

## Gerichtsmedizin

# Anwendungen der PCR in der forensischen DNA-Analyse

ESTHER REUSS

ZENTRUM DER RECHTSMEDIZIN, JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT  
FRANKFURT

In der forensischen DNA-Analyse ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) die zentrale Methode zur Erstellung von DNA-Profilen. Des Weiteren wird sie zur DNA-Quantifizierung und zur Amplifikation von DNA-Abschnitten für die anschließende Sequenzierung eingesetzt.

The polymerase chain reaction (PCR) is a crucial method in forensic DNA analysis enabling the generation of DNA profiles, DNA quantitation and amplification of DNA followed by nucleotide sequence analysis.

■ Mithilfe der forensischen DNA-Analyse soll durch den Vergleich von DNA-Profilen in der Regel eine Tat-relevante biologische Spur einer Person zugeordnet oder eine unbekannte Leiche identifiziert werden. Mit der Entdeckung individualspezifischer DNA-Muster haben Jeffreys *et al.* 1985 den Grundstein für die Erstellung solcher DNA-Profile in der forensischen Spurenanalytik gelegt<sup>[1]</sup>. Den zweiten großen Meilenstein in der Entwicklung der heute angewandten forensischen DNA-Analyse-Methoden setzte Anfang der 90er-Jahre die Einführung der PCR.

Vor der Entwicklung der PCR benötigten DNA-Analytiker noch relativ große Mengen (1–2 µg) hochmolekularer DNA für aufwändige RFLP (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus)-Analysen. Hierdurch war die Untersuchung auf gut erhaltene Blut- und Sekretpuren (z. B. Speichel) beschränkt. Heute beantworten forensische Wissenschaftler die Frage nach der Zuordnung einer Tatortspur und der Identität einer Leiche fast immer mithilfe der PCR-Technik. Hiermit ist eine Zuordnung von Spurenmaterial häufig auch bei geringen (wenige 100 pg) DNA-Mengen

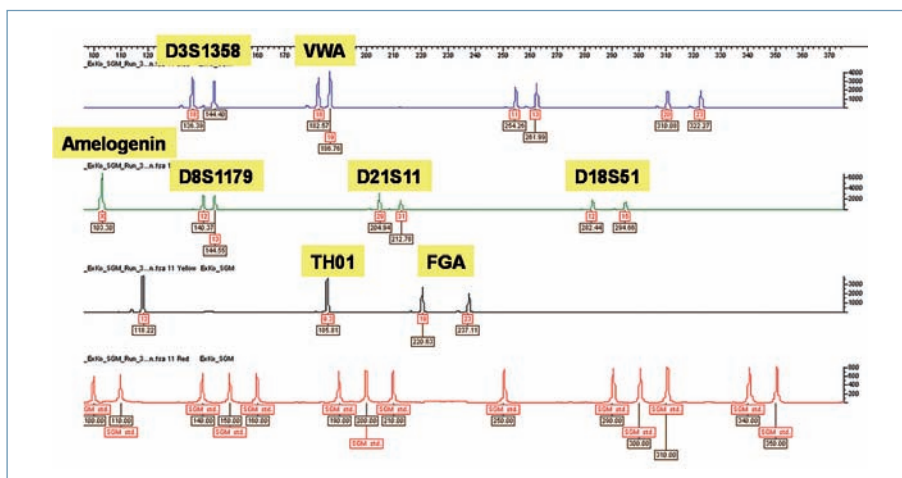
möglich. Des Weiteren gelingt die Identifizierung von Leichen oft noch nach langer Liegezeit, einhergehend mit fortgeschrittener DNA-Degradation. Darüber hinaus wird die PCR-Technik im forensischen Labor zur DNA-Quantifizierung in Spurenextrakten herangezogen. Bei speziellen Fragestellungen wird die Generierung von PCR-Produkten auch für die anschließende Sequenzierung eingesetzt.

### PCR und Elektrophorese zur Erstellung eines DNA-Profiles

Die Kriminalpolizei stellt täglich an Tatorten Spurenmaterial sicher und sendet es an die Untersuchungsstellen, in der Regel Rechtsmedizinische Institute und Landeskriminalämter. Dort soll das den Asservaten möglicherweise anhaftende biologische Material, beispielsweise Blut an einer Messerklinge oder Hautpartikel an einem Einbruchswerkzeug, DNA-analytisch untersucht werden, um bestenfalls ein DNA-Profil (DNA-Identifizierungsmuster) für einen Personenabgleich zu erstellen.

Genetische Grundlage des DNA-Profiles stellt das Vorliegen zahlreicher tandemartig angeordneter Wiederholungseinheiten von 4 bp langen DNA-Motiven, so genannten *Short Tandem Repeats* (STR) oder Mikrosatelliten, in nicht codierenden Bereichen des Genoms dar. Personen unterscheiden sich in der Anzahl der Wiederholungseinheiten, denn in der Bevölkerung existieren zahlreiche Varianten dieser STR-Polymorphismen. Die Allel-Benennung erfolgt numerisch nach der Anzahl der Wiederholungseinheiten, die Allelhäufigkeiten sind bekannt. Um eine gute Diskriminierungskraft zu erreichen, werden in Deutschland acht autosomale STR-Polymorphismen (STR-Systeme) auf verschiedenen Chromosomen untersucht sowie ein geschlechtsunterscheidendes Merkmal. Eine rein zufällige Übereinstimmung von DNA-Profilen ist unter einer Milliarde unverwandten Personen nicht zu erwarten.

Mithilfe kommerziell erhältlicher Kits können mehrere STR-Systeme in einer Multiplex-PCR gleichzeitig amplifiziert werden, was nur geringfügige Mengen Template-DNA erfordert und somit wiederum der effizienten Spuren-



▲ **Abb. 1:** Elektropherogramm einer Multiplex-PCR mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Die benannten STR-Systeme (D3S1358, VWA, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01 und FGA/Fibra) sind Bestandteil der DNA-Analyse-Datei. Amelogenin bezeichnet den geschlechtsdiskriminierenden Marker, das DNA-Profil stammt von einer weiblichen Person. Jeder Peak eines STR-Systems ist mit Fragmentlänge [bp] des PCR-Produkts (braun) und der Allelbenennung (rot) beschriftet. Der Längenstandard wurde im roten Kanal detektiert.

analyse entgegenkommt. Die PCR-Fragmente sind durch Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte PCR-Primer markiert und bei der elektrophoretischen Auftrennung mittels eines automatischen Sequenziergeräts über einen Laser detektierbar (**Abb. 1**).

In Deutschland wurde 1998 beim Bundeskriminalamt eine zentrale Datenbank (DNA-Analyse-Datei/DAD) eingerichtet, welche die Speicherung von eindeutigen Spuren-DNA- und Personen-DNA-Profilen ermöglicht (**Abb. 2**). Treffer verschiedener Datensätze (Spur-Spur oder Spur-Person) liefern wertvolle Ermittlungshinweise. Vor Gericht muss dann die Tatrelevanz und der direkte Tatzusammenhang einer Spur aufgezeigt werden. Allerdings ist ein alleiniger „DNA-Beweis“ unter juristischen Aspekten für eine Verurteilung nicht ausreichend.

Auch auf den Geschlechtschromosomen sind STR-Polymorphismen lokalisiert, die größtenteils gekoppelt vererbt werden und so genannte X- bzw. Y-chromosomale Haplotypen bilden. Da Y-chromosomale Haplotypen ausschließlich paternal vererbt werden, können sie zur Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen in männlicher Linie herangezogen werden. Zudem haben die Y-chromosomalen STR-Marker große Bedeutung bei der Analyse von Mischspuren erlangt, denn bei Vorliegen einer Mischung aus weiblicher und männlicher DNA kann der männliche Mischungsanteil mit der Analyse der Y-chromosomalen STR-Systeme separat erfasst werden<sup>[2]</sup>. Um eine Vorstellung von der Häufigkeit eines Y-chromosomalen Haplotyps zu bekommen, wurde vom Institut für Rechtsmedizin der Humboldt Universität Berlin-Charité eine Datenbank etabliert ([www.yhrd.org](http://www.yhrd.org)).

Wie jedes Verfahren hat auch die forensische DNA-Analyse Grenzen. Diese sind bei der autosomalen STR-Typisierung erreicht, wenn in einer Mischspur der geringfügige Anteil weniger als zehn Prozent beträgt und somit nicht mehr detektiert werden kann, oder wenn eine Mischspur von mehr als drei Personen vorliegt. Im letztgenannten Fall enthält das resultierende DNA-Mischprofil fast immer die häufigsten in der Bevölkerung vorkommenden Allele und lässt keinen beweiskräftigen Personenabgleich zu, da die Chance einer rein zufälligen Merkmalsübereinstimmung einfach zu hoch ist. Eine weitere Grenze des Verfahrens ist erreicht, wenn die DNA durch Mikroorganismen

bereits stark degradiert wurde (z. B. bei Gewebe eines verwesten Leichnams oder feucht-warmem Milieu ausgesetzten Spurenmaterial) und daher keine ausreichend langen DNA-Abschnitte (mindestens 100–200 bp) als PCR-Template vorhanden sind. Des Weiteren ist trotz hoher Sensitivität der forensischen Standard-PCR eine Mindestmenge von etwa 100 pg DNA als PCR-Template notwendig, was der DNA aus ca. 15 diploiden Zellen entspricht<sup>[3]</sup>.

### Real Time-PCR zur Quantifizierung der DNA in Spuren-Extrakten

Bevor an einem DNA-Extrakt aus Zellanhaftungen am Spurenmaterial die Typisierungs-PCR zur Erstellung des DNA-Profiles erfolgt, führen DNA-Analytiker häufig eine DNA-Quantifizierung mithilfe der Real Time-PCR durch. Hierbei wird die Entstehung von PCR-Produkt in Echtzeit beobachtet. Die Zahl der PCR-Zyklen bis zum ersten Auftreten von messbarem PCR-Produkt hängt von der Ausgangskonzentration des DNA-Templates ab; je mehr davon vorhanden ist, desto früher werden PCR-Produkte detektiert. Durch den Vergleich des PCR-Verlaufs von Proben unbekannter DNA-Konzentration mit dem einer Verdünnungsreihe bekannter DNA-Konzentrationen erfolgt die DNA-Quantifizierung. Als Folge kann eine optimale DNA-Menge in die Multiplex-PCR zur DNA-Typisierung eingesetzt werden. Einige Labors nutzen die Quantifizierungs-PCR als Vortest für die DNA-Typisierung, denn diese ist erst ab einer bestimmten Mindestmenge an DNA Erfolg versprechend<sup>[4]</sup>.

Wenn bei der DNA-Analyse im Rahmen von Sexualdelikten ein Gemisch aus Spermien und Vaginalzellen vorliegt (**Abb. 3**), kann eine differenzierte Quantifizierung von männlicher und weiblicher DNA erfolgen, um die weitere DNA-Typisierung optimal gestalten zu können.

Forscher studieren mittels Real Time-PCR außerdem die Genexpression in verschiedenen Geweben, um z. B. über den zeitlichen Verlauf der Expression von Entzündungsmediatoren im Gewebe von Wundrändern eine Korrelation zum Zeitpunkt der Entstehung einer Verletzung zu finden<sup>[5]</sup>.

### PCR mit anschließender Sequenzierung

Bei der Beantwortung forensischer Fragestellungen kommt auch die Sequenzierung verschiedener DNA-Bereiche nach deren

**A DNA - Identifizierungsmuster:**

SE 33		D21 S11		VWA		TH 01		FIBRA	
Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
16	20	29	31	18	19	9.3	9.3	19	23

D3 S1358		D8 S1179		D18 S51		Amelogenin			
Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
18	20	12	13	12	15	X	X		

**B**

712.000 Datensätze:  
 • 570.000 Personen  
 • 142.000 Spuren

◀ **Abb. 2:** A, Allel-Tabelle für das DNA-Profil/Identifizierungsmuster aus **Abbildung 1** zur Einstellung in die DNA-Analyse-Datei. In der ersten Zeile sind die Bezeichnungen der STR-Systeme sowie des geschlechtsspezifischen Systems aufgeführt. In der zweiten Zeile sind jeweils die beiden detektierten Allele angegeben. B, Datenbestand der DAD im Juni 2008.

cell-PCR zur DNA-Typisierung gelingen. Die STR-Typisierung in der *low volume*-PCR, die in Reagenzientropfen auf Objektträgern durchgeführt werden kann, ermöglicht bereits die weitere Reduktion des DNA-Templates und dadurch das Generieren eines DNA-Profiles aus nur wenigen Zellen<sup>[9]</sup>. Gleichzeitig etablieren Wissenschaftler PCR-Systeme mit immer kürzeren Amplikonlängen, um die erfolgreiche DNA-Typisierung stark degradierter DNA zu erzielen<sup>[10]</sup>.

**Literatur**

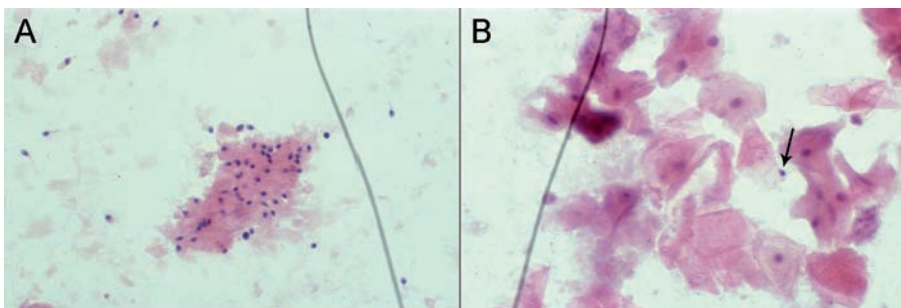
- [1] Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. (1985): Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316: 76–79.
- [2] Jobling, M. A., Pandya, A., Tyler-Smith, C. (1997): The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.* 110: 118–124.
- [3] Wiegand, P., Rolf, B. (2003): Analyse biologischer Spuren-Teil II: DNA-Typisierung. *Rechtsmedizin* 13: 375–383.
- [4] Reuss, E., Kaufenstein, S., Zehner, Bratzke, H., Schneider, H. (2008): Sicherung und Auswertung von latenten DNA-Spuren im Bereich der Eigentumskriminalität. *Rechtsmedizin* 18: 251–256.
- [5] Bai, R., Wan, L., Shi, M. (2008): The time-dependent expressions of IL-1 beta, COX-2, MCP-1 mRNA in skin wounds of rabbits. *Forensic Sci. Int.* 175: 193–197.
- [6] Parson, W., Dür, A. (2007): EMPPOP-A forensic mtDNA database. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 1: 88–92.
- [7] Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M. (2000): Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.* 114: 23–28.
- [8] Kiehne, N., Kaufenstein, S. (2007): Mutations in the SCN5A gene: Evidence for a link between long QT syndrome and sudden death? *Forensic Sci. Int.: Genet.* 1: 170–174.
- [9] Schmidt, U., Lutz-Bonengel, S., Weisser, H. J., Sängler, T., Pollak, S., Schön, U., Zacher, T., Mann, W. (2006): Low-volume amplification on chemically structured chips using the PowerPlex16 DNA amplification kit. *Int. J. Legal Med.* 120: 42–48.
- [10] Hill, C. R., Kline, M. C., Coble, M. D., Butler, J. M. (2008): Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.* 53: 73–80.

**Korrespondenzadresse:**

Dr. Esther Reuss  
 Zentrum der Rechtsmedizin  
 Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
 Frankfurt  
 Kennedyallee 104  
 D-60596 Frankfurt  
 Tel.: 069-6301-7564  
 Fax: 069-6301-84017  
 e.reuss@em.uni-frankfurt.de

**AUTORIN****Esther Reuss**

Jahrgang 1971. Biologie-Studium an den Universitäten Marburg und Freiburg. 2002 Promotion an der Universität Mainz. Seit 2002 stellvertretende Leiterin des DNA-Labors am Zentrum der Rechtsmedizin der Universität Frankfurt.



▲ **Abb. 3:** Ausschnitte aus zwei Objektträgerpräparaten nach HE(Hämalaun/Eosin)-Färbung in unterschiedlicher Vergrößerung. A, Zusätzlich zu den rosa gefärbten Epithelzellen sind zahlreiche Spermien an der spezifischen bipolaren blau-violetten Färbung erkennbar. Teilweise sind Spermiegeißeln vorhanden. B, Gemisch aus zahlreichen Epithelzellen und einem einzigen Spermium (mit Pfeil markiert).

gezielter Amplifikation zum Einsatz. Beim Vorliegen stark degradierter nukleärer DNA, wenn die Standard-STR-Analyse selten erfolgreich ist, bietet oftmals die mitochondriale DNA (mtDNA) aufgrund ihrer hohen Kopienzahl pro Zelle und ihrer Stabilität gegenüber Degradation eine gute Untersuchungsmöglichkeit. Hierbei werden Sequenzpolymorphismen im hypervariablen d-Loop-Bereich der mtDNA analysiert. Auskunft über die Häufigkeit eines mitochondrialen Haplotyps gibt die EMPPOP-Datenbank (*European DNA Profiling Group* (EDNAP) *mtDNA Population Database*) des Rechtsmedizinischen Instituts Innsbruck ([www.empop.org](http://www.empop.org))<sup>[6]</sup>. Bei der Interpretation der mitochondrialen Befunde muss der rein maternale Vererbungsgang der mtDNA berücksichtigt werden.

Die Sequenz des mitochondrialen Gens für Cytochrom b gibt Aufschluss über den Herkunftsorganismus einer DNA-Spur<sup>[7]</sup>. Sie wird ermittelt, wenn beispielsweise nicht zu identifizierendes Gewebe aufgefunden wurde und im Anschluss an die Frage „Tier oder Mensch?“ die Frage „wenn Tier, welcher Spezies gehört es an?“ zur Lösung ansteht.

Forscher setzen die PCR und nachfolgenden Sequenzierung auch bei weiteren speziellen forensischen Fragestellungen ein. Dazu zählt unter dem Begriff „Molekulare Autopsie“ die Sequenzierung kardial exprimierter Gene zum Auffinden funktioneller Mutationen, durch welche ein plötzlicher Herztod zu erklären sein kann<sup>[8]</sup>. Dies ist in Fällen, bei denen die Obduktion unter Einbezug der mikroskopischen Organuntersuchung keine Todesursache ergeben hat, indiziert.

In Zusammenarbeit mit forensischen Entomologen arbeiten DNA-Analytiker mithilfe von PCR-Amplifikation und Sequenzierung insektenspezifischer Gene an der Art- und Altersbestimmung von Maden zur Eingrenzung der Leichenliegezeit.

**Weiterentwicklung der PCR mit Trend zur Miniaturisierung**

Die Weiterentwicklung der PCR-Technik bewirkt derzeit in der forensischen DNA-Analyse einen Trend zur Miniaturisierung. Nach gezielter Laserdissektion einzelner Zellen bzw. Zellpopulationen aus mikroskopischen Präparaten soll in naher Zukunft die *single*