



Oxidationsbeobachtung mit Fluoreszenzspektroskopie offenbart das Alter von Fingerabdrücken*

Annemieke van Dam, Janina C. V. Schwarz, Judith de Vos, Maria Siebes, Titia Sijen, Ton G. van Leeuwen, Maurice C. G. Aalders und Saskia A. G. Lambrechts*

Abstract: Es gibt keine forensische Methode, die das Alter von Fingerspuren am Tatort zuverlässig ermitteln kann. Informationen über die Zeit, die seit dem Entstehen des Fingerabdrucks vergangen ist, sind wünschenswert, weil hierdurch zwischen deliktsbezogenen und irrelevanten Fingerabdrücken unterschieden werden kann. Wir stellen eine kontaktlose Methode vor, mit der das Alter von Fingerabdrücken geschätzt werden kann. Fingerabdrücke wurden hierbei als Protein-Lipid-Gemisch behandelt, und ein Modell zur Altersschätzung wurde entwickelt, das auf Protein-Lipid-Oxidationsreaktionen basiert. Zwei Messgrößen eines Fingerabdrucks sind erforderlich, um dessen Alter zu berechnen: die relative Menge an fluoreszierenden Oxidationsprodukten und die Geschwindigkeit, mit der diese Produkte gebildet werden. Fluoreszenzspektroskopie wurde eingesetzt, um diese Messgrößen zu erhalten. Wir haben die Methode an 44 Fingerabdrücken getestet und konnten das Alter bei 55 % der männlichen Fingerabdrücke bis zu einem Alter von drei Wochen mit einer Unsicherheit von 1.9 Tagen ermitteln.

Das akkurate Protokollieren und Auswerten von Fingerspuren ist ein essentieller Bestandteil der Tatortanalyse. So kann ein Eingrenzen des Zeitraumes, in dem ein Fingerabdruck entstand, von großer Bedeutung sein. Kriminaltechniker können damit relevante Beweisstücke finden und selektieren sowie Spuren ausschließen, die nicht tatbezogen sind. Außerdem können derartige Informationen genutzt werden,

um Aussagen von Zeugen, Opfern und Verdächtigen zu überprüfen.^[1] Bisher ist es nicht möglich, das Alter von Fingerabdrücken zu bestimmen. Früher wurde das Alter anhand der Qualität der Fingerspur und der Leichtigkeit ihrer Entwicklung, z. B. mit daktyloskopischem Puder, geschätzt – aber scheinbar „frische“ Fingerabdrücke erwiesen sich tatsächlich als alt.^[2] Der wichtigste bisher erzielte Fortschritt ist die Einstufung von Fingerabdrücken als jünger oder älter als fünf Stunden auf Grundlage von Weißlichtabbildung.^[3] Haupthindernis für die Entwicklung einer Altersschätzmethode für Fingerabdrücke ist die sehr variable chemische Zusammensetzung, die den Alterungsprozess beeinflusst.^[4] Im Unterschied hierzu ist die Altersbestimmung von Blutflecken anhand der Oxidationsprodukte von Hämoglobin möglich.^[5] Wir schlagen vor, auch für Fingerabdrücke Oxidationsprozesse zur Altersbestimmung zu nutzen.

Im Allgemeinen enthalten Fingerabdrücke Proteine und Lipide.^[4] Es wurde vorgeschlagen, dass Tryptophan-haltige Proteine (Tryp) die Hauptverursacher der Autofluoreszenz von frischen Fingerabdrücken sind (Abbildung 1 A).^[6] An der Luft oxidieren ungesättigte Lipide und bilden reaktive Oxidationsprodukte (LipOx), die mit Proteinen zu fluoreszierenden Oxidationsprodukten reagieren [FOX; Gl. (1)].^[7]



Das Ausmaß der Oxidation von Protein-Fett-Emulsionen steht im Zusammenhang mit einer verringerten Tryp-Fluoreszenz und einer vermehrten FOX-Fluoreszenz.^[7] Abhängig von der Zusammensetzung des Fingerabdrucks wird Tryp möglicherweise nicht vollständig zu LipOx umgeformt. Wir trennen Tryp daher in einen Teil, der reagiert (Tryp_R), und einen inerten Teil (Tryp_C). Da LipOx sowohl durch Oxidation von ungesättigten Lipiden gebildet wird als auch bei der Proteinoxidation verbraucht wird, nehmen wir an, dass die LipOx-Konzentration konstant ist, was durch $[\text{LipOx}]_0$ gekennzeichnet ist. Die Reaktion entspricht daher einer Reaktionsdynamik pseudo-1. Ordnung [Gl. (2)]. Dem folgt Gleichung (3).

$$-\frac{d[\text{Tryp}_R]_t}{dt} = k' [\text{LipOx}]_0 [\text{Tryp}_R], \quad k' = k[\text{Tryp}_R], \quad (2)$$

$$[\text{Tryp}]_t = [\text{Tryp}_R]_0 e^{-kt} + [\text{Tryp}_C] \quad \text{und} \\ [\text{FOX}]_t = [\text{Tryp}_R]_0 (1 - e^{-kt}) + [\text{FOX}]_0 \quad (3)$$

FOX wird gebildet, wie durch Gleichung (1) beschrieben; $[\text{FOX}]_0$ ist die FOX-Konzentration, die bereits bei Entstehung des Fingerabdrucks ($t=0$) vorhanden ist. Von Glei-

* A. van Dam,^[+] J. C. V. Schwarz,^[+] J. de Vos, Dr. M. Siebes, Prof. T. G. van Leeuwen, Dr. S. A. G. Lambrechts
Department of Biomedical Engineering and Physics, Academic Medical Center, University of Amsterdam
Meibergdreef 9, 1105 AZ, Amsterdam (Die Niederlande)
E-Mail: s.a.lambrechts@amc.uva.nl
s.a.g.lambrechts@gmail.com

Prof. M. C. G. Aalders
Department of Biomedical Engineering and Physics, Academic Medical Center and Co van Ledden Hulsebosch Centrum, University of Amsterdam
Meibergdreef 9, 1105 AZ, Amsterdam (Die Niederlande)

Dr. T. Sijen
Netherlands Forensic Institute,
Department of Human Biological Traces
P.O. Box 24044, 2490 AA, Den Haag (Die Niederlande)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Prof. P. D. Iedema für seinen Beitrag zur Ableitung der Alterungsfunktion. Dieses Projekt wurde durch das Ministry of the Interior and Kingdom Relations (5.6/5.15) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201402740> zu finden.

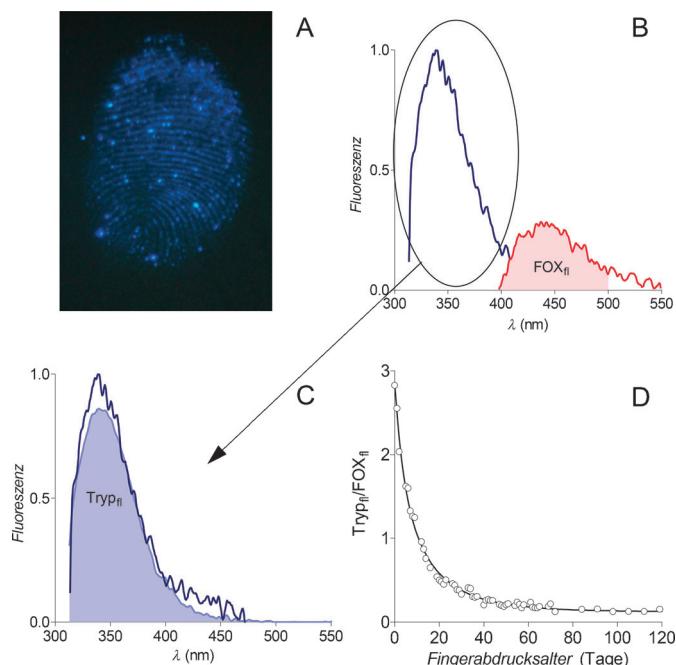


Abbildung 1. Verfahren zur Schätzung des Alters eines Fingerabdrucks. A) Abbildung der Autofluoreszenz eines Fingerabdrucks, der mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm illuminiert wird. B) Tryp- und FOX-Fluoreszenzemissionsspektren. Blaue Kurve: Anregung bei 283 nm, rote Kurve: Anregung bei 365 nm. Gefüllte Fläche: integrierte Fläche zur FOX_{fl}-Bestimmung. C) Kurvenanpassung vom Referenz-Fluoreszenzemissionsspektrum (lavendelfarbene Linie) zu dem gemessenen Tryp-Fluoreszenzemissionsspektrum (blaue Linie), das in (B) dargestellt ist. D) ○: Tryp_{fl}/FOX_{fl}-Verhältnis von einem alternden Fingerabdruck, schwarze Linie: Kurvenanpassung.

chung (3) wird die Alterungsfunktion abgeleitet [Gl. (4); siehe Hintergrundinformationen, Abschnitt 2], wobei f_0 der Wert von $f(t)$ zum Zeitpunkt $t=0$ ist und f_∞ gemäß Gleichung (5) berechnet werden kann.

$$f(t) = \frac{[\text{Tryp}]_t}{[\text{FOX}]_t} = \frac{(f_0 - f_\infty)e^{-kt} + f_\infty(f_0 + 1)}{-(f_0 - f_\infty)e^{-kt} + f_0 + 1} \quad \text{Alterungsfunktion} \quad (4)$$

$$f_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} f(t) = \frac{[\text{Tryp}_C]}{([\text{Tryp}]_0 - [\text{Tryp}_C]) + [\text{FOX}_0]} \quad (5)$$

Da [Tryp] und [FOX] in Fingerabdrücken nicht bestimmt werden können, haben wir angenommen, dass sie proportional zu den Integralen ihrer Fluoreszenzintensität in den Wellenlängenintervallen 313–550 nm (Anregung bei 283 nm, Tryp_{fl}) bzw. 400–500 nm (Anregung bei 365 nm, FOX_{fl}) sind.^[7] Anregungs-Emissions-Konturdiagramme von frischen und gealterten Fingerabdrücken bestätigen die Angemessenheit der gewählten Wellenlängen (Hintergrundinformationen, Abschnitt 4, Abbildung S2).^[8]

Fluoreszenz von Fluorophoren, die nicht von Proteinen stammen, kann zu einer Überschätzung von Tryp führen. Wir haben daher ein Referenzspektrum von sechs Fingerabdrücken erstellt. Diese wurden mit einem Chloroform/Methanol-Gemisch gewaschen, das fluoreszierende Oxidationsprodukte und andere unbekannte fluoreszierende Komponenten elu-

ierte, während es Proteine zurücklässt.^[9] Dieses Referenzspektrum wurde an das Tryp-Fluoreszenzspektrum mit einer gewichteten Methode der kleinsten Fehlerquadrate angeglichen. Die Fläche unter der Kurve wurde als Tryp_{fl} gewertet. Dementsprechend konnten das Tryp_{fl}/FOX_{fl}-Verhältnis berechnet und dessen zeitliche Entwicklung dargestellt werden (Abbildung 1D).

Für die Altersbestimmung wurde das Tryp_{fl}/FOX_{fl}-Verhältnis zum ersten Mal zu einem (unbekannten) Zeitpunkt t_0 Tage nach Hinterlassung des Fingerabdrucks ermittelt. Darauf folgend wurde das Verhältnis an mehreren Tagen danach bestimmt, wodurch eine Zeitreihe $f(t_0 + t_{\text{gemessen}})$ generiert wurde. Hierbei entsprach t_{gemessen} dem Zeitpunkt innerhalb der Messreihe. Der Parameter f_0 , das Tryp_{fl}/FOX_{fl}-Verhältnis von frischen Fingerabdrücken, wurde anhand von 23 frischen Fingerabdrücken ermittelt (3.85 ± 3.48 ; Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Durch eine Kurvenanpassung der Alterungsfunktion [Gl. (4)] an die Daten mit einer nichtlinearen Methode der kleinsten Fehlerquadrate konnten t_0 , k und f_∞ geschätzt werden. Anhand der ersten Messung eines unbekannten Fingerabdrucks ($t=t_0$) wurde dessen Eignung für eine Altersbestimmung beurteilt. Hierzu wurden drei Kriterien angewendet (Hintergrundinformationen, Abschnitt 3): a,b) Tryp_{fl} und FOX_{fl} mussten ein vorbestimmtes Mindestmaß überschreiten; c) das Bestimmtheitsmaß R^2 der Kurvenanpassung vom Referenzspektrum an das gemessene Tryp-Fluoreszenzspektrum musste positiv sein. Die Tryp-Ausschlusskriterien (a,c) wurden verwendet, um einen dominanten Anteil an Proteinfluoreszenz im Vergleich zur Hintergrundlumineszenz zu gewährleisten. Diese Kriterien wurden nur für den ersten Messwert $t=t_0$ berücksichtigt, da zu erwarten ist, dass Tryp in den Folgemessungen nachlässt und FOX vermehrt auftritt. Alterungskurven wurden in die Auswertung mit einbezogen, wenn a) $R^2 \geq 0.85$, b) minimal sechs nicht konstante Datenpunkte vorhanden waren sowie c) das Verhältnis des ersten Messwertes ($t=t_0$) mindestens 0.2 betrug. Eine Untergrenze für das Signal/Rausch-Verhältnis wurde auf 3.92 festgelegt (Hintergrundinformationen, Abschnitt 3). Aufeinandergeschichtete Fingerabdrücke wurden genutzt, um ein stärkeres Fluoreszenzsignal zu erhalten. Freiwillige Probanden platzierten hierfür fünf oder zehn Fingerabdrücke (einen pro Finger) übereinander.

Ein Testsatz von 22 männlichen und 22 weiblichen Fingerabdrücken wurde genutzt, um unsere Methode zu testen. Zunächst wurde für jeden Fingerabdruck die gesamte Zeitreihe (zwischen 65 und 176 Tagen lang) verwendet. Danach wurde der erste Messpunkt der Zeitreihe weggelassen, und die Alterungsfunktion wurde erneut angeglichen, woraufhin die Prozedur wiederholt wurde. Auf diese Weise wurden die Daten mehrfach genutzt, um ein steigendes Alter für t_0 zu simulieren (von einer Stunde bis zu fünf Monaten). Zwölf Fingerabdrücke ließen eine Altersberechnung zu. Allerdings wurden durch die Simulation des steigenden Alters mehr als zwölf Datenpunkte generiert (Abbildung 2).

Alle Fingerabdrücke, die für eine Altersschätzung angemessen waren, stammten von männlichen Spendern, da die Fingerabdrücke weiblichen Ursprungs ein niedriges Fluoreszenzsignal aufwiesen: Im Unterschied zu 27 % der männlichen Fingerabdrücke hatten 77 % der frischen weiblichen

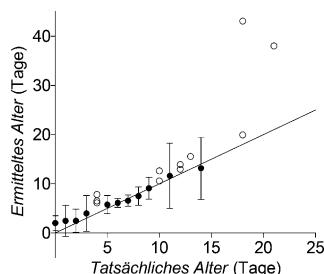


Abbildung 2. Altersschätzung von zwölf Fingerabdrücken. Durch wiederholtes Verwenden der Daten jedes einzelnen Fingerabdrucks wurde die Methode über einen großen Altersbereich getestet. ●: Median von mindestens vier Datenpunkten, ○: einzelne Ergebnisse. Fehlerbalken: Inter-Quartilsabstand. Die Identitätslinie wurde als Richtlinie hinzugefügt.

Fingerabdrücke eine unzureichende Trp_{fl} -Fluoreszenz. Schätzungen des Alters waren bis zu drei Wochen nach Entstehung, bei einer Median-Unsicherheit von 1.9 Tagen, möglich. Um die Abhängigkeit der Alterungsgeschwindigkeit vom Gehalt an ungesättigten Lipiden zu demonstrieren, hinterlegten sechs Freiwillige sowohl natürliche als auch mit Squalen angereicherte Fingerabdrücke (Fingerspitzen wurden zuvor mit Squalen eingerieben). Squalen ist ein hochungesättigtes Lipid, das in Fingerabdrücken vorkommt und leicht oxidiert.^[10] Fingerspuren enthalten normalerweise Cholesterin und ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure, von denen angenommen werden kann, dass sie oxidieren und somit zum Alterungsprozess beitragen.^[10] Squalen erhöhte eindeutig die Fingerabdrucks-Alterungsgeschwindigkeit (Abbildung 3 sowie Hintergrundinformationen, Abschnitt 5 und Abbildung S3).

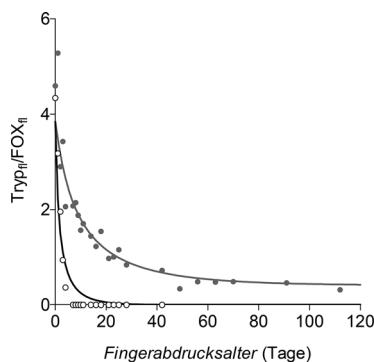


Abbildung 3. Wirkung von Squalen auf die Fingerabdrucks-Alterungsgeschwindigkeit. Typisches Beispiel von natürlichem Altern (○) und Altern eines mit Squalen angereicherten Fingerabdrucks (●). Die Linien entsprechen den angeglichenen Alterungskurven.

Fünfundfünzig Prozent der Fingerabdrücke männlicher Spender waren zur Altersbestimmung geeignet gegenüber keinem der weiblichen Probanden. Wir führen dieses auf die geringe Exkretion von Hautbestandteilen bei Frauen zurück.^[11] Dies bedeutet nicht, dass unser Alterungsmodell

ungeeignet ist, sondern dass dringend effiziente Techniken zur Fingerabdrucksicherung erforderlich sind. Wir erwarten, dass Fingerabdrücke, die in dieser Studie keine oder nur eine geringe Fluoreszenz zeigten, auch in der kriminaltechnischen Praxis nicht darstellbar sind. Mit Hinsicht auf die ungleiche Neigung zu männlichen Tätern in der Kriminalstatistik gefährdet die anscheinende Unfähigkeit, weibliche Fingerabdrücke zu datieren, die Anwendbarkeit unserer Methode nicht.^[12] Spuren wie Samen- und Vaginalflüssigkeit können ebenfalls als Protein-Lipid-Emulsionen betrachtet werden. So ergaben erste Versuche mit Samenflüssigkeit ähnliche Alterungskurven, wie sie in dieser Studie für Fingerabdrücke beschrieben wurden.

Die Anwendung von Fluoreszenz, um den Zeitraum seit Hinterlassung festzustellen, wurde vor über dreißig Jahren untersucht, wobei eine Rotverschiebung hin zu längeren Wellenlängen für alternde Fingerabdrücke beobachtet wurde, die zu der Bildung von FOX passt.^[13] Allerdings war die Inter- und Intra-Personenvariabilität für quantitative Rückschlüsse auf das Alter zu groß. Wir haben dieses Variabilitätsproblem durch Messung der Alterungsgeschwindigkeit überwunden. Korrekturen für Umgebungsbedingungen sind erforderlich, um unser Altersschätzmodell zu vervollständigen. Erste Versuche haben gezeigt, dass unsere Methode trotz schnelleren Altern bei höheren Temperaturen dennoch das Datum der Fingerabdrücke ermitteln kann (Hintergrundinformationen, Abschnitt 6, Abbildung S4). Zudem beeinflusst auch der Träger, auf dem der Fingerabdruck hinterlassen wird, die Alterungsgeschwindigkeit: So wurde z.B. ein schnelleres Altern von Squalen und Cholesterin in Fingerabdrücken auf Glas gegenüber solchen, die auf Mikrofilterpapier deponiert wurden, beschrieben.^[10c] Unsere Methode enthält die Alterungsgeschwindigkeit in der Schätzung und berücksichtigt damit Substrateneffekte. Eine starke Lumineszenz des Trägermaterials und die Notwendigkeit, den Zeitverlauf des Alterungsprozesses zu verfolgen, sind Einschränkungen für die beschriebene Methode. Eine Übertragung des Altersschätzmodells auf den Einsatz am Tatort kann auf zwei Weisen geschehen: 1) Eine Optimierung der experimentellen Umsetzung, um Rauschen zu minimieren, kann die benötigte Überwachungszeit verringern und Messungen am Tatort ermöglichen. 2) Die Notwendigkeit, den Zeitverlauf des Oxidationsprozesses zu verfolgen, könnte entfallen, falls FOX-Komponenten, die mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten gebildet werden, identifiziert werden. Eine Bestimmung der Verhältnisse dieser Komponenten zu nicht oxidierten Proteinen, z.B. mit Massenspektrometrie oder spezifischen Markierungstechniken,^[14] könnte die Altersbestimmung mit einer einzigen Messung ermöglichen.

Wir berichten hier von einer erfolgversprechenden Altersschätzmethode für Fingerabdrücke. Mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie wurden der Abbau von Proteinen und die Entstehungsgeschwindigkeit von Oxidationsprodukten in alternden Fingerabdrücken gemessen. Wir konnten das Alter von 55 % der Fingerabdrücke männlicher Probanden bis zu einem Alter von drei Wochen mit einer Unsicherheit von 1.9 Tagen schätzen. Die hier vorgestellte Methode ist nicht auf Fingerabdrücke beschränkt, sondern dient als Vorlage zur Altersbestimmung für alle Spuren, die Proteine und

Lipide enthalten, wie Sperma, Vaginalflüssigkeit oder sogar Tränen.

Eingegangen am 24. Februar 2014
Online veröffentlicht am 21. Mai 2014

Stichwörter: Altersbestimmung · Fingerabdrücke · Fluoreszenz · Forensik · Oxidationen

- [1] a) A. C. van Asten, *Sci. Justice* **2014**, *54*, 170–179; b) C. Weyermann, O. Ribaux, *Sci. Justice* **2012**, *52*, 68–75.
- [2] a) Y. Cohen, E. Rozen, M. Azoury, D. Attias, B. Gavrielli, M. L. Elad, *J. For. Ident.* **2012**, *62*, 47–53; b) D. Greenlees, *Fingerprint Whorld* **1994**, *20*, 50–52.
- [3] R. Merkel, S. Gruhn, J. Dittmann, C. Vielhauer, A. Bräutigam, *Forensic Sci. Int.* **2012**, *222*, 52–70.
- [4] A. Girod, R. Ramotowski, C. Weyermann, *Forensic Sci. Int.* **2012**, *223*, 10–24.
- [5] a) R. H. Bremmer, A. Nadort, T. G. van Leeuwen, M. J. C. van Gemert, M. C. G. Aalders, *Forensic Sci. Int.* **2011**, *206*, 166–171; b) B. Li, P. Beveridge, W. T. O'Hare, M. Islam, *Sci. Justice* **2013**, *53*, 270–277.
- [6] S. A. G. Lambrechts, A. van Dam, J. de Vos, A. van Weert, T. Sijen, M. C. G. Aalders, *Forensic Sci. Int.* **2012**, *222*, 89–93.
- [7] a) M. Heinonen, D. Rein, M. T. Satué-Gracia, S.-W. Huang, J. B. German, E. N. Frankel, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 917–922; b) K. Viljanen, R. Kivikari, M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1104–1111; c) J. H. Liang, *Food Chem.* **1999**, *66*, 103–108.
- [8] E. Koller, O. Quehenberger, G. Jürgens, O. S. Wolfbeis, H. Escherbauer, *FEBS Lett.* **1986**, *198*, 229–234.
- [9] B. L. Fletcher, C. J. Dillard, A. L. Tappel, *Anal. Biochem.* **1973**, *52*, 1–9.
- [10] a) N. E. Archer, Y. Charles, J. A. Elliott, S. Jickells, *Forensic Sci. Int.* **2005**, *154*, 224–239; b) K. A. Mountfort, H. Bronstein, N. Archer, S. M. Jickells, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2650–2657; c) C. Weyermann, C. Roux, C. Champod, *J. Forensic Sci.* **2011**, *56*, 102–108.
- [11] P. U. Giacomoni, T. Mamnone, M. Teri, *J. Dermatol. Sci.* **2009**, *55*, 144–149.
- [12] F. Heidensohn, M. Silvestri in *The Oxford handbook of criminology*, 5. Aufl. (Hrsg.: M. Maguire, R. Morgan, R. Reiner), Oxford University Press, Oxford, **2012**, S. 336–369.
- [13] a) J. M. Duff, E. R. Menzel, *J. Forensic Sci.* **1978**, *23*, 129–134; b) E. R. Menzel, *J. Forensic Sci.* **1992**, *37*, 1212–1213.
- [14] a) P. Hazarika, D. A. Russell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3524–3531; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3582–3589; b) J. Wang, T. Wei, X. Li, B. Zhang, J. Wang, C. Huang, Q. Yuan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1616–1620; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1642–1646; c) M. Wood, P. Maynard, X. Spindler, C. Lennard, C. Roux, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12272–12274; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12438–12440; d) A. van Dam, M. C. G. Aalders, K. van de Braak, H. J. J. Hardy, T. G. van Leeuwen, S. A. G. Lambrechts, *Forensic Sci. Int.* **2013**, *232*, 173–179.