Der genetische Fingerabdruck

Lehrerinformation

Eva D. Nunes

Kurzfassung
Der genetische Fingerabdruck bietet sich als ein mögliches Thema für den Oberstufenunterricht an. Da das Thema inhaltlich ohne vorherige Kenntnisse anspruchsvoll und praktisch schwierig umzusetzen ist, soll mit diesem Beitrag versucht werden, zunächst einen Einblick in die relevanten fachlichen Inhalte zu geben. In einem weiteren Beitrag wird dann näher auf die Unterrichtsumsetzung eingegangen werden.

Keywords
Genetischer Fingerabdruck, Genetik

1 Einleitung

Jedes Individuum besitzt bestimmte Merkmale, die durch eine entsprechende Information auf der DNA festgelegt sind, und die nach bestimmten Regeln an die Nachkommen vererbt werden. Manche Ausprägungen eines Merkmals unterscheiden sich zwischen den Individuen einer Art, die entsprechenden Merkmale sind polymorph. Betrachtungen dieser besonderen Merkmale können genutzt werden, um Individuen voneinander zu unterscheiden.

Der Vergleich von Merkmalen lässt sich auf verschiedenen Ebenen durchführen. Die Untersuchungen können sich z.B. auf die Ebene komplexer Merkmale beziehen; dann werden beispielsweise Blutgruppen untersucht, also ein komplexer Polymorphismus auf der Basis von Merkmalen auf Zelloberflächen. Enzym- und

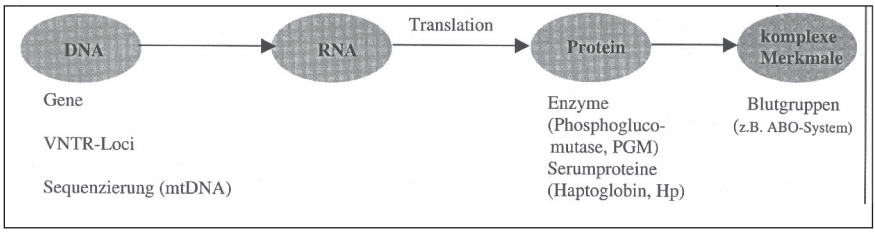

Abb. 1: Mögliche Auswertungen von Merkmalen auf verschiedenen Ebenen. Angelehnt an SCHLEENBECKER & SCHMITTER, 1994

Serumprotein-Analysen sind Beispiele für Erforschungen auf der Ebene einzelner Proteine (Abb. 1).

Heute werden besonders solche Merkmale untersucht, die direkt an der menschlichen Erbsubstanz, der DNA, erfasst werden können.

In den 70er Jahren entdeckte man hypervariable Merkmalsysteme, VNTR-Polymorphismen (s. unten), die direkt auf der Ebene der DNA nachweisbar sind. Sie werden oft herangezogen, um Blut- oder Sekretproben und Personen einander zuzuordnen (SCHLEENBECKER & SCHMITTER, 1994), z.B. um Spuren am Tatort einem Tatverdächtigen zuzuordnen. Der genetische Fingerabdruck zeigt solche individuellen genetischen Daten einer Person bzw. einer Spurenprobe. Er spiegelt also bestimmte DNA-Merkmale des zugrunde gelegten Materials wider.

2 Vergleich

2.1 Der (echte) Fingerabdruck

Auf der Haut befinden sich so genannte Papillarlinien. Dieses sind Erhebungen der Hautleisten, die in besonderer Weise an den Fingerkuppen Muster ausbilden. Diese Muster können bogenförmig, wirbelartig oder wie eine Schlinge geformt sein. Der Haut haftet im Schweiß neben Wasser immer auch anorganische Salze wie Natriumchlorid, Aminosäuren, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, organische Säuren und Fette an, so dass beim Berühren von Gegenständen die bekannten Fingerabdrücke entstehen (LIPSCHER et al., 1998).

Abb. 2: Der Fingerabdruck. Die angegebenen Begriffe sind wichtige Hilfen zur Musterbestimmung

Interessant und geläufig wurde der Fingerabdruck, als Anfang des 20. Jahrhunderts der erste Verbrecher anhand seiner Fingerabdrücke überführt werden konnte. Bis heute werden sie seitdem benutzt, um Spurenverursacher zu finden und Tatverdächtige zu überführen. Den Erfolg verdankt die Methode der Tatsache, dass jeder Finger einen einmaligen Abdruck hinterlässt. Es gibt nicht zwei Finger auf der ganzen Welt, die identische Papillarlinien haben. Die Muster bilden sich erst während der Embryonalentwicklung in Zufallsprozessen aus, so dass selbst eineiige Zwillinge unterschiedliche Fingerabdrücke besitzen (DREIFERT, 1999).

2.2 Der genetische Fingerabdruck

Beim „genetischen Fingerabdruck“ werden bestimmte DNA-Bereiche eines Individuums aus untersuchten Zellen in Form eines Strichmusters dargestellt.

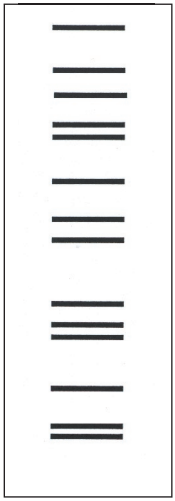

Abb. 3: Schematische Darstellung des genetischen Fingerabdrucks; Banden von DNA-Fragmenten verschiedener Größe (Methodik s.u.).

Der Entdecker dieses Verfahrens, der englische Molekulargenetiker Jeffrey, wurde durch das für jede Person charakteristische Strichmuster an die echten Fingerabdrücke erinnert und bezeichnete Mitte der achtziger Jahre seine Methode in Anlehnung und Abgrenzung dazu als genetischen Fingerabdruck (Benecke, 1999, 48).

Greber & Greber beschreiben das Phänomen wie folgt: „In Analogie zum individuellen Hautleistenmuster der Fingerbeeren spricht man von genetischem Fingerabdruck (genetic fingerprint), wenn es gelingt, aus Spurenmaterial (z.B. Blut-,Speichel- oder Spermaresten) individuelle genetische Daten der zugehörigen Person zu bestimmen.“ (1995, 38) Statt von genetischem Fingerabdruck kann man auch allgemeiner von DNA-Typisierung oder DNA-Profil-Analyse sprechen.

2.3 Einsatz des genetischen Fingerabdrucks

Im Gegensatz zum echten Fingerabdruck, der hauptsächlich bei kriminalistischen Fragestellungen relevant ist, kann der genetische Fingerabdruck weitreichender eingesetzt werden. Hier einige Beispiele:

- Einsatz bei Vaterschafts- und Verwandtschaftsermittlungen,
- Biologen erhalten durch die DNA-Analyse Aufschluss über die Herkunft bzw. Verwandtschaft zwischen Tier- und Pflanzenarten,
- Anthropologen können durch den Vergleich des Erbguts verschiedener Völker bestimmte Abstammungslinien klären,
- Kunsthistoriker können durch die Untersuchung von organischem Klebstoff, der jeweils nur in bestimmten Ateliers verwendet wurde, die Entstehung bzw. Bearbeitung eines Kunstwerkes einem bestimmten Atelier zuordnen,
- in der Landwirtschaft kann z.B. geklärt werden, woher bestimmte Zuchttiere oder aus welchem Saatgut bestimmte Pflanzen stammen, d.h. allgemeiner: die Herkunft und die Bestandteile von Lebensmitteln können ermittelt werden,
- Anwendung in der menschliche Genomforschung und klinischen Medizin (Kartierung des Genoms, Tumorbiologie, Transplantationsmedizin, Mikrobiologie) (Krawczak & Schmidtke, 1994),
- zu den kriminalistischen Fällen zählt die Verbrechensaufklärung im Zusammenhang mit Mord, Vergewaltigung, Identifizierung unbekannter Toter, sexuellem Missbrauch u.ä. Auch beispielsweise Fälle aus dem Sport werden hier zugeordnet: eine zur Dopinganalyse

abgegebene Urinprobe kann eindeutig einem Sportler zugeordnet werden (BENECKE, 1999, 44).

3 Allgemeines

3.1 Struktur des Genoms

Fast jede Zelle eines höheren Lebewesens besitzt eine komplette genetische Ausstattung, die vollständige DNA. Dabei besteht beim Menschen das DNA-Gesamtmolekül zu etwa 3% aus informationstragenden (=codierenden) Bereichen. 97% der DNA besteht somit aus nichtcodierenden Stücken.

Ein Gen als Teilstück der Erbinformation wirkt auf die Ausbildung eines bestimmten Merkmals. Nicht alle Gene – besonders die höherer Lebewesen – tragen ihre biologische Information an einem Stück. Nur die zu exprimierenden Domänen, die Exons, sind informationstragende DNA. Sie werden u.U. von sog. Introns, oft viel längeren informationslosen „Einschüben", unterbrochen. Exons und Introns zählen zu den Genen und genähnlichen Sequenzen. Die restliche DNA, etwa 70–80 % des Gesamtmoleküls, wird als extragene DNA beschrieben (Abb. 4).

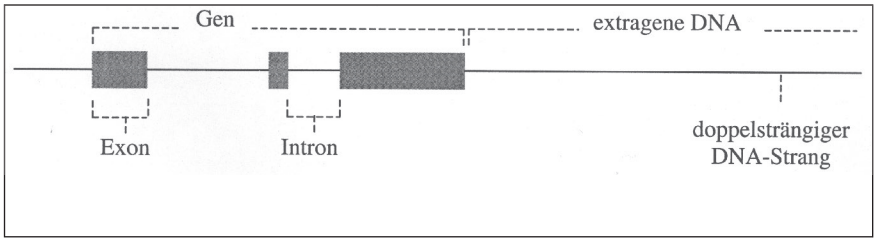

Abb. 4: Vereinfachte Struktur des Genoms.

Die Gene unterliegen evolutionären Selektionsmechanismen, so dass nur Mutationen, die sich neutral oder positiv für den Organismus auswirken, durch Fortpflanzung des Individuums ihren Anteil in der Population vergrößern. Nichtcodierende Stücke unterliegen diesem Selektionszwang nicht. Hier können nahezu alle Mutationen vererbt werden, da sie für das Individuum ohne negative Folgen bleiben. Folglich sind Unterschiede in der Sequenzfolge – sog. Polymorphismen – der nichtcodierenden DNA-Stücke zwischen verschiedenen Individuen deutlich höher als in den Genbereichen (KRAWCZAK & SCHMIDTKE, 1994, 48). Dieses macht man sich bei der Erstellung des genetischen Fingerabdrucks zunutze.

Generell ist zu fordern, dass der genetische Fingerabdruck durch die Untersuchung von DNA-Bereichen dargestellt wird, welche

- bei verschiedenen Personen in unterschiedlichen Ausprägungen auftreten, also polymorph sind.

- nicht durch physiologische Zustände oder z.B. das Alter des Individuums beeinflusst werden.
- unverändert beispielsweise bei Austrocknung oder Zerstörung der Zellen, in denen sie vorhanden sind, überdauern.
- in allen Geweben des Individuums gleich voehanden sind, so dass z.B. Blut- und Spermaspuren miteinander vergleichbar werden (vgl. Schleenbecker & Schmitter, 1994, 58).

Die nachfolgend beschriebenen VNTR-Loci erfüllen diese Anforderungen; sie zeigen besonders eine ausgeprägte Variantenvielfalt (Polymorphismus).

3.2 VNTR-Loci

Die menschliche extragene DNA besteht u.a. aus Bereichen, die bestimmte, sich gehäuft wiederholende Nukleotidsequenzen besitzen. Diese Bereiche sich mehrmals direkt wiederholender kurzer Basensequenzen nennt man VNTR-Loci (Variable Number of Tandem Repeats oder unterschiedliche Anzahl hintereinander hängender Wiederholungen). Die Anzahl der Sequenzhäufungen ist polymorph ausgebildet, d.h. von Person zu Person stark variierend. Bei manchen tritt eine bestimmte Sequenz, z.B. GATC, 10-mal hintereinander auf, bei deren 5-mal. Die Längen entsprechender Sequenzen sind also oft unterschiedlich und können deshalb zum DNA-Vergleich herangezogen werden.

Jede Person trägt von einem autosomalen VNTR-Locus zwei homologe „Allele“, (Teifel-Greding, 2000), die sich in ihrer Länge unterscheiden können: Bei einer Heterozygotie von VNTR-Loci sind die beiden Allele unterschiedlich lang, bei Homozygotie ist die Länge identisch. In Abbildung 5 zeigt Person A eine Heterozygotie, Person B eine Homozygotie. Die Längen eines VNTRs eines Individuums können mit Hilfe der Elektrophorese deutlich gemacht und mit der eines anderen Individuums verglichen werden.

Vor und hinter den Wiederholungssequenzen liegen bestimmte Basenfolgen. Diese können als Erkennungssequenzen zum Beispiel für Restriktionsenzyme dienen, so dass die VNTRs herausgeschnitten werden können. Dieses Vorgehen erfolgt bei der RFLP (Restriktions-Fragment-Längen- Polymorphismus)-Analyse, s. u. 4.3.

Die Erkennungssequenzen bieten beispielsweise auch Anlagerungsstellen für sog. Primer, die bei einer anderen Methode zur Erstellung des genetischen Fingerabdrucks, der PCR (Polymerase Chain Reaction, s. u. 4.4), Einsatz findet. Es sei hier bereits darauf hingewiesen, dass das RFLP-Verfahren in der aktuellen Vaterschaftsdiagnostik und Kriminalistik nur noch kaum Anwendung findet.

Damit die VNTRs zur Vergleichbarkeit der Länge nach sortiert und sichtbar gemacht werden können, müssen eine Reihe an Schritten erfolgen, die unter Kapitel 4 beschrieben werden.

Die Längen der Allele eines VNTR-Locus einer Person können zufällig mit denen einer anderen Person übereinstimmen. Deshalb stützt man sich bei einem Vergleich nicht nur auf einen sich wiederholenden Sequenzbereich, sondern auf bis zu sieben (HOMBERT, 2003, 16).

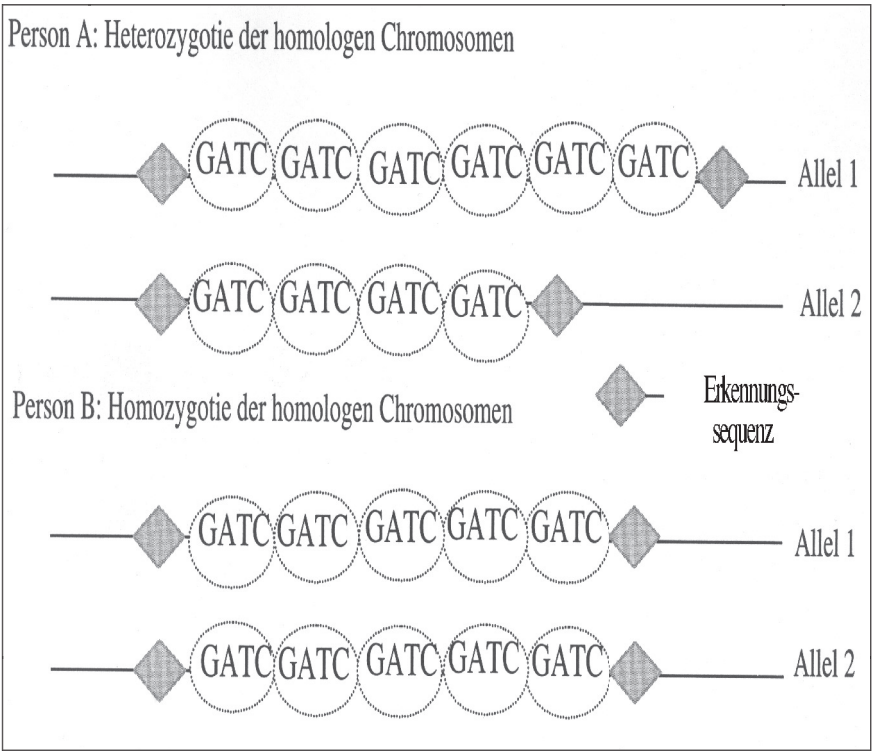

Abb. 5: Beispiel: VNTR-Loci zweier Personen, jedes Allel nur einzelsträngig dargestellt (s. auch 4.2, Abb. 7).

Beim genetischen Fingerabdruck sind oft die hier vorgestellten, polymorphen VNTR-Loci – nichtcodierende extragene DNA-Abschnitte – interessant, mit denen keine Aussage in Bezug auf andere phänotypische Merkmale außer dem phänotypischen Merkmal ‚Länge der DNA-Sequenz gemacht werden kann. Laut Müller gibt es aber auch Ansätze, die beispielsweise HLA-Gene (Human-Leucocyte-Antigen-Gene) auf dem 6. Chromosom untersuchen, welche für die Ausbildung von Glykoproteinen auf humanen Zelloberflächen codieren (2001, 109). Bei der kritischen Diskussion des Einsatzes vom genetischen Fingerabdruck könnte demnach nicht behauptet werden, es komme immer nur nichtcodierendes DNA-Material zum Einsatz.

4 Methoden

4.1 Isolierung und Bearbeitung von DNA

Um die gewünschten DNA-Bereiche vergleichen zu können, muss zunächst die DNA isoliert werden. Die benötigte DNA kann aus allen Körperzellen von Mensch, Tier oder Pflanze gewonnen werden, vorausgesetzt, in ihnen sind vollständige Zellkerne enthalten (Ausnahme: Untersuchung der mtDNA, s. 4.5.1). Bei lebenden Tieren und Menschen können einfach Blut, Speichel oder Haare (mit Wurzel) entnommen werden. Bei Spurenuntersuchungen reichen oft schon winzige Blutspritzer, Spermareste, Federn, Pollen oder Hautfetzen aus, um genügend DNA zu isolieren. Für die Isolierung und Aufbereitung der DNA geben Schleenbeck und Schmitter (1994) folgende Vorgehensweise an:

1. Extraktion der DNA aus dem Zellmaterial: (Blut, Speichel, Haare, Sperma etc.): Schutz des DNA-Extrakts vor DNA-zersetzenden Enzymen (kühlen auf -18ºC). Das gefrorene Material wird zerkleinert und in eine Lösung (meist SDS: SodiumDodecylSulfat) gebracht, welche Zellmembranen auflöst, so dass DNA aus Zellkernen freigesetzt werden kann.

2. Reinigung und Anreicherung der DNA: Der wässrige Extrakt wird mit organischen Lösungsmitteln (Chloroform und Phenol) vermischt. Die Verunreinigungen und Proteine verbleiben, da sie hydrophob sind, in der organischen Phase, die hydrophile DNA in der wässrigen. Nach Zentrifugation kann die DNA-haltige Lösung abpipettiert werden.

Durch Ethanol und Natriumacetat lässt sich die DNA aus der wässrigen Phase ausfällen und kann durch verschiedene Verfahren weiter gereinigt werden.

3. Restriktion der DNA: Die DNA liegt noch als hochmolekularer Doppelstrang vor, der durch Einwirkung von Restriktionsenzymen an definierten Stellen in viele kleinere Fragmente zerlegt wird.

Restriktionsenzyme wie z.B. Eco R1, Hind III oder Bam HI schneiden die DNA an spezifischen Erkennungsstellen. Diese Stellen sind meist 4–8 Nukleotide lang. Der Abstand zwischen den Erkennungsstellen im Genom ist mehr oder weniger zufällig (Krawczak & Schmidtke, 1994).

4.2 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine Methode, bei der Moleküle (z.B. Proteine, DNA, RNA) durch ein elektrisches Feld getrennt werden. Im Fall der Gelelektrophorese findet die Auftrennung im Inneren eines „Gels“ statt, das aus vernetzter Agarose, Polyacrylamid oder einem Gemisch aus beiden besteht. Die Moleküle mit negativer Oberflächenladung werden in taschenartige Vertiefungen eines Gels gegeben und wandern bei eingeschalteter Spannung zum positiv geladenen Ende der

Elektrophoresekammer, zur Anode (Abb. 6). Die DNA ist wegen ihres Phosphatrückgrates ebenso wie Proteine negativ geladen.

Abb. 6: Aufbau einer Gelelektrophoresekammer. Das Gel liegt innerhalb der Elektrophoresekammer noch in einer weiteren Plastikkammer, dem Gelschlitten (hier in der Abb. nicht eingezeichnet).

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen wird von ihrer Form, Ladung und Größe bestimmt. Die Form ist bei DNA-Molekülen weitgehend gleich. Die Ladung hängt mit der DNA-Fragmentgröße zusammen. Wichtiger noch für die Geschwindigkeit ist aber die Molekülgröße. Kleinere Moleküle können durch die netzartigen Poren des Gels schneller hindurchtreten als größere. In einer bestimmten Zeit wandern also kleine Moleküle schneller durch das Gel in Richtung Anode als große. Moleküle gleicher Größe wandern natürlich gleich schnell; bei Beendigung des Gellaufs finden sie sich auf einer Höhe und bilden eine sog. Bande (Brown, 1993, 20).

Zur Bestimmung der Molekülgrößen in den Banden wird im Gel ein sog. Marker als Längenstandard mitlaufen gelassen. Die Molekülgrößen der DNA-Fragmente des Markers sind bekannt. Die Größenordnungen der Banden für DNA-Fragmente liegen ungefähr im Bereich von 20 bp (bp= Basenpaare) bis 15 kb (kb= Kilobase =Tausend Basenpaare). Den Gesamtablauf einer Elektrophorese zeigt Abb. 7.

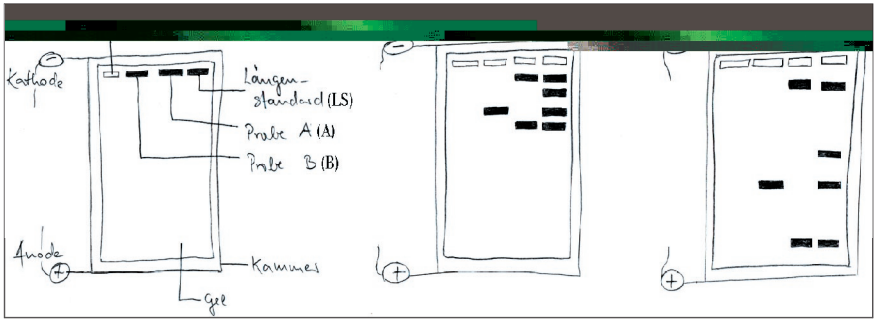

Abb. 7: Schematischer Ablauf einer Gelelektrophorese. Probe A: Heterozygotes VNTR, Probe B: Homozygotes VNTR. Links die Elektrophorese kurz nach Befüllung der Taschen, in der Mitte ist die Wanderung der Fragmente nach etwa der Hälfte der Laufzeit veranschaulicht, rechts das Endergebnis der Elektrophorese. Die Dauer richtet sich nach der angewandten Netzspannung.

Das Elektrophoresegel befindet sich in der Elektrophoresekammer überschichtet

suchte VNTR-Loci.

Um eine solche selektive Vervielfältigung zu erreichen, müssen die Sequenzen an den Enden des gewünschten DNA-Abschnittes bekannt sein. So kann man dann zwei kurze Oligonukleotide, sog. Primer, einsetzen, welche als etwa 20 bp lange DNA-Stücke die komplementäre Nukleotidsequenz der DNA-Matrize aufweisen. Die Primer können sich nämlich an die beiden Stränge der DNA anlagern und den Abschnitt begrenzen, der amplifiziert werden soll.

Je nach Verfahren können die eingesetzten Primer auch mit Fluoreszenzfarbstoffen in Blau, Grün oder Gelb versetzt sein. Da die Primer Teil der amplifizierten (amplifizieren = vervielfältigen einer kurzen bestimmten Basensequenz mittels PCR) DNA-Abschnitte sind, kann über die Intensität der Fluoreszenz bestimmt werden, wie viele Stränge gebildet wurden. Alternativ und kostengünstiger kann

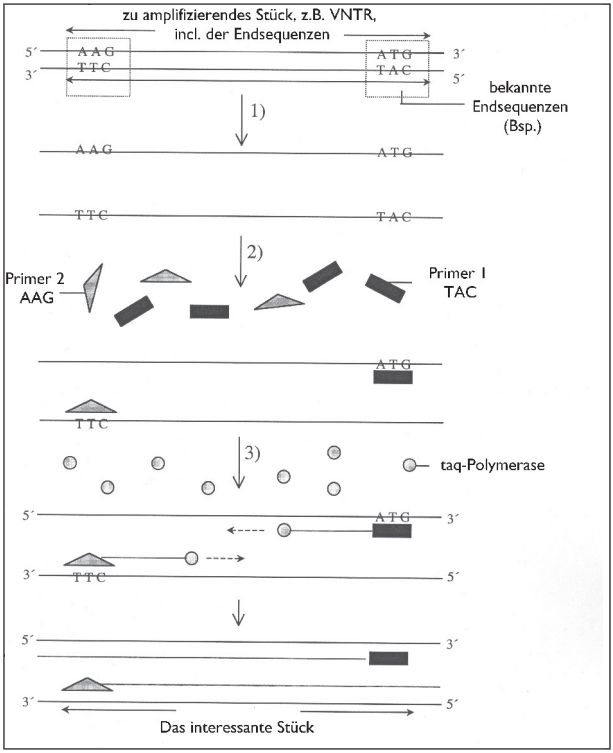

Abb. 10: Schematischer Ablauf des ersten Zyklus einer PCR. (Die Sequenzen der Primer sind in Relation zu den amplifizierten Abschnitten länger, als hier grafisch vereinfacht dargestellt, sonst wäre die Wahrscheinlichkeit der Amplifikation uninteressanter Sequenzen zu groß. Die grafische Vereinfachung sollte hier gezeigt werden)

auch eine Färbung mit Ethidiumbromid erfolgen (s.u.). Ablauf (s. dazu Abb. 10)

1) Zunächst wird die DNA denaturiert, d.h. durch eine Hitzebehandlung von etwa 90°C einsträngig gemacht.
2) Die beiden im Überschuss zugesetzten Primer paaren sich bei Abkühlung auf 50°C mit den entsprechenden DNA-Bereichen (Hybridisierung). Die Primer begrenzen, wie erwähnt, den zu amplifizierenden Sequenzbereich.
3) Bei etwa 70°C kommt eine spezielle Polymerase, die taq-Polymerase (vom Bakterium *Thermus aquaticus*), zum Einsatz: Sie erkennt die Primer als ihren Startpunkt und beginnt beim „Wandern" über die einsträngige DNA, in 5´-3´-Richtung einen komplementären Strang zu synthetisieren. Dafür braucht sie alle Nukleotidtriphosphate, die dementsprechend der Lösung vorher zugesetzt werden müssen (in der Abb. aber nicht berücksichtigt sind).

Dieser neu synthetisierte Strang kann nun wieder als Matrize für den jeweils komplementären Strang dienen. Da mit jedem Durchgang die Anzahl der vorhandenen DNA-Moleküle verdoppelt wird, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der ausgewählten Ausgangssequenz. Dass hauptsächlich genau dieser Bereich und nicht bzw. nur sehr wenig zu lange DNA-Stränge entstehen, zeigen Greber & Greber, 1995.

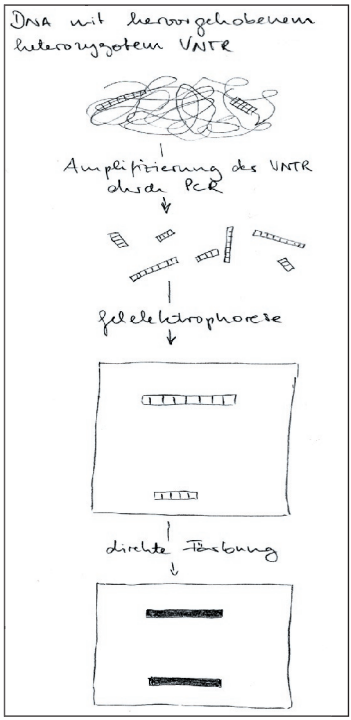

Abb. 11: DNA-Typisierung mit Hilfe der PCR, betrachtet nur ein heterozygoter VNTR. Vergleiche das Schema auch mit Abb. 8 (RFLP).

Die PCR dauert pro Zyklus etwa drei Minuten. Es werden meist 30 Zyklen gewählt. Da die eingesetzte taq-Polymerase hitzestabil ist, muss für einen neuen Zyklus nicht wiederholt Polymerase zugesetzt werden, sondern die Zyklen können sich ununterbrochen einander anschließen. Die Temperaturregelung läuft dabei automatisch in einem sog. Thermocycler ab.

Im Ansatz befinden sich nach der Replikation dann im Wesentlichen die amplifizierten Bereiche (pro Person 2 Allele je VNTR bei Heterozygotie). Das Ganze wird über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und direkt gefärbt. Eine typische Färbung erfolgt mit dem giftigen Ethidiumbromid. Es wird zum Elektrophoresegel hinzugegeben und heftet sich an die wandernden DNA-Fragmente, indem es sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren schiebt. Folglich werden alle entstehenden Banden an

[3] Zusatz: Die durch die PCR entstandenen DNA-Stücke lassen sich auch mit Restriktionsenzymen spalten, sofern die amplifizierten Teile polymorphe Schnittstellen für das Enzym aufweisen. So können hier ebenfalls RFLPs ohne ein aufwändiges Southern-Blotting dargestellt werden.

gefärbt und unter UV-Licht rot fluoreszierend sichtbar[3]. Eine Charakterisierung der Banden kann mit dieser Färbung nur über deutlich unterschiedliche Laufweiten erfolgen. Werden dagegen verschiedene Primer mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt, können Banden auch anhand der verschiedenen Fluoreszenzfarben unterschieden werden, auch wenn die Banden dicht beieinander liegen.

Neben dieser klassischen PCR-Methode, die hier am Beispiel für den Vergleich von VNTR-Loci vorgestellt wurde, gibt es noch weitere PCR-Verfahren. Um nicht den Rahmen des Beitrags zu sprengen, sei nur kurz erwähnt, dass auch mehrere Merkmalsysteme gleichzeitig, Gene oder Teil- bzw. unbekannte Sequenzen amplifiziert werden können. Näheres dazu findet sich in Müller (2001).

Inzwischen wird die PCR-Methode fast immer eingesetzt, da sie – wie unter 4.3 schon erwähnt – schneller, präziser und mit sehr geringen DNA-Mengen durchgeführt werden kann. Theoretisch reicht für die PCR der DNA-Gehalt eines einzigen Zellkerns. In der Praxis werden meist 50-100 Zellkerne benötigt (Teifel-Greding, 2000).

4.5 Andere Verfahren

Über mehrere Generationen können bei der Vererbung aber zu untersuchende Allele „herausgemendelt“ werden, weil nicht alle Allele der Autosomen an die Zygote weitergegeben werden müssen. Daher bedient man sich in manchen Fällen Allelen, die nicht typisch nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden: Merkmale auf Y-Chromosomen oder mitochondrial codierte Merkmale. Diese Allele werden zwingend in der väterlichen bzw. mütterlichen Linie weitergegeben.

4.5.1 mtDNA

Neben der Zellkern-DNA existiert in einer Zelle auch ein ringförmiges DNA-Moleküle in jedem Mitochondrium, die sog. mtDNA. Sie ist nur etwa 16 000 bp groß und unterscheidet sich von der Kern-DNA u.a. in den folgenden Punkten (s. Anslinger & Rolf, 2003):

- sie ist gegenüber DNA-abbauenden Umwelteinflüssen widerstandsfähiger, also praktisch „länger haltbar“
  → Einsatz zur Untersuchung von altem Spurenmaterial
- sie liegt in der Zelle aufgrund der hohen Mitochondrienanzahl in wesentlich höherer Kopienzahl vor, d.h. es gibt pro Zelle mehr Ausgangsmaterial
  → Einsatz bei nur geringstem Spurenmaterial (z.B. einem Haarschaft)
- die mtDNA wird nur maternal vererbt, also von der Mutter auf Ihre Kinder[4].

[4] Mitochondrien des Vaters werden zwar wie der Spermienkern im Zuge der Befruchtung in die Eizelle aufgenommen, dann aber abgebaut (Müller & Hassel, 1999, 206).

→ Ist kein DNA-Material der Vergleichsperson selbst vorhanden, kann zum Vergleich auf Proben von Personen der gleichen mütterlichen Linie zurückgegriffen werden.

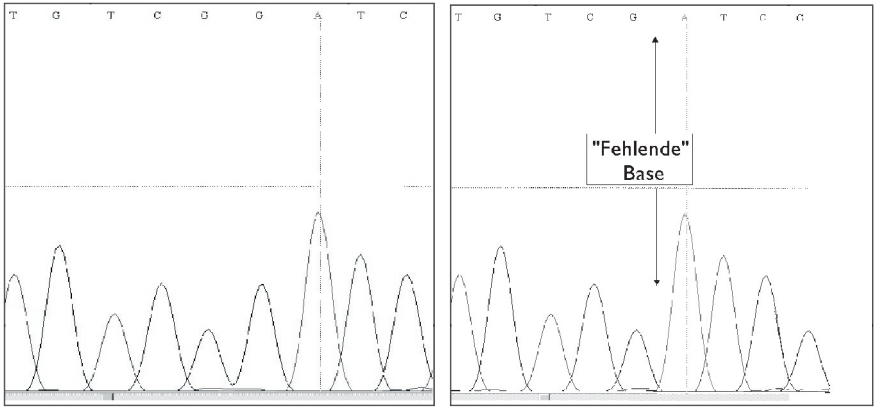

Abb. 12: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis zweier unterschiedlicher mtDNA-Proben

Im Unterschied zur Untersuchung von Kern-DNA werden bei der mtDNA zwei bestimmte, ca. 400bp große Bereiche vollständig sequenziert. Individuen verschiedener mütterlicher Linien lassen sich in der Basenfolge dieser zwei Regionen unterscheiden.

Abb. 12 zeigt einen Ausschnitt des Sequenzierungsergebnisses von zwei unterschiedlichen mtDNA-Proben. Die einzelnen Basen der Proben erscheinen im Computerausdruck als farbig markierte Wellenlinien. Die Farben sind in der Abbildung nicht zu sehen, aber die Zuordnung von Wellenlinie und Base wird am oberen Bildrand angegeben.

Zeigen die vergleichenden Proben identische Basenfolgen, kann daraus geschlossen werden, dass eine Verwandtschaft in mütterlicher Linie besteht. Möglich ist aber auch, dass die beiden Proben von ein und derselben Person stammen. „Bei mehr als zwei Unterschieden kann die Verwandtschaft über die mütterliche Linie bzw. die entsprechende Person als Spurenleger ausgeschlossen werden“ (Anslinger & Rolf, 2003, 1), wobei bei einem Unterschied das mögliche Auftreten einer Mutation berücksichtigt werden muss.

Mit Hilfe der Prüfung von mtDNA ist eine Verwandtschaftsanalyse im Fall Kaspar Hauser durchgeführt worden. Die Untersuchung eines Blutflecks auf seiner Wäsche schien eine Verwandtschaft mit der Linie der Stéphanie von Beauharnais, Frau des Großherzogs von Baden, zu widerlegen (Zehner, 2000, 7). Jüngere Untersuchungen des Instituts für Rechtsmedizin der WWU Münster unter Leitung

von Prof. Dr. Dr. B. Brinkmann an einem Haar aus derselben Wäsche lassen die Frage der Verwandtschaft Hausers mit dem Fürstenhaus wieder ungeklärt erscheinen (Dr. H. Pfeiffer, 2004, persönl. Mitteilung).

4.5.2 Y-Chromosom

Werden Allele des y-Chromosoms betrachtet, können DNA-Proben von Männern miteinander verglichen werden, deren Verwandtschaft vermutet wird. Die Y-chromosomalen Merkmale, die untersucht werden, sind wie die autosomalen Loci VNTR-Domänen, also extragene DNA-Bereiche mit bestimmten Wiederholungssequenzen.

4.6 Zusammenfassung der Methodik

Der genetische Fingerabdruck entsteht wie folgt:

- Zunächst wird DNA-Material zusammengetragen, entweder als Spurengewinnung an einem Tatort oder durch Speichel-/ Gewebeabnahme o.ä.
- Die DNA wird gereinigt und
- durch Restriktionsenzyme geschnitten.
- (Evtl. erfolgt nun eine Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte durch PCR.)
- Die DNA wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Es entstehen Banden.
- Eine Markierung der gesuchten Banden erfolgt entweder direkt (typischer „PCR-Fall“) oder indirekt durch ein Southern-Blot (typischer „RFLP-Fall“).
- Der genetische Fingerabdruck kann nun mit anderen verglichen werden.

Untersuchungen mit mtDNA werden dagegen durch eine Sequenzierung bestimmter DNA-Bereiche miteinander vergleichbar gemacht.

5 Aussagekraft

5.1 Mögliche Fehlerquellen

Unbedingte Voraussetzung für die DNA-Analyse ist die einwandfreie hygienische Bearbeitung des Materials im Labor. Gelangt nämlich z.B. nur eine Zelle des Wissenschaftlers in die zu untersuchende Probe, kann das zu verfälschten Ergebnissen und folglich zu falschen Urteilen führen. Grundsätzlich müssen entstandene Verunreinigungen der DNA durch Bakterien, organisches Material o.ä. vollständig beseitigt werden.

Wichtig zu wissen ist, dass eine zerstörte DNA für eingesetzte Sonden unter Umständen nicht die üblichen Bindungsstellen aufweist und so beispielsweise statt zwei nur eine Bande im Gel sichtbar wird.

Immer ist von zentraler Wichtigkeit zu entscheiden, ob auftretende Banden verschiedener Personen im Gel gleich weit gewandert sind oder nicht. Schneider vom Institut für Rechtsmedizin der Universität Mainz gibt generell zu bedenken, dass „aufgrund der beschränkten Trennschärfe der DNA-Elektrophorese-Systeme Entscheidungskriterien erarbeitet werden müssen, die zur Unterscheidung von sehr eng beieinander liegenden Fragmenten hinsichtlich Ein- oder Ausschluss verwendet werden können. Hierzu ist eine objektive DNA-Fragmentlängenbestimmung mittels EDV-gestützter Analyse unter Anwendung empirisch erarbeiteter laborspezifischer Mess- und Fenstergrößen erforderlich. Nur eine standardisierte und reproduzierbare Auswertung ermöglich eine Vergleichbarkeit von DNA-Fragmentlängentypisierungen." (Schneider, ohne Jahr)

5.2 Wahrscheinlichkeiten

Wie bereits unter Punkt 3.2 erwähnt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass auftretende Bande(n) eines VNTRs einer Person mit vielen anderen Personen – zufällig – übereinstimmen, recht groß. Deshalb werden immer mehrere Loci untersucht, mindestens so viele, dass als Ausschlusskriterium mehr Unterschiede nachweisbar als durch Mutation allein erklärbar sind.

Sind die auftretenden Banden bei Betrachtung mehrere Loci aber gleich, stellt sich für die Wissenschaftler die Frage, ob es sich um eine zufällige Übereinstimmung handelt oder ob die Gleichheit an einem identischen Spurenabdruck bzw. bei einer Teilübereinstimmung an einem vererbten Spurenabdruck (bei Stammbaumanalysen) liegt. Bei letzterem ist ein Vergleich beispielsweise zwischen Vater und Kind recht einfach zu untersuchen: das Kind müsste bei der Hälfte der Merkmale mit dem Vater übereinstimmen. Im Gegensatz zur forensischen Spurenkunde sind hier evtl. Mutationen zu berücksichtigen, die in der Regel bei der Keimzellbildung aufgetreten sein könnten (Schneider, ohne Jahr).

Zur Klärung, ob eine Merkmalsübereinstimmung statistisch eher zufällig ist oder nicht, werden biomathematische Berechnungen durchgeführt. Zur Berechnung muss man wissen, wie viele Menschen in der Vergleichsregion ein gleiches DNA-Profil, bezogen auf das eine Merkmal, aufweisen (Benecke, 1999, 68–74). Für jedes untersuchte Merkmal, für jedes Allel, wird eine bestimmte Bevölkerungszahl untersucht und dadurch die Häufigkeit bestimmt, mit der das Merkmal in dieser Bevölkerung auftritt. Da Häufigkeitsverteilungen der betrachteten Allelsequenzen stochastisch unabhängig sind, kann man die Häufigkeiten einzelner Allele miteinander multiplizieren.

Beispiel: Eine Person hat auf einem Chromosom einen bestimmten VNTR-Locus von 15 Wiederholungen. 1. Frage: Wie viele Personen in der Vergleichsregion haben das auch? Nun betrachtet man die Wiederholungsanzahl des VNTR-Locus auf dem homologen Chromosom. Sie sei bei der untersuchten Person 16. 2. Frage: Wie viele Personen in der Bevölkerung haben das auch? Zur Bestimmung

der Wahrscheinlichkeit der Kombination 15/16 werden die aufgetretenen Einzelhäufigkeiten multipliziert. Dies geschieht auch mit allen weiteren Merkmalen. Treten in einer Population pro VNTR-Locus mehrere Allele auf, muss dies in dies Berechnung zur Wahrscheinlichkeitsbestimmung mit einbezogen werden. D.h. die Gesamtzahl der auftretenden Allele an einem VNTR-Locus wird genutzt, um die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen der beiden Allele in einer Person zu bestimmen. Insgesamt werden alle auftretenden Einzelwhrscheinlichkeiten miteinander zu Gesamtwahrscheinlichkeit multipliziert (genaueres s. KRAWCZAK & SCHMIDTKE, 1994, Kapitel 4).

In der Fachliteratur wird bei der Betrachtung von 4–5 Genloci eine Wahrscheinlichkeit von 4x10-11 dafür genannt, dass zwei nicht verwandte Personen das gleiche Bandenmuster haben; bei Verwandten liege sie immer noch unter 4x10-5 (RÖSSEL, 2000).

Treten bei einem Bandenvergleich mehr als zwei Unterschiede auf, also mehr Unterschiede als durch Mutationen allein erklärbar, wird hundertprozentig ausgeschlossen, dass sie von ein und derselben Person stammen bzw. Elter/Kind sind. Dagegen wird einer Bandengleichheit nie eine 100%ige Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung gegeben werden können (Vaterschaftsnachweise werden meist mit 99,99% – Vaterschaft praktisch erwiesen – angegeben), da theoretisch, wenn auch oft eher nur rechnerisch, eine zufällige Übereinstimmung vorliegen könnte.

5.3 Rechtliches

Laut Beschluss des Bundesverfassungsgerichts 2000 (§2 DNA-IFG i.V. m. §81 gStPO) ist die Feststellung, Speicherung und Verwendung des DNA-Identifizierungsmusters erlaubt, sofern nur nichtcodierende Teile der DNA erfasst werden und das Genmaterial zerstört wird, die Untersuchung richterlich angeordnet und streng zweckgebunden ist (HOMBERT, 2003, 36).
Zur schnelleren Vergleichbarkeit von schweren Delikten gibt es beim Bundeskriminalamt so genannte Individualdatenbanken, die genetische Fingerabdrücke von Straftätern speichern. Der genetische Fingerabdruck ist bei der Verbrechensaufklärung nicht als ausschließliches Beweismittel anzusehen, sondern kann immer nur im Zusammenhang mit anderen Indizien zu einer Verurteilung führen (KRAWCZAK & SCHMIDTKE, 1994, 89 und HOMBERT, 2003, 19).

Literatur

ANONYMUS (ohne Jahr): Genetischer Fingerabdruck: Die DNA–Fingerprint–Technik. Im Internet unter: http://www.biochemie.uni-freiburg.de/nat-w/versuch/dna-finger.htm (Stand: 06.04.04)

Anslinger, K., & B. Rolf (2003): Analyse der mitochondrialen DNA (mtDNA) zur Identifizierung von Knochen oder Leichenteilen. Veröffentlichung der Münchner Wissenschaftstage 2003 unter: http://rechts.web.med.uni-muenchen.de/WTAGE_2003_ mtDNA.pdf (Stand: 06.04.04)

Benecke, M (1999): Kriminalbiologie. BLT Verlag, Gladbach

Brown, T.A. (1993): Moderne Genetik. Eine Einführung. Spektrum, Heidelberg.

Dreifert, M.(1999): Handfeste Spuren: Fingerabdrücke. Im Internet unter: http://www.quarks.de/taeter/04.htm (Stand: 06.04.04)

Greber, E. & W. Greber (1995): Anwendung der PCR in Archäologie und Kriminalistik. In: Unterricht Biologie **19** (209), Friedrich, Seelze /Velber, 40–43

Hombert, T. (2003): Der freiwillige genetische Massentest. Verfassungsrechtliche Zulässigkeit und Grenzen unter Darstellung des Falls „Christina Nytsch". Cuvillier, Göttingen

Krawczak, M & J. Schmidtke (1994): DNA- Fingerprinting. Spektrum, Heidelberg

Lipscher, J. et al. (1998): Chemie und Verbrechen. Kriminalistik im gymnasialen Chemieunterricht. In: Chemie in unserer Zeit. **23**, Wiley-Vch, Weinheim, 143–149

Müller, H.-J. (2001): PCR Polymerase-Kettenreaktion. Das Methodenbuch. Spektrum Akademischer Verlag

Müller, W. & Hassel, M. (1999): Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen. Einführendes Lehrbuch der Embryologie, Entwicklungsgenetik und Entwicklungsphysiologie. Springer, Berlin

Rössel, H.(2000): Arbeitsblätter zum genetischen Fingerabdruck. In: Praxis der Naturwissenschaften-Biologie **49** (2), Aulis, Köln, 22–25

Schindler, S. (2002): Warum gibt es 2 verschiedene, voneinander getrennte Geschlechter? Bild unter: http://www.susas.de/geschlechterrollen/pix/x_y_chromsom.jpg

Schleenbecker, U. & H. Schmitter (1994): DNA-Analyse in der forensischen Spurenuntersuchung. In: Chemie in unserer Zeit. **28**, Wiley-Vch, Weinheim, 58–63

Schneider, P. M.(ohne Jahr): Methoden der Minisatelliten-DNA-Analyse. Im Internet unter: http://www.rechts medizin.uni-mainz.de/Remedneu/molgen/dnainfo.htm (Stand 06.04.04)

Teifel-Greding, J. (2000): DNA-Analysen in der Forensik. In: Praxis der Naturwissenschaften-Biologie **49** (2), Aulis, Köln, 1–2

Zehner, R.(2000): Vaterschaftsuntersuchungen in der forensischen Biologie. In: Praxis der Naturwissenschaften-Biologie **49** (2), Aulis, Köln, 3–7

Verfasser: Eva Désirée Nunes, Institut für Didaktik der Biologie, AG Humanbiologie, Fliednerstraße 21, 48149 Münster; werker@uni-muenster.de