

Melanie Weissenberger  
Dr. sc. hum.

## **Entwicklung eines Multiplex PCR Kits zur Unterscheidung verschiedener Wildtierarten**

Geboren am 01.04.1982 in Karlsruhe  
Diplom der Fachrichtung Biologie am 15.05.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Rechtsmedizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Mattern

Statistisch gesehen verursacht alle 2,5 Minuten ein Wildtier einen Unfall auf deutschen Straßen. Der Oktober ist dabei der Monat mit den meisten Unfällen. In den vergangenen zehn Jahren nahmen Wildunfälle um 30 % zu. Fahrzeughalter, die ihr Auto mit einer Teilkasko-Versicherung versichert haben, müssen bei Wildunfällen den vollen Beweis erbringen, dass es sich wirklich um einen Wildunfall gehandelt hat. Wenn kein totes Tier oder zur Identifizierung ausreichend große Fellstücke vorhanden waren, konnte der Beweis bisher nicht erbracht werden.

Auch bei Wildunfällen mit Personenschäden, bei denen die Geschädigten durch die Unfallfolgen nicht mehr aussagefähig sind, war es bisher nicht möglich, Angaben zum Unfallhergang zu machen, wenn nur forensisch kleine Spuren – die teilweise nicht mit dem bloßen Auge zu erkennen sind – des Wildtieres am Fahrzeug gesichert werden konnten, da es für diese kleinen Spuren bisher keine Untersuchungsmöglichkeit gab.

Ziel der Arbeit war es, ein Multiplex PCR Kit zur Amplifizierung von *short tandem repeats* zu entwickeln, mithilfe dessen es möglich sein soll, forensisch kleine Spuren bestimmten Wildtierarten zuzuordnen.

In der Forensischen Genetik werden *short tandem repeats* benutzt für die Erstellung von Täterprofilen und für Abstammungsgutachten. In den letzten Jahren hat sich der Teilbereich *animal forensics* entwickelt, bei dem *short tandem repeats* von Tieren untersucht werden. Diese dienen der Identifizierung bestimmter Tierarten oder der Zuordnung zu einer Ursprungspopulation. Bisher gibt es allerdings keine Möglichkeit mit einem einzigen Multiplex-PCR-Ansatz Tiere verschiedener Ordnungen zu unterscheiden.

Für die Arbeit wurden Blut- und Speichelproben verschiedener Tierarten (Reh 115 Proben, Damwild 14 Proben, Rotwild 17 Proben, Wildschwein 144 Proben, Fuchs 19 Proben und Hund 26 Proben) von Jägern und Privatpersonen (im Raum Baden-Württemberg) gesammelt. Hundeproben wurden gesammelt, da der Hund zur gleichen Familie gehört wie der Fuchs und getestet werden muss, ob sich in der Multiplex PCR Hunde von Füchsen abgrenzen lassen.

Zunächst wurden Primer-Paare (21 für Rehe/Rotwild/Damwild, 7 für Wildschweine, 6 für Hunde/Füchse) in Einzel-PCRs auf Funktion und auf benötigte PCR-Bedingungen (*Annealing*-Temperatur, MgCl<sub>2</sub>-Konzentration) getestet. Ein wichtiger Aspekt war auch, dass die erhaltenen Merkmale nicht zu groß (nicht größer als ca. 200bp) sind, da diese bei degradiertem DNA oft ausfallen. Die als geeignet befundenen Primer wurden in verschiedenen Ansätzen miteinander kombiniert, um auszutesten, welche zum vereinten Einsatz geeignet sind. Dabei konnten einige Primer-Paare ausgeschlossen werden, die zwar in Einzel-PCRs geeignet sind, in der Multiplex-PCR jedoch unspezifische Nebenprodukte verursachen. Da es sich bei den getesteten STR-Systemen ausschließlich um Dinukleotidrepeats handelt, ist auch das Auftreten von *stutter* Produkten deutlich höher. Primer-Paare für STR-Loci, deren Merkmale sehr ausgeprägte *stutter* Produkte hatten, wurden aussortiert. Es hat sich gezeigt, dass 7 Primerpaare (SW72, ROE9, CPH4, CPH12, SW240, SW951 und RT27) miteinander kombiniert einsetzbar sind. Durch weitere Versuche wurden die jeweils optimalen Primer-

Konzentrationen ermittelt, die optimale *Annealing*-Temperatur für die eingesetzten Primer-Paare ist 48°C. Die sechs Tierarten lassen sich alle sehr deutlich voneinander unterscheiden.

Die Sequenzierung der einzelnen Merkmale hat Sequenzen der erwarteten Länge ergeben. In den Systemen für Wildschweine unterscheiden sich die einzelnen Merkmale nur durch variierende Anzahl an Wiederholungseinheiten. In den restlichen Systemen lassen sich abgesehen von der unterschiedlichen Anzahl der Wiederholungen auch noch tierartspezifische Unterschiede in den flankierenden Regionen feststellen. Bei den Hunden gab es keine rassenspezifischen Unterschiede in der Sequenz. Da aber zwei STR-Systeme in dem Ansatz enthalten sind – die beide eine hohe Allelvarianz für Hunde aufweisen – ist auch die Möglichkeit gegeben, bei einer Hundebissattacke den Hund zu identifizieren der die Verletzung verursacht hat.

Das Ziel, verschiedene Wildtierspezies mit Hilfe eines einzigen PCR-Ansatzes unterscheiden zu können, wurde somit erreicht und zusätzlich wurde der Einsatz in ein weiteres Anwendungsgebiet – der Identifizierung eines Hundes bei Hundebissattacken – ermöglicht.