

.SIAK-Journal – Zeitschrift für Polizeiwissenschaft und polizeiliche Praxis



Nussbaumer, Christa (2009):

Neue Methoden der Spurenvoruntersuchung. Die RNA-Typisierung

SIAC-Journal – Zeitschrift für
Polizeiwissenschaft und polizeiliche Praxis
(3), 62-67.

doi: 10.7396/2009_3_1

Um auf diesen Artikel als Quelle zu verweisen, verwenden Sie bitte folgende Angaben:

Nussbaumer, Christa (2009). Neue Methoden der Spurenvoruntersuchung. Die RNA-Typisierung, SIAC-Journal – Zeitschrift für Polizeiwissenschaft und polizeiliche Praxis (3), 62-67, Online: http://dx.doi.org/10.7396/2009_3_1.

© Bundesministerium für Inneres – Sicherheitsakademie / Verlag NWV, 2009

Hinweis: Die gedruckte Ausgabe des Artikels ist in der Print-Version des SIAC-Journals im Verlag NWV (<http://nwv.at>) erschienen.

Online publiziert: 3/2013

Die RNA-Typisierung

Neue Methoden der Spurenvoruntersuchung



CHRISTA NUSSBAUMER,
allgemein beeidete und gerichtlich
zertifizierte Sachverständige für
humane Erbbiologie – forensische
Molekularbiologie.

Bisherige Methoden der Voruntersuchung von (menschlichen) Körperflüssigkeiten mittels enzymatischer bzw. immunologischer Schnelltests sind zwar nicht aufwändig, jedoch lassen sie nur wenig differenzierte Aussagen über den Ursprung des forensischen Spurenmaterials zu. Vor allem bei Missbrauchsfällen innerhalb der Familie oder des Bekanntenkreises erhebt sich oft die Frage nach dem Ausgangsmaterial von Spuren, die an der Kleidung und am Körper des Opfers oder vice versa am Beschuldigten gesichert werden konnten. Körpersekrete wie Blut, Sperma und Speichel können mit herkömmlichen Vortests lediglich voneinander unterschieden werden. Die Analyse der Ribonucleinsäure (RNA), die zellspezifische Ausprägungen in verschiedenen biologischen Materialien zeigt, gewinnt daher in den letzten Jahren auch in der Forensik an Bedeutung. Während das bereits zur Routine gewordene DNA-Profilung eine eindeutige Identifizierung des Spurenlegers ermöglicht, kann das RNA-Profilung aus derselben oft minimalen Tatortspur auch Informationen über den Ursprung des biologischen Materials, bezogen auf Körpergewebe oder Organe, liefern. Dieser Beitrag gibt einen Überblick über die in den letzten Jahren von mehreren Forschungsgruppen entwickelten molekularen RNA-Marker für verschiedene Körpersekrete bzw. Gewebe. Mit diesen Methoden kann derzeit das Vorliegen von Blut, Sperma, Speichel, Menstruationsblut und Vaginalsekret relativ präzise nachgewiesen werden. Die Entwicklungs- bzw. Validierungsarbeiten an dieser Methode, die unter Einsatz der Real-Time-PCR-Technologie eine enorme Sensitivität erreicht, sind jedoch noch im Gange, sodass es noch einige Zeit dauern wird, bis RNA-Profilung auch routinemäßig zur Anwendung kommen kann.

1. FORENSISCHE MOLEKULARBIOLOGIE

Im Laufe der letzten 20 Jahre hat die forensische DNA-Analyse (DNA-Profilung) im Bereich der Strafrechtspflege beträchtlich an Bedeutung gewonnen. Die Erstellung von DNA-Profilen aus biologischen Spuren, die von Kriminalbeamten am Tatort gesichert werden, gehört mittlerweile weltweit zum Alltag der Molekularbiologen in forensischen Spurenlabors. Tag für Tag liefert diese Methode der Spurenvoruntersuchung entscheidende Hinweise

bzw. Beweise, die zur Klärung unterschiedlichster Delikte wie Einbruch, Raub, Vergewaltigung und Mord führen. Als spektakuläres österreichisches Beispiel der jüngeren Zeit sei das Gift-Attentat auf den Bürgermeister von Spitz in Niederösterreich erwähnt.

Seit im Jahre 1997 die österreichische DNA-Datenbank des Bundesministeriums für Inneres etabliert wurde, konnten tausende Fälle über die Auswertung des Vergleichsmaterials tatverdächtiger Personen durch Abgleich mit Tatortspuren gelöst

werden. Laut Angaben des Bundeskriminalamtes wurden über 6.000 Straftäter durch diese Datenbank-Treffer überführt.

Quelle: Nussbaumer



DNA-Profilung im forensischen Speziallabor

2. BEDEUTUNG DER KLASSIFIZIERUNG FORENSISCHER SPUREN

Während die Erstellung von DNA-Profilen und damit eine Zuordnung zu einer bestimmten Person als Spurensatz auch bei sehr geringen Spurenmengen häufig zum Erfolg führt, ist die Feststellung des Ausgangsmaterials bzw. der Herkunft einer biologischen Spur oftmals schwierig oder nicht möglich. So stammt beispielsweise ein großer Teil der im Auftrag der Staatsanwaltschaft bzw. der Polizei untersuchten Tatortspuren von Einbrechern, die meist Kontaktsuren durch Übertragung von Hautzellen (Epithelzellen) hinterlassen. In solchen Fällen ist eine Klassifizierung des Spurenmaterials von untergeordneter Bedeutung. Schon allein die Tatsache, dass das DNA-Profil eines unbekanntes Täters am Tatort nachgewiesen werden kann, hat den geforderten hohen Beweiswert.

Eine ganz andere Fragestellung liegt zum Beispiel bei den immer häufiger gemeldeten Fällen von sexuellem Missbrauch innerhalb der Familie vor. Es kann bei solchen Delikten von entscheidender Bedeutung sein, die Herkunft des Spurenmaterials zu definieren, da die Aussagen

der betroffenen Personen anhand der gesicherten Spuren verifiziert oder widerlegt werden müssen. Selbstverständlich macht es im Falle des Verdachts auf Kindesmissbrauch einen wesentlichen Unterschied, ob am Körper oder an der Kleidung des Kindes z.B. Speichel oder aber Sperma des Vaters gefunden wird. Während Speicheltropfen im normalen Umgang mit Angehörigen übertragen werden können, bedarf der Nachweis von Sperma am Körper oder an der Kleidung eines Kindes einer sehr plausiblen Erklärung.

3. BISHERIGE MÖGLICHKEITEN DER SPURENVORUNTERSUCHUNG

Derzeit werden im Rahmen der Spurenvoruntersuchungen routinemäßig so genannte Schnelltests angewendet. Diese ermöglichen es, durch die Bestimmung jeweils typischer Eiweißanteile, auf Basis proteinchemischer Reaktionen, einige wenige Arten von Körpersekreten, wie Blut, Sperma oder Speichel, zu identifizieren. Die Nachteile dieser enzymatischen Tests (α -Amylase-Nachweis für Speichel) und immunologischer Nachweismethoden (PSA-Test für Sperma, Hexagon-OBTI-Test für menschliches Blut) bestehen einerseits im Verlust des Spurenmaterials, aber auch darin, dass das Ergebnis nicht genügend spezifisch oder die Sensitivität der Methode zu gering sein kann. Zudem stehen keine differenzierenden Schnelltestmethoden für das Vorliegen von Vaginalsekret oder Menstruationsblut zur Verfügung.

4. RNA-PROFILING ZUR KLASSIFIZIERUNG FORENSISCHER SPUREN

Während sich das DNA-Profilung in den letzten zehn Jahren zunehmend etablierte, wurden die Möglichkeiten der RNA-Analyse im Bereich der Forensik bis vor wenigen Jahren völlig außer Acht gelassen. Die

mRNA (von engl. messenger ribonuclein acid), auch als Boten-RNA bezeichnet, stellt in jeder Zelle das Bindeglied zwischen der DNA im Zellkern, die in allen Zellen eines Individuums ident ist, und den spezifischen Proteinen, die in der Zelle abhängig von der jeweiligen Zugehörigkeit zu einem bestimmten Gewebe produziert werden, dar. Jeder Zelltyp, der zum Beispiel ein Sekret produziert oder ein Gewebe bildet, hat ein einzigartiges Expressionsmuster, das durch das Vorhandensein und die relative Häufigkeit bestimmter mRNAs definiert ist.

Das RNA-Expressionsmuster ist daher zellspezifisch und eignet sich dafür, eine Aussage über die Herkunft des Spurenmaterials zu treffen.

So ist zum Beispiel die mRNA für den Blutfarbstoff β -Hämoglobin in großen Mengen nur in Blutzellen zu finden, die mRNA für das Enzym Kallikrein 3 nur in Samenflüssigkeit. Kallikrein 3 kann daher als „molekularer Marker“ für Samenflüssigkeit dienen.

Unter Wissenschaftlern bestand und besteht zum Teil immer noch die weitverbreitete Meinung, dass RNA ein extrem instabiles Molekül darstellt und daher am Tatort zu rasch degradieren würde, als dass eine sinnvolle Auswertung des Materials möglich wäre. Erst Ende der 1990er Jahre wurden die ersten wissenschaftlichen Arbeiten über die Gewinnung von mRNA aus Spurenmaterial publiziert. Zuvor wurde mRNA in forensischem Zusammenhang lediglich zur Bestimmung von Leichenliegezeiten gewonnen. Die Stabilität von mRNA in Blut konnte jedoch bereits 2003 für einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren wissenschaftlich belegt werden. Weitere, neuere Arbeiten, die die Stabilität verschiedener mRNAs in

unterschiedlichen Geweben belegen, werden laufend veröffentlicht.

5. VORTEILE DES RNA-PROFILINGS

Obwohl dieses neue Anwendungsgebiet der forensischen Molekularbiologie sehr viel versprechend ist, haben bis heute nur wenige Arbeitsgruppen das komplexe Thema des RNA-Profilings aufgegriffen. Diese bemühen sich hauptsächlich um die Entwicklung einer routinemäßig einsetzbaren Methode, die dann in naher Zukunft zum Standard der forensischen Untersuchungsmethoden gehören wird.

Die Herausforderung bei der Entwicklung der neuen Methode besteht darin, jene Genprodukte, zum Beispiel Enzyme, zu identifizieren, die spezifisch in einem bestimmten Körpersekret oder Gewebstyp vorkommen und daher auch die entsprechende(n) mRNAs aufweisen. Die mRNA(s) dieser Genprodukte muss (müssen) isoliert, gereinigt, nachgewiesen und quantifiziert werden. Dadurch kann eine genaue Zuordnung des Ausgangsmaterials zu bestimmten Organen erfolgen. Mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Körperflüssigkeiten bzw. Gewebstypen müssen in ausgedehnten Validierungsstudien untersucht und nach Möglichkeit ausgeschlossen werden. Gleichzeitig müssen die Nachweismethoden derart konzipiert werden, dass analoges menschliches und tierisches Zellmaterial unterschieden werden kann. Erst dies gewährleistet die Artspezifität, die bei den herkömmlichen Vortests nur selten gegeben ist.

Ein weiterer Vorteil der Methode ist ihre hohe Sensitivität. Wie das DNA-Profilings basiert auch das RNA-Profilings auf der Methode der PCR (engl. polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion), wobei die entsprechenden RNA-Abschnitte millionenfach vermehrt werden und dadurch auch bei Vorliegen von nur eini-

gen wenigen intakten Zellen eine zuverlässige Aussage möglich wird. Noch vor einigen Jahren wurde bei Spurenvoruntersuchungen häufig soviel Material verbraucht, dass danach nicht mehr ausreichend DNA für eine Identifizierung des Täters zur Verfügung stand. Da in jeder Zelle DNA und auch die spezifischen mRNAs vorliegen, können sowohl DNA als auch RNA gleichzeitig aus ein und derselben Probe isoliert und ausgewertet werden. Die Aussagen, die auf Grund dieser neuen Methode der Voruntersuchung möglich sind, fallen daher wesentlich genauer und vielfältiger aus.

6. STAND DER TECHNIK DES RNA-PROFILINGS

Derzeit ist der Nachweis von Blut über die mRNA der Gene β -Spectrin (SPTB), Porphobilinogendeaminase (PBGD), β -Hämoglobin (HBB) bzw. Erythroid-spezifische δ -Aminolevulinate-Synthase (ALAS2) und der Nachweis von Menstruationsblut über die mRNA der Gene Matrix-Metalloproteinasen 7, 10 und 11 (MMP7, MMP10 und MMP11) möglich. Samenflüssigkeit kann mittels der Marker für Protamin 1 und 2 (PRM1, PRM2) bzw. Kallikrein 3 (KLK3) bestimmt werden. Spezifisch in Speichel auftretende mRNAs sind jene der Gene für Statherin (STATH) und Histatin 3 (HTN3). Der Nachweis für das Vorliegen von Vaginalsekret wurde über die Bestimmung von mRNA für die Proteine β -Defensin 1 (HBD) und Mucin 4 (MUC4) geführt.¹

Zur Verbesserung der Technik des RNA-Nachweises werden derzeit von verschiedenen Forschungsgruppen unterschiedliche Methoden ausgetestet.² Die moderne Real-Time-PCR ist sicherlich sehr gut für einen empfindlichen Nachweis von auch geringen Mengen an Ausgangsmaterial geeignet. Dies ist vor allem im Bereich der Forensik ein wesentlicher Vorteil. Eine

Körperflüssigkeit	mRNA-Marker	Referenz
Blut	β -Spectrin (SPTB)	Juusola et al. 2005, Juusola et al. 2007, Haas et al. 2009
Blut	Porphobilinogendeaminase (PBGD)	Juusola et al. 2005, Haas et al. 2009
Blut	β -Hämoglobin (HBB)	Nussbaumer et al. 2006, Haas et al. 2009
Blut	Erythroid-spezifische δ -Aminolevulinate-Synthase (ALAS)	Juusola et al. 2007
Menstruationsblut	Matrix-Metalloproteinasen 7 (MMP7)	Bauer et al. 2002, Juusola et al. 2005, Juusola et al. 2007, Haas et al. 2009
Menstruationsblut	Matrix-Metalloproteinasen 10 (MMP10)	Juusola et al. 2007
Menstruationsblut	Matrix-Metalloproteinasen 11 (MMP11)	Ferri et al. 2004, Haas et al. 2009
Sperma	Protamin 1 (PRM1)	Bauer et al. 2003, Juusola et al. 2005, Juusola et al. 2007, Haas et al. 2009
Sperma	Protamin 2 (PRM2)	Bauer et al. 2003, Juusola et al. 2005, Juusola et al. 2007, Haas et al. 2009
Sperma	Kallikrein 3 (KLK3)	Nussbaumer et al. 2006
Speichel	Statherin (STATH)	Juusola et al. 2003, Juusola et al. 2005, Juusola et al. 2007, Haas et al. 2009
Speichel	Histatin 3 (HTN3)	Juusola et al. 2003, Juusola et al. 2005, Juusola et al. 2007, Haas et al. 2009
Vaginalsekret	β -Defensin 1 (HBD)	Juusola et al. 2005, Nussbaumer et al. 2006, Haas et al. 2009
Vaginalsekret	Mucin 4 (MUC4)	Juusola et al. 2005, Nussbaumer et al. 2006, Haas et al. 2009

Überblick der bis dato getesteten Marker-mRNAs für verschiedene Körperflüssigkeiten

weit verbreitete Nachweismethode, die technisch weniger aufwändig, aber auch weniger sensitiv und weniger aussagekräftig ist, stellt den Nachweis mittels der Endpunkt-PCR dar.

In jedem Falle muss erst, egal welche RNA-Nachweismethode in der Folge angewendet wird, die RNA aus der vorliegenden Spur gereinigt werden (RNA-Extraktion). Anschließend wird während einer mehrstündigen enzymatischen Reaktion (reverse Transkription) aus der instabilen einzelsträngigen RNA eine doppelsträngige so genannte cDNA (von engl. complementary DNA) hergestellt. Danach können in einer weiteren mehrstündigen enzymatischen Reaktion, der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die spezifischen RNA-Marker auf der vorliegenden cDNA vermehrt werden. Wenn daher z.B. die gesicherte Spur Samenflüssigkeit enthält, kann aus der gereinigten RNA und daraus transkribierten cDNA zwar der Marker für Kallikrein 3 vermehrt werden, die Spur

wird jedoch für die Marker der Sekrete Blut, Speichel oder Vaginalsekret keine spezifischen RNAs und daher auch keine entsprechenden cDNAs enthalten. Solche RNA-Abschnitte können daher aus einer Spermaspur nicht vermehrt und in der Folge auch nicht festgestellt werden.

Der Nachweis der mittels PCR millionenfach vermehrten Abschnitte, die den jeweiligen mRNA-Abschnitten entsprechen, kann nach der beschriebenen Endpunkt-PCR über die bewährte Methode der Gelelektrophorese oder über die sensitivere Kapillarelektrophorese geführt werden.

Viele Gründe sprechen jedoch dafür, anstatt der beschriebenen Endpunkt-PCR die technisch aufwändigere Real-Time-PCR-Methode anzuwenden, wobei die vermehrten Abschnitte der cDNA mittels Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und auch bei sehr geringer Ausgangsmenge detektiert werden können. Da in diesem Rahmen nicht im Detail auf die Methodik der verschiedenen RNA-Nachweismöglichkeiten eingegangen werden kann, sei der interessierte Leser auf das Literaturverzeichnis verwiesen.

Aus Gründen der Vollständigkeit, aber auch wegen der zu erwartenden künftigen Relevanz, ist noch ein sehr junges Forschungsgebiet – die Genregulation durch microRNAs (miRNA) – zu erwähnen. Diese winzigen RNA-Stränge, die natürlicherweise in der Zelle vorkommen, könnten auch für die Weiterentwicklung des RNA-Profilings in der Forensik von großem Interesse sein, da forensisches Probenmaterial durch Umwelteinflüsse am Tatort oft stark degradiert ist. Sowohl die DNA als auch RNA einer solchen Spur liegen dann nur mehr in Bruchteilen, also kurzen Strangstücken vor. MicroRNAs werden ebenfalls gewebspezifisch exprimiert und bieten sich daher im forensischen Bereich als molekulare Marker für

degradiertes Spurenmaterial an, da sie auf Grund ihrer geringen Länge von umweltbedingten Degradationsprozessen weniger betroffen sind.

Im April dieses Jahres erschien die erste Publikation einer amerikanischen Forschungsgruppe zu diesem richtungsweisenden Thema (Hanson et al. 2009).

Eine Reihe von miRNAs, die in verschiedenen Körperflüssigkeiten unterschiedlich exprimiert sind, konnten bereits identifiziert werden. Die Sensitivität dieser Methode übertrifft sogar die der bisher beschriebenen RNA-Methoden. Bis zur Anwendung dieses miRNA-Profilings für Spurenvoruntersuchungen muss jedoch noch viel Entwicklungs- und Validierungsarbeit geleistet werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Spurenvoruntersuchung mittels RNA-Profilings ist derzeit noch keine Routineanwendung in der Forensik. Obwohl es mittlerweile einige funktionierende Marker für verschiedene Körperflüssigkeiten (Blut, Sperma, Speichel, Vaginalsekret) gibt, müssen viele der entwickelten Systeme noch ausgiebig validiert werden, bevor diese Nachweismethoden in den Routineablauf forensischer Labors aufgenommen werden können. Ohne Zweifel wird sich dieses Fachgebiet in den nächsten Jahren noch stark weiterentwickeln, zumal das RNA-Profilings ein aussagekräftiges und sensitives Werkzeug zur Klärung von kriminalistischen Fragestellungen liefern kann, die gelegentlich in Zusammenhang mit molekularbiologischen Spurengutachten im Strafrechtsprozess auftreten.

¹ Überblick von Körperflüssigkeiten, die für Kriminalbeamte und Vertreter der Justiz bei der Klärung strafrechtlicher Tatbestände von Bedeutung sein könnten.

² Die DNA-Arbeitsgruppe des europäischen Netzwerks forensischer Institute (ENFSI-DNA Working Group) ist derzeit um Validierung und Standardisierung dieser Methoden bemüht.

Quellenangaben

Bauer, M./Patzelt, D. (2002). Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood, *Journal of Forensic Sciences* (47), 1278–1282.

Bauer, M./Patzelt, D. (2003). Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains, *International Journal of Legal Medicine* (117), 175–179.

Bauer, M. (2007). RNA in forensic science, *Forensic Science International: Genetics* (1), 69–74.

Ferri, G./Bini, C. et al. (2004). Successful identification of two years old menstrual bloodstain by using MMP-11 shorter amplicons, *Journal of Forensic Science* (49), 1387.

Haas, C./Klessner, B. et al. (2009). mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR, *Forensic Science International: Genetics* (3), 80–88.

Hanson, E. K./Lubenow, H./Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs, *Analytical Biochemistry* (387), 303–314.

Juusola, J./Ballantyne, J. (2003). Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification, *Forensic Science International* (135), 85–96.

Juusola, J./Ballantyne, J. (2005). Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluid, *Forensic Science International* (152), 1–12.

Juusola, J./Ballantyne, J. (2007). mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR, *Journal of Forensic Science* (52), 1252–1262.

Nussbaumer, C./Gharehbaghi, E./Korschineck, I. (2006). Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR, *Forensic Science International* (157), 181–186.