

## Forensische Molekularbiologie

# Forensische RNA-Analyse – Möglichkeiten und Perspektiven

CORNELIUS COURTS  
INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN DER UNIKLINIK KÖLN

**RNA analysis is used to contextualize biological traces in forensic investigations by assigning biological trace material and components of mixed stains containing different body fluids to particular tissues. While RNA based forensic body fluid and organ tissue identification is already a mature and robust method that is routinely used in forensic casework, there is still active ongoing research exploring the potential of forensic RNA analysis to investigate even more contextual aspects of forensic relevance.**

DOI: 10.1007/s12268-024-2178-x  
© Der Autor 2024

Die forensische Molekularbiologie ist eine angewandte forensische Wissenschaft und forensisch-molekularbiologische Untersuchungen gehören heute zu den wichtigsten und besonders objektiven Werkzeugen in vielen strafrechtlichen Ermittlungen. Im universitären Bereich ist die forensische Molekularbiologie häufig an Instituten für Rechtsmedizin neben Abteilungen für Mor-

phologie und forensische Toxikologie repräsentiert. Ihre Routinetätigkeiten umfassen typischerweise die Identifikation unbekannter Verstorbener, die genetische Begutachtung von Abstammungs- und Verwandtschaftsverhältnissen und die molekularbiologische Untersuchung und biostatistische Bewertung von biologischen Spuren und Spurenbildern im Zuge kriminalistischer

Ermittlungen zu verschiedensten Straftaten; bei letzterem ist die eindeutige Zuordnung der Spuren, z. B. Blutflecken, sekretverdächtige Anhaftungen, Haare oder Hautepithelzellen, zu einem bestimmten Individuum („Individualisierung“) eine der wichtigsten Aufgaben. Für all diese Tätigkeiten ist die forensische DNA-Analyse die zentrale Untersuchungsform.

### Perspektivwechsel zum Kontext einer Spur

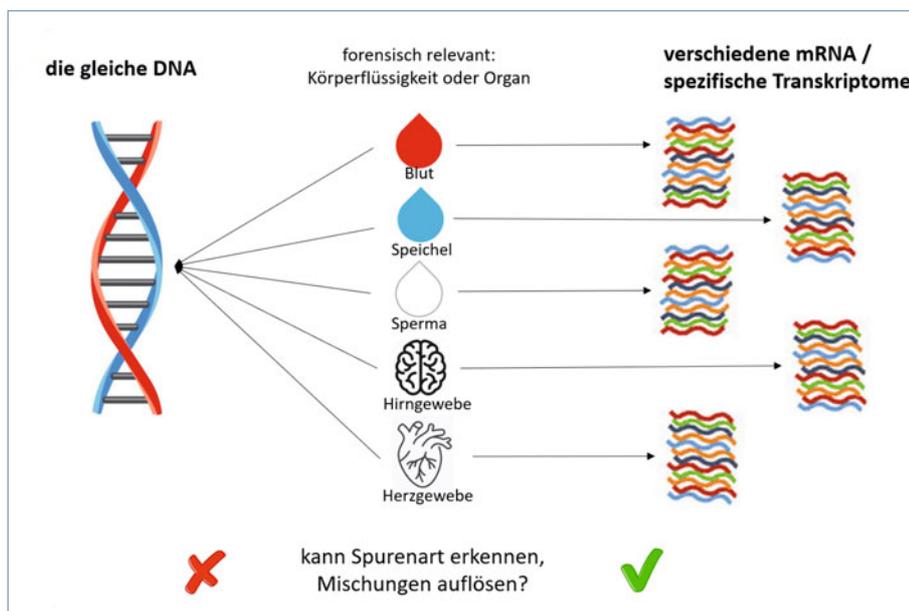
In den letzten Jahren vollzieht sich jedoch ein Perspektivwechsel in der forensischen Molekularbiologie und der Interpretation ihrer Befunde bei Gericht mit einer merklichen Verschiebung des Fokus‘ des Interesses von der Individualisierung zur „Kontextualisierung“ von Spuren und Spurenbildern.

Unter Kontextualisierung versteht man die Einordnung von Spuren in ihren Entstehungskontext; dies ermöglicht Rückschlüsse nur aus dem reinen Spurenmaterial auf bestimmte und ganz verschiedene Aspekte eines Tatgeschehens, das zur Deponierung der Spur(en) bzw. zur Entstehung (eines Teils) des Spurenbilds geführt hat. Die moderne forensische Molekularbiologie wendet hierzu inzwischen mehrere verschiedene kontextualisierende Untersuchungsformen an, darunter auch die forensische RNA-Analyse.

### Ribonukleinsäuren (RNA) und ihre Aufgaben in der Zelle

RNA-Moleküle fungieren als zelluläre Informations- aber auch Funktionsträger von zentraler Bedeutung. Drei besonders wichtige Erscheinungsformen pro- und eukaryotischer RNA sind messenger-RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA) und transfer-RNA (tRNA). Darüber hinaus sind inzwischen mannigfache Varianten vergleichsweise kurzer RNAs, sogenannte „small RNAs“, mit verschiedenen Funktionen bekannt [1].

Die mRNA ist von besonderer Bedeutung, denn sie bildet eine dynamische Zwischenstufe der Genexpression und in Eukaryoten ermöglicht sie als temporärer Träger den



▲ Abb. 1: Forensische DNA- und RNA-Analyse im Vergleich.

Übergang der in der im Zellkern stationären DNA codierten Information für die Herstellung von Genprodukten ins Zytoplasma zu den Ribosomen, den Organellen der Proteinbiosynthese.

In jeder Zelle werden ständig zahlreiche Genorte gleichzeitig transkribiert, um die Genprodukte vorhalten zu können, die für die ihrer Differenzierung entsprechende Funktionalität sowie zur Aufrechterhaltung von Stoffwechsel und Homöostase notwendig sind. Auf die Regulation der Transkription wirken zahlreiche intrinsische und extrinsische Faktoren ein. Dadurch besteht zu jedem Zeitpunkt eine Population von Tausenden mRNAs in jeder Zelle, das sogenannte Transkriptom, das ihr „Genexpressionsmilieu“ und damit ihren aktuellen Bedarf an Genprodukten, der durch Typus und (ggf. pathologisch veränderten) Zustand der Zelle konstituiert wird, recht präzise abbildet.

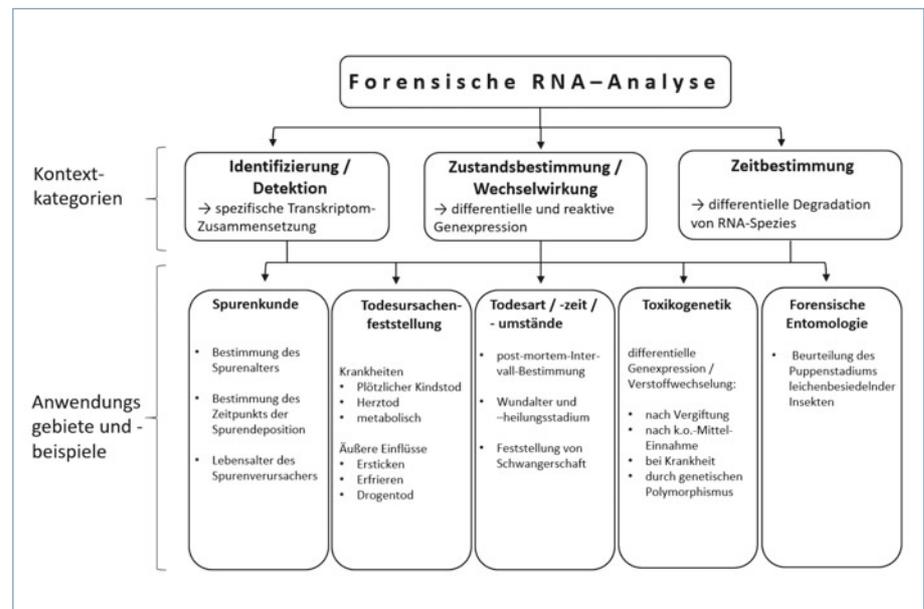
### Forensische RNA-Analyse

Im Transkriptom ist auf diese Weise also sehr vielschichtige komplexe Information enthalten und die forensische RNA-Analyse zielt darauf ab, forensisch relevante Teile dieser Information zu erschließen und im Rahmen der Kontextualisierung von Spuren zu interpretieren [2]. Hierdurch ergänzt sie ideal die DNA-Analyse, da die DNA zwar individualspezifisch, aber auch in allen Geweben und Körperflüssigkeiten identisch ist und sich ihre Menge, Zustand und Zusammensetzung weder durch innere oder äußere Einflüsse noch in anderen forensisch relevanten Kontexten verändern und sie diese mithin nicht abbildet (**Abb. 1**).

RNA hat sich im Übrigen in Studien von postmortalen Geweben aber auch in teils sehr alten biologischen Spuren als deutlich haltbarer und weniger degradationsempfindlich erwiesen als zuvor gemeinhin angenommen [3, 4]. Dennoch ist RNA im Allgemeinen weniger stabil und haltbar als DNA und relativ anfällig für den Abbau durch überall in der Umwelt vorkommende Enzyme, die RNAsen [5], weshalb Degradation nach wie vor eine grundsätzliche Einschränkung der forensischen RNA-Analyse darstellt.

### RNA-basierte Spurenartidentifikation

Die meisten biologischen Spuren in der forensischen Fallarbeit bestehen bzw. stammen aus menschlichen Körperflüssigkeiten. Die am häufigsten als Spuren auftretenden und damit forensisch relevantesten Körperflüssigkeiten sind Speichel, Blut, Sperma,



▲ **Abb. 2:** Zukünftige Einsatzmöglichkeiten der forensischen RNA-Analyse.

Vaginalsekret und Menstruationsblut. Die ersten Ergebnisse von Versuchen zur Identifikation von Körperflüssigkeiten mittels RNA-Expression wurden bereits 2003 vorgelegt [6]. Seitdem wurde die mRNA-basierte Detektion und Identifikation von einer oder mehrerer dieser fünf oder anderer biologischer Spurenarten, z. B. Haut oder verschiedener Organgewebe, intensiv erforscht [7] und in einigen Ländern, darunter auch Deutschland, wird die RNA-basierte Spurenartidentifikation schon regelmäßig in der forensisch-molekularbiologischen Fallarbeit eingesetzt.

Das Prinzip der Methode besteht darin, in biologischem Spurenmaterial spurenartspezifische, d. h. möglichst ausschließlich in den Zellen einer bestimmten Spurenart transkribierte, mRNAs nachzuweisen und somit das Vorhandensein dieser Spurenart festzustellen (**Abb. 1**).

Vorteile dieses Verfahrens gegenüber veralteten, meist (immun-)chemischen Standardtests zur Identifikation bestimmter Spurenarten ist die deutlich höhere Spezifität und die Möglichkeit, auch komplexe Mischungen von Spurenarten erfolgreich zu untersuchen. Für andere Spurenarten, z. B. Vaginalsekret oder Organgewebe, gibt es zudem keine Standardtests. Durch Verwendung eines kombinierten Extraktionsverfahrens kann überdies neben der mRNA parallel auch die DNA extrahiert werden. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, ohne zusätzlichen Probenverbrauch auch bei kleinsten Tatort-

spuren nicht nur die Spurenart zu bestimmen, sondern auch das DNA-Profil des Spurenlegers zu erstellen. Neben der Identifikation von Körperflüssigkeiten und anderen biologischen Spurenarten eignet sich die mRNA-Analyse im Prinzip für Detektion und Unterscheidung aller aufgrund ihrer Transkriptomzusammensetzung verschiedenen Gewebe.

### Fallbeispiele

Um die Einsatzmöglichkeiten der forensischen RNA-Analyse bei strafrechtlichen Ermittlungen zu verdeutlichen, werden im folgenden Anwendungsszenarien aus echten Fällen beschrieben:

1. Fall: Sexuelle Misshandlung: Ein weibliches Opfer gibt an, dass ein Tatverdächtiger sie gegen ihren Willen mit dem Finger vaginal penetriert habe. Das Opfer hatte unmittelbar nach der Tat Hilfe gerufen, der Tatverdächtige wurde festgehalten und von der hinzugerufenen Polizei befragt. Bei dieser Gelegenheit wurden auch Abriebproben seiner Finger gesichert. Die molekularbiologische Analyse der Proben ergab eine Mischung von DNA des Tatverdächtigen und des Opfers (Individualisierung). Der Tatverdächtige gibt an, dass er mit dem Opfer getanzt und es dabei auch intensiv berührt und am Kopf gekrault habe (dafür gibt es auch Zeugen); so erkläre sich die DNA des Opfers auf seinen Fingern. Die parallel durchgeführte RNA-Analyse jedoch weist eindeutig Spuren von Vaginalsekret

an den Fingern des Tatverdächtigen nach. Diese Spuren werden durch das vom Tatverdächtigen beschriebene Szenario nicht erklärt.

2. Fall: Tötungsdelikt: Ein männliches Opfer wurde durch einen Stich mit einer Waffe in die Lunge getötet, dabei hatte es stark geblutet; in der Nähe des Tatorts werden später zwei Stichwaffen sichergestellt, beide befleckt mit Blut. Die DNA-Analyse zeigt, daß das Blut vom Opfer stammt. Später werden zwei Tatverdächtige A und B festgenommen, deren DNA zur DNA auf dem Griff jeweils einer der Waffen passt (Individualisierung). Beide behaupten, es sei bei einem Raubüberfall mit gezogenen Waffen zu einem Gerangel mit dem Opfer gekommen, dass aber der jeweils andere Tatverdächtige den tödlichen Stich geführt habe und das spritzende Blut des Opfers dabei nur passiv auf die eigene Waffe gelangt sei. Die parallel durchgeführte RNA-Analyse weist jedoch an der Klinge mit der DNA von Tatverdächtigem B neben Blut

eindeutig Anhaftungen von Lungengewebe nach, an der anderen Klinge wird nur Blut nachgewiesen. Die Lungenverletzung des Opfers stammt also höchstwahrscheinlich von der Klinge des Tatverdächtigen B.

Aus diesen Beispielen wird ersichtlich, dass sich diese und ähnlich gelagerte Fallkonstellationen durch Ergebnisse der DNA-Analyse allein nicht aufklären lassen und nur eine parallel durchgeführte RNA-Analyse die entscheidenden Hinweise liefern kann, um das Spurenbild zu interpretieren und den Tathergang zu rekonstruieren.

#### Andere RNA-Spezies

Die bereits erwähnte Empfindlichkeit von mRNA gegen Degradation kann bei umweltausgesetzten, stark gealterten oder unsachgemäß gelagerten Proben aus forensischen Szenarien ein erhebliches Problem darstellen. Aus diesem Grund wird seit Längerem auch der Einsatz anderer, kürzerer und damit stabilerer, weil weniger degradations-

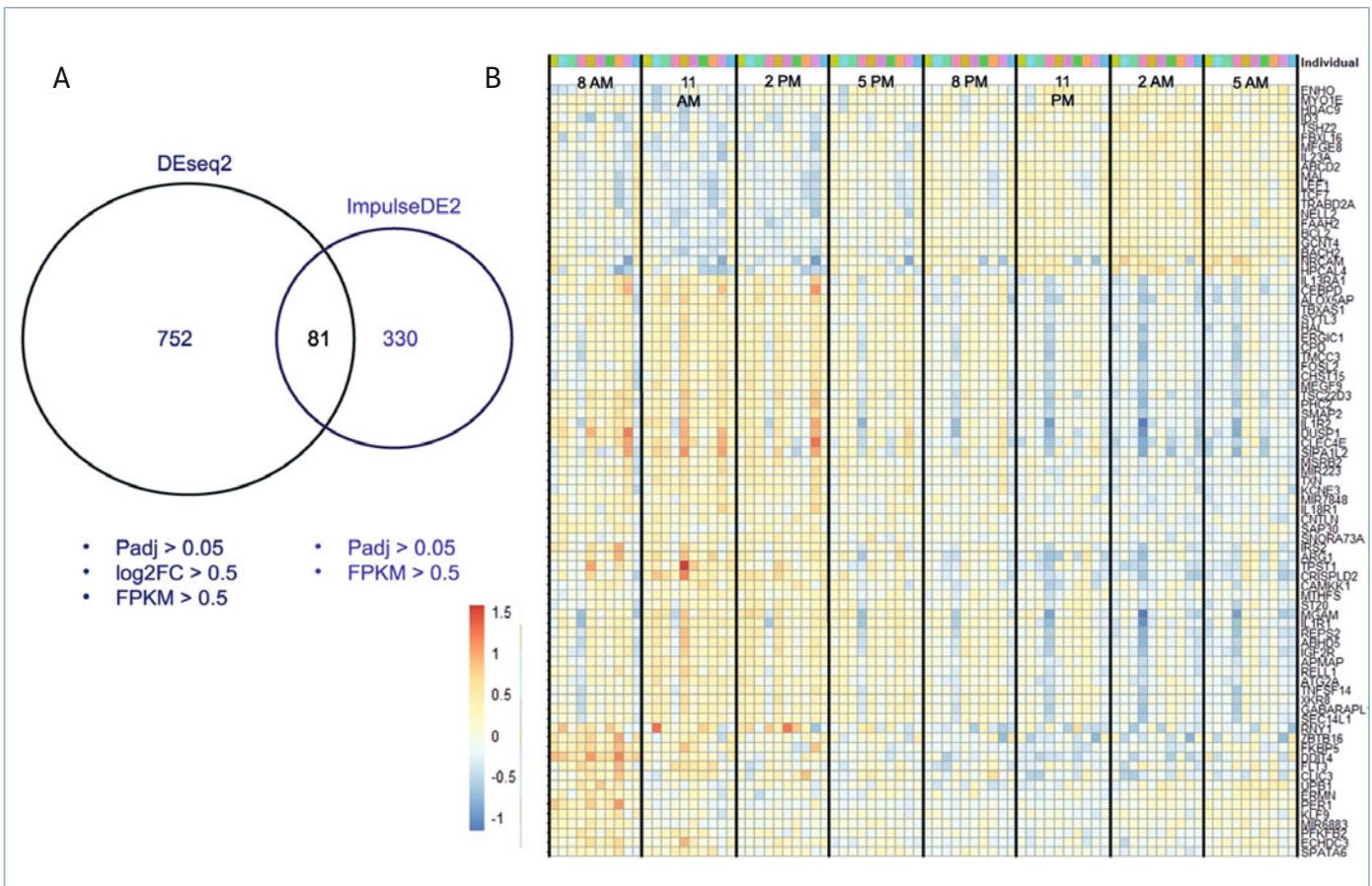
anfälliger und daher potenziell besser geeigneter, RNA-Spezies für forensische Zwecke erforscht [8]. Die meisten Ergebnisse liegen hier für mikro-RNA (miRNA) vor, eine kurze, nur ca. 22 Nukleotide lange, regulatorische RNA-Art, die in allen Tieren und Pflanzen vorkommt, wie mRNA ebenfalls eine für Körperflüssigkeiten und Organgewebe spezifische Verteilung aufweist und sogar in einer Studie noch in über 35 Jahre alten Blutspuren nachweisbar war [9]. Aber auch für das forensische Potenzial der *piwi-interacting* RNA (piRNA), einer anderen, sehr kurzen small-RNA-Art sowie der zirkulären RNA (circRNA), die durch alternatives Spleißen von mRNA entsteht und stabile kreisförmige Moleküle ohne offene Enden bildet, gibt es inzwischen vielversprechende Ergebnisse [10, 11].

#### Zukünftige Einsatzmöglichkeiten

Während die RNA-basierte forensische Identifikation von Körperflüssigkeiten und

Hier steht  
eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 3:** Auswahl von Kandidatenmarkern für die Tageszeitvorhersage. **A,** Das Venn-Diagramm zeigt die Anzahl von Markern, die von zwei unterschiedlichen Algorithmen (Deseq2 und ImpulseDE2) als differentiell exprimiert ausgewählt wurden einschl. der Filterkriterien. **B,** Die Heatmap zeigt die  $\log_2$ -transformierte Genexpression pro Probe im Vergleich zur gemittelten Gesamtexpression über alle Proben für die 81 differentiell exprimierten Kandidatenmarker.  $P_{adj}$ : adjusted p-values;  $\log_2FC$ : log fold change; FPKM: Fragments per kilobase million.

Organgewebe bereits sehr ausgereift und zuverlässig in der Fallarbeitsroutine einsetzbar sind, wird an anderen Einsatz- und Erkenntnismöglichkeiten der forensischen RNA-Analyse noch aktiv geforscht (**Abb. 2**).

Zahlreiche Studien belegen inzwischen das überaus vielseitige Potenzial von Transkriptom- und Genexpressionsanalysen bei der Bearbeitung sehr verschiedener forensischer Fragestellungen.

Zu nennen wären hier neben spurenkundlichen Analysen (s. u.) vor allem Zustands- und Zeitbestimmungen, etwa die Abschätzung des Post-mortem-Intervalls (PMI) [12], die zeitliche Eingrenzung von Wundalter und Heilungsprozessen [13], die Schätzung des Alters forensischen Spurenmaterials [14] und des Puppenstadiums leichenbesiedelnder Insekten sowie des biologischen Alters einer Person. In einer eigenen aktuellen Arbeit wurden kürzlich mRNA-Kandidaten zur Bestimmung des Depositionszeitpunkts (Tageszeit) von Blutspuren identifiziert

(**Abb. 3**). Aber auch molekulare Todesursachenermittlungen, z. B. zur Abgrenzung zwischen Suizid, Homizid und Unfalltod, und toxikogenetische Untersuchungen können durch forensische RNA-Analyse informiert werden. In vielen dieser Bereiche sind jedoch noch umfangreiche Validierungsarbeiten erforderlich, um die besten RNA-Marker zu identifizieren, aus den beobachteten Zusammenhängen mathematische Modelle zu entwickeln oder um die Robustheit bereits etablierter Modelle unter verschiedenen forensisch relevanten Bedingungen zu untersuchen.

Dennoch besteht Anlass zur Zuversicht, dass fortgesetzte Forschungsanstrengungen bei Einbeziehung der sich stetig weiterentwickelnden technischen Möglichkeiten, wie etwa der massiv-parallelen Sequenzierung, es in der Zukunft ermöglichen werden, die forensische RNA-Analyse zur Beantwortung weiterer forensischer Fragestellungen in der Fallarbeit einzusetzen. ■

## Literatur

- [1] Chitwood DH, Timmermans MC (2010) Small RNAs are on the move. *Nature* 467: 415–419
- [2] Courts C, Madea B (2012) Ribonucleic acid: Importance in forensic molecular biology. *Rechtsmedizin* 22: 135–144
- [3] Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M (2009) New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med* 123: 71–74
- [4] Kohlmeier F, Schneider PM (2012) Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains. *Forensic Sci Int Genet* 6: 274–276
- [5] Fattorini P, Bonin S, Marrubini G et al. (2020) Highly degraded RNA can still provide molecular information: An in vitro approach. *Electrophoresis* 41: 386–393
- [6] Juusola J, Ballantyne J (2003) Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int* 135: 85–96
- [7] Lynch C, Fleming R (2020) RNA-based approaches for body fluid identification in forensic science. *WIREs Forensic Sci*, DOI: <https://doi.org/10.1002/wfs2.1407>
- [8] Song B, Qian J, Fu J (2024) Research progress and potential application of microRNA and other non-coding RNAs in forensic medicine. *Int J Legal Med* 138: 329–350
- [9] Sauer E, Reinke AK, Courts C (2016) Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet* 22: 89–99
- [10] Liu B, Song F, Yang Q et al. (2019) Characterization of tissue-specific biomarkers with the expression of circRNAs in forensically relevant body fluids. *Int J Legal Med* 133: 1321–1331
- [11] Wang S, Wang Z, Tao R et al. (2019) The potential use of Piwi-interacting RNA biomarkers in forensic body fluid identification.

tification: A proof-of-principle study. *Forensic Sci Int Genet* 39: 129–135

[12] Scrivano S, Sanavio M, Tozzo P, Caenazzo L (2019) Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: a review of current evidence. *Int J Legal Med* 133: 1629–1640

[13] Sun JH, Zhu XY, Dong TN et al. (2017) An “up, no change, or down” system: Time-dependent expression of mRNAs in contused skeletal muscle of rats used for wound age estimation. *Forensic Sci Int* 272: 104–110

[14] Salzmänn AG, Russo G, Kreutzer S, Haas C (2021) Degradation of human mRNA transcripts over time as an indicator of the time since deposition (TsD) in biological crime scene traces. *Forensic Sci Int Genet* 53: 102524

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und

angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

**Korrespondenzadresse:**

Prof. Dr. Cornelius Courts  
Institut für Rechtsmedizin  
Universitätsklinikum Köln (AöR)  
Melatengürtel 60/62  
D-50823 Köln  
cornelius.courts@uk-koeln.de  
www.rechtsmedizin-koeln.de

**AUTOR**



**Cornelius Courts**

1998–2008 Studium der Biologie und Promotion. 2008–2015 Leitung des Bereichs für Forensische Genetik am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn. 2015–2021 Leitung des Bereichs für Fo-

rensische Genetik am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Seit 2021 Professur für Forensische Molekulargenetik an der Universität zu Köln und Leitung des Bereichs für Forensische Molekulargenetik am Institut für Rechtsmedizin der Uniklinik Köln.

Hier steht  
eine Anzeige.

 Springer