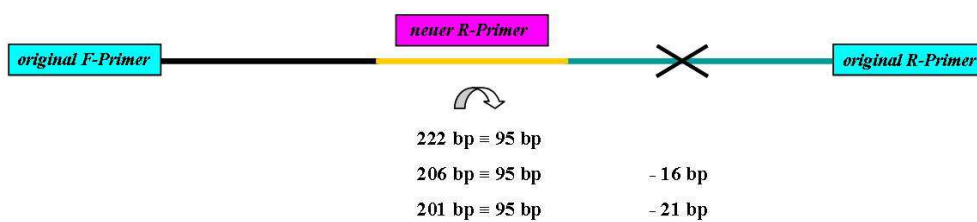


Abb. 81: Theoretische Darstellung zu den Allelvariationen des Systems F42_vkz_neu

Das System F42 beinhaltet zwei Sequenzwiederholungsblöcke, die unterschiedliche Abfolgen von Repeateinheiten aufweisen (in Schwarz und Grün dargestellt). In Türkis sind die Original-Primer aus der Literatur wiedergegeben und in pink der neu synthetisierte R-Primer des verkürzten Systems F42_vkz_neu, der in einem konstanten Bereich liegt (in Orange wiedergegeben).

Durch den Ausschluss des zweiten Repeatblocks (X) im System F42_vkz_neu stellen sich sowohl das 222 bp-Produkt als auch die 201 bp- und 206 bp-Produkte mit 95 bp dar. Die Variationen zwischen den drei Produkten fanden ausschließlich im zweiten Repeatblock statt, weshalb mit dem neuen Produktbereich die ursprünglichen Variationen von 16 bp und 21 bp nicht detektiert wurden und nun drei gleichgroße Produkte detektiert werden.

Dieser Informationsverlust trug jedoch nicht zu einer besonderen Reduktion der Aussagekraft des Systems bei. Mit 16 detektierten Allelen aus einer Stichprobe von 340 Katzen, weist dieser Marker eine ausreichende Menge an Allelen auf und ist für eine forensische Anwendung geeignet. Zudem konnte der Produktbereich des Systems erheblich reduziert werden (um bis zu 130 bp) und so für forensische Zwecke optimiert werden. Eine weitere Optimierung des Systems bestand darin, das 5'-Ende des unmarkierten Primers mit einem (GTT)-Tail zu modifizieren. Vor dieser Modifikation zeigte die überwiegende Anzahl der Produktpeaks des Markers (-A)-Strukturen, deren Entstehung durch diesen Tail verhindert werden konnte. Bereits in der Literatur wurde beschrieben, dass bestimmte Basenpaarkonstellationen speziell am 5'-Ende des unmarkierten Primers die Produktamplifikation sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können [83]. Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Durch diese Modifikation ist für das Markersystem F42_vkz_neu nun eine sichere Interpretation der Allele ohne Stotterprodukte und (-A)-Peaks gewährleistet. Speziell in der Forensik müssen oft verunreinigte Proben untersucht werden, die dazu neigen, die Bildung von (-A)-Peaks und somit eine Fehlinterpretation als tatsächliches Allel zu begünstigen. Dem wurde jedoch durch die durchgeführte Optimierung entgegengewirkt.

Nicht nur die Sequenzierung, sondern auch die Amplifikation von Produkten zeigte, dass die umliegende Sequenz eines Repeatbereichs Variationen aufweisen kann. Ein Beispiel hierfür stellt die Neusynthese der Primer des Markersystems F141 dar. Nach der Amplifikation wurden für viele Individuen lediglich homozygote Produkte erhalten, die jedoch in einigem Abstand wesentlich kleinere Peakstrukturen erkennen ließen. Durch Verwendung des in der Literatur beschriebenen F-Primers stellten sich die zuvor als homozygot typisierten Individuen heterozygot dar. Dies macht deutlich, dass Sequenzvariationen an bestimmten Stellen der Primerbindungsstelle zu einer unzulänglichen Amplifikation des Produktes oder im Extremfall zu einem Allel-Dropout führen.

Der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin ist ein weiteres Beispiel hierfür. Mit den in der Literatur beschriebenen Primern wurde das Produkt des X-Chromosoms männlicher Individuen nur schwach amplifiziert. Durch Generierung eines männchen- als auch weibchenspezifischen R-Primers, unter Einbeziehung einer Deletion in der Sequenz, konnte die Amplifikation des Produktes des X-Chromosoms in männlichen Individuen gesteigert und zusätzlich eine Anpassung der Intensitäten der Produkte des X- und Y-Chromosoms erreicht werden.

Durch diese einzelnen Optimierungsschritte der untersuchten und letztendlich für die Individualisierung eingesetzten 14 Markersysteme, den geschlechtsspezifischen Marker Amelogenin eingeschlossen, konnte eine Reduktion der Produktbereiche einzelner Systeme auf den gewünschten Größenbereich von bis zu 300 bp erreicht werden. So wurde eine Grundlage für die Untersuchung von forensischem Spurenmaterial geschaffen, die in den weiteren Arbeitsschritten verfeinert wurde (z. B. die Erstellung von Multiplexen). Gerade auch im Hinblick auf das Hauptuntersuchungsobjekt Haar, welches meist nur geringe Mengen an Kern- und zudem fragmentierte DNA aufweist, wurden hier beste Voraussetzungen geschaffen.

4.2 Eigenschaften der untersuchten Markersysteme

4.2.1 Unterschiede zwischen beschriebenen und ermittelten Sequenzen

Die Sequenzanalyse zeigte bei dem überwiegenden Anteil der untersuchten Markersysteme eine Diskrepanz zwischen dem beschriebenen und dem sich tatsächlich in den Produkten widerspiegelndem Repeatmotiv. Bei allen ausgewählten Markersystemen sollte es sich um reine Tetranukleotid-Repeatmarker handeln. Dies trifft u. a. für das Markersystem F37_vkz5 nicht zu. In der Sequenz des Markers sind neben dem genannten (TTTA)-Repeat weitere variierende Elemente enthalten. Hierbei handelte es sich um (GA)-Direpeatenheiten, die sich nach einem konstanten (TTTTT)-Element der Tetranukleotid-Repeatregion anschlossen und essenziell für die Benennung der Allele waren. Des Weiteren war für viele Marker häufig nur ein Tetranukleotid-Repeatgrundmotiv beschrieben. Bei genauerer Analyse der Sequenzabschnitte zeigte sich jedoch, dass weitere davon abweichende Tetranukleotid-Grundmotive vorhanden waren. Für den Marker F141_vkz3 war lediglich das Motiv (GAAA) beschrieben. Es traten jedoch auch (GATA)-Motive in der Sequenz auf, die maßgeblich zu der Repeatstruktur beitrugen. Dies zeigte sich ebenso für das Markersystem FCA749_vkz, welches neben dem beschriebenen (GATA)-Grundmotiv sich wiederholende (CATA)-Einheiten beinhaltete. Die Repeatmotive stellten sich meist viel komplexer dar als sie zuvor dargelegt wurden. Allein das System FCA744_vkz wies die in der Literatur wiedergegebene einfache Repeatstruktur des (GATA)-Repeatmotivs auf.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Elemente eines jeden Markersystems, die in der Literatur nicht beachtet wurden, tragen zu deren Gesamtrepeatstruktur bei und müssen für die Allelbenennung berücksichtigt werden. Ebenso dient die Gesamtrepeatstruktur dazu, die

Marker in Kategorien einzuteilen. Nach den Angaben aus der Literatur hätten alle Marker in die Kategorie „einfache Repeats“ eingeordnet werden müssen. Die hier durchgeführte Sequenzanalyse ließ jedoch eine genauere Einteilung in STR-Kategorien zu. So konnten mittels der erfassten Gesamtrepeatstruktur neben „einfachen Repeats“ auch die Kategorien der „komplexen Repeats“ und „komplexen hypervariablen Repeats“ beschrieben werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die genaue Sequenzanalyse verschiedener Allele eines Markers enorm wichtig ist. Auch die Analyse mehrere Produkte eines Allels trägt dazu bei (Homoplasie; siehe Abschnitt 4.4). Somit wird ein detaillierter Überblick über die vorhandenen Repeatmuster erhalten und der Marker kann entsprechend seiner Repeatmotive korrekt beschrieben werden.

4.2.2 Elektrophoretisches Laufverhalten

Wissenschaftler haben immer wieder die Erfahrung gemacht, dass sich der Datenaustausch zwischen unterschiedlichen Laboren schwierig gestalten kann, auch wenn sie das gleiche Equipment verwenden. Speziell bei der Auswertung von Elektropherogrammen, oder sog. STR-Profilen, können Unterschiede in der Zuordnung einzelner Allele auftreten. Dies liegt daran, dass am Elektrophoresegerät pro Lauf Produktgrößenunterschiede von bis zu 0,5 bp oder mehr auftreten können. Gerade dann, wenn sich verschiedene Allele in ihrer Produktgröße zueinander um nur 1 bp unterscheiden, wird selbst diese Allelzuordnung für ein und dasselbe Labor erschwert. Des Weiteren kommt es auf die Verwendung des Größenstandards an, der zur Produktgrößenbestimmung eingesetzt wird. Selbst die Verwendung von ROX-Standards der gleichen Firma, die geringfügig unterschiedliche Produktfragmente enthalten (z. B. ROX 400 und ROX 500), können zu abweichenden Produktgrößen von bis zu 1 bp führen (eigene Beobachtung; Daten nicht gezeigt).

Auch Unterschiede in den Basenpaarzusammensetzungen können zu einem abweichenden elektrophoretischen Laufverhalten führen. Zum einen können diese durch Variationen in den Repeatstrukturen selbst und die teils heterogene Verteilung einzelner Repeatelemente innerhalb der Allele eines Markers bedingt sein. Zum anderen tragen sowohl Basenpaaraustausche außerhalb der Repeatbereiche als auch innerhalb einer einzelnen Repeatereinheit zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung bei. Speziell der Austausch von Einzelbasen kann durch Transitionen und Transversionen zustande kommen, die aufgrund der meist nicht-kodierenden Funktion der Bereiche in der Sequenz erhalten bleiben und keinem Selektionsdruck unterliegen.

DISKUSSION

Die Basen der DNA weisen ein unterschiedliches Molekulargewicht zueinander auf. Geringe Unterschiede in der Sequenz könnten sich also auf die elektrophoretische Auftrennung der Produkte eines Allels auswirken.

So ließe sich der Basenpaar-Versatz von unterschiedlichen Allelen ein und desselben Markers erklären. In Abschnitt 3.3 wurde hierzu das Beispiel des Markersystems F27 erläutert. Da die einzelnen Allele meist eine unterschiedliche Zusammensetzung der Repeatelemente zueinander aufweisen, könnte sich hier so ein Versatz von bis zu 2 bp zwischen Allelen über einen größeren Produktbereich hinweg ergeben. Dies ist der Grund, weshalb die apparenten Produktgrößen in die entsprechenden Produktgruppen (*PG`s*) umgeschrieben wurden.

Des Weiteren kann der Versatz der apparenten Größen innerhalb der Produkte eines Allels um bis zu 0,5 bp durch eine unterschiedliche Basenpaarzusammensetzung erklärt werden. Bei den auftretenden Homoplasien eines Allels handelt es sich meist um eine unterschiedliche Zusammensetzungen der Repeatelemente zueinander. Dies konnte durch die Sequenzanalyse belegt werden. Dieses Phänomen ist bereits für Marker des Menschen und des Hundes bekannt und wurde in entsprechenden Studien beschrieben und belegt [141,145,150].

All diese Umstände machen es notwendig, einen Standard in Form von Allelleitern einzuführen, der eine sichere Zuordnung der Allele gewährleistet.

4.3 Standardisierung

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt wurde, treten bei der Größenbestimmung der Produkte eines Markers immer wieder Probleme auf. Hierzu tragen neben der unterschiedlichen Basenpaarzusammensetzung auch die zur Größenauftrennung verwendeten Elektrophoresegeräte als auch die eingesetzten Größenstandards bei. Somit erschwert sich nicht zum einen der direkte Vergleich zwischen verschiedenen Institutionen, die mit einem unterschiedlichen Equipment ausgestattet sind. Zum anderen kann auch der interne Abgleich zwischen unterschiedlichen Läufen ein und derselben Probe variierende Ergebnisse liefern. Gerade im Hinblick auf Allele, die nur einen Größenunterschied von 1 bp zueinander aufweisen, kann leicht eine falsche Zuordnung getätigt oder ein Zwischenallel übersehen werden. Um dem Vorzubeugen ist es unumgänglich einen Standard bzw. eine Referenz in Form von einer Allelleiter einzuführen. Die Zuordnung detektierter Produkte zu Allelen erfolgt hierbei nicht über die Produktgröße selbst, sondern findet über Allele in der Allelleiter

statt, die das gleiche elektrophoretische Laufverhalten aufweisen. Die Allelleitern müssen gewissen Anforderungen unterliegen. So sollten neben häufigen Allelen einer Population auch häufige Zwischenallele berücksichtigt werden. Größere Lücken zwischen den Allelen sind bei der Erstellung zu vermeiden (ideal ist bei Tetranukleotid-Repeatmarkern ein 4 bp-Abstand). Die Einbeziehung von besonders großen und kleinen Allelen ist nötig, da so der Produktbereich des Systems bestmöglichst abgedeckt wird. Wichtig ist, dass die Allelleiter bei jedem neuen Lauf auf dem Gerät mitgeführt werden muss, um exakt den gleichen Bedingungen wie die zu analysierenden Proben zu unterliegen.

Für jedes Markersystem wurde eine Allelleiter erstellt, die sowohl häufige als auch seltene Allele beinhaltet. Zwischenallele wurden für die Erstellung der Allelleiter berücksichtigt, wenn diese gehäuft in einem System vertreten waren. Die Allelleiter des Systems FCA749_vkz beinhaltet beispielsweise neben dem Zwischenallel 7.3 die Zwischenallele 48.1, 49.1 und 50.1, da nur diese die größeren Allele des Systems repräsentieren (siehe Abschnitt 3.4.3.5, Abb. 56).

Die in dieser Arbeit erstellten Allelleitern bilden eine Neuerung und stellen einen ersten Ansatz in der Etablierung eines Laborstandards im Feld der Typisierung von Hauskatzen dar. So kann unter Verwendung dieser Referenz ein schneller und exakter Datenaustausch erfolgen. Des Weiteren könnte unter Verwendung dieses Standards und durch Einsatz derselben Markersysteme eine Datenbank erstellt, die Ergebnisse zwischen Institutionen ausgetauscht und der Datenpool in kürzester Zeit immens erweitert werden.

4.4 Homoplasien und mögliche Beeinträchtigungen

Die beobachteten und beschriebenen Homoplasien in dieser Arbeit betrafen einen Großteil der untersuchten Markersysteme. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel stellte im System F141_vkz3 das Allel 29.3 einer Katze dar. In der Kapillarelektrophorese war lediglich ein Produktpeak erkennbar, was auf ein homozygoten Produkt schließen ließ. Die Sequenzierung wies dagegen Überlagerungen der Basen (A) und (G) innerhalb der sich sonst gut lesbaren Sequenz auf. Nach genauerer Betrachtung der Sequenzen anderer Allele des Markers, konnte letztendlich die Überlagerung zweier unterschiedlicher Sequenzen festgestellt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit besitzt die Katze auf ihren Chromosomen unterschiedliche Sequenzvarianten des Allels, die ohne eine Sequenzierung nicht aufgefallen wären. Es handelt sich somit eigentlich um ein heterozygoten Produkt.

Die auftretenden Homoplasien zwischen Allelen in neun der 14 untersuchten Markersysteme könnten dazu beigetragen haben, dass einzelne Repeatelemente in der Literatur außer Acht gelassen und nicht beschrieben wurden. Es ist davon auszugehen, dass zu den in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen lediglich die Sequenzierung von nur einem Produkt pro Allel stattgefunden hat.

Treten zwei Profile mit denselben Merkmalskombinationen auf, könnte nun spekuliert werden, dass es bei einem Vergleich aufgrund der häufig auftretenden Homoplasien zu einer falschen Übereinstimmung kommen könnte. Da mittels der durchgeführten Analyse nur die Größe der Produkte und nicht deren Sequenz ermittelt wird, könnten so Diskrepanzen entstehen. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden. Fünf der untersuchten Systeme zeigten bislang keine Homoplasien in den sequenzierten Produkten ein und desselben Allels (FCA559, FCA730_vkz, FCA733, FCA742_vkz und FCA744_vkz). Zudem relativiert die genetische Vielfalt der verwendeten Marker als auch die Anzahl der eingesetzten Systeme ein solches Szenario.

4.5 Chromosomale Lage der STR-Marker

Mehrere der in dieser Arbeit untersuchten Markersysteme liegen laut den Angaben von Menotti-Raymond et al. [53] auf gleichen Chromosomen. Zum einen die Systeme F42 und F141 auf Chromosom A1, die Systeme F27 und FCA730 auf Chromosom B1 und die Systeme FCA742, FCA744 und FCA747 auf Chromosom D4. Um eine uneingeschränkte Berechnung zur Individualisierung durchführen zu können, darf zwischen den verwendeten Systemen keine Kopplung bestehen. Eine Kopplung zwischen zwei Systemen besteht nicht, wenn diese mindestens 50 cM (centiMorgan) auseinander liegen.

Laut der Hybridisierungskarte liegen neben den Markern F42 und F141 auch die beiden Marker FCA742 und FCA744 nah beieinander. Die Position des Markers FCA747 war in der Karte auf Chromosom D4 nicht vermerkt. Eine Aussage über die Entfernung zu den Markern FCA742 und FCA744 konnte so nicht getroffen werden. Die Markersysteme F27 und FCA730 sind dagegen fast an unterschiedlichen Enden des Chromosoms B1 lokalisiert. Eine Überprüfung der Lage der STR-Marker über die NCBI-Datenbank mittels der unter den Accession-Nummern angegebenen Sequenz zeigte, dass die Marker F27 und FCA730 insgesamt 125 MB weit auseinander liegen. Die Marker F42 und F141 besitzen einen Abstand von 10 MB zueinander, während die Markersysteme FCA742 und FCA747 in etwa 35 MB weit auseinander liegen. Eine Zuordnung der Einheit MB in cM ist auch hier nicht zu tätigen,

da es sich bei den beiden Größen zum einen um eine reelle und zum anderen um eine abstrakte Größe (Anzahl der Rekombinationsereignisse) handelt. STR-Systeme für den Menschen zeigten selbst bei einem Abstand von 25 MB zueinander kein Kopplungsungleichgewicht, so dass eine Kopplung bei den STR-Markern der Hauskatze unwahrscheinlich erscheint (persönliche Aussage von Herrn Dr. Hecht). Das genaue Kopplungsungleichgewicht zwischen den Markern F42 und F141 ist aufgrund des nur 10 MB großen Abstandes für zukünftige Berechnungen zu überprüfen. Die Häufigkeitsberechnung einer Merkmalskombination kann aufgrund dieser möglichen Kopplung nur mit einem der beiden Systeme erfolgen. Somit können 13 der Systeme für eine solche Berechnung berücksichtigt werden. Die Aussagekraft der kombinierten Systeme ist dennoch sehr hoch, wie die häufigste Merkmalskombination aus einer Katzenpopulation mit 71 Individuen zeigte (siehe hierzu Abschnitt 3.15). Diese kommt 1 Mal unter 20 Milliarden Katzen vor und liegt weit über der Anzahl an tatsächlich in Deutschland vorhandenen Hauskatzen (12,3 Mio).

Die Aussage von Menotti-Raymond et al. über die Lage des Systems FCA744 konnte durch die Nachforschung in der NCBI- Datenbank nicht bestätigt werden. Die Sequenz des Markers wird eindeutig dem Chromosom A2 zugewiesen. Die Referenz hierzu bildet die Studie von Davis et al. [153]. Es wird deshalb angenommen, dass sich dieser Marker auf dem Chromosom A2 befindet und keine Kopplungen zu anderen Systemen vorliegen.

4.6 Allelverteilung und Frequenzen

Mit der vorliegenden Stichprobe von 340 Hauskatzen konnte den 14 ausgewählten STR-Markern durchweg eine polymorphe Verteilung zugesprochen werden. Das von der Allelzahl her kleinste System umfasste acht Allele (FCA744_vkz), während für das größte System 31 Allele (FCA733) nachgewiesen wurden. Sieben der Systeme repräsentierten zwischen 10 - 20 Allele (F37_vkz5, F42_vkz_neu, FCA441_vkz, FCA730_vkz, FCA734, FCA740_vkz und FCA747_vkz2), während die restlichen fünf Systeme zwischen 20 - 30 Allelen aufwiesen (F27, F141_vkz3, FCA559, FCA742_vkz und FCA749_vkz).

Die Berechnung der Allelfrequenzen gestaltete sich unterschiedlich: Im Durchschnitt stellten sich in der vorliegenden Stichprobe die häufigsten Allele pro Marker mit einer Frequenz zwischen 0,3 - 0,4 dar.

Für fünf der Markersysteme stellte sich das häufigste Allel meist mit einer fast doppelt so hohen Frequenz wie das zweithäufigste Allel dar (F27, F37_vkz5, F42_vkz_neu, FCA742_vkz

DISKUSSION

und FCA749_vkz). Ist die Häufigkeit eines Allels relativ hoch, verschiebt sich das Verhältnis stark in Richtung des entsprechenden homozygoten Genotyps.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht besagt, dass die Allelhäufigkeiten in Populationen in einem stabilen Gleichgewicht zueinander stehen, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Die Population ist ausreichend groß, Paarungen finden zufällig statt (Panmixie) und es findet keine Selektion, keine Migration sowie keine Mutation statt.

In natürlichen Populationen ist dies nicht realisierbar, da es in Populationen zu einer stetigen Evolution durch Selektion, Mutation, Gendrift sowie durch Ein- und Abwanderung von Individuen kommt. Dies machte sich auch bei der Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes für die STR-Marker von *F. s. catus* bemerkbar. Unter Berücksichtigung der Gesamtpopulation (340 Hauskatzen) lag für sechs Systeme ein Gleichgewicht vor und vier wichen weit davon ab. Nach Aussortierung einer reinrassigen Perser-Population mit 29 Tieren und Neuberechnung des Gleichgewichtes mit 311 Hauskatzen konnte eine Verbesserung der Berechnung festgestellt werden, wodurch alle STR-Systeme höhere p-Werte aufwiesen. Es befanden sich nun sieben der Markersysteme im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Ein weiteres System rutschte dadurch in eine andere Kategorie und lag knapp außerhalb des Gleichgewichtes.

Dies zeigt deutlich, dass die Berechnung des Gleichgewichtes in dieser Stichprobe durch das Einbeziehen oder den Ausschluss von reinrassigen Populationen beeinflusst wird. Weitere reinrassige Individuen sind in der Stichprobe enthalten, die jedoch durch weitaus weniger Individuen repräsentiert sind (Maine Coon (n = 3), Kartäuser (n = 4), British Kurzhaar (n = 2), Orientalisch Kurzhaar (n = 1) und Türkisch Van (n = 1)). Aufgrund der geringen Anzahl an Individuen pro Rasse wurden diese in der Stichprobe belassen.

Die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für einige der Markersysteme kann infolge der durch den Menschen betriebenen Züchtung einhergehen. Für die Züchtung ist lediglich wichtig, welche Merkmale in einer Rasse vertreten sind (z. B. Felllänge, Färbung etc.) und dass diese erhalten bleiben. So findet eine Selektion der Tiere statt, bei denen diese gewünschten Merkmale besonders ausgeprägt sind. Ein Vergleich der Frequenzverteilungen einer Population bestehend aus Mischlingen und einer reinrassigen Population (z. B. der Perser) würde mit Sicherheit zu einer Verschiebung der häufigsten Allele in einigen STR-Markensystemen führen. Dies war in den Systemen FCA 441, FCA744 und FCA747 für die Perserpopulation (n = 29) der Fall (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen tritt auch in einigen Hundepopulationen auf (z. B. beim Schäferhund in den Systemen PEZ 3 und PEZ 10; persönliche Information durch Herrn Dr. Hellmann).

Der größte Anteil, der in der Stichprobe enthaltenen Katzen, wurden als Hauskatze bzw. Europäisch Kurzhaar (EKH) beschrieben. Die Proben dieser Katzen kamen zu einem großen Teil von Privatpersonen, auf deren Aussage über Rasse und Verwandtschaftsgrad (bei Abgabe mehrerer Proben) sich verlassen werden musste. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Einzelfall Daten von Geschwistertieren in die Datenbank übernommen wurden, die zu einer Verschiebung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes geführt haben könnten.

Dennoch kann eine Berechnung der Individualisierungswahrscheinlichkeit mit allen Markern stattfinden. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei nicht verwandte und zufällig aus der vorliegenden Population ausgewählte Individuen die gleiche Merkmalskombination aufweisen, beträgt $2,2 \times 10^{-18}$ (combined non-exclusion probability for identity). Dies spricht für einen hohen Individualisierungsgrad, da diese Wahrscheinlichkeit sehr gering ist. Des Weiteren beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass zufällig aus der Population ausgewählte Geschwistertiere dasselbe Profil aufweisen $6,4 \times 10^{-7}$ (combined non-exclusion probability for sib-identity). Auch diese Wahrscheinlichkeit ist gering und erfordert eine hohe Nachkommenschaft, um dieselbe Merkmalskombination zwischen Geschwistertieren zu erhalten.

Um die Berechnungen weiter zu verfeinern, müssten mehrere reinrassige Populationen (z. B. Maine Coon, Kartäuser, British Kurzhaar etc.) untersucht und die Verteilung der Allele verifiziert werden. So könnte ein sog. Bottleneck-Effekt (Reduktion der Allele innerhalb der Population und Verschiebung der Allelfrequenzen) erkannt und für jede Rasse beschrieben werden. Durch die signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist eine Korrektur nötig. Hierzu könnte der Faktor Θ (Theta), der den genetischen Zusammenhang aufgrund von Subpopulationsbildungen beschreibt, dienen [151].

4.7 Multiplexe

Die Untersuchung von Minimalspuren (z. B. Haare) setzt stabile und ausreichend sensitive Multiplexe voraus. Hierzu wurden verschiedenste Kombinationen der bereits beschriebenen STR-Marker getestet. Vier Multiplexe wurden entwickelt, die einen Duplex (Duplex-1; D1), zwei Tetraplexe (Quadro-6_Primer3; Q6-P3 und Quadro-10; Q10) und einen Pentaplex (Penta-6; P6) umfassen. Der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin ist Teil des Multiplexes P6.

In den vergangenen Jahren haben Studien gezeigt, dass die Reduktion des Produktgrößenbereichs eines Markers hin zu „Mini-STRs“ die Amplifikation in Minimalspuren und gerade

bei heterozygoten Markern begünstigt [87,88,89,90,91]. Des Weiteren zeigte sich, dass es ab einer Produktgröße von > 250 bp zu Dropout-Erscheinungen kommen kann [86]. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit ein maximaler Produktgrößenbereich von 300 bp angestrebt. Dieser liegt zwar über den in der Literatur beschriebenen 250 bp, jedoch birgt die Multiplex-PCR auch Einschränkungen, die zu berücksichtigen waren. Durch die Mehrfarbtechnologie gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Fluoreszenzfarbstoffen, die verwendet werden können. Zudem sollte bei Systemen, deren Primer mit demselben Fluoreszenzmarker markiert sind, ein ausreichend großer Abstand zwischen deren Produktgrößen liegen. So wird verhindert, dass Allele dieser Systeme untereinander verwechselt werden.

Von den optimierten Markersystemen weisen 11 Marker Produktgrößenbereiche auf, deren bisher größtes Allel unter 200 bp liegt. Die Markersysteme F141_vkz3, F37_vkz5 und FCA749 besitzen Produktgrößenbereiche, die 200 bp überschreiten, wobei lediglich die letzten beiden Marker Produkte über 250 bp aufwiesen. Das größte Produkt des Markers FCA749_vkz liegt mit 259 bp hierbei nur knapp über den in der Literatur vorgeschlagenen 250 bp.

Der Multiplex Penta-6 ist von den entwickelten Multiplexen der sensitivste. Das System FCA749_vkz ist Teil dieses Multiplexes und stellte sich im Sensitivitätstest als das sensitivste System des Multiplexes heraus. Dies zeigt deutlich, dass der Wert von 250 bp nicht als konkrete Grenze, sondern als ein Richtwert angesehen werden sollte.

Des Weiteren spielt natürlich die Probe selbst eine wichtige Rolle. Liegen keine DNA-Stücke in diesem Größenbereich vor, hilft auch der sensitivste Marker nicht aus. Da es sich bei den größeren Markersystemen nur um drei Systeme handelt, könnten die anderen 11 Systeme bei Spuren mit hochgradig degradierter DNA auswertbare Ergebnisse liefern.

4.8 Validierung

Die Multiplexe und somit jeder einzelne STR-Marker wurden einer Validierung unterzogen, um deren Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfassen und beschreiben zu können. Die Validierungsschritte umfassten die von der ISFG empfohlene Vorgehensweise [75]. Es erfolgte sowohl ein Sensitivitäts- und Artspezifitätstest als auch die Untersuchung und Interpretation von Mischspuren und ein Vergleich der Typisierungsergebnisse aus verschiedenen Gewebe- und Haarproben desselben Individuums untereinander. Die Nomenklatur wurde entsprechend den Vorschlägen durchgeführt sowie Allelleitern erstellt,

deren Bedeutung in Abschnitt 4.3 bereits erläutert wurde. Zusätzlich wurde eine Datenbank angelegt, in der alle verwendeten Proben, Allelfrequenzen und entsprechende Berechnungen und Diagramme hinterlegt sind. Für die forensische Fallarbeit ist eine erfolgreich abgeschlossene Validierung die Grundlage für die Nutzung der Systeme in der Fallarbeit.

4.8.1 Multiplexanalyse und Sensitivitätstest

Die Nachweisgrenze der Multiplexe in einer 25 µl-PCR-Reaktion lag zwischen einer Menge von 50 pg (Q6-P3 und P6) bzw. 100 pg (D1 und Q10) an eingesetzter DNA. Diese Grenzwerte wurden unter Betrachtung aller Markersysteme der jeweiligen Multiplexe erhalten. DNA-Mengen unter diesen Werten lieferten nur noch für vereinzelte Marker der Multiplexe Produktpeaks und führten zu Dropouts. Es zeigte sich jedoch auch, dass für alle Markersysteme Ergebnisse bis zu einer eingesetzten DNA-Menge von lediglich 12,5 pg erhalten wurden. Dieser Gehalt entspricht ungefähr der DNA-Menge, die in zwei Zellen enthalten ist. Somit ist es auch möglich die Produktamplifikationen von Einzelsystemen eines Multiplexes zu interpretieren, selbst wenn andere Systeme keine oder nur unzulängliche Ergebnisse (z. B. die Intensität liegt unter der festgesetzten Detektionsgrenze von 50 rfu) liefern. Da die ausgewählten Marker sich sehr polymorph darstellen, kann selbst unter Verwendung von weniger als 14 Systemen noch eine hohe Aussagekraft getroffen werden.

Die Sensitivitätsstudie wurde nicht nur durchgeführt, um die Nachweisgrenze eines STR-Markers bzw. Multiplexes zu ermitteln, sondern auch, um die Eigenschaften und die Eigenheiten eines STR-Markers bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen beschreiben und charakterisieren zu können. So wurde deutlich, dass der Einsatz von zu hohen DNA-Mengen eine Reduktion der Intensitäten von Produktpeaks bedingen kann. Dieses Phänomen konnte für das System F37_vkz5 beobachtet werden. Unter Verwendung von 10 ng DNA wurden lediglich Produktintensitäten um die 4000 rfu detektiert, während die Amplifikation unter Einsatz von 5 ng Produktpeaks mit Intensitäten um die 6.500 rfu aufwies. Die DNA-Menge von 10 ng muss eine Hemmung bei diesem System verursacht haben, die sich durch die Verwendung von niedrigeren DNA-Mengen relativierte. Dieser Umstand ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen. Die Multiplexe wurden so erstellt, dass sie bei einem DNA-Einsatz von ca. 1 ng sowohl zueinander ausgeglichene als auch sensitive Produktamplifikationen aufwiesen, die nicht durch die Bildung von Artefakten beeinträchtigt wurden.

Die Peakimbancen der einzelnen Markersysteme lagen bis zu einer DNA-Menge von 50 pg (Q6-P3, Q10 und P6) bis 100 pg (D1) oberhalb von 70 %, dem Grenzwert des sog.

Heterozygote Peak Treshold, anhand dem „echte“ heterozygote Allele identifiziert werden. Unterhalb dieser DNA-Mengen kamen gehäuft Imbalancen unterhalb von 70 % vor. Diese waren nie so schwerwiegend, dass eine Detektion und korrekte Zuordnung der Allele nicht hätte gewährleistet werden können.

Die detektierten Stotterprodukte lagen unterhalb von 15 %. Die einzige Ausnahme bildete das Markersystem F37_vkz5. Da dieser Marker neben einem Tetranukleotid-Repeatmuster auch noch ein Dinukleotid-Motiv beinhaltetete, lagen die prozentualen Anteile dieser Stotterprodukte oberhalb der 15 % und erreichten einen Maximalwert von 38,8 %. Auch in diesem Fall war eine eindeutige Zuordnung und Auswertung der Produktpeaks möglich.

4.8.2 Artspezifität

Der durchgeführte Artspezifitätstest der STR-Marker zeigte überwiegend Produktamplifikationen mit Individuen aus der Familie der Felidae (Katzen). Dies erscheint aufgrund der Verwandtschaftsgrade der jeweiligen Spezies zueinander nicht verwunderlich. Einige wenige Marker wiesen nur eine sporadische bis gar keine Amplifikation innerhalb der Spezies *P. leo*, *L. lynx* und *P. r. phillipsi* auf (F27, FCA730_vkz, FCA747_vkz2 und FCA749_vkz). Dahingegen konnten für *F. s. silvestris* mit allen Markern Produkte erhalten werden, die sich teilweise von denen der Hauskatze unterschieden.

Darüber hinaus wurde ein Produkt für das System FCA730_vkz in der Familie der Ursidae (Bären) detektiert. Da es sich lediglich um ein Markersystem handelte, welches bei dieser Spezies ein positives Ergebnis erbrachte und dieses zudem eine sehr niedrige Intensität von 146 rfu aufweist, kann diese Kreuzreaktivität mit dieser Spezies vernachlässigt werden.

Der geschlechtsspezifische Marker Amelogenin wies mit allen Spezies aus der Gruppe der Carnivora in Tabelle 1 (Abschnitt 2.1.1) eine Amplifikation auf. Eine Ausnahme bildete lediglich *M. martes*. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Sequenz des Amelogenins der Carnivoren wahrscheinlich stark konserviert zwischen den Spezies vorliegt. Da jeweils nur das dem X-Chromosom entsprechende Produkt erhalten wurde (Familie der Felidae ausgeschlossen, da hier sowohl Produkte des X- als auch das Y-Chromosom detektiert wurden), scheint die Deletion, die das Y-Chromosom von *F. s. catus* aufweist, in keiner der anderen Spezies auf diese Weise vorhanden zu sein. Aufgrund dessen findet mit dem spezifisch für die Katze entwickelten R-Primer des Y-Chromosoms keine Produktamplifikation für die getesteten Spezies der Carnivora statt. Somit ist dieser Bereich spezifisch für die Familie der Felidae.

4.8.3 DNA-Mischspuren, Speichel an Haaren und Kontinuität

Die Untersuchung der Mischspuren zeigte deutlich, dass Mischproben selbst mit geringsten DNA-Mengen einer Komponente eindeutig interpretiert und sowohl die Haupt- als auch die Nebenkomponekte identifiziert werden können. Dies spielt gerade in dem Zusammenhang eine Rolle, falls davon ausgegangen werden muss, dass sich mehrere Individuen in einem Haushalt befinden. Studien haben gezeigt, dass Katzen sich ausgiebig putzen und dies auch bei ihren Artgenossen tun [152]. In dieser Arbeit wurde getestet, ob sich Speichel und somit die DNA derselben oder anderer Katzen an Haaren befindet. Es konnte keine Fremd-DNA gefunden werden. Dieses Ergebnis kann jedoch nicht verallgemeinert werden und es muss immer mit einer Kontamination gerechnet werden. Der Test der Multiplexe zeigt deutlich, dass diese für eine Analyse von Mischspuren geeignet sind. Bei der Spurennahme und der anschließenden Bearbeitung der Spuren muss auch hier eine Kontamination durch den Menschen bedacht werden. Die Beimischung humaner DNA zeigte keinerlei Einfluss auf die Amplifikation der Katzen-DNA und beweist, dass die verwendeten Markersysteme nicht innerhalb der Sequenz der humanen DNA binden und eine Kontamination von dieser Seite keine Beeinträchtigung zeigt (siehe Abschnitt 3.8).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Ergebnisse eines jeden STR-Markers über unterschiedliche Gewebe und Haare hinweg, identisch sind. In keinem der untersuchten Gewebe oder Haare konnte eine Diskrepanz zwischen den detektierten Produkten festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die Ergebnisse in allen Zellen der Katze reproduzierbar sind und auch unterschiedliche Gewebe sowie Haare für eine Vergleichsuntersuchung herangezogen werden können.

4.9 Vergleich der Allelverteilungen zwischen Haus- und Europäischer Wildkatze

Die untersuchten Markersysteme der Hauskatze (*F. s. catus*) können durchaus für eine Individualisierung bei der Europäischen Wildkatze (*F. s. silvestris*) eingesetzt werden. Bis auf wenige Ausnahmen wiesen alle Systeme eine Produktdetektion auf. Sechs Marker lieferten eine nur sehr geringe Aussagekraft, da bevorzugt ein Allel repräsentiert wurde und der Allelbereich grundsätzlich nur eine geringe Anzahl an Allelen aufwies. Hierdurch zeigten sich die Systeme F37_vkz5, FCA559, FCA730_vkz, FCA733, FCA740_vkz und FCA744_vkz in der untersuchten Stichprobe von *F. s. silvestris* durchweg wenig polymorph und erscheinen für eine Individualisierung nur bedingt geeignet.

DISKUSSION

Andere Systeme wiesen dagegen eine ungefähr gleichhäufige Verteilung vieler Allele des Allelbereichs von *F. s. catus* auf, die für eine Individualisierung geeignet erscheinen (z. B. F141_vkz).

Die meisten Systeme zeigten eine ausreichend gute Aufspaltung des Produktbereiches in Allele und eine polymorphe Verteilung, sodass mindestens acht Systeme für eine Individualisierung herangezogen werden können.

Es bleibt zu Prüfen, ob eine Differenzierung zwischen der Haus- und der Europäischen Wildkatze mittels der verwendeten Markersysteme aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen den beiden Subspezies realisierbar ist. Lediglich die Systeme F27, FCA742_vkz und FCA749_vkz weisen für die Europäische Wildkatze Allele auf, die in der hier verwendeten Stichprobe von *F. s. catus* nicht beobachtet wurden. Doch auch diese liegen meist innerhalb des detektierten Produktbereiches oder grenzen nahe an diesem an. Eine größere Stichprobe beider Spezies sowie Rassekatzen müssten herangezogen werden, um eine definitive Aussage über eine mögliche Differenzierung zu tätigen.

Das Markersystem FCA749_vkz wies für zwei der getesteten Proben keine Produktdetektion auf. Es konnten selbst nach mehrmaligen Wiederholungsansätzen keine Ergebnisse erhalten werden. Wahrscheinlich lag bei diesen Individuen eine Mutation in der Primerbindestelle vor, sodass die Primer nicht binden und keine Produktamplifikation stattfinden konnte. Um dieses System effizient für *F. s. silvestris* nutzen zu können, müssten neue Primer synthetisiert werden. Andernfalls besteht unter Verwendung dieses Markers mit den jetzigen Primern die Gefahr keine Ergebnisse zu erhalten. In der durchgeführten Stichprobe lag die Erfolgsrate des Systems bei der Europäischen Wildkatze bei umgerechnet 97,4 %.

Somit eignet sich nur Rund die Hälfte der vorliegenden Markersysteme für eine Typisierung mit anschließender Individualisierung für die Europäische Wildkatze. Hierdurch wird die Aussagekraft reduziert. Da sich in der freien Wildbahn im Vergleich zur Hauskatze (12,3 Mio.) jedoch nur ein Bruchteil von existierenden Individuen befindet (5.000 - 7.000), ist eine hohe Individualisierungsrate nicht unbedingt notwendig, um dennoch eine sichere Aussage über den Individualisierungsgrad treffen zu können.

4.10 Optimierung der Haar-DNA-Extraktion

Die Untersuchung verschiedener Geräte auf Basis der Magnetpartikelseparation sowie manueller Kits haben gezeigt, dass es durchaus Alternativen zu der herkömmlichen als gesundheitsgefährdend einzustufende Methode der Phenol/Chloroform-Extraktion gibt. Mittels des Gerätes King FisherTM Duo der Fa. Thermo Scientific und unter Verwendung der TNCa-Lyse in Kombination mit dem „Crime Prep Adem-Kit“ der Fa. Ademtech können mindestens genauso gute, wenn nicht sogar bessere Ergebnisse erzielt werden. Während der Testphase kam es immer wieder vor, dass mittels der Methode TNCa → Phenol/Chloroform → Microcon30-Filtersäulen (PC-M) keine oder nur unzureichende Ergebnisse erlangt wurden. Gründe könnten entweder die Verschleppung des Phenol/Chloroforms, das die anschließende PCR hemmt oder der Ablauf eine der verwendeten Chemikalien sein. Ein Austausch dieser führte in darauffolgenden Extraktionen zu etwas verbesserten Ergebnissen. Des Weiteren ist zudem immer das Ausgangsmaterial zu berücksichtigen, das unterschiedliche Mengen an DNA enthalten kann. Ein Magnetpartikelseparator in Verbindung mit der hier getesteten Methode könnte die manuelle PC-M-Methode durch eine automatisierte ersetzen. PCR-inhibierende Stoffe werden meist sicher entfernt und die DNA möglichst in reinster Form eluiert, sodass auch bei geringsten Spuren Ergebnisse erhalten werden können. Somit erscheint diese Methode für forensische Spurenansätze geeignet. Im Einzelfall sollte jedoch abgewogen werden, welche Methode sich für den Untersuchungsansatz am besten eignet. Dabei spielt natürlich auch das Ausgangsmaterial eine Rolle. Nach dessen Zustand und Menge ist abzuwägen, welche Methode die bestmöglichen und effizientesten Ergebnisse liefern könnte.

4.11 Untersuchung der mtDNA

Ist die DNA-Menge für eine STR-Untersuchung nicht ausreichend oder liegt die Kern-DNA in einem hohen Maß degradiert vor, sodass nur noch sporadische bzw. gar keine Produkte amplifiziert werden können, bietet sich als Alternative die Untersuchung der mitochondrialen DNA an. Diese liegt als ringförmiges Molekül in einer hohen Kopienzahl pro Zelle vor. Dies bedingt, dass die mtDNA selbst noch in abgestorbenen Zellen oder bei stark degradiertem DNA in einer ausreichenden Menge vorliegen kann, die für eine Analyse ausreichend ist.

Aus diesem Anlass wurden zwei Systeme auf der mtDNA auf ihre Aussagekraft hin untersucht, um eine Haplotypeneinteilung vorzunehmen. Das zuvor schon von Tarditi et al. [121,122] in einer Studie untersuchte System wies vier Haupthaplotypen auf, von denen der Haplotyp A am stärksten in den untersuchten Populationen vertreten war. Die in dieser Arbeit untersuchte Population mit 92 Hauskatzen repräsentierte diesen Haplotypen zu 50 %. Die Aufspaltung dieses Haplotypen konnte mittels eines zweiten Systems, dem RS2-System, auf bis zu 10,9 % heruntergebrochen werden (beide Systeme kombiniert betrachtet). Zudem wurde eine Reihe an einzigartigen Haplotypen erhalten, die in der vorliegenden Population nur durch jeweils ein Individuum repräsentiert wurden. Insgesamt traten diese Haplotypen zu 35,9 % auf. Durch die Kombination dieser beiden Systeme wird eine sehr gute Aufspaltung erhalten. Da lediglich die Aussage über eine Ausschlusswahrscheinlichkeit zwischen Spur und Vergleich getätigt werden kann, liegt diese in der kombinierten Darstellung mit beiden Systemen relativ hoch. Gerade wenn ein einzigartiger Haplotyp erhalten wird, kann unter Einbeziehung einer entsprechend großen Population eine konkrete Aussage getroffen werden. Zu berücksichtigen ist, dass aufgrund der maternalen Vererbung der mtDNA keine Unterscheidung zwischen Nachkommen einer mütterlichen Linie möglich ist.

4.11.1 Validierung

Die Validierung beider Systeme erfolgte in Anlehnung zu den STR-Marker mittels einer Sensitivitätsstudie und einem Artspezifitätstest.

4.11.1.2 Sensitivitätstest

Die Sensitivitätsstudie zeigte, dass selbst noch bei einer Gesamt-DNA-Menge von nur 12,5 pg Produktpeaks mit Intensitäten bis zu 4.000 rfu erhalten werden, die für eine erfolgreiche Sequenzierung mehr als ausreichend sind. Im Gegensatz hierzu werden bei der STR-Analyse unter Einsatz einer solchen DNA-Menge meist Allelpeaks mit max. 200 rfu detektiert. Dies weist darauf hin, dass im Vergleich zur Kern-DNA ein erheblich größerer Anteil an mitochondrialer DNA in den Proben enthalten ist, der für eine Untersuchung herangezogen werden kann.

4.11.1.3 Artspezifität

Die Untersuchung auf Kreuzreaktionen mit beiden Systemen erfolgte unter Einbeziehung derselben Proben, die auch für die STR-Markensysteme verwendet wurden. Das Tarditi-System wies ausschließlich Produktpeaks für den Löwen (*P. leo*) und die Europäische

Wildkatze (*F. s. silvestris*) aus der Familie der Felidae auf, die mit der Produktgröße der Hauskatze (*F. s. catus*) übereinstimmen. Die Sequenzen dieser Spezies scheinen sehr ähnlich zu sein, da identische Produktlängen erhalten werden. Das Produkt für den Luchs (*L. lynx*) unterschied sich dagegen von den anderen und wurde nur in einem geringen Umfang amplifiziert, sodass hier eine spezifische Amplifikation mittels der verwendeten Primer für diese Spezies auszuschließen ist. Wahrscheinlich liegen die Primer in einer Region, die Unterschiede in der Sequenz zwischen *F. s. catus* und *L. lynx* beinhaltet.

Im Vergleich hierzu wurden für das RS2-System mit allen Individuen der Felidae eindeutige Ergebnisse erhalten, die sich in ihrer Größe zueinander unterschieden. Allein für die Europäische Wildkatze konnten identische Ergebnisse zu der Hauskatze erhalten werden. Dies scheint durch den nahen Verwandtschaftsgrad der beiden Spezies bedingt zu sein. Die mitochondrialen Sequenzen der Rostkatze (*P. r. phillipsi*), des Luchses (*L. lynx*) und des Löwen (*P. leo*) scheinen unterschiedliche Abfolgen und Längen des RS2-Repeats in dieser Region zu enthalten oder weisen andere Unterschiede innerhalb der von den Primern erfassten Sequenz auf. Die Produkte von *P. leo* zeigten eine geringere Produktamplifikation mit einer Intensität von max. 800 rfu. Die Primer binden aufgrund von Sequenzvariationen innerhalb der Primerbindestelle nicht effizient genug, sodass diese Diskrepanzen zustande kommen.

Die Amplifikation von Produkten des Baummarters (*M. martes*) mit dem RS2-System lässt darauf schließen, dass auch hier die Primer in dessen Sequenz binden. Es wurde nicht eruiert, ob die Primer in der mitochondrialen DNA oder etwa auf der Kern-DNA binden. Die im Vergleich geringfügigere Amplifikation mit Intensitäten von 1.500 rfu, weist darauf hin, dass die Primer nicht effizient binden. Eine Verwechslung zu Produkten der Hauskatze ist aufgrund deutlich abweichender Produktgrößen auszuschließen.

Es hat sich gezeigt, dass beide Systeme in Kombination eine gute und effiziente Alternative bieten, um bei einer fehlgeschlagenen oder unzureichenden STR-Analyse eine Aussage, wenn auch mit geringerer Aussagekraft, tätigen zu können.

4.12 Artbestimmung mit Hilfe der mtDNA

Die Artbestimmung erfolgte mittels zweier Systeme, die auf unterschiedliche Bereiche der mitochondrialen DNA zurückgreifen. Das System, welches Herr Dr. Hecht entwickelte, umfasst die Kontrollregion der mtDNA, während das System von Linacre et al. [114] den Bereich des Cytochrom b-Gens einbezieht. Nach der Amplifikation erfolgte keine anschließende Sequenzierung der jeweiligen Produkte, sondern eine Bestimmung der speziesspezifischen Größen. Dies hat den Vorteil, dass Mischspuren keine Hürden mehr darstellen. Bei der klassischen Methode der Sequenzierung konnten diese durch die entstehenden Sequenzüberlagerungen nicht oder nur schwer voneinander unterschieden werden. Mit den Systemen nach Herrn Hecht und Tobe und Linacre entstehen Produkte entsprechend der in der Mischung enthaltenen Tierart. Das System von Herr Dr. Hecht ist nach jetzigen Erkenntnissen spezifisch für Säuger und Vögel und kann dann eingesetzt werden, wenn gar kein Hinweis auf eine der entsprechenden Spezies vorliegt. Dahingegen sind die von Tobe und Linacre beschriebenen Primer in Multiplexe zusammengefasst („HoCaDo“ und „CoPiGoSh“). Diese enthalten mehrere speziesspezifische Primer und können speziell dann eingesetzt werden, wenn eine Tendenz zu einer Spezies gegeben ist, die nur noch bestätigt werden soll.

Neben der Zeit- und Kostenersparnis, die durch die Verwendung dieser Systeme gegenüber der Sequenzierung entsteht, werden zudem sichere und leicht zu interpretierende Ergebnisse erhalten. Diese sind durch die spezifischen Produktgrößen der jeweiligen Referenzspezies definiert.

4.13 Analysen auf Basis der Kern- und mitochondrialen DNA - ein Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen und optimierten STR-Markersysteme der Kern-DNA der Hauskatze (*F. s. catus*) sind dazu geeignet eine sichere Individualisierung innerhalb dieser Spezies zu ermöglichen. Die Systeme wurden speziell dem Spurenmaterial angepasst, das sowohl einen geringen DNA-Gehalt als auch degradierte DNA aufweist. Diese Spezifikationen der DNA sind gerade in Haaren zu erwarten, die in forensischer Hinsicht das Hauptuntersuchungsobjekt von *F. s. catus* darstellen.

Die signifikante Abweichung einiger Systeme vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sollte genauer untersucht werden. Hierzu ist die Betrachtung einer Ausbildung von Subpopulationen

notwenig wie auch die Frequenzanalyse in reinrassigen Populationen. So kann ein Korrekturfaktor Θ in die Berechnung der Individualisierungswahrscheinlichkeit eingehen.

Nachforschungen haben zudem zu Diskrepanzen in der Zuordnung der einzelnen STR-Marker zu bestimmten Chromosomen geführt. Chromosomale Untersuchungen oder spezielle Berechnungen über die genaue Lage der STR-Marker könnten angestrebt werden, um eine Kopplung zwischen den Markern ausschließen zu können, die sich auf ein und demselben Chromosom befinden sollen (u. a. mit dem Programm MIDAS).

Falls eine Analyse über die Kern-DNA zu keinem Ergebnis führt, kann alternativ auf die mitochondriale DNA zurückgegriffen werden. Die Kombination zweier Systeme im Bereich der Kontrollregion von *F. s. catus* haben gezeigt, dass eine ausreichend hohe Differenzierung über die rein maternal vererbte mtDNA erfolgen kann und gegebenenfalls zwischen Spur und Vergleich zu einem Ausschluss führt. Aufgrund der maternalen Vererbung sind über die mütterliche Linie verwandte Tiere hiervon ausgenommen.

In dieser Arbeit sind Systeme der Kern-DNA und mitochondrialen DNA etabliert worden, die den größtmöglichen Informationsgehalt aus einer Spur ermöglichen. Diese Analysen können in der Zukunft für Untersuchungen von Proben der Spezies *F. s. catus* angewendet werden und gerade auch im Bereich der forensischen Kriminaltechnik konkrete Fragestellungen klären. Die Systeme sind so optimiert, dass ihr Einsatz auch bei der Minimalspur Haar sehr gute Ergebnisse liefert.

Die verwendeten STR-Marker sowie die Systeme der mtDNA haben in der Sensitivitätsstudie gezeigt, dass selbst bei Gesamt-DNA-Mengen von 12,5 pg Ergebnisse zu erwarten sind. Unterschiede zwischen Kern-DNA und mtDNA ergeben sich dahingehend, dass bei dieser DNA-Menge die STR-Systeme an ihre Grenzen geraten (Produktpeaks mit ~ 200 rfu). Die mtDNA liefert ausreichend hohe Produktpeaks, sodass interpretierbare Ergebnisse unterhalb von 12,5 pg Gesamt-DNA zu erwarten sind. Auch zeigte der Einsatz in der Fallarbeit, dass unter Verwendung von realem Spurenmaterial interpretierbare Produkte erhalten werden können, die zu aussagekräftigen Schlussfolgerungen führen. Ein Test mit manipulierten DNA-Proben, die z. B. Ultraschall oder UV-Strahlung ausgesetzt waren, könnte einen Hinweis darauf geben, wie sich die Ergebnisse der Systeme bei stark degradierter DNA verändern.

Um eine noch bessere Differenzierung über die mitochondriale DNA erreichen zu können, könnte nach weiteren Bereichen gesucht werden, die Variationen beinhalten. Anhand derer

DISKUSSION

könnte in Kombination mit den beiden bereits beschriebenen Systemen (Tarditi- und RS2-System) eine weitere Aufspaltung der Haupthaplotypen ermöglicht werden.

Zur Erhaltung und Weiterführung der Populationsdaten müssten weitere Daten von Hauskatzen, gerade im Bereich der mtDNA-Analyse aufgenommen werden. Vor allem Rassekatzen wären hier in beiden Fällen von Bedeutung. Eventuell bietet sich über die mtDNA zusätzlich mittels der verwendeten Systeme eine Aussage über die Rasse treffen zu können.

Neue Möglichkeiten ergeben sich auch aus der sich rasant entwickelnden Methode des „Whole Genome Sequencing“. Diese ermöglicht es in kurzer Zeit ganze Genome zu sequenzieren und sowohl die Kern-DNA als auch die mitochondriale DNA auf geeignete polymorphe Marker hin zu untersuchen.

Die hier vorgestellten STR-Marker und mtDNA-Systeme bieten in Zukunft eine gute Grundlage, um konkret einen Beitrag zur Aufklärung eines Verbrechens in der forensischen Fallarbeit leisten zu können.

5 Zusammenfassung

Die Hauskatze (*F. s. catus*) ist eines der beliebtesten Haustiere in Deutschland. Das enge Zusammenleben mit dem Menschen bedingt die Übertragung von Haaren auf Gegenstände oder andere Personen, sodass diese Spuren für eine forensische Untersuchung von größter Bedeutung sind. Da in Haaren mit einer sehr geringen Menge an Kern-DNA gerechnet werden muss und diese sich zudem in einem degradierten Zustand befindet, wurden die zur Individualisierung ausgewählten Tetranukleotid-STR-Markersysteme dahingehend optimiert. Die Optimierung umfasste neben der Reduktion der Produktgrößenbereiche auch die Anpassung der PCR-Profile. Die Sequenzierung und Beschreibung der Repeatmotive aller Marker führte überwiegend zu einer von der Literatur abweichenden Darstellung. Anhand der Sequenzanalyse erfolgte die Einteilung der Marker in STR-Klassen sowie die Einführung einer markerspezifischen Nomenklatur. Diese spiegelt sich vor allem in den erstellten Allelleitern wider, die zum Abgleich der amplifizierten Produkte eines jeden Markersystems eingesetzt werden. Die Allelleitern dienen als interne Laborreferenz und können als Standard für den Datenaustausch zwischen unterschiedlichen Laboren genutzt werden. Mittels 14 speziell angepassten Markersystemen und dem geschlechtsspezifischen Marker Amelogenin kann praktisch eine Individualisierung für *F. s. catus* durchgeführt werden.

Sind über die Kern-DNA keine oder nur unzureichende Ergebnisse zu erhalten, kann alternativ auf die Untersuchung der mitochondrialen DNA zurückgegriffen werden. Neben Systemen, die einen Aufschluss zum Artnachweis erbringen, stehen in der Kontrollregion von *F. s. catus* weitere Systeme für eine Differenzierung in Haplotypen zur Verfügung. Trotz der maternalen Vererbung der mtDNA und der dadurch nicht zu realisierenden Individualisierung liefert diese Einteilung einen hohen Anteil an einzigartigen Haplotypen, die in der untersuchten Stichprobe nur durch je ein Individuum repräsentiert wurden. Die Aufspaltung in Haplotypen liefert einen Aussagewert, mit dem gegebenenfalls ein Ausschluss zwischen Spur und Vergleich getroffen werden kann.

Beide Analyseverfahren, sei es auf Ebene der Kern- oder mitochondrialen DNA, bieten eine Möglichkeit den größtmöglichen Informationsgehalt aus einer Spur zu erhalten. Im forensischen Bereich steht somit erstmals ein komplett standardisiertes Verfahren zur Untersuchung von Spuren der Hauskatze zur Verfügung. Dieses reicht von der Artbestimmung einer Spur bis zur praktisch individuellen Zuordnung.

6 Literaturverzeichnis

- [1] **A. Hellmann, J. Morzfeld, U. Schleenbecker**, Der genetische Fingerabdruck von Tieren und Pflanzen. *Kriminalistik 2* (2007) 109-111
- [2] ZZF Deutschlands e.V.; Der deutsche Heimtiermarkt 2011/20012
- [3] **J. O'Brien, W.E. Johnson**, The Evolution of Cats, *Scientific American* July (2007) 68-75
- [4] **C.A. Driscoll, M. Menotti-Raymond, A.L. Roca, K. Hupe, W.E. Johnson, E. Geffen, E.H. Harley, M. Delibes, D. Pontier, A.C. Kitchener, N. Yamaguchi, S.J. O'Brien, D.W. Macdonald**, The Near Eastern Origin of Cat Domestication, *Science* 137 (2007) 519-523
- [5] **C.A. Driscoll, J. Clutton-Brock, A. C. Kitchener, S.J. O'Brien**, Die wahre Herkunft der Hauskatze, *Spektrum der Wissenschaft* April (2010) 34-41
- [6] **WCF**: <http://www.wcf-online.de/>
- [7] http://www.bund.net/themen_und_projekte/rettungsnetz_wildkatze/europaeische_wildkatze/
- [8] R. Piechocki, Die Wildkatze, 1. Auflage, Westarp Wissenschaftenverlagsgesellschaft
- [9] <http://www.wildkatze-rlp.de/wildkatze/steckbrief/>
- [10] **E. Randi, M. Pierpaoli, M. Beaumont, B. Ragni, A. Sforzi**, Genetic Identification of Wild and Domestic Cats (*Felis silvestris*) and Their Hybrids Using Bayesian Clustering Methods, *Mol. Biol. Evol.* 18 (9) (2001) 1679-1693
- [11] **R. Lecis, M. Pierpaoli, Z.S. Birò, L. Szemethy, B. Ragni, F. Vercillo, E. Randi**, Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci, *Mol. Ecol.* 15 (2006) 119-131
- [12] **M.A. Beaumont, E.M. Barrat, D. Gottelli, A.C. Kitchener, M.J. Daniels, J.K. Pritchard, M.W. Bruford**, Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat, *Mol. Ecol.* 10 (2001) 319-336
- [13] **F. D'Andrea, F. Fridez, R. Coquoz**, Preliminary experiments on animal hair transfer during simulated criminal behaviour, *J. Forensic Sci.* 43 (1998) 1257-1258
- [14] **J.L. Halverson, C. Basten**, Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects, *Croat. Med. J.* 46 (2005) 598-605
- [15] **A. Boehme, E. Brooks, I. McNaught, J. Robertson**, The persistence of animal hairs in a forensic context, *Austral. J. of Forensic Sci.* 41 (2009) 99-112
- [16] **M.A. Menotti-Raymond, V.A. David, S.J. O'Brien**, Pet cat hair implicates murder suspect, *Nature* 386 (1997) 774
- [17] **C.A. Linch, D.A. Whiting, M.M. Holland**, Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 844-853
- [18] http://www.dogs-magazin.de/hund_familie/fellwechsel-hund-in-der-wohnung-99671.html

- [19] **W.H. Hendriks, M.F. Tarttelin, P.J. Moughan**, Seasonal hair loss in adult domestic cats (*Felis catus*), *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* 79 (1998) 92-101
- [20] **W.H. Hendriks, M.F. Tarttelin, P.J. Moughan**, Seasonal Hair Growth in the Adult Domestic Cat (*Felis catus*), *Comp. Biochem. Physiol.* 116 (1997) 29-35
- [21] **R. Higuchi, C.H. von Beroldingen, G.F. Sensabaugh, H.A. Erlich**, DNA typing from single hairs, *Nature* 332, (1988) 543-546
- [22] **H. Matsuda, K. Imaizumi, S. Kubota, S. Miyasaka, M. Yoshino, S. Seta**, Technical investigation of DNA extraction from single hair shaft, *Rep. Nat. Res. Inst. Police Sci.* 50 (1997) 23-28
- [23] **L. Pötsch, K. Bender**, Untersuchungen zu möglichen Mechanismen einer PCR-Hemmung in Haarextrakten durch Melanine, *Rechtsmedizin* 11 (2001) 42-45
- [24] **J.M. Butler**, Fundamentals of Forensic DNA Typing, 1. Auflage, *Elsevier Academic Press*, 2010
- [25] **W. Bär, A. Kratzer, M. Machler, W. Schmid**, Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci. Int.* 39 (1988) 59-70
- [26] **M. M. Holland, T.J. Parsons**, Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use for forensic casework. *Forensic Sci. Rev.* 11 (1999) 21-49
- [27] **L. Eckhart, J. Bach, J. Ban, E. Tschachler**, Melanin Binds Reversibly to Thermostable DNA Polymerase and Inhibits Its Activity, *Biochem. and Biophys. Research Communications* 271 (2000) 726-730
- [28] **H. Nozawa, T. Yamamoto, R. Uchihi, T. Yoshimoto, K. Tamaki, S. Hayashi, T. Ozawa, Y. Katsumata**, Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences, *Legal Med.* 1 (1999) 61-67
- [29] **T. Yoshii, K. Tamura, T. Taniguchi, K. Akiyama, I. Ishiyama**, Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal, *Jpn. J. Leg Med.* 47 (1993) 323-329
- [30] **D. McNevin, L. Wilson-Wilde, J. Robertson, J. Kyd, C. Lennard**, Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair Part 1. Review of current status and knowledge gaps, *Forensic Sci. Int.* (2005) 237-246
- [31] **J.U. Pontius, J.C. Mullikin, D.R. Smith; Agencourt Sequencing Team, K. Lindblad-Toh, S. Gnerre, M. Clamp, J. Chang, R. Stephens, B. Neelam, N. Volfvsky, A.A. Schäffer, R. Agarwala, K. Narfström, W.J. Murphy, U. Giger, A.L. Roca, A. Antunes, M. Menotti-Raymond, N. Yuhki, J. Pecon-Slattey, W.E. Johnson, G. Bourque, G. Tesler, NISC Comparative Sequencing Program, S.J. O'Brien**, Initial sequence and comparative analysis of the cat genome, *Genome Res.* 17 (2007) 1675-1689
- [32] **S.J. O'Brien, E. Eizirik, W.J. Murphy**, On choosing mammalian genomes for sequencing, *Science* 292 (2001) 2264-2266

- [33] **W.J. Murphy, S. Sun, Z. Chen, N. Yuhki, D. Hirschmann, M. Menotti-Raymond, S.J. O'Brien**, A Radiation Hybrid Map of the Cat Genome: Implications for Comparative Mapping, *Genome Res.* 10 (2000) 691-702
- [34] **J.M. Butler, V.A. David, S.J. O'Brien, M.A. Menotti-Raymond**, The MeowPlex: A New DNA Test Using Tetranucleotide STR Markers for the Domestic cat, *Profiles in DNA* 5 (2002) 7-10
- [35] **S.J. O'Brien, M. Menotti-Raymond, W.J. Murphy, N. Yuhki**, The Feline Genome Project, *Annu. Rev. Genet.* 36 (2002) 657-686
- [36] **A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein**, Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, *Nature* 314 (1985) 67-73
- [37] **A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein**, Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, *Nature* 316 (1985) 76-79
- [38] <http://forensicsciencecentral.co.uk/colinpitchfork.shtml>
- [39] **D. Tautz**, Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucl. Acids Res.* 17 (1989) 6463-6471
- [40] **J.L. Weber, P. E. May**, Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, *Am. J. Hum. Genet.* 44 (1989) 388-396
- [41] **J.M. Butler, J. M.**, Forensic DNA Typing – Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, 2. Auflage, *Elsevier Academic Press*, 2005
- [42] **W. Barendse, S.M. Armitage, L.M. Kossarek, A. Shalom, B.W. Kirkpatrick, A.M. Ryan, D. Clayton, L. Li, H.L. Neibergs, N. Zhang et al.**, A genetic linkage map of the bovine genome, *Nat. Genet.* 6 (1994) 227-235
- [43] **A.M. Crawford, K.G. Dodds, A.J. Ede, C.A. Pierson, G.W. Montgomery, H.G. Garmonsway, A.E. Beattie, K. Davies, J.F. Maddox, S.W. Kappes, R.T. Stone, T.C. Nguyen, J.M. Penty, E.A. Lord, J.E. Broom, J. Buitkamp, W. Schwaiger, J.T. Epplen, P. Matthew, M.E. Matthews, D.J. Hulme, K.J. Beh, R.A. McGraw, C.W. Beattie**, An Autosomal Genetic Linkage Map of the Sheep Genome, *Genetics* 140 (1995) 703-724.
- [44] **A.L. Archibald, C.S. Haley, J.F. Brown, S. Couperwhite, H.A. McQueen, D. Nicholson, W. Coppieters, A. Van de Weghe, A. Stratil, A.K. Winterø et al.**, The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*), *Mamm. Genome* 6 (1995) 157-175
- [45] **C.S. Mellersh, A.A. Langston, G.M. Acland, M.A. Fleming, K. Ray, N.A. Wiegand, L.V. Francisco, M. Gibbs, G.D. Aguirre, E.A. Ostrander**, A linkage map of the canine genome, *Genomics* 46 (1997) 326-336
- [46] **M. Menotti-Raymond, V.A. David, L.A. Lyons, A.A. Schäffer, J.F. Tomlin, M.K. Hutton, S.J. O'Brien**, A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*), *Genomics* 57 (1999) 9-23

- [47] **E. Eizirik, J.H. Kim, M. Menotti-Raymond, P.G. Jr Crawshaw, S.J. O'Brien, W.E. Johnson**, Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae), *Mol. Ecol.* 10 (2001) 65-79
- [48] **A.C. Driscoll, M. Menotti-Raymond, G. Nelson, D. Goldstein, S.J. O'Brien**, Genomic Microsatellites as Evolutionary Chronometers: A Test in Wild Cats, *Genome Res.* 12 (2002) 414-423.
- [49] **S. DeNise, E. Johnston, J. Halverson, K. Marshall, D. Rosenfeld, S. McKenna, T. Sharp, J. Edwards**, Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel Club breeds using 17 canine microsatellite markers, *Anim. Genet.* 35 (2004) 14-17
- [50] **M.J. Lipinski, Y. Amigues, M. Blasi, T.E. Broad, C. Cherbonnel, G.J. Cho, S. Corley, P. Daftari, D.R. Delattre, S. Dileanis, J.M. Flynn, D. Grattapaglia, A. Guthrie, C. Harper, P.L. Karttunen, H. Kimura, G.M. Lewis, M. Longeri, J.C. Meriaux, M. Morita, R.C. Morrin-O'donnell, T. Niini, N.C. Pedersen, G. Perrotta, M. Polli, S. Rittler, R. Schubbert, M.G. Strillacci, H. Van Haeringen, W. Van Haeringen, L.A. Lyons**, An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*), *Anim. Genet.* 38 (2007) 371-377
- [51] **M. Menotti-Raymond, V.A. David, S.M. Pflueger, K. Lindblad-Toh, C.M. Wade, S.J. O'Brien, W.E. Johnson**, Patterns of molecular genetic variation among cat breeds, *Genomics* 91 (2008) 1-11
- [52] **M. Menotti-Raymond, V.A. David, J.C. Stephens, L.A. Lyons, S.J. O'Brien**, Genetic individualization of domestic cats using feline STR loci for forensic applications, *J. Forensic Sci.* 42 (1997) 1039-1051
- [53] **M.A. Menotti-Raymond, V.A. David, L.L. Wachter, J.M. Butler, S.J. O'Brien**, An STR Forensic Typing System for Genetic Individualization of Domestic Cat (*Felis catus*) Samples, *J. Forensic Sci.* 50 (2005) 1061-1070
- [54] **K. Müller, C. Brugger, R. Klein, E. Miltner, F. Reuther, P. Wiegand**, STR typing of hairs from domestic cats, *Forensic Sci. Int.: Genetic Supplement Series 1* (2008) 607-609
- [55] **N. Coomber, V.A. David, S.J. O'Brien, M. Menotti-Raymond**, Validation of a short tandem repeat multiplex typing system for genetic individualization of domestic cat samples, *Croat. Med. J.* 48 (2007) 547-555
- [56] **W. Parson, A. Brandstätter, A. Alonso, N. Brandt, B. Brinkmann, A. Carracedo, D. Corach, O. Froment, I. Furac, T. Grzybowski, K. Hedberg, C. Keyser-Tracqui, T. Kupiec, S. Lutz-Bonengel, B. Mevag, R. Ploski, H. Schmitter, P. Schneider, D. Syndercombe-Court, E. Sørensen, H. Thew, G. Tully, R. Scheithauer**, The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation,

- results and perspectives, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 215-226
- [57] **M. Pierpaoli, Z.S. Birò, M. Herrmann, K. Hupe, M. Fernandes, B. Ragni, L. Szemethy, E. Randi**, Genetic distinction of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridization with domestic cats in Hungary, *Mol. Ecol.* 12 (2003) 2585-2598
- [58] **M. Culver, W.E. Johnson, J. Pecon-Slattery, S.J. O'Brien**, Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*), *J. Hered.* 91 (2000) 186-197
- [59] **W. Janning, E. Knust**, Genetik, 1. Auflage, *Thieme-Verlag* (2004)
- [60] **T. Strachan, A.P. Read**, Molekulare Humangenetik, 3. Auflage, *Spektrum-Verlag* (2005)
- [61] **J.E. Lygo, P.E. Johnson, D.J. Holdaway, S. Woodroffe, J.P. Whitaker, T.M. Clayton, C.P. Kimpton, P. Gill**, The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework, *Int. J. Legal Med.* 107 (1994) 77-89
- [62] **J.M. Butler**, Forensic DNA Typing - Biology & Technology behind STR Markers, 1. Auflage, *Academic Press* (2001)
- [63] **P.S. Walsh, N.J. Fildes, R. Reynolds**, Sequence Analysis and Characterization of Stutter Products at the Tetranucleotide Repeat Locus vWa, *Nucl. Acids Res.* 24 (1996) 2807-2812
- [64] **X.Y. Hauge, M. Litt**, A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR, *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 411-415
- [65] **I. Berg, R. Neumann, H. Cederberg, U. Rannug, A.J. Jeffreys**, Two Modes of Germline Instability at Human Minisatellite MS1 (Locus *DIS7*): Complex Rearrangements and Paradoxical Hyperdeletion, *Am. J. Hum. Genet.* 72 (2003) 1436-1447
- [66] **Q.Y. Huang, F.H. Xu, H. Shen, H.Y. Deng, Y.J. Liu, Y.Z. Liu, J.L. Li, R.R. Recker, H.W. Deng**, Mutation Patterns at Dinucleotide Microsatellite Loci in Humans, *Am. J. Hum. Genet.* 70 (2002) 625-634
- [67] **D. Bachtrog, S. Weiss, B. Zangerl, G. Brem, C. Schlötterer**, Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome, *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 602-610
- [68] **J. Majewski, J. Ott**, GT repeats are associated with recombination on human chromosome 22, *Genome Res.* 10 (2000) 1108-1114
- [69] **H. Ellegren**, Microsatellites: simple sequences with complex evolution, *Nat. Rev. Genet.* 5 (2004) 435-445
- [70] **A. Urquhart, C.P. Kimpton, P. Gill**, Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (*ACTBP2*) locus, *Hum. Genet.* 92 (1993) 637-638
- [71] **A. Urquhart, C.R. Kimpton, T.J. Downes, P. Gill**, Variation in Short Tandem Repeat sequences – a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers, *Int. J. Leg. Med.* 107 (1994) 13-20
- [72] DNA recommendations – 1994 report concerning further recommendations of the DNA

- commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems, *Forensic Sci. Int.* 69 (1994) 103-104
- [73] **B. Olaison, W. Bär, B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, W.R. Mayr, S. Rand**, DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics, *Vox Sang.* 74 (1998) 61-63
- [74] **B. Budowle, P. Garofano, A. Hellmann, M. Ketchum, S. Kanthaswamy, W. Parson, W. van Haeringen, S. Fain, T. Broad**, Recommendations for animal DNA forensic and identity testing, *Int. J. Legal Med.* 119 (2005) 295-302
- [75] **A. Linacre, L. Gusmão, W. Hecht, A.P. Hellmann, W.R. Mayr, W. Parson, M. Prinz, P.M. Schneider, N. Morling**, ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 501-505
- [76] **M.H. Polymeropoulos, H. Xiao, D.S. Rath, C.R. Merril**, Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH), *Nucl. Acids Res.* 19 (1991) 3753
- [77] **F.S. Baechtel, J.B. Smerick, K.W. Presley, B. Budowle**, Multigenerational amplification of a reference ladder for alleles at locus D1S80, *J. Forensic Sci.* 38 (1993) 1176-1182
- [78] **R.N. Smith**, Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR, *BioTechniques* 18 (1995) 122-128
- [79] **W. Bär, B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, W. Mayr, B. Olaisen**, DNA recommendations - Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems, *Int. J. Legal Med.* 110 (1997) 175-176
- [80] **C. Schlötterer, D. Tautz**, Slippage synthesis of simple sequence DNA, *Nucl. Acids Res.* 20 (1992) 211-215
- [81] **B. Leclair, C.J. Frégeau, K.L. Bowen, R.M. Fourney**, Systematic analysis of stutter percentages and allele peak height and peak area ratios at heterozygous STR loci for forensic casework and database samples, *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 968-980
- [82] **J.M. Clark**, Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA Polymerases, *Nucl. Acids Res.* 16 (1988) 9677-9686
- [83] **M.J. Brownstein, J.D. Carpten, J.R. Smith**, Modulation of non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping, *BioTechniques* 20 (1996) 1004-1010
- [84] **W. Goodwin, A. Linacre, S. Hadi**, An Introduction to Forensic Genetics, 1. Auflage, Wiley-Verlag (2007)
- [85] **C. Kimpton, D. Fisher, S. Watson, M. Adams, A. Urquhart, J. Lygo, P. Gill**, Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int. J. Legal Med.* 106 (1994) 302-311

- [86] **P.M. Schneider, K. Bender, W.R. Mayr et al.**, STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative European exercise, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 123-134
- [87] **P. Grubwieser, R. Mühlmann, B. Berger, H. Niederstätter, M. Pavlic, W. Parson**, A new "miniSTR-multiplex" displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA, *Int. J. Legal Med.* 120 (2006) 115-120
- [88] **P. Wiegand, M. Kleiber**, Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers, *Int. J. Legal Med.* 114 (2001) 285-287
- [89] **J.M. Butler, Y. Shen, B.R. McCord**, The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, *J. Forensic Sci.* 48 (2003) 1054-1064
- [90] **J.P. Whitaker, T.M. Clayton, A.J. Urquhart, E.S. Millican, T.J. Downes, C.P. Kimpton, P. Gill**, Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples, *Biotechniques* 18 (1995) 670-677
- [91] **A. Hellmann, U. Rohleder, H. Schmitter, M. Wittig**, STR typing of human telogen hairs – a new approach, *Int. J. Legal Med.* 114 (2001) 269-273
- [92] **I. Findlay, A. Taylor, P. Quirke, R. Frazier, A. Urquhart**, DNA fingerprinting from single cells, *Nature* 389 (1997) 555-556
- [93] **A. Barbaro, G. Falcone, A. Barbaro**, DNA typing from hair shaft, *Prog. Forensic Genet.* 8 (2000) 523-525
- [94] **P.Gill, J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, J. Buckleton**, An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, *Forensic Sci. Int.* 112 (2000) 17-40
- [95] http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/Butler2003e.pdf
- [96] **M.C. Edwards, R.A. Gibbs**, Multiplex PCR: advantages, development, and applications, *PCR Methods Appl.* 3 (1994) 65-75
- [97] **J.V. Lopez, S. Cevario, S.J. O'Brien**, Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (*Numt*) in the nuclear genome, *Genomics* 33 (1996) 229-246
- [98] **A.R. Hoelzel, J.V. Lopez, G.A. Dover, S.J. O'Brien**, Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores, *J. Mol. Evol.* 39 (1994) 191-199
- [99] **G.G. Brown**, Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA, *J. Mol. Biol.* 192 (1986) 503-511
- [100] **C.S. Madsen, S.C. Ghivizzani, W.W. Hauswirth**, Protein binding to a single termination-associated sequence in the mitochondrial D-loop region. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 2162-2171

- [101] **G. Tully, S.M. Barritt, K. Bender, E. Brignon, C. Capelli, N. Dimo-Simonin, C. Eichmann, C.M. Ernst, C. Lambert, M.V. Lareu, B. Ludes, B. Mevag, W. Parson, H. Pfeiffer, A. Salas, P.M. Schneider, E. Staalstrom**, Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts, *Forensic Sci. Int.* 140 (2004) 1-11
- [102] **K. Sekiguchi, H. Sato, K. Kasai**, Mitochondrial DNA heteroplasmy among hairs from single individuals, *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 986-991
- [103] **T. Grzybowski**, Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots, *Electrophoresis* 21 (2000) 548-553
- [104] **M.A. Jobling, P. Gill**, Encoded evidence: DNA in forensic analysis, *Nat. Rev. Genet.* 5 (2004) 739-751
- [105] **J. Tsuji, M.C. Frith, K. Tomii, P. Horton**, Mammalian NUMT insertion is non-random, *Nucl. Acids Res.* 40 (2012) 9073-9088
- [106] **E. Hazkani-Covo, R. M. Zeller, W. Martin**, Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (*numts*) in Sequenced Nuclear Genomes, *PloS Genet.* 6 (2010) 1-11
- [107] **J.V. Lopez, N. Yuhki, R. Masuda, W. Modi, S.J. O'Brien**, Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat, *J. Mol. Evol.* 39 (1994) 174-190
- [108] <http://dobzhanskycenter.bio.spbu.ru/pdf/sjop/MS624%20MMR%20Forensics.pdf>
M.A. Menotti-Raymond, A. Victor, M.S. David, S.J. O'Brien, STR Based Forensic Analysis of Felid Samples from Domestic and Exotic Cats, 71-93
- [109] **M. Allen, A.S. Engström, S. Meyers, O. Handt, T. Saldeen, A. von Haeseler, S. Pääbo, U. Gyllensten**, Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities, *J. Forensic Sci.* 43 (1998) 453-464
- [110] AmpFℓSTR Profiler Plus™ PCR Amplification Kit: User`s Manual, *Perkin-Elmer* (1997)
- [111] **L.E. Baker, W.F. McCormick, K.J. Matteson**, A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 126-130
- [112] **J. Dachs, I.J. McNaught, J. Robertson**, The persistence of human scalp hair on clothing fabrics, *Forensic Sci. Int.* 138 (2003) 27-36
- [113] **B. Budowle, M.W. Allard, M.R. Wilson, R. Chakraborty**, Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations, *Annu. Rev. Genomics Hum Genet.* 4 (2003) 119-141
- [114] **S.S. Tobe, A.M. Linacre**, A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene, *Electrophoresis* 29 (2008) 340-347
- [115] **T. Melton, C. Holland**, Routine forensic use of the mitochondrial 12S ribosomal RNA

- gene for species identification, *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 1305-1307
- [116] **W. Parson, K. Pegoraro, H. Niederstätter, M. Föger, M. Steinlechner**, Species identification by means of the cytochrome b gene, *Int. J. Legal Med.* 114 (2000) 23-28
- [117] **T. Kitano, K. Umetsu, W. Tian, M. Osawa**, Two universal primer sets for species identification among vertebrates, *Int. J. Legal Med.* 121 (2007) 423-427
- [118] **K. Imaizumi, T. Akutsu, S. Miyasaka, M. Yoshino**, Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA, *Int. J. Legal Med.* 121 (2007) 184-191
- [119] **A. Linacre**, Application of mitochondrial DNA technologies in wildlife investigations - species identification, *Forensic Sci. Rev.* 18 (2006) 1-8
- [120] **J.H. Wetton, G.L. Braidley, C.S.F. Tsang, C.A. Roney, S.L. Powell, A.C. Spriggs**, Generation of a species-specific DNA sequence library of British mammals, *Report for the Joint Nature Conservation Committee & the Environment and Heritage Service*, Northern Ireland, (2002) 37
- [121] **C.R. Tarditi, R.A. Grahn, J.J. Evans, J.D. Kurushima, L.A. Lyons**, Mitochondrial DNA sequencing of cat hair: an informative forensic tool. *J. Forensic Sci.* 56 (2011) 36-46
- [122] **R.A. Grahn, J.D. Kurushima, N.C. Billings, J.C. Grahn, J.L. Halverson, E. Hammer, C.K. Ho, T.J. Kun, J.K. Levy, M.J. Lipinski, J.M. Mwenda, H. Ozpinar, R.K. Schuster, S.J. Shoorijeh, C.R. Tarditi, N.E. Waly, E.J. Wictum, L.A. Lyons**, Feline non-repetitive mitochondrial DNA control region database for forensic evidence, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 33-42
- [123] **C. Eichmann, W. Parson**, Molecular characterization of the canine mitochondrial DNA control region for forensic applications. *Int. J. Legal Med.* 121 (2007) 411-416
- [124] **P. Savolainen, B. Rosen, A. Holmberg, T. Leitner, M. Uhlen, J. Lundeberg**, Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forensic use, *J. Forensic Sci.* 42 (1997) 593-600
- [125] **P.M. Schneider, Y. Seo, C. Rittner**, Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident, *Int. J. Legal Med.* 112 (1999) 315-316
- [126] <http://www.crimelibrary.com/blog/2013/08/14/dna-database-of-british-felines-helps-convict-killer/index.html>
- [127] <http://www.parrymedicalwriting.com/how-a-cat-helped-convict-a-killer/>
- [128] **N. Schury**, Etablierung einer Multiplex-PCR zur Unterscheidung verschiedener Tierarten, Diplomarbeit (2011)
- [129] **J. M. Reinholz**, Etablierung einer Methode zur genetischen Untersuchung der hypervariablen Bereiche der D-Loop-Region bei Katzen für den Einsatz in der kriminaltechnischen Fallarbeit, Masterarbeit (2014)

- [130] QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook (2007)
- [131] **B. Wheeler, L.J. Wilson**, Practical Forensic Microscopy, 1. Auflage, *Wiley Blackwell* (2008) 161
- [132] <http://www.algimed.by/download/EN-EZ1-DNA-Investigator-Handbook.pdf>
- [133] **C. Mülhardt**, Der Experimentator - Molekularbiologie und Genomics, 6. Auflage, *Spektrum-Akademischer Verlag* (2009)
- [134] AmpliTaq Gold[®] PCR Master Mix, Applied Biosystems[®] (2001)
- [135] **G. Richter**, Praktische Biochemie - Grundlagen und Techniken, 1. Auflage, *Thieme-Verlag* (2003)
- [136] Microcon[®] Centrifugal Filter Devices User Guide, Millipore (2005)
- [137] **J. Sambrook, D.W. Russel**, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3. Auflage, *Cold Spring Harbor Laboratory* (2001)
- [138] **M.A. Menotti-Raymond, V.A. David, R. Agarwala, A.A. Schäffer, R. Stephens, S.J. O'Brien, W.J. Murphy**, Radiation hybrid mapping of 304 novel microsatellites in the domestic cat genome, *Cytogenet. Genome Res.* 102 (2003) 272-276
- [139] **K.L. Pilgrim, K.S. Mckelvey, A.E. Riddle, M.K. Schwartz**, Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Mol. Ecol. Notes* 5 (2005) 60-61
- [140] **A. Estoup, C. Tailliez, J.M. Cornuet, M. Solignac**, Size Homoplasmy and Mutational Process of Interrupted Microsatellites in Two Bee Species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol. Biol. Evol.* 12 (1995) 1074-1084
- [141] **C. Eichmann, B. Berger, W. Parson**, A proposed nomenclature for 15 canine-specific polymorphic STR loci for forensic purposes. *Int. J. Legal Med.* 118 (2004) 249-266
- [142] **H.R. Schneider, S. Rand, H. Schmitter, G. Weichhold**, ACTBP2-nomenclature recommendations of GEDNAP. *Int. J. Legal Med.* 111 (1998) 97-100
- [143] **S.J. Walsh, S.L. Robinson, G.R. Turbett, N.P. Davies, A.N. Wilton**, Characterisation of variant alleles at the HumD21S11 locus implies unique Australasian genotypes and re-classification of nomenclature guidelines. *Forensic Sci. Int.* 135 (2003) 35-41
- [144] **A. Möller, M. Schürenkamp, B. Brinkmann**, Evaluation of an ACTBP2 ladder composed of 26 sequenced alleles. *Int. J. Legal Med.* 108 (1995) 75-78
- [145] **P. Gill, B. Brinkmann, E. d'Aloja, J. Andersen, W. Bar, A. Carracedo, B. Dupuy, B. Eriksen, M. Jangblad, V. Johnsson, A.D. Kloosterman, P. Lincoln, N. Morling, S. Rand, M. Sabatier, R. Scheithauer, P. Schneider, M.C. Vide**, Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci. Int.* 87 (1997) 185-192
- [146] **A.P. Hellmann, R. Rohleder, C. Eichmann, I. Pfeiffer, W. Parson, U. Schleenbecker, A** Proposal for Standardization in Forensic Canine DNA Typing: Allele Nomenclature of Six

- Canine-Specific STR Loci. *J. Forensic Sci.* 51 (2006) 274-281
- [147] **C.K. Yoon**, Botanical witness for the prosecution, *Science* 260 (1993) 894-895
- [148] **B. Berger, C. Berger, W. Hecht, A. Hellmann, U. Rohleder, U. Schleenbecker, W. Parson**, Validation of two canine STR multiplex-assays following the ISFG recommendations for non-human DNA analysis, *Forensic Sci. Int. Genet.* 8 (2014) 90-100
- [149] **N. Dawnay, R. Ogden, R.S. Thorpe, L.C.Pope, D.A. Dawson, R. McEwing**, A forensic STR profiling system for the Eurasian badger: A framework for developing profiling systems for wildlife species, *Forensic Sci. Int. Genet.* 2 (2008) 47-53
- [150] **J.B. Sgueglia, S. Geiger, J. Davis**, Precision studies using the ABI prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 1247-1254
- [151] **A.D.J. Overall, R.A. Nichols**, A Method for Distinguishing Consanguinity and Population Substructure Using Multilocus Genotype Data, *Mol. Biol. Evol.* 18 (2001) 2048-2056
- [152] **R.A. Grahn, T.I-T. Huang, L.A. Lyons**, Impact of Allogrooming in Domestic Cats (*Felis silvestris catus*) on Mitochondrial DNA Profiling of Shed Hairs, *Open Forensic Sci. J.* 6 (2013) 12-19
- [153] **B.W. Davis, T. Raudsepp, A.J. Pearks Wilkerson, R. Agarwala, A.A. Schäffer, M. Houck, B.P. Chowdhary, W.J. Murphy**, A high-resolution cat radiation hybrid and integrated FISH mapping resource for phylogenomic studies across Felidae, *Genomics* 93 (2009) 299-304

Bildquellen (Internetadressen):

- [i] <http://blog.evercats.com/2009/09/05/the-origin-of-cat-breeds/>
- [ii] http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/bilder/themen_und_projekte/wildkatze/wildkatze_vergleich_500.jpg
- [iii] http://bund-rlp.de/fileadmin/bundgruppen/Wildkatze_RLP/Fotos_Wildkatze/Hauskatze_by_Moni-Sertel_pixelio.de_300x400.jpg
- [iv] <http://www.thearkdb.org/arkdb/do/getChromosomeDetails;jsessionid=93A087EE01840E26693901FD1661020E?accession=ARKSPC00000002>
- [v] <https://www.biolynx.ca/literature/el12.pdf>
- [vi] <https://www.biolynx.ca/literature/el12.pdf>
- [vii] <http://biotechnologia.pl/biotechnologia/aktualnosci/zintegrowane-rozwiazania-od-promeginowe-wielofunkcyjne-urzadzenia,150>
- [viii] <http://www.biocompare.com/19934-Magnetic-Particle-Systems-Automated-Workstations/2144715-KingFisher-Duo-Nucleic-Acid-Purification-Systems/>
- [ix] <http://www.qiagen.com/Videos/Video-EZ1-Advanced/>

7 Publikationen

- Veröffentlichungen:

N. Schury, U. Schleenbecker, A.P. Hellmann, Forensic animal DNA typing: Allele nomenclature and standardization of 14 feline STR markers, *Forensic Sci. Int. Genet.* 12 (2014) 42-59

Das Manuskript ist von dem Journal akzeptiert und erscheint in der Septemбераusgabe. Die finale Version ist bereits online publiziert.

Die Daten des Manuskripts basieren grundlegend auf dieser Dissertation. Diese umfassen sowohl experimentelle Vorgehensweisen, Ergebnisse als auch Teile der Diskussion.

- Vorträge:

03/2013 - „Brief Information about Species Identification“, Animal, Plant and Soil Traces (APST)-Meeting (ENFSI working group), *Dänemark, Niederlande*

02/2014 - “Forschungsproject zur Individualisierung von Katzen in der Forensik”, 34. Spurenworkshop in Verbindung mit der DGRM (Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin) sowie der Spurenkommission (gemeinsame Kommission rechtsmedizinischer und kriminaltechnischer Institute), *Innsbruck, Österreich*

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

9 Lebenslauf

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Das sich im Anhang befindende Manuskript wurde zum größten Teil von mir verfasst. Die Daten des Manuskripts basieren grundlegend auf Teilen dieser Dissertation. Diese umfassen sowohl experimentelle Vorgehensweisen, Ergebnisse als auch Teile der Diskussion.

Natalie Schury

Wiesbaden, den 12.06.2014

Diese Dissertation wurde im Fachbereich KT32 „Pflanzen-, Tier- und Bodenspuren“ des Bundeskriminalamtes in Wiesbaden verfasst. Die Betreuung erfolgte durch Herrn [REDACTED] und Herrn [REDACTED].

Die externe Betreuung seitens der Johannes Gutenberg-Universität Mainz fand über die Universitätsmedizin am Institut für Rechtsmedizin unter der Leitung von [REDACTED] [REDACTED] in der Abteilung für Forensische Molekulargenetik statt.

Die interne Betreuung durch den Fachbereich Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz übernahm [REDACTED]. Vonseiten des Instituts für Rechtsmedizin erfolgte die Betreuung durch [REDACTED].

11 Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
Amel	geschlechtsspezifischer Marker Amelogenin
Atto 550	Fluoreszenzfarbstoff; verwandt mit Rhodamine 6G
Atto 565	Fluoreszenzfarbstoff; Familie der Rhodaminfarbstoffe
BKA	Bundeskriminalamt
BoTMR	Boron-Dipyrromethen-Derivat (Bodipy)
bp	Basenpaar
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ca ²⁺	zweiwertiges Calcium-Ion
cm	Zentimeter
cM	centiMorgan
cRNA	carrier RNA
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol (auch unter Clelands Reagenz bekannt)

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	exclusion limit
engl.	englisch
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FAM	6-Carboxyfluorescein
F-Primer	Forward-Primer
<i>F. s.</i>	<i>Felis silvestris</i>
g	Gramm
G	Guanin
Genom.	Genomische
Gew	Gewebe
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ₂ O	Wasser
Ha	Haar
HEX	4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-carboxyfluorecein
i. d. R.	in der Regel
Inc.	Incorporated
ISFG	International Society for Forensic Genetics
ISFH	International Society for Forensic Haemogenetics
Jh.	Jahrhundert
k.A.	keine Angabe
Ktz	Katze
l	Liter
LCN-DNA	Low Copy Number-DNA
LEV	Low Elution Volume
M	Molar
max.	maximal
MB	Megabasen
mg	Milligramm
Mg ²⁺	zweiwertiges Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mind.	mindestens

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mtDNA	mitochondriale DNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
No.	Nummer (<i>engl.: number</i>)
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.: Polymerase Chain Reaction</i>)
pg	Pikogramm
pH	pondus Hydrogenii bzw. potentia Hydrogenii
rfu	Peakhöhe (<i>engl.: realive fluorescence units</i>)
rpm	rounds per minute
R-Primer	Reverse-Primer
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.: sodium dodecyl sulphate</i>)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
Sp	Speichel
STR	Short Tandem Repeat
südl.	südliches
T	Thymin
TF	Tränenflüssigkeit
TNCa	Tris-Natrium-Calcium
TNE	Tris-Natrium-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (auch Tromethamin)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.: Ribonucleic acid</i>)
tRNA	transfer Ribonukleinsäure (<i>engl.: transfer Ribonucleic acid</i>)
U	Unit
u. a.	unter anderem

usw.	und so weiter
V	Volt
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
WCF	World Cat Federation
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
'	Minute
''	Sekunde
Ø	Durchmesser
° C	Grad Celcius

11.2 Manuskript

N. Schury, U. Schleenbecker, A.P. Hellmann, Forensic animal DNA typing:
Allele nomenclature and standardization of 14 feline STR markers, *Forensic
Sci. Int. Genet.* 12 (2014) 42-59

Das Manuskript ist von dem Journal akzeptiert und erscheint in der Septemбераusgabe. Die finale Version ist bereits online publiziert.

11.3 Elektronischer Anhang

- Ordner 1: Populationsdatenbank der Hauskatze - Informationen zu den verwendeten Proben, Markersystemen, Frequenzen und Häufigkeitsverteilungen
- Ordner 2: Populationsdatenbank der Europäischen Wildkatze - Angaben zu den verwendeten Proben sowie zu den Frequenzverteilungen
- Ordner 3: Sequenzierungsergebnisse - Detaillierte Auflistung der Daten von allen sequenzierten Allelen