

## Das lange Wochenende der Genome

# Möglichkeiten und Grenzen der Bewertung von Mischspuren

**Dr. rer. nat. Carsten Hohoff**

Institut für Forensische Genetik GmbH  
Im Derdel 8, 48161 Münster  
info@ifg-ms.de

## 1) Kurzvorstellung IFG

- Historie und Geschäftsfelder

## 2) Auf dem Weg zum Elektropherogramm

- von der SpuSi zur HV
- (molekular-)genetische Grundlagen und Methoden
- Interpretation von Befunden

# Kurzvorstellung IFG - Historie

---

- **Ausgründung der Rechtsmedizin Münster**
  - 1981-2007: Prof. Brinkmann Direktor des Instituts für Rechtmedizin, Uni Münster
  - 2007: Gründung als „Forensische Genetik“
  - 2009: Umzug in das neue Institutsgebäude (IFG GmbH)



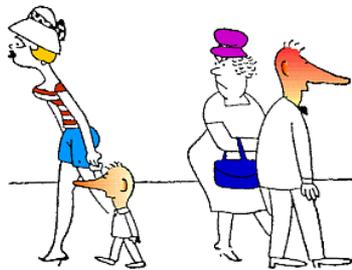
# Kurzvorstellung IFG - Aufgabenspektrum



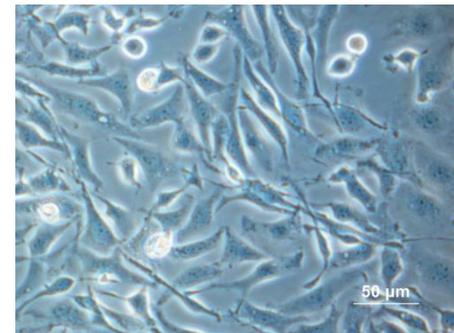
**Spurenkundliche Untersuchungen**



**GEDNAP Spurenringversuche**



**Abstammungsgutachten**



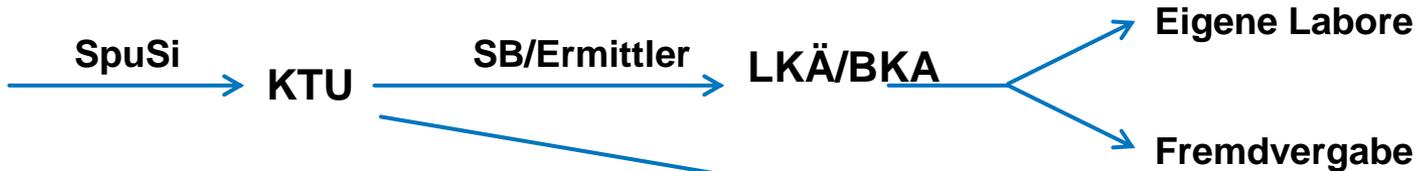
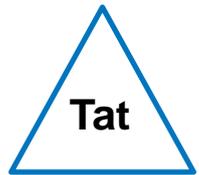
**Zelllinien-Verifizierung**

## ➤ Material

- Person A:** 20 µl Blut auf Zellstofftupfer (Zellette, 2016)
- Person B:** 10 µl Blut auf Zellstofftupfer (Zellette, 2016)
- Person C:** 10 µl Blut auf Zellstofftupfer (Zellette, 2018)
- Spur 1:** 15 µl Blut auf Sand (2008)
- Spur 2:** 20 µl Blutmischung auf Zellette (2 P., 1 + 1, 2016)
- Spur 3:** 10 µl Sperma auf Wattestäbchen (2019)
- Spur 4:** 20 µl Blutmischung auf Zellette (3 P, 2+1+2, '16)

# Typischer Ablauf

Polizei



Labor X

Ergebnisüberprüfung

**Treffer!!**

§ 81 e, g StPO ?

**DAD**

DNA-Analyse-Datei



molekulargenetisches  
Spurengutachten

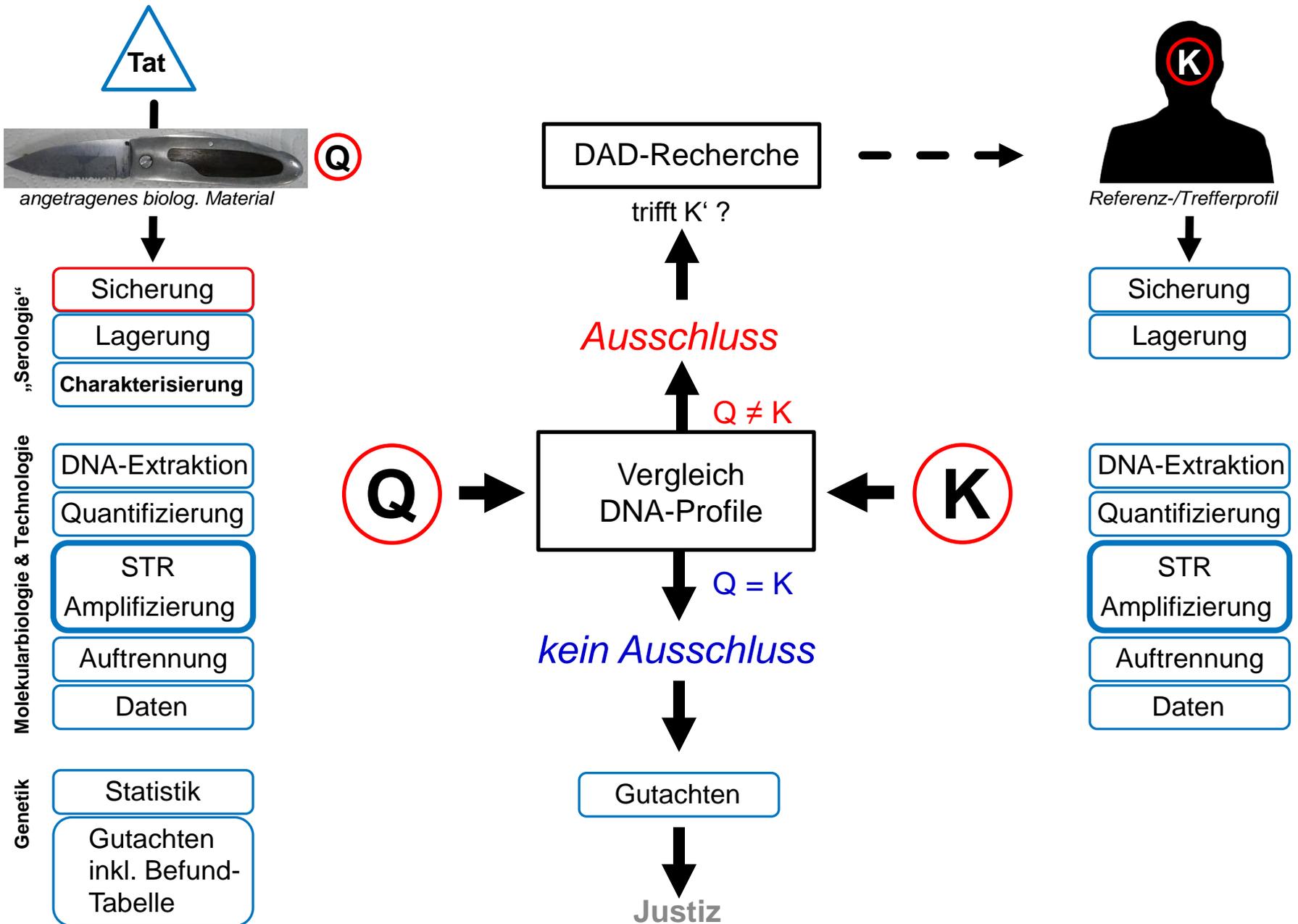
+

Meldebogen



Gericht

Justiz



Übersetzt und verändert nach **Butler, 2009**

# Asservate & Spureuträger I

Sicherung

- **Abriebe & Originalasservate**



- **Vergleichsspeichelproben (RP, H)**



# Asservate & Spurenräger II

## Organe/Gewebe

Knochen  
Epithelien (c)  
Haare (d)  
Haut(-schuppen)

## Körpersekrete

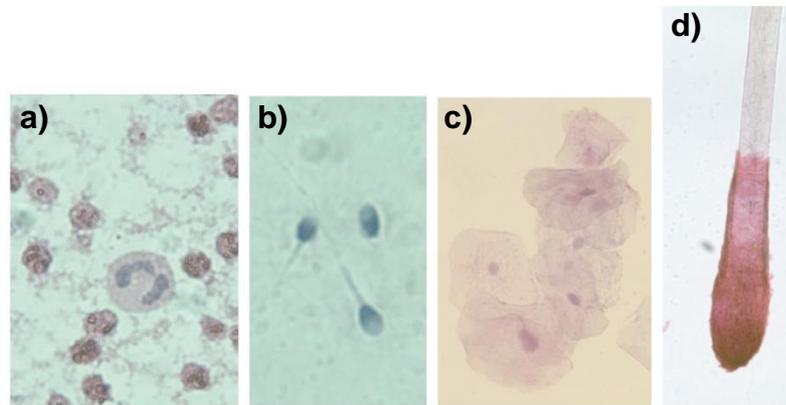
Speichel  
Nasensekret  
Schweiß

## Körperflüssigkeiten

Blut (a)  
Urin

## Sexualsekrete

Ejakulat (b)  
Vaginalsekret



verändert nach Goodwin *et al.*, 2009

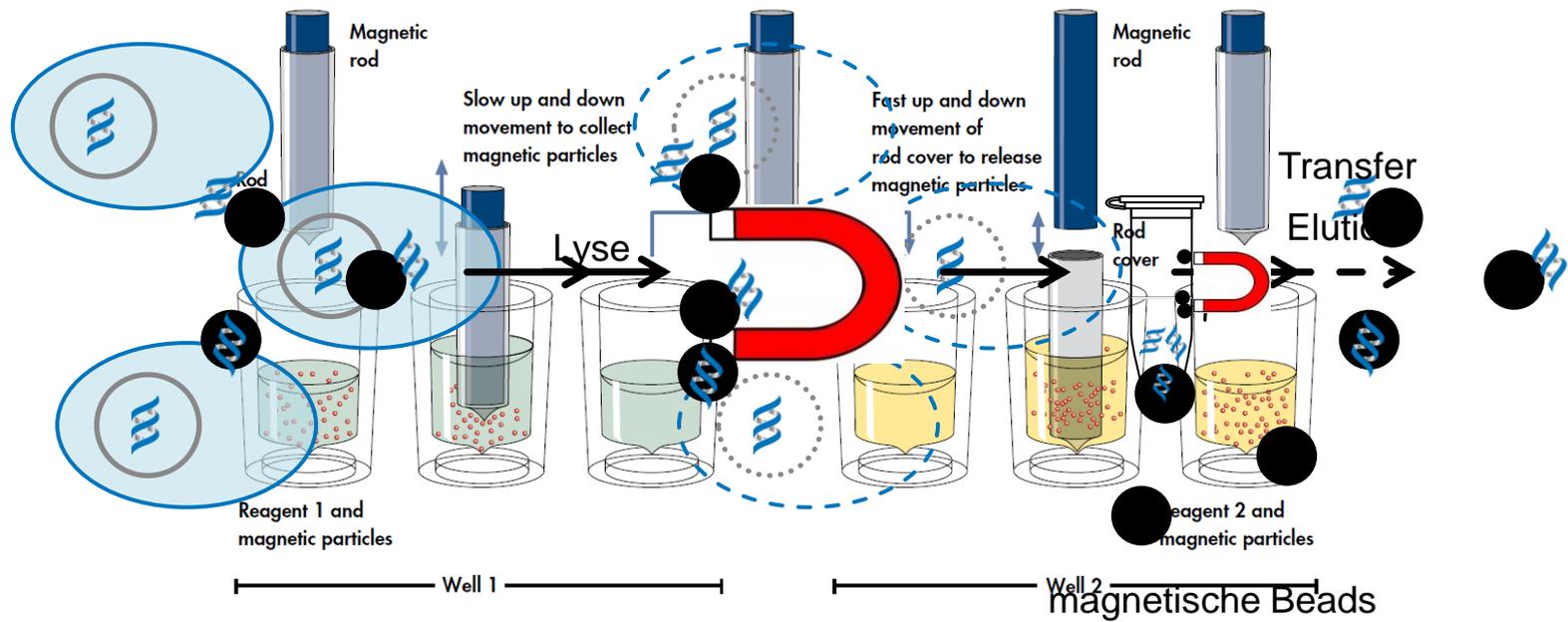
## • Charakterisierung nach Leitenzymen/Zielstrukturen

- Kastle-Meyer Blutvortest
- saure Phosphatase/PSA, HE-Färbung, Mikroskop
- $\alpha$ -Amylase-Test (Phadebas)

Charakterisierung



# DNA-Extraktion: magnetic beads



# DNA-Quantifizierung

- **quantitative real-time PCR**
  - Monitoring durch Fluoreszenzanregung
  - TaqMan-Chemie
  - Detektion von  $\lambda_{em}$

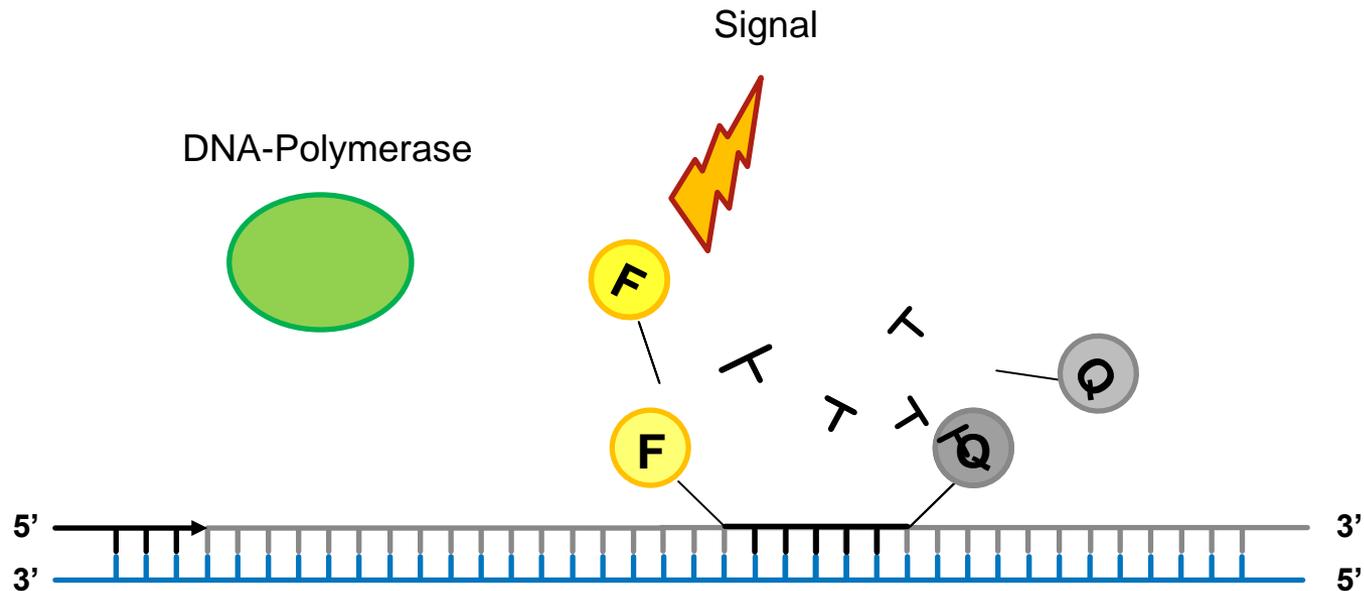
DNA-Extraktion

Quantifizierung

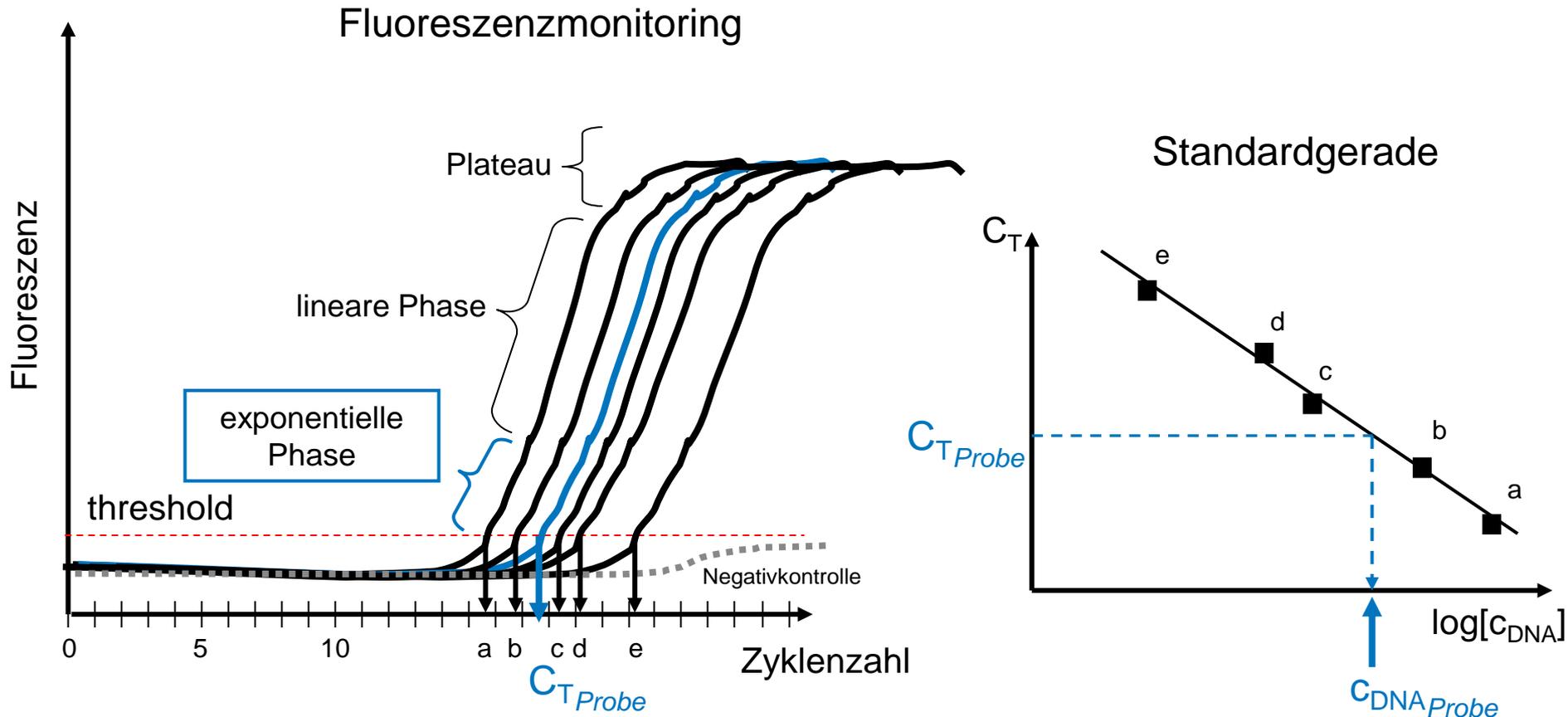
STR  
Amplifizierung

Auftrennung

Daten



# DNA-Quantifizierung



verändert nach Butler, 2009

## **Ziele**

**Nachweis menschlicher DNA**

**Nachweis männlicher DNA**

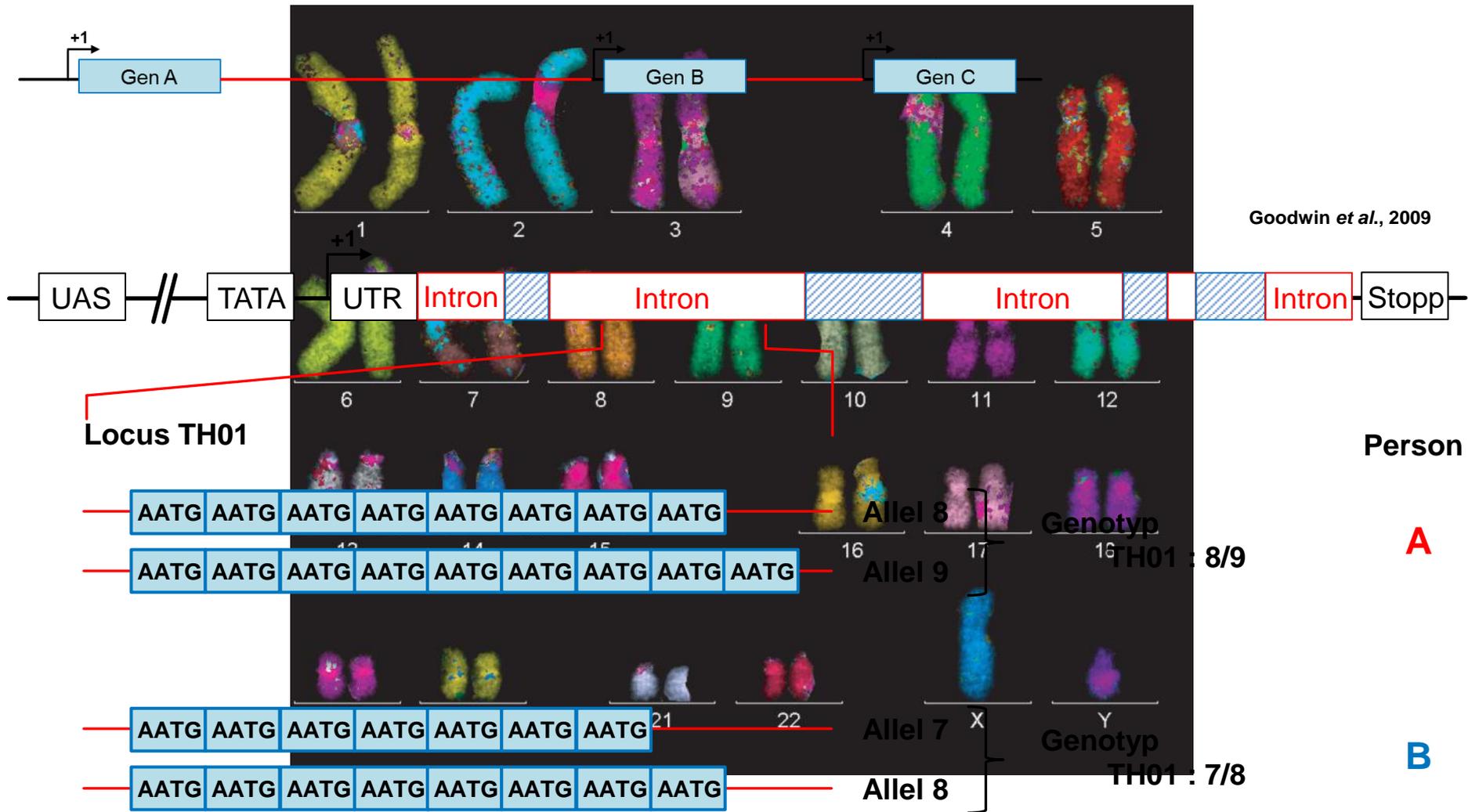
**Nachweis degradiertes DNA**

## **Labor**

**Standardisierung der eingesetzten DNA-Menge**

**Wahl der richtigen weitergehenden Untersuchungs-Strategie**

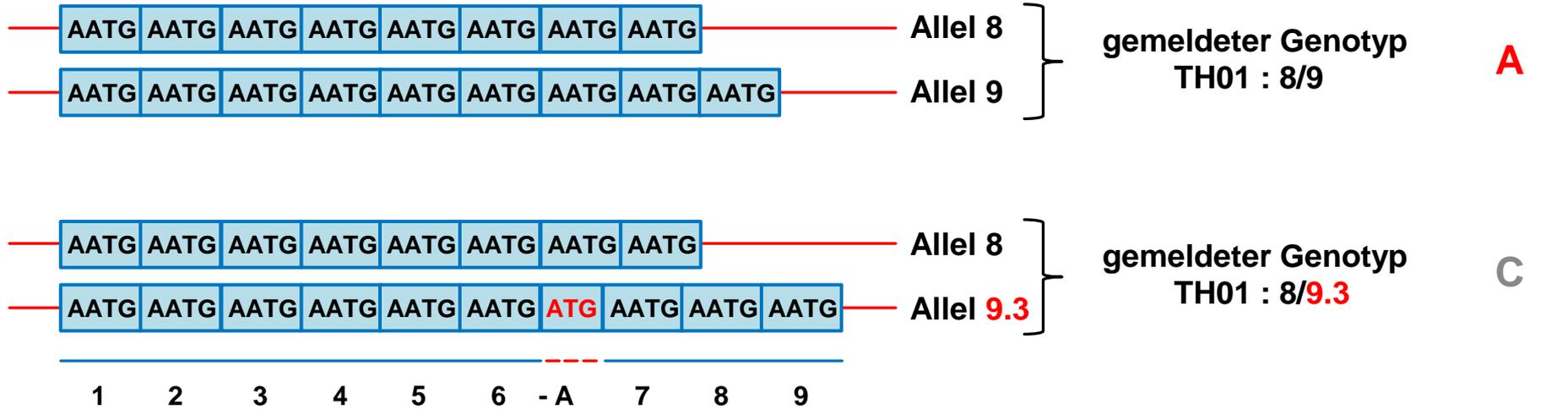
# short tandem repeats



Duncan Holdsworth, Westlakes Research Institute, University of Central Lancashire; UK in: Goodwin et al., 2009

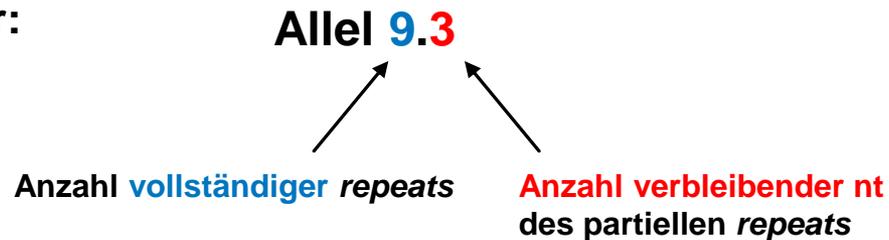
# Mikrovarianten

## Locus TH01



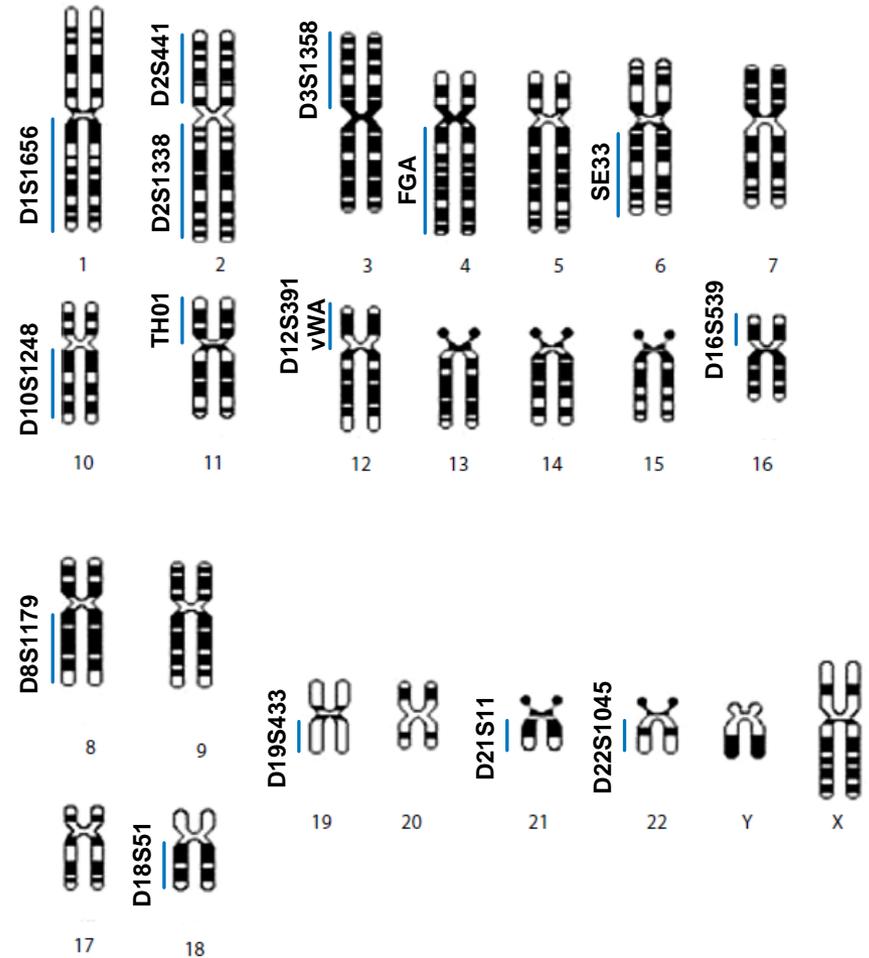
- Mikrovarianten (Bsp. TH01)

- Nomenklatur:



# (Advanced) European Standard Set

Marker	repeat	Chromosom
D3S1358	TCTR	3p21.31
TH01	TCAT	11p15.5
D21S11	TCTR	21q21.1
D18S51	AGAA	18q21.33
D10S1248	GGAA	10q26.3
D1S1656	TAGA	1q42
D2S1338	TKCC	2q35
D16S539	GATA	16q24.1
D22S1045	ATT	22q12.3
vWA	TCTR	12p13.31
D8S1179	TCTR	8q24.13
FGA	YTTY	4q31.3
D2S441	TCWA	2p14
D12S391	AGAY	12p13.2
D19S433	WAGG	19q12
SE33 (ACTBP2)	AAAG	6q14



verändert nach Kassem *et al.*, 2012

# STR Multiplex-PCR

- **Multiplex-PCR**

- multiple Primerpaare in einer Reaktion
- Fluorophor-markiert

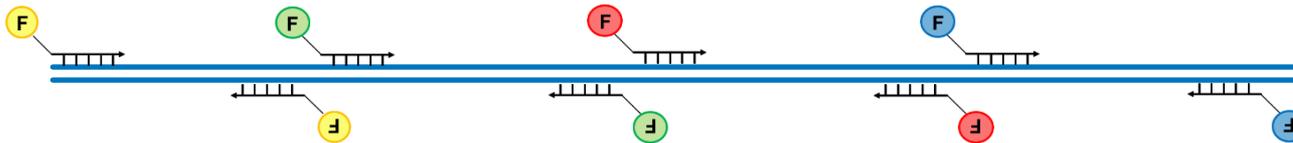
DNA-Extraktion

Quantifizierung

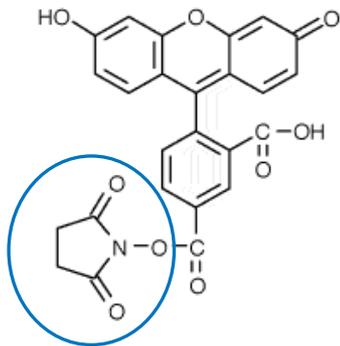
**STR  
Amplifizierung**

Auftrennung

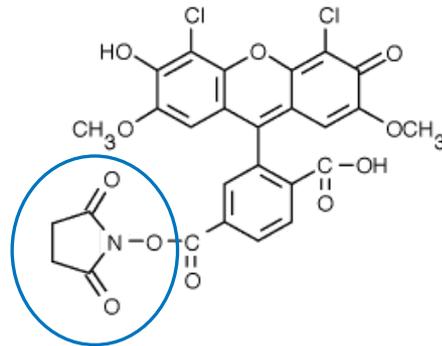
Daten



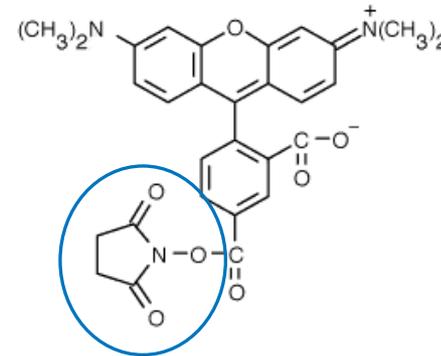
FAM



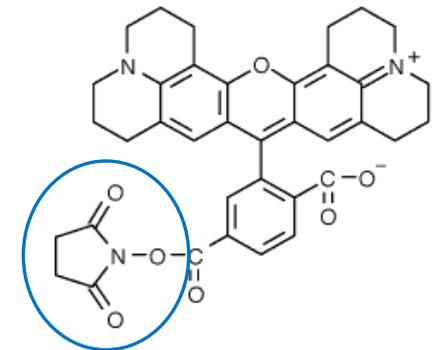
JOE



TAMRA



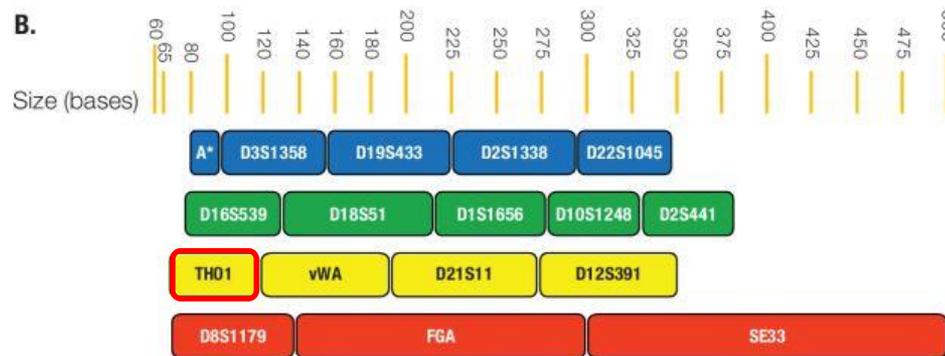
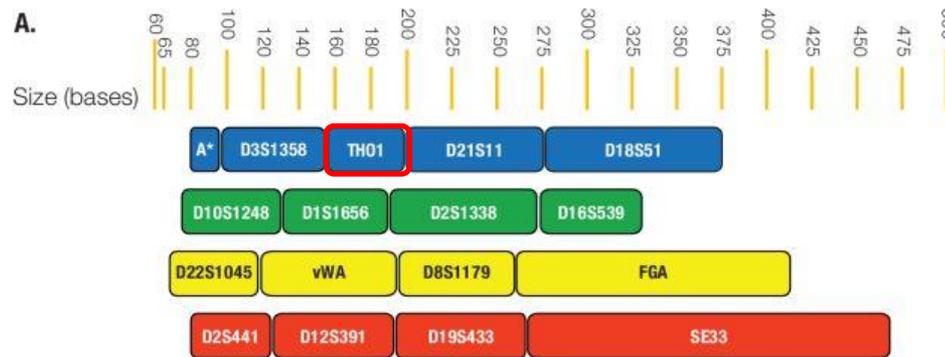
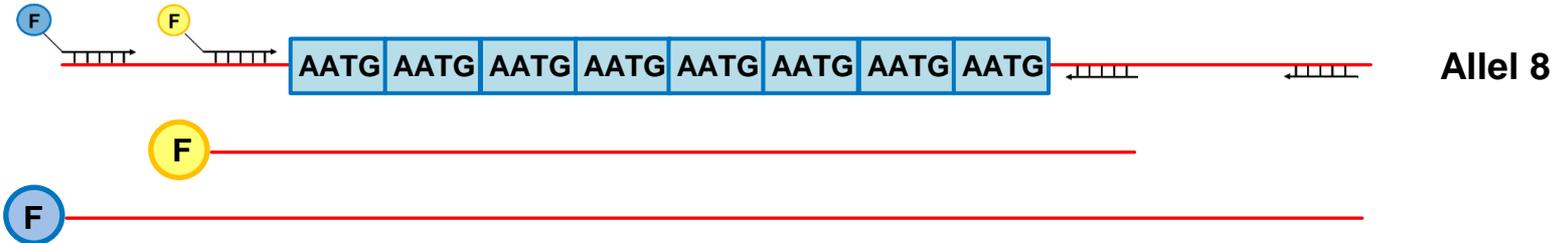
ROX



verändert nach Butler, 2009

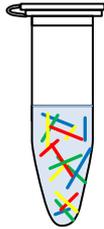
# STR Multiplex-PCR

- Unterschiedliche Kits/Reagenziensätze:
  - Ein Allel – unterschiedliche Amplifikatlängen
  - Ein Allel – unterschiedliche Fluorophore



\*Amelogenin

# Auftrennung von Amplifikationsprodukten I



- **Endergebnis Multiplex-PCR:**

- Amplifikationsprodukte unterschiedlicher Länge
- Amplifikationsprodukte unterschiedlicher Markierung

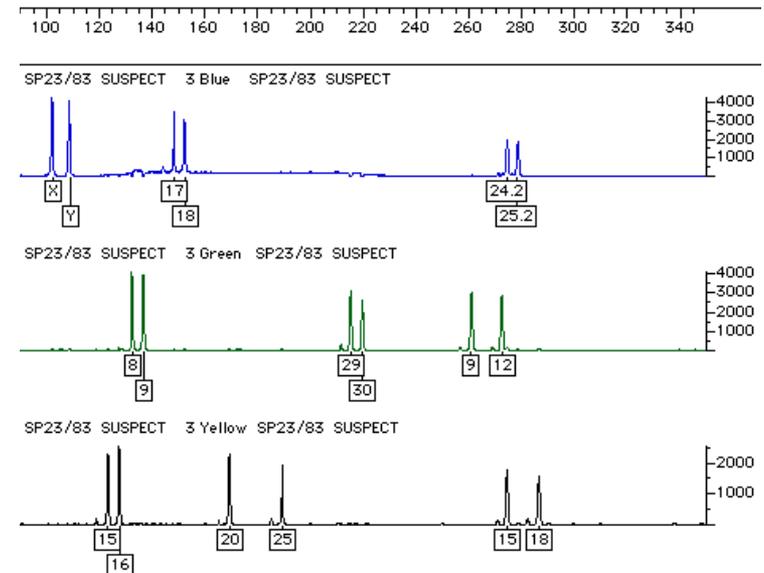
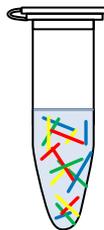
DNA-Extraktion

Quantifizierung

STR  
Amplifizierung

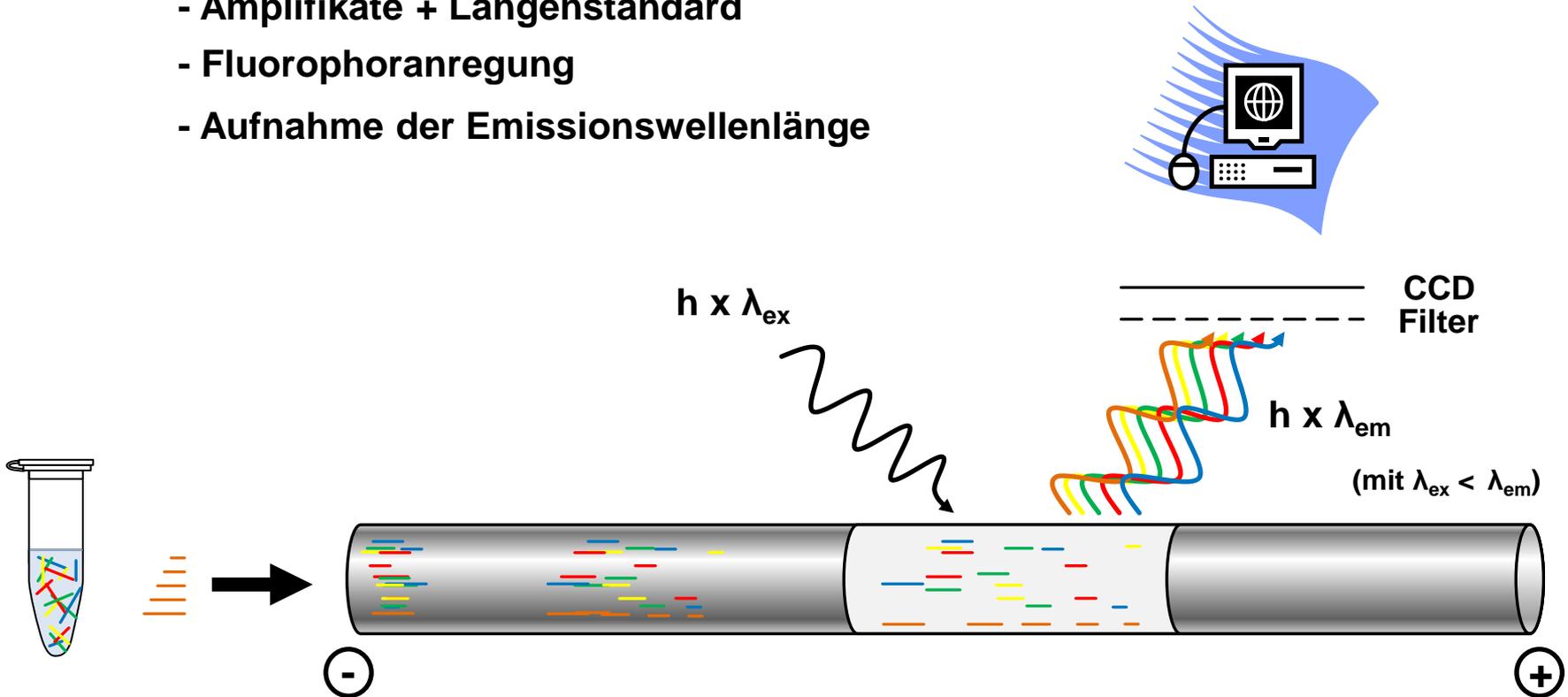
**Auftrennung**

Daten

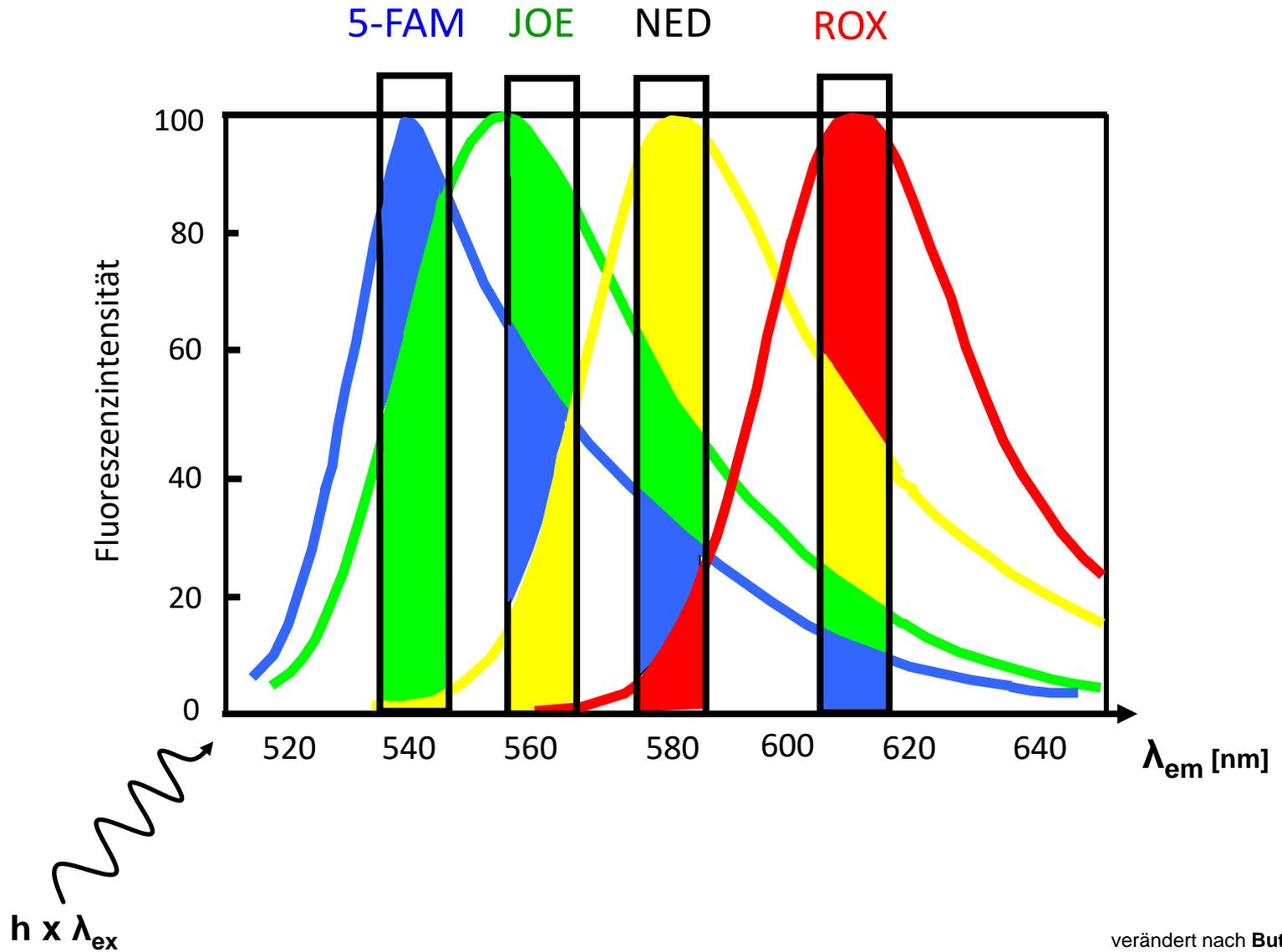


# Auftrennung von Amplifikationsprodukten II

- **Kapillar-Gelelektrophorese (CE)**
  - Polymerfüllung
  - Amplifikate + Längenstandard
  - Fluorophoranregung
  - Aufnahme der Emissionswellenlänge



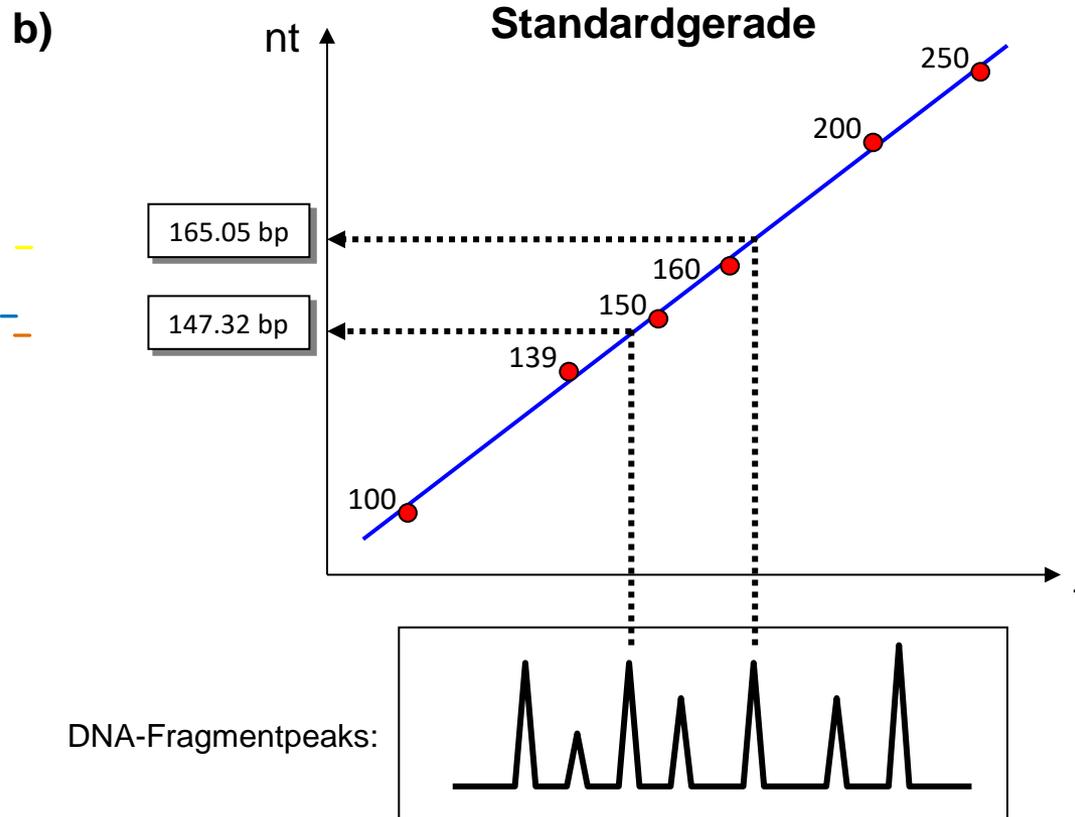
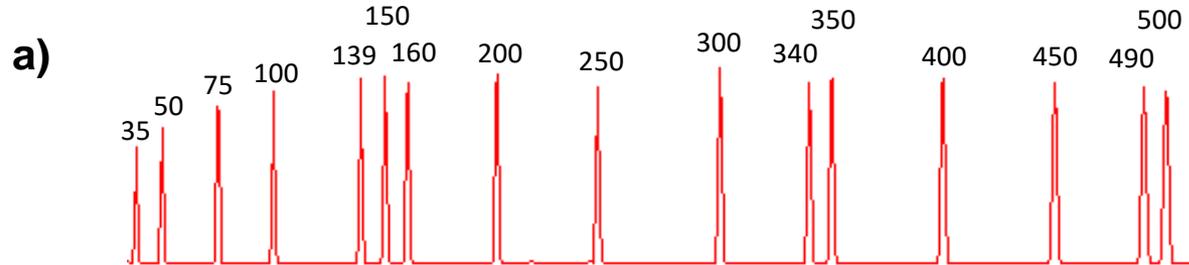
# Auftrennung der Spektralüberlappung



verändert nach Butler, 2009

# Längendetermination

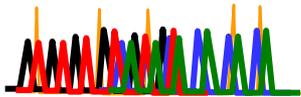
## Interner Längenstandard (ILS)



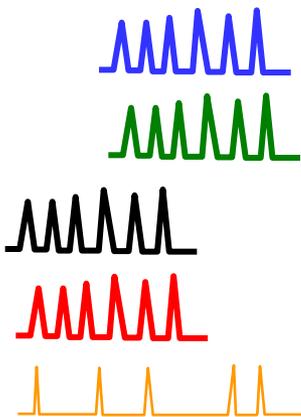
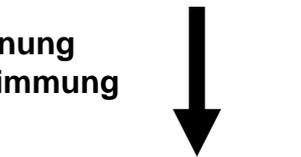
# Auftrennung von Amplifikationsprodukten III



Allelleiter



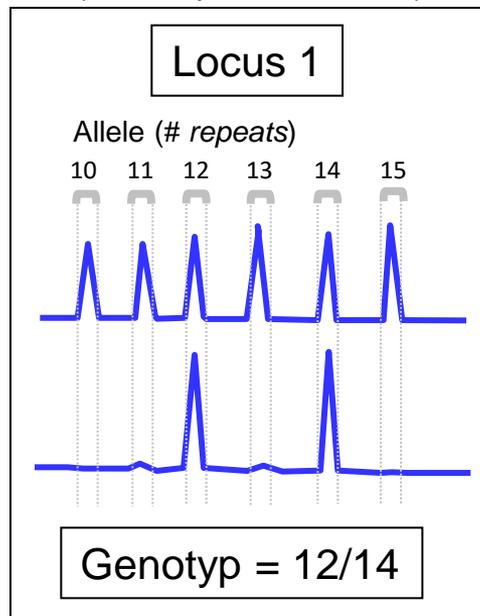
Farbtrennung  
Längenbestimmung



ILS

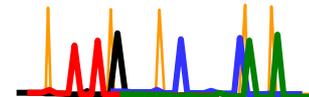
Längenbestimmung  
Allelleiter anhand des  
ILS

Allel-Bins  
( $\pm 0,5$  bp um Leiterallel)

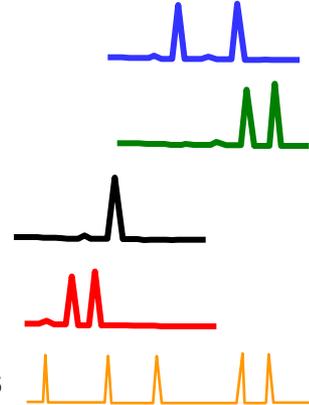


Vergleich  
Allelleiter  $\longleftrightarrow$  Probe

amplifizierte Probe



Farbtrennung  
Längenbestimmung



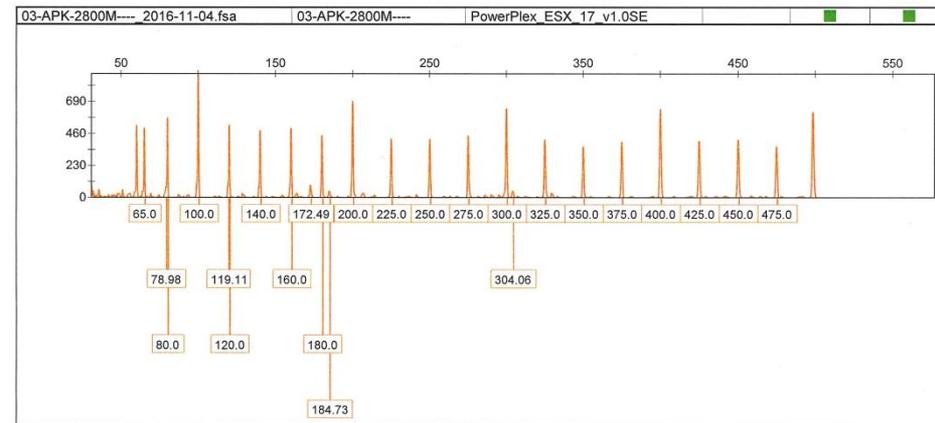
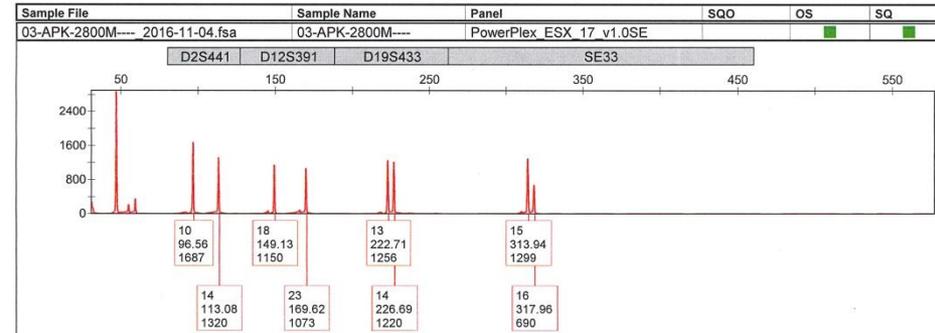
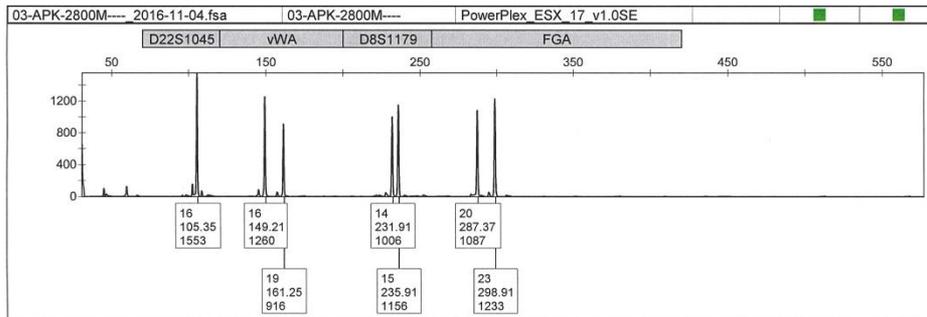
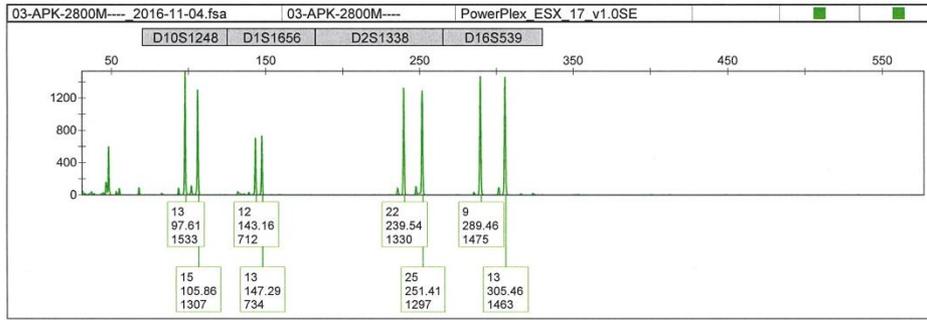
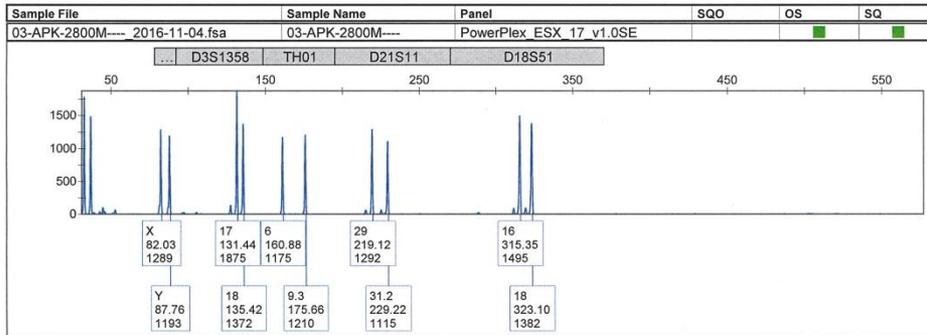
ILS

Längenbestimmung  
aller Probenallele  
anhand des ILS

# Elektropherogramm (EPG)

Auftrennung

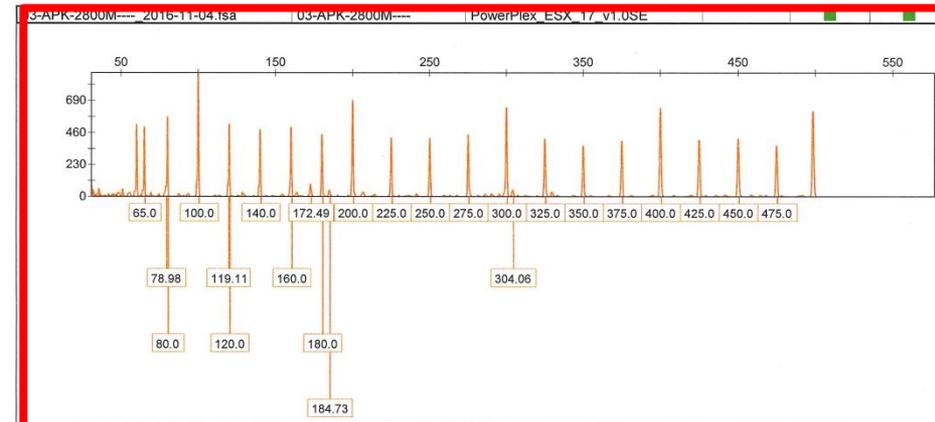
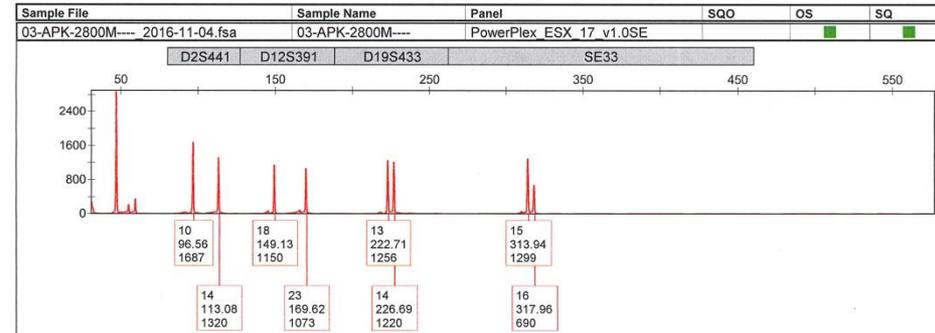
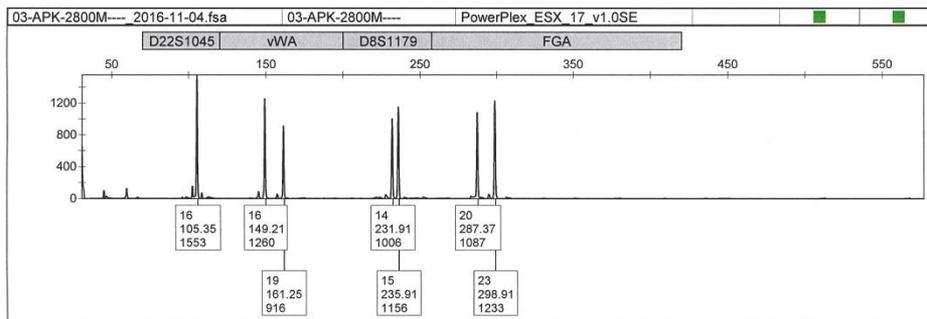
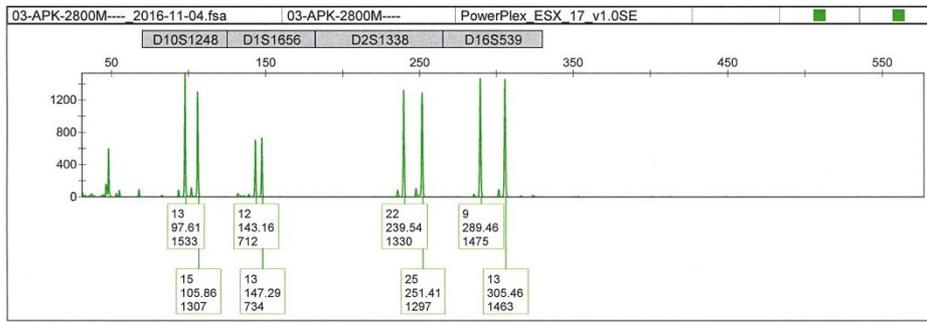
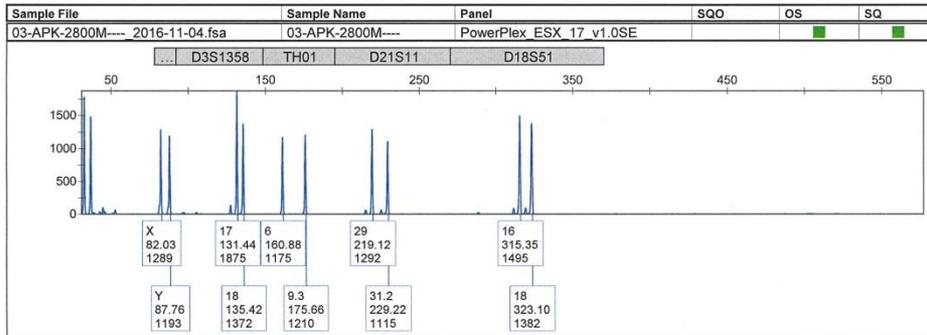
Daten



# Elektropherogramm (EPG)

Auftrennung

Daten



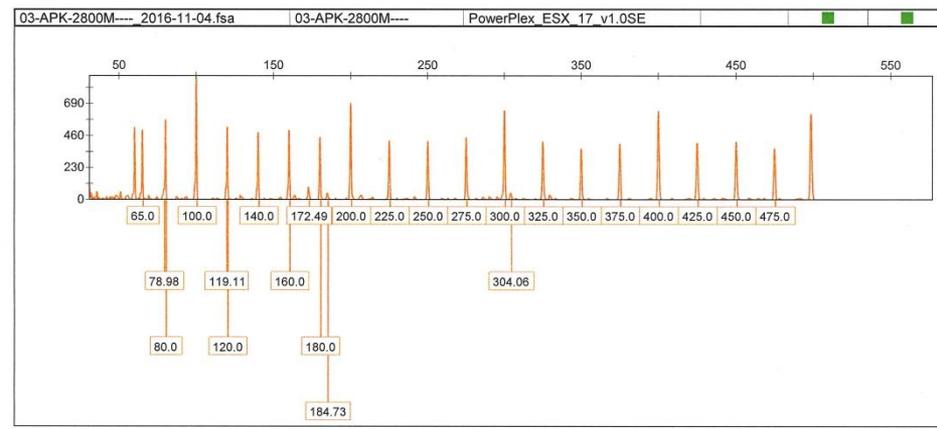
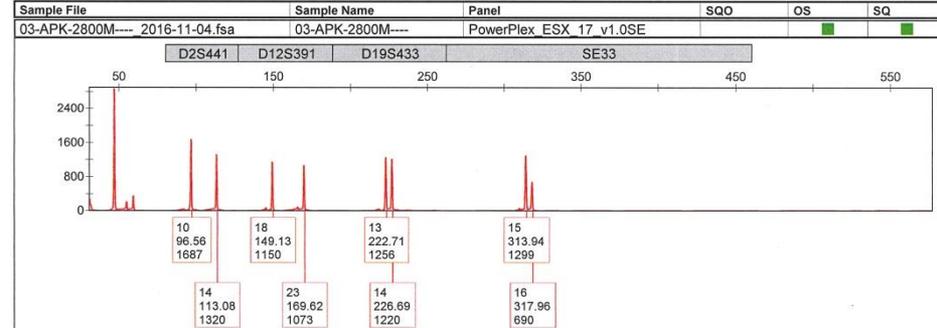
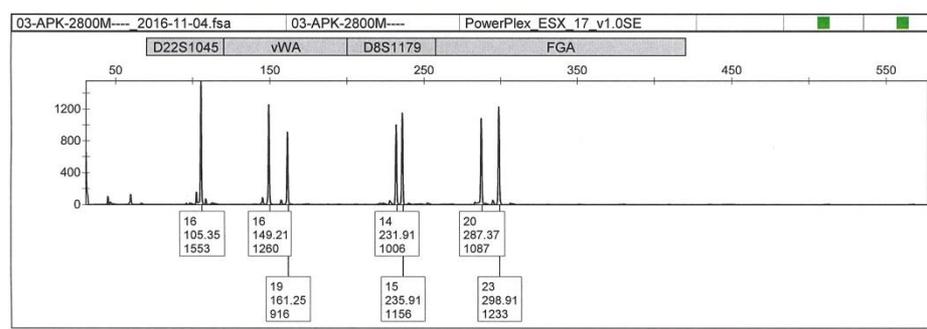
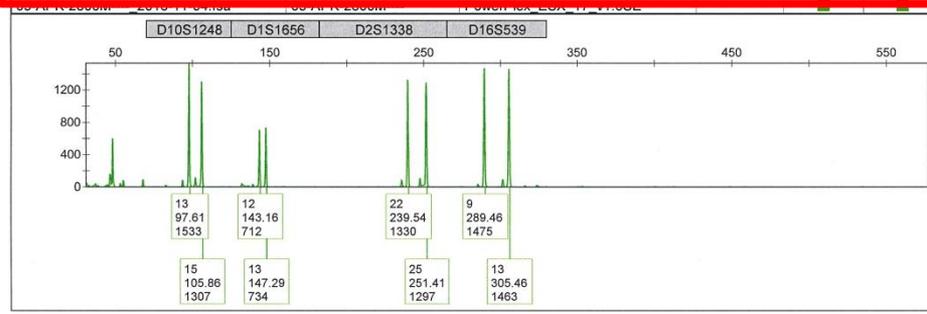
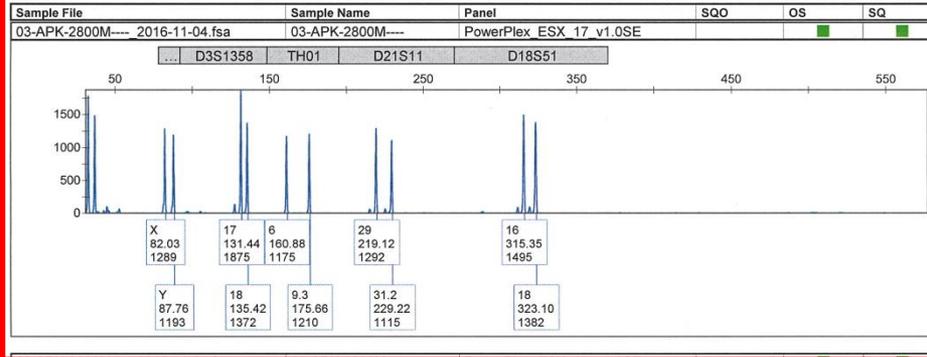
Interner Längenstandard

# Elektropherogramm (EPG)

## blauer Kanal

Auftrennung

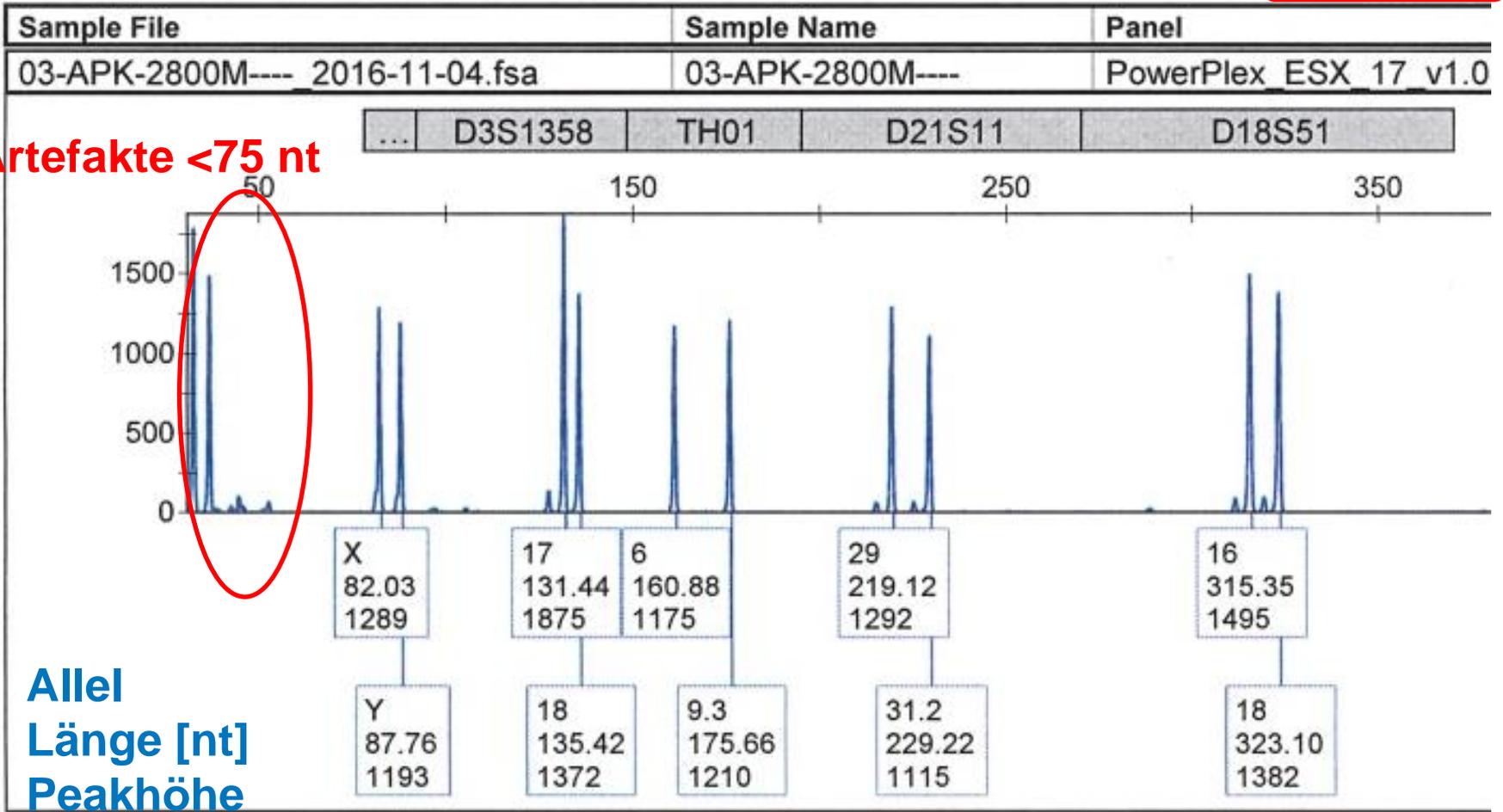
Daten



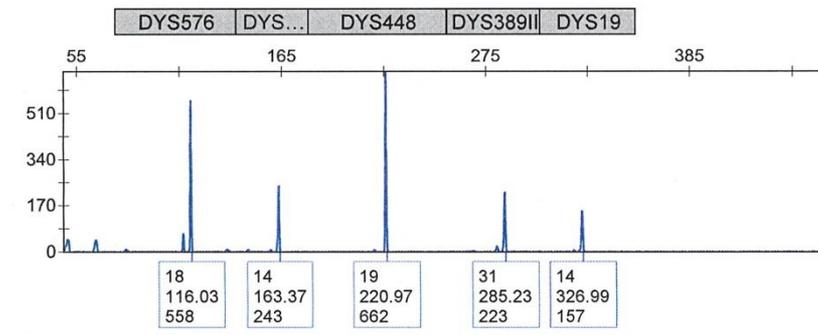
# Elektropherogramm (EPG)

Auftrennung

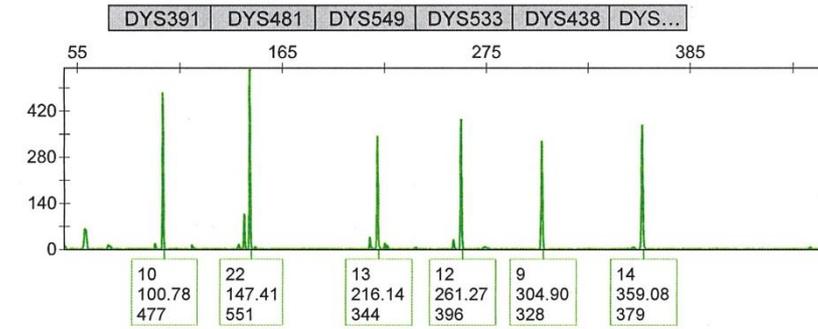
Daten



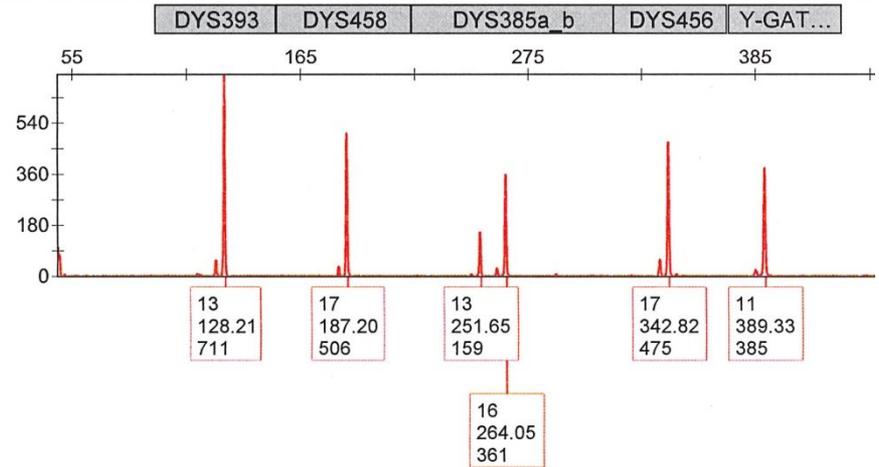
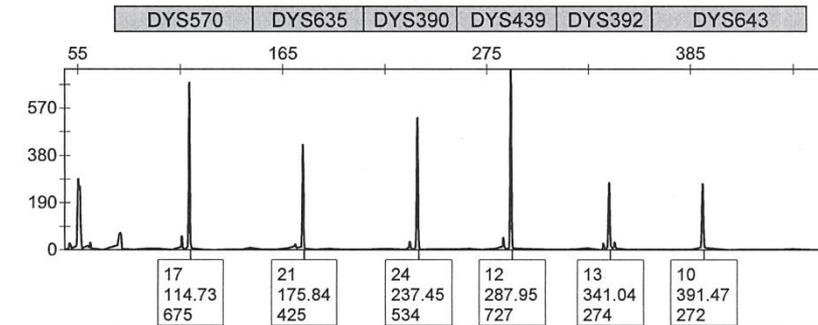
# Exkurs: EPG Y-chromosomale STR



PK-XY1---- 2014-05-14.fsa 93-APK-XY1---- Prototype PowerPlex Y 23 v1.0

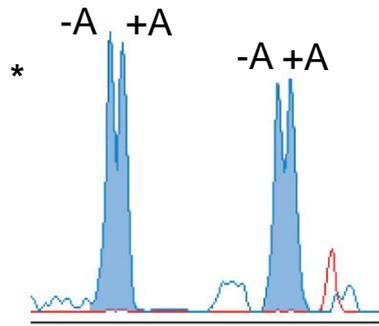


PK-XY1---- 2014-05-14.fsa 93-APK-XY1---- Prototype PowerPlex Y 23 v1.0

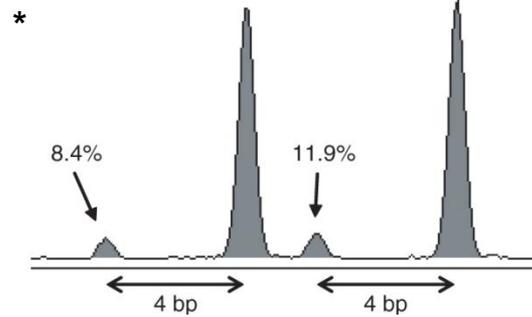


**Haploide Marker  
idR 1 Allel pro Locus**

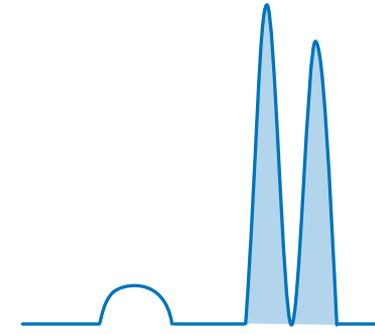
# 5 Artefakttypen



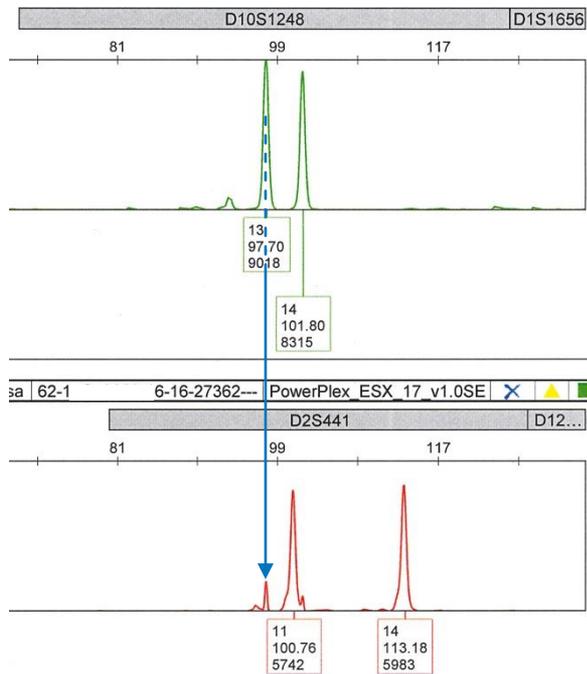
split peaks



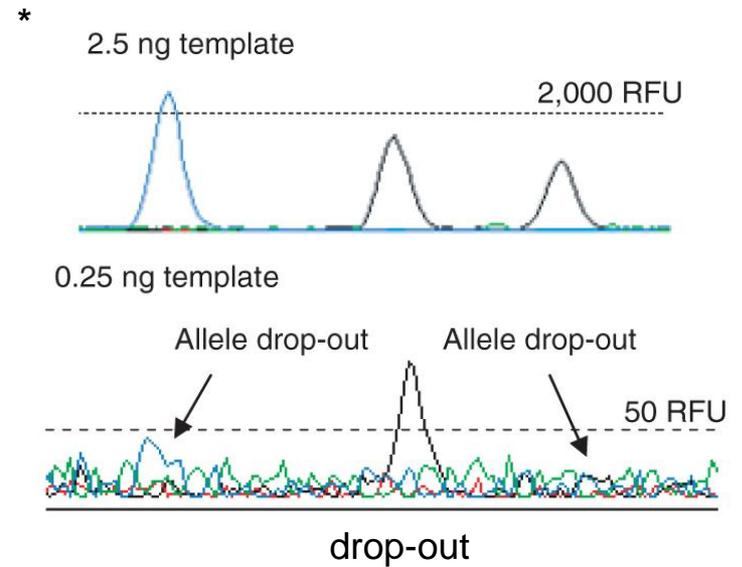
stutter



dye blob



pull up



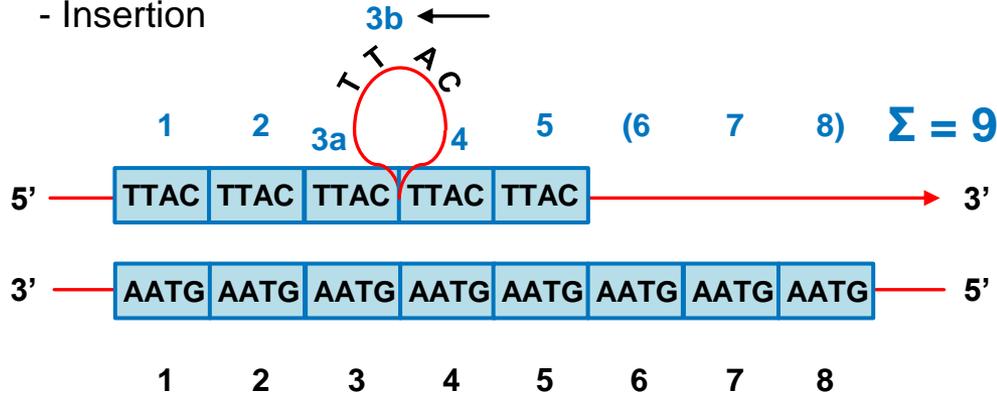
\* Goodwin *et al.*, 2009

# Mechanismus der *stutter*-Bildung

- **Nachstutter** durch *backward slipping*

- „Zurückrutschen“ des naszierenden Strangs um ein *repeat*

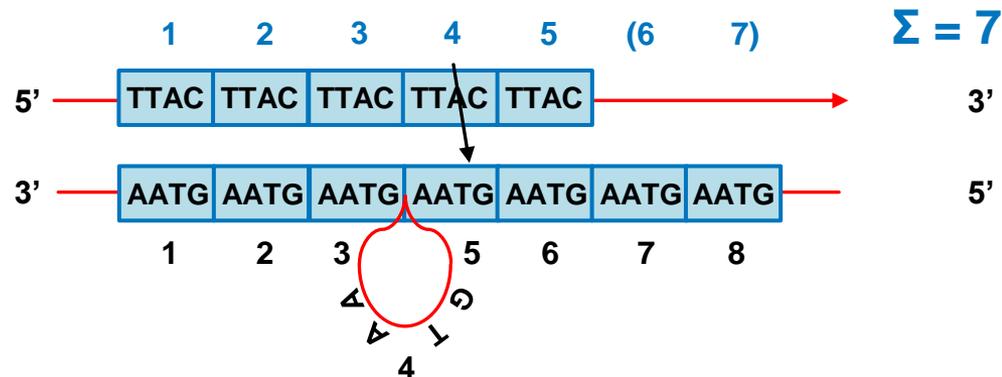
- Insertion



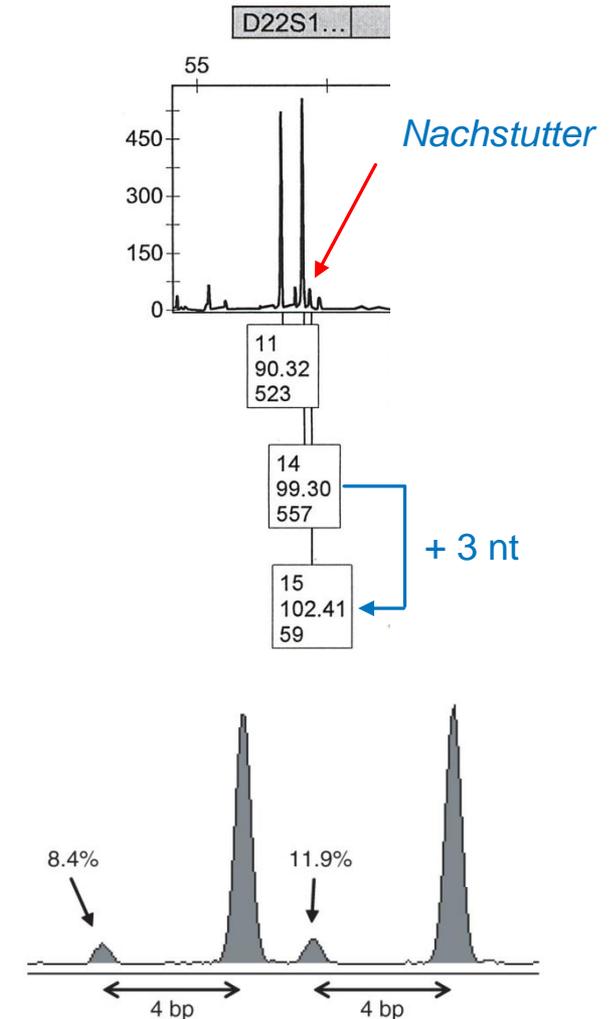
- **Vorstutter** durch *forward slipping*

- „Vorrutschen“ \* des naszierenden Strangs um ein *repeat*

- Deletion

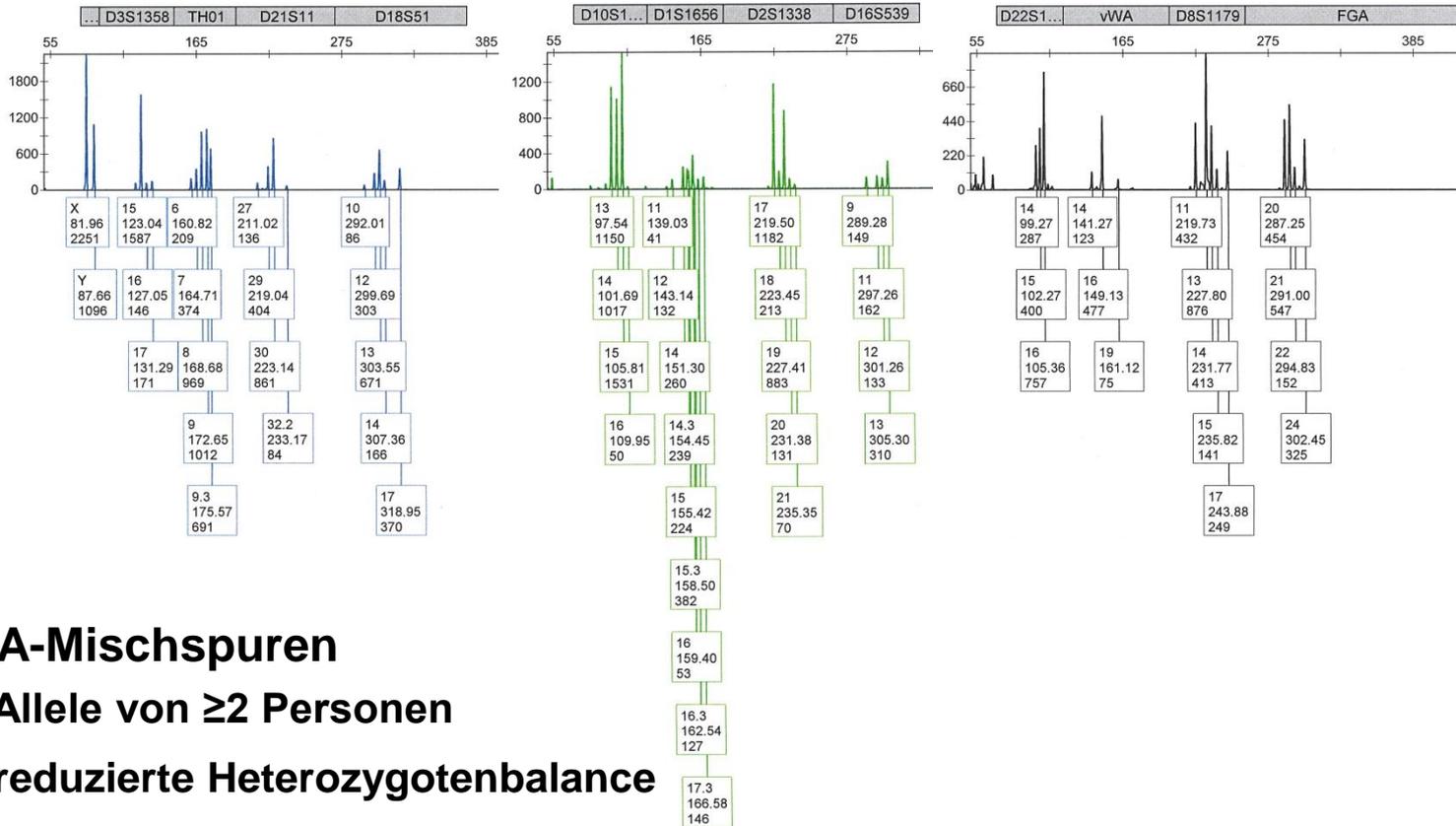


D22S1045 Trinukleotid-repeat



\* „Zurückrutschen“ des *template*-Strangs um ein *repeat*

# Mischspuren



- **DNA-Mischspuren**
  - Allele von  $\geq 2$  Personen
  - reduzierte Heterozygotenbalance
  - erhöhte *drop-out*-Wahrscheinlichkeit
  - additive Peakhöhen
  - stochastische Effekte

SpuKo `06

Eine Spur, die **mehr als zwei Allele in einem DNA-System** aufweist, kann i.d.R. als Mischspur bezeichnet werden, sofern keine genetischen Besonderheiten (z.B. Trisomie, somatischer Mosaizismus, Duplikation) vorliegen.

**Wenn mehr als zwei Allele in mindestens zwei DNA-Systemen auftreten, ist von einer Mischspur auszugehen.**

- DNA-Mischspuren

**Zeitpunkt & Modus (*activity level*) der Antragung einer Komponente idR nicht ohne Weiteres erkennbar**

**Aussagen zum source level möglich**

PG Bio/SpuKo `16

## Spurenqualität

...prüfen, ob in allen MMS **belastbare** (Grad der Reproduzierbarkeit der erhobenen Merkmale & der gemessenen Signalintensitäten) und sich nicht widersprechende Analyseergebnisse vorliegen.

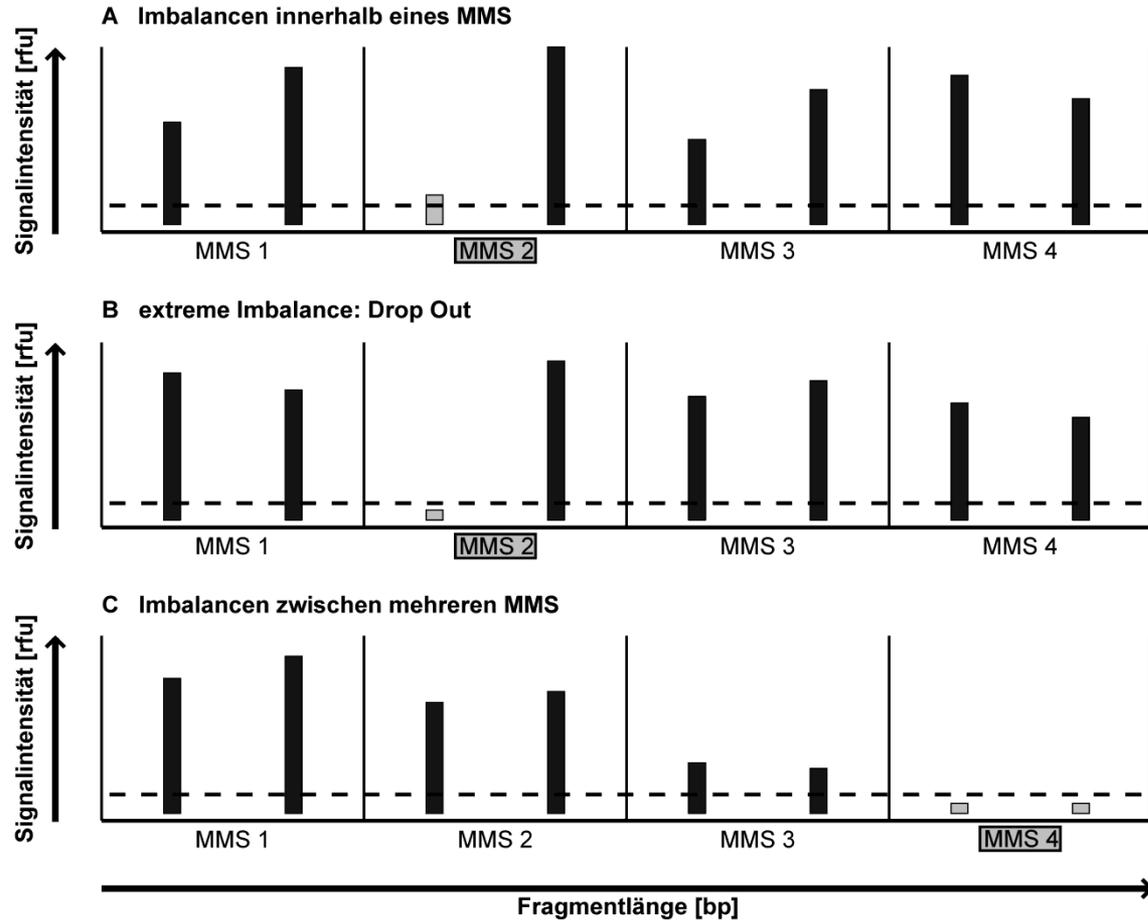
**DNA-Konzentrationsmessungen liefern zusätzliche Informationen.**

Verbesserung der Befundlage durch weitere Untersuchung des DNA-Extraktes ?

# Imbalancen bei Minimal Spuren

PG Bio/Spuko `16

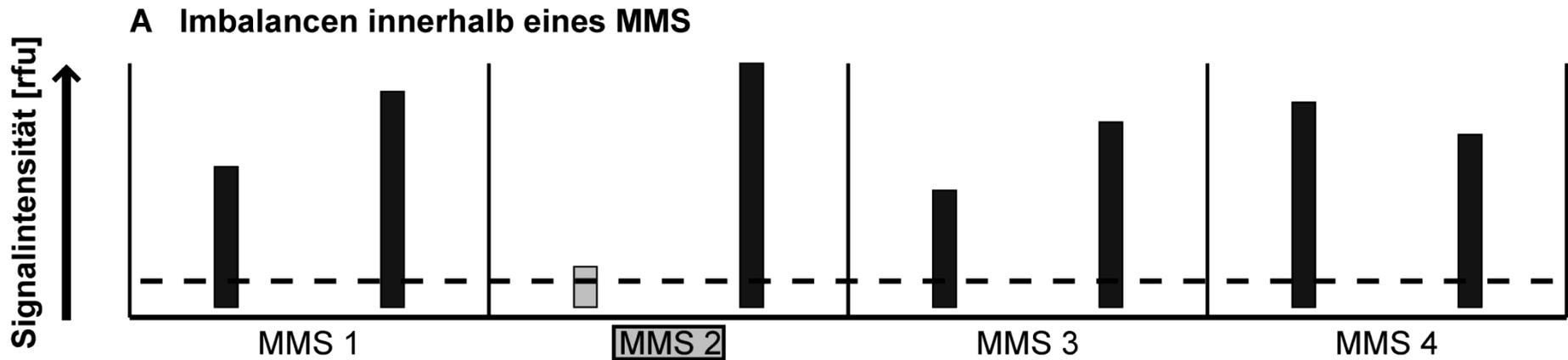
Einzelne  
MMS nicht  
auswertbar



Legende	
- - -	Nachweisgrenze
■	zu wertendes Allel
□	fragliches Allel an der Schwelle zur Nachweisgrenze
MMS	Merkmalssystem berechenbar
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MMS</span>	Merkmalssystem nicht berechenbar

# Imbalancen bei Minimal Spuren

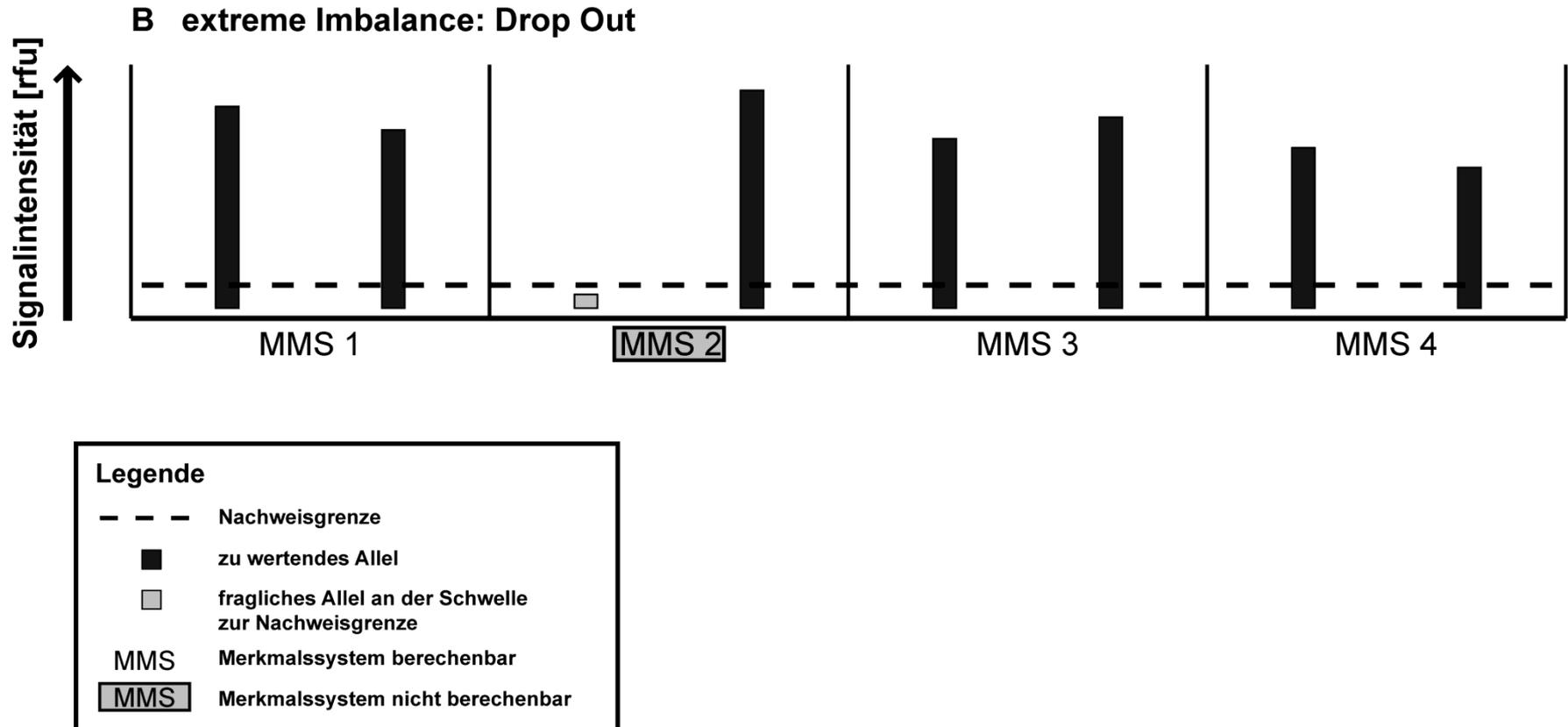
PG Bio/Spuko `16



Legende	
---	Nachweisgrenze
■	zu wertendes Allel
□	fragliches Allel an der Schwelle zur Nachweisgrenze
MMS	Merkmalssystem berechenbar
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MMS</span>	Merkmalssystem nicht berechenbar

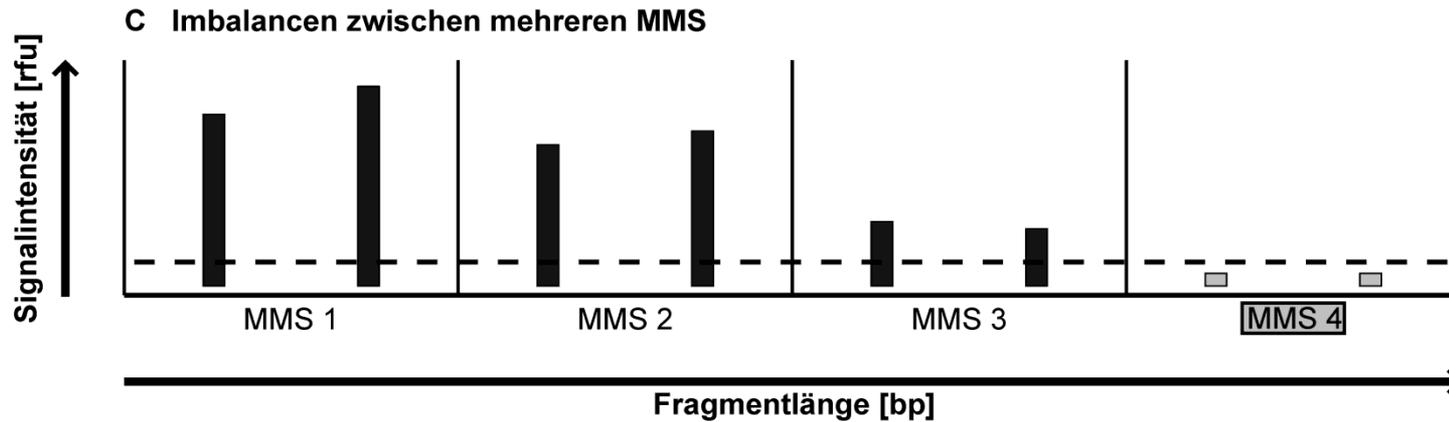
# Imbalancen bei Minimal Spuren

PG Bio/SpuKo `16



# Imbalancen bei Minimal Spuren

PG Bio/Spuko `16



## Legende

- - - Nachweisgrenze
- zu wertendes Allel
- fragliches Allel an der Schwelle zur Nachweisgrenze
- MMS Merkmalssystem berechenbar
- MMS Merkmalssystem nicht berechenbar

SpuKo `06

Bei Mischspuren muss – sofern möglich – die Zahl der unterschiedlichen Spurengeräte geklärt werden:

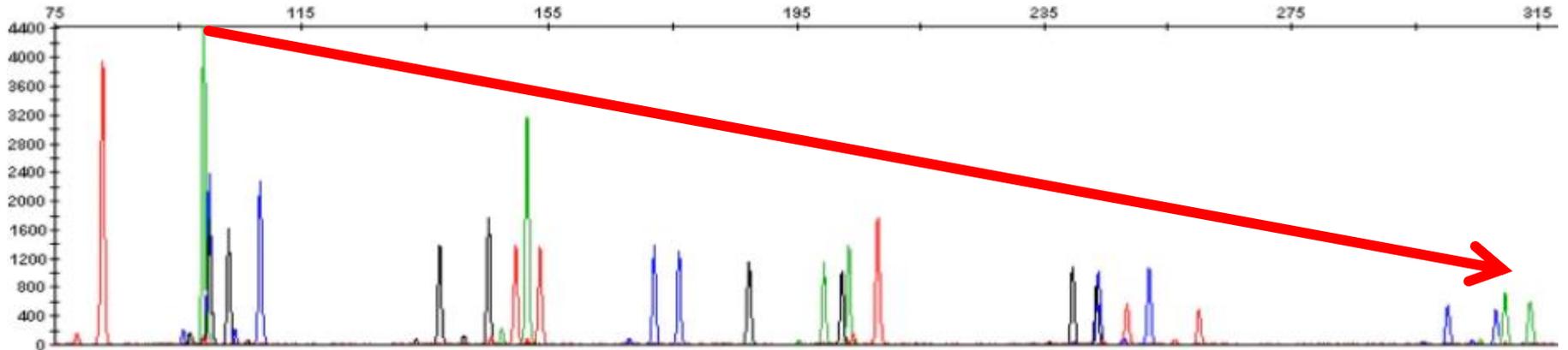
- im Allgemeinen lässt der Nachweis von max. 4 Allelen/System auf mind. 2 unterschiedliche Spurengeräte schließen.
- im Allgemeinen lässt der Nachweis von max. 6 Allelen/System auf mind. 3 unterschiedliche Spurengeräte schließen.
- im Allgemeinen ist die Festlegung auf die genaue Anzahl der Spurengeräte bei mehr als 6 Allelen/System nicht sinnvoll und nicht möglich.

**Typ A:** kein eindeutiger Hauptverursacher, keine Ergebnisse im stochastischen Bereich.

**Typ B:** deutlich unterscheidbarer Haupt- und Nebenverursacher; durchgängiges Mindest-Verhältnis der Peakhöhen von ca. 4:1 (Haupt- zu Nebekomponente) für alle heterozygoten Systeme; keine stochastischen Phänomene.

**Typ C:** Mischspuren ohne deutliche(n) Hauptverursacher und mit Ergebnissen im stochastischen Bereich.

degradierte DNA – **Ski-Schanz-Effekt (ski slope)**



**Reinspur vs Mischspur**

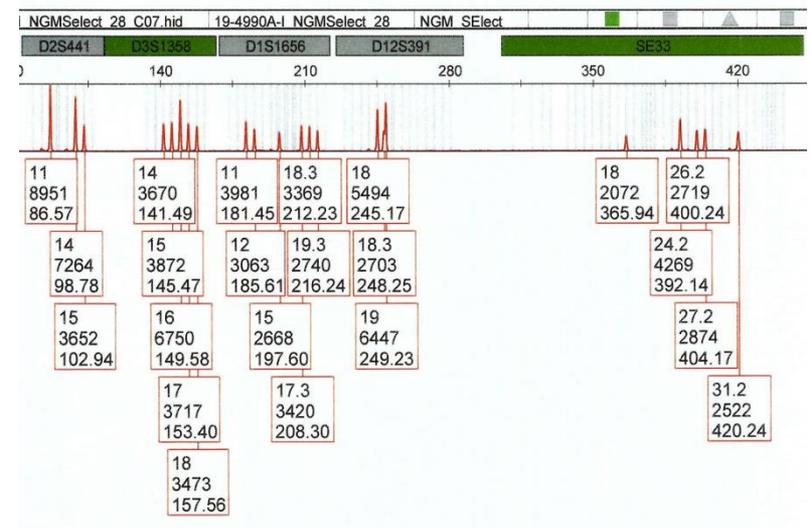
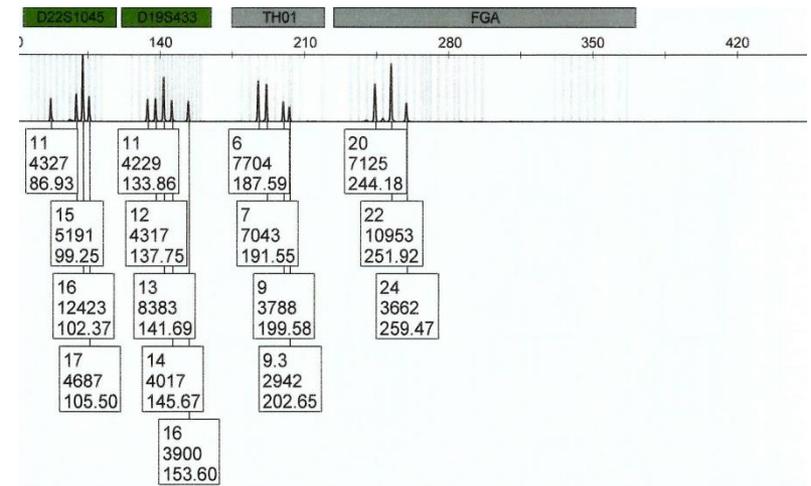
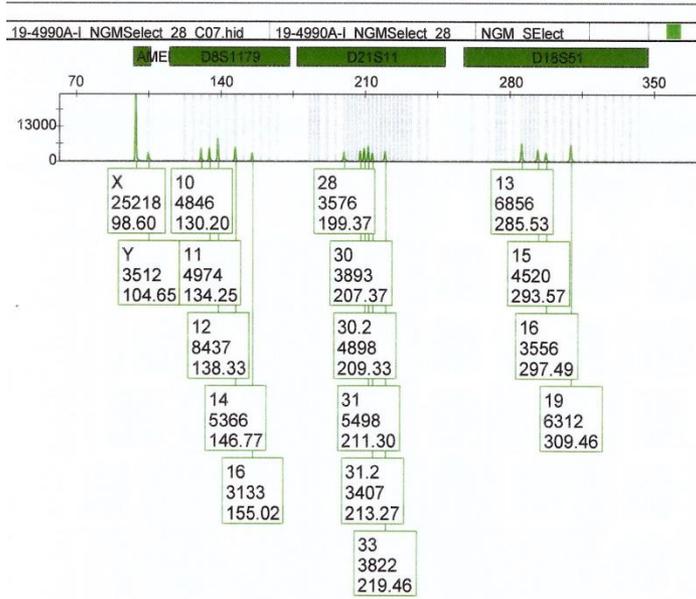
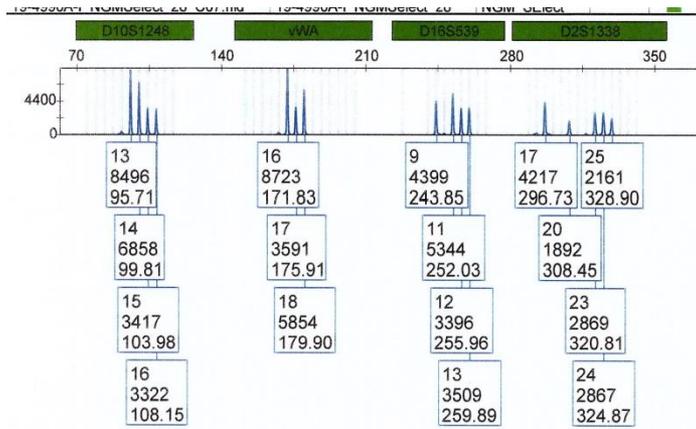
**Spur mit Inhibitor**

**Degradierte Spur / Degradierte Mischungskomponente**

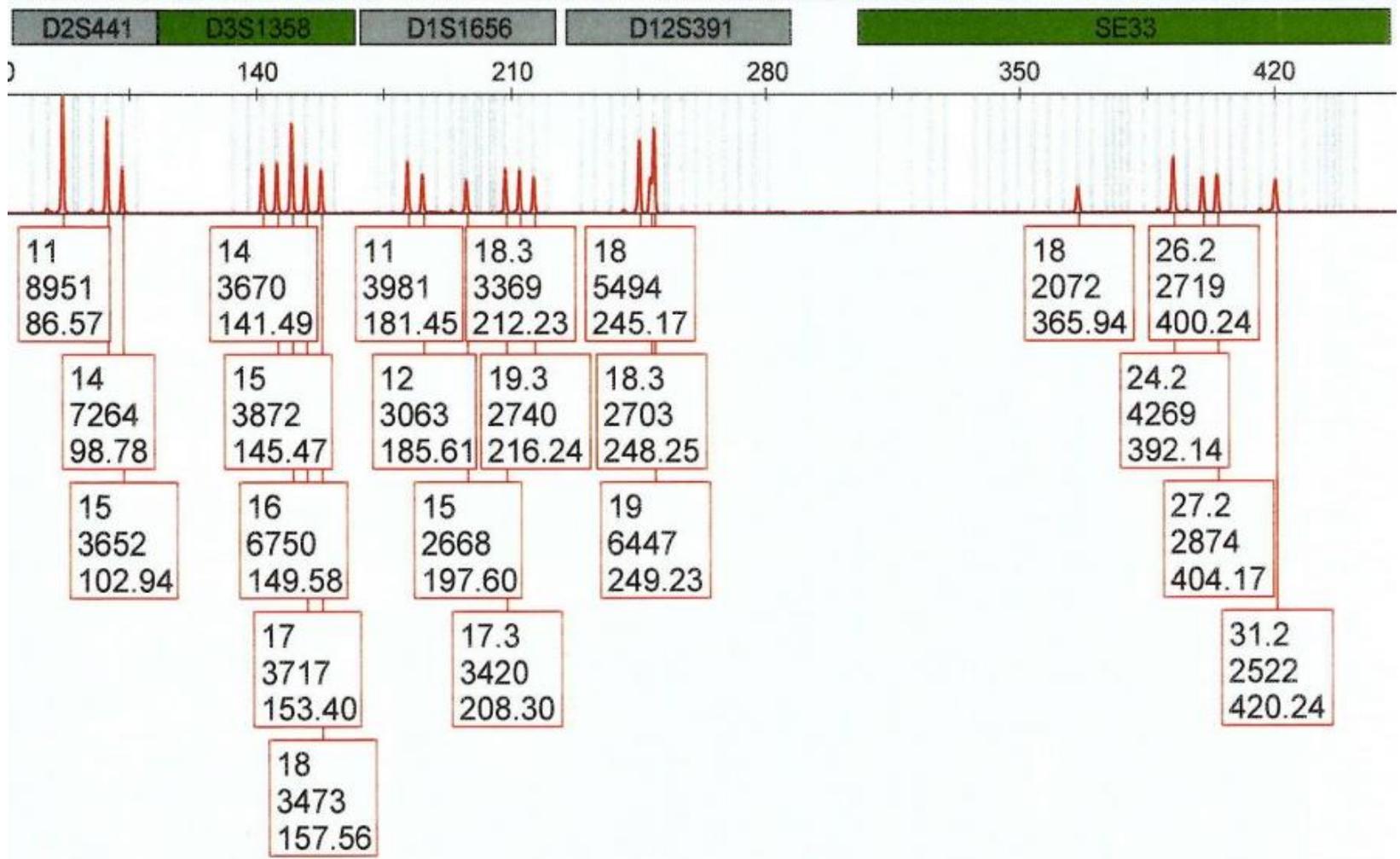
**Minimalspur (geringe DNA-Menge)**

**Mischspur mit deduzierbarer Komponente (HK/NK)**

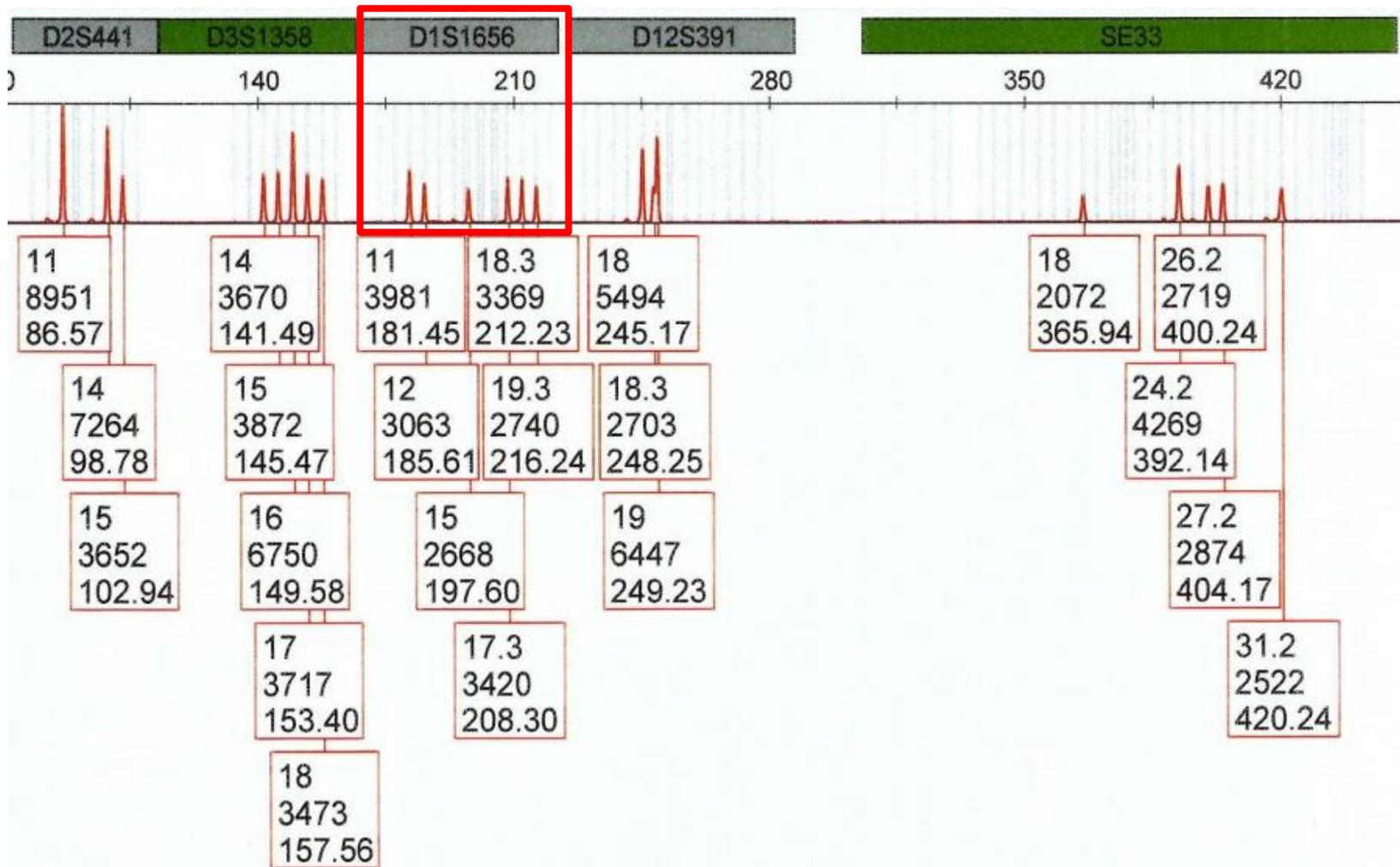
# GEDNAP 58 Spur 3 – 10 µl Blutmix **Mischspur Typ A**



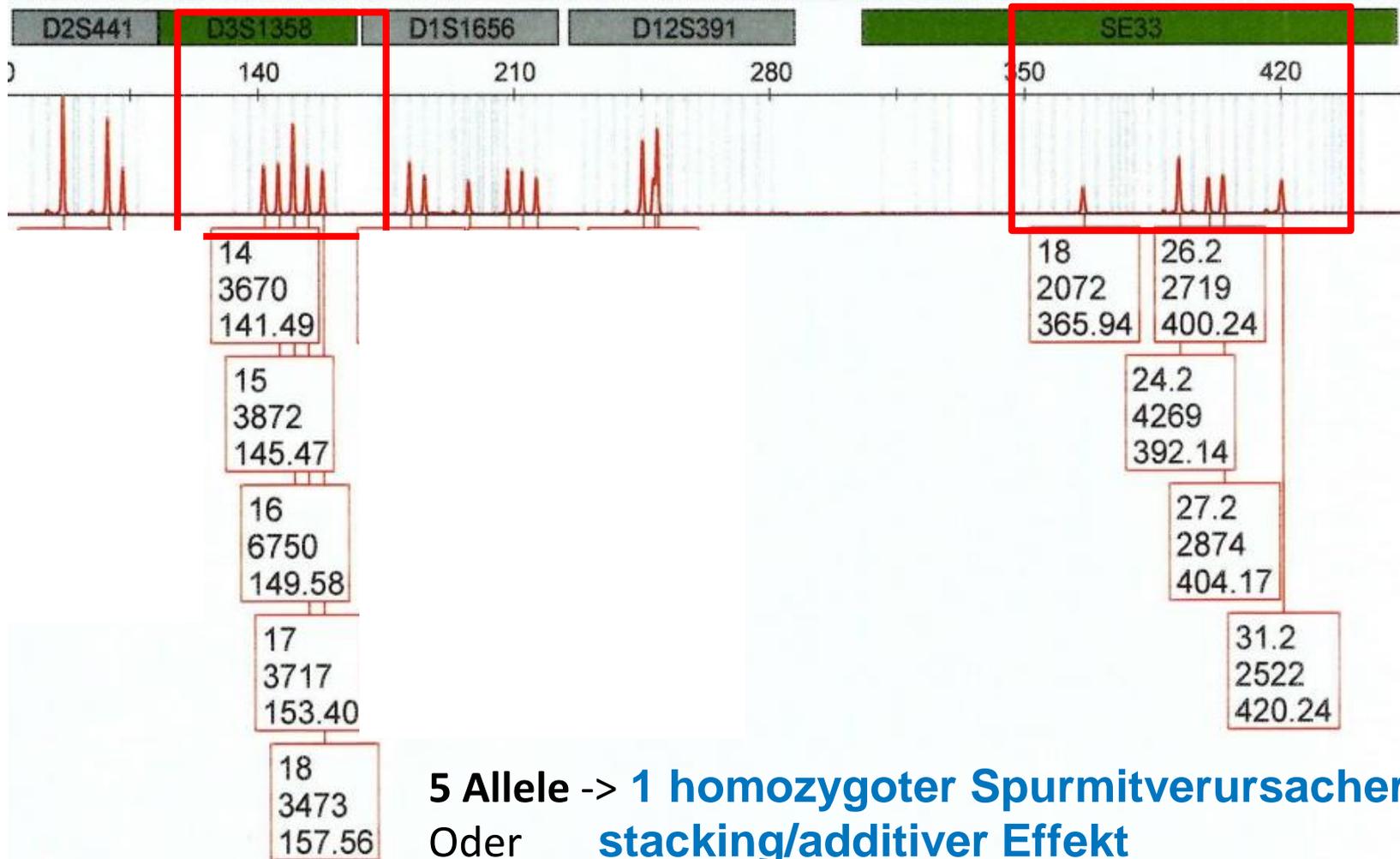
# GEDNAP 58 Spur 3 – 10 µl Blutmix **Mischspur Typ A**



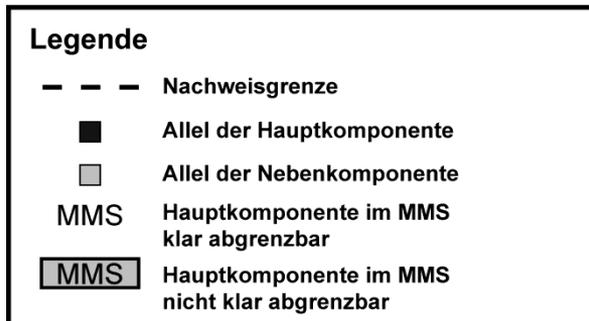
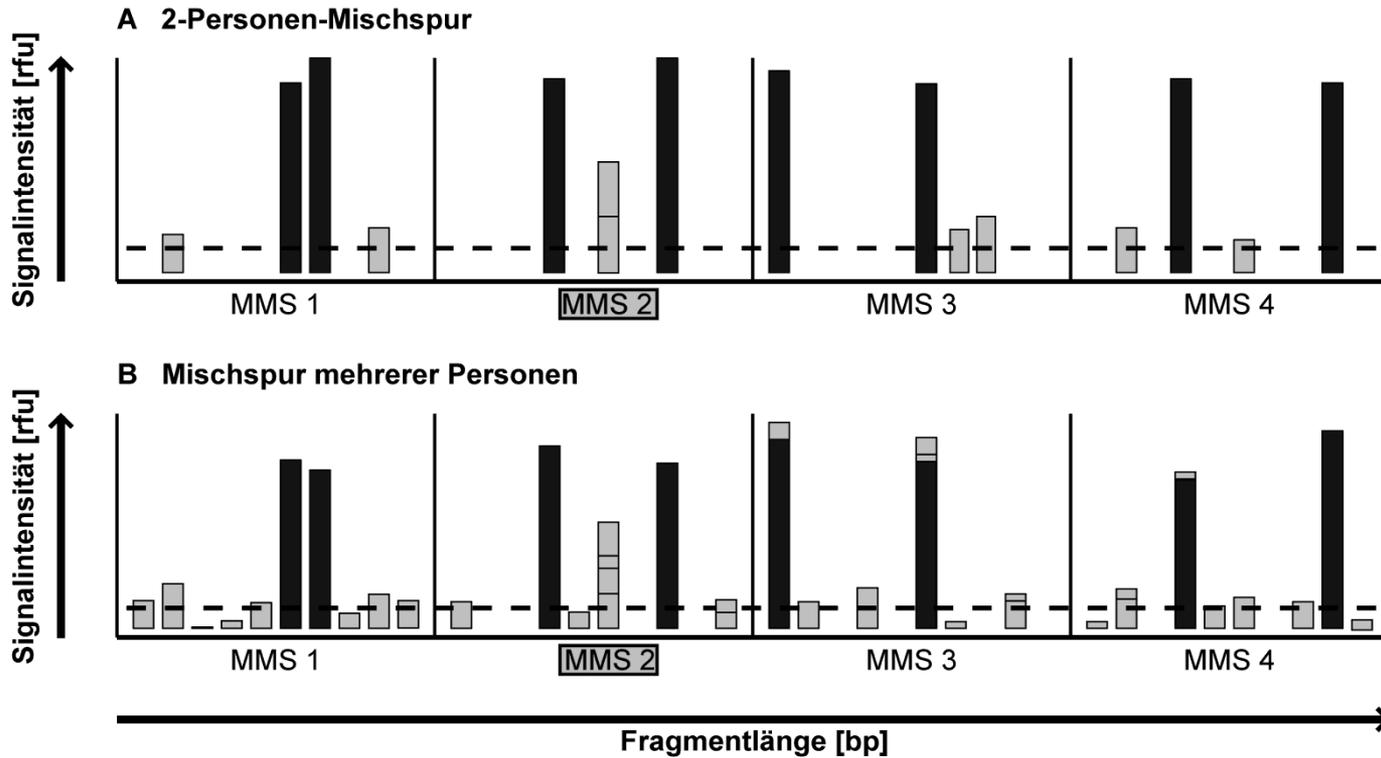
# GEDNAP 58 Spur 3 – 10 µl Blutmix (1m+1w+1w) **Mischspur Typ A**



6 Allele -> **3 Spurmitverursacher**



# stacking/additiver Effekt bei Mischspuren



# Mischspur Typ A

---

Ohne Vergleichsperson: **keine Ableitung eines DAD-Meldebogens**

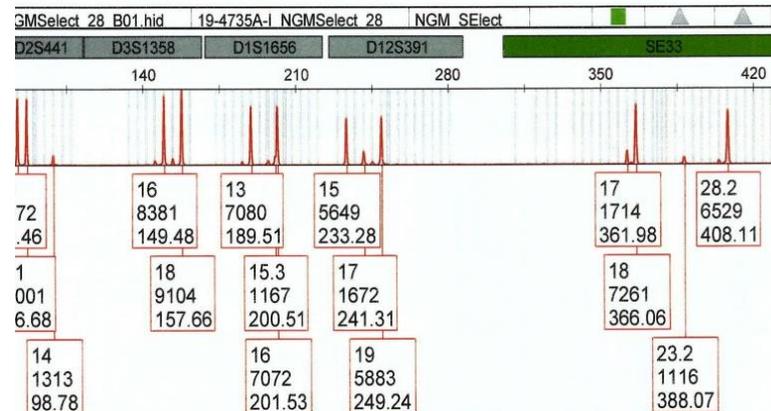
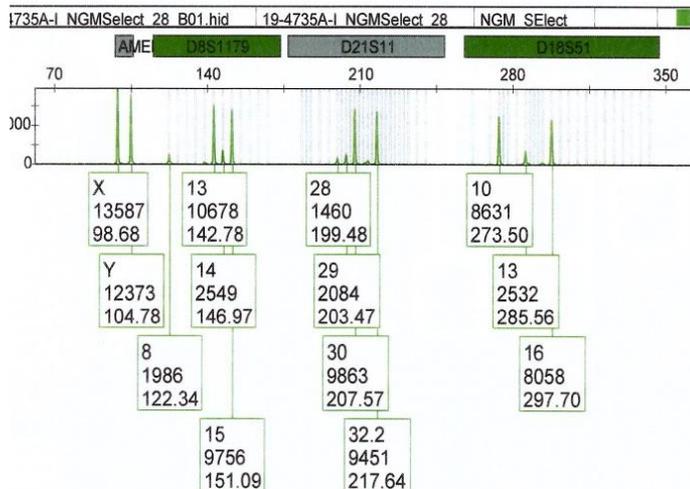
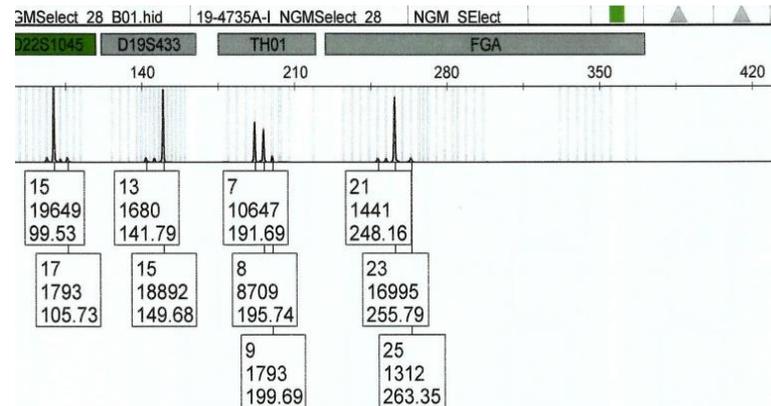
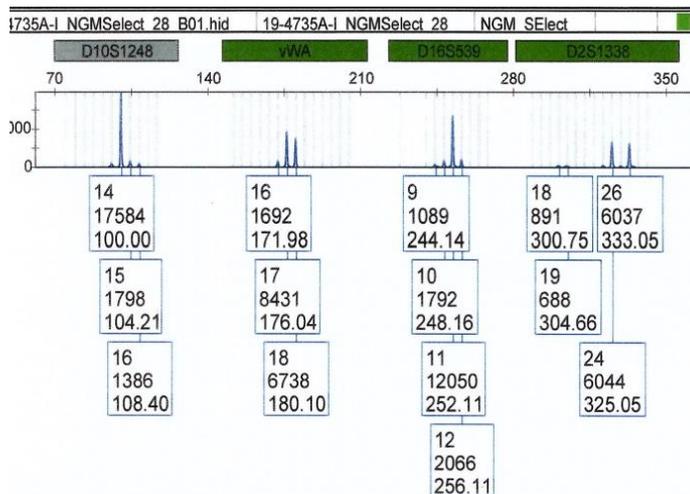
Mit Vergleichsperson(en): **Direktvergleich (Biostatistik), Ableitung eines Differenz-Profiles**

Ohne Vergleichsperson: **DAD-Recherche einer 2 Person-Mischspur**

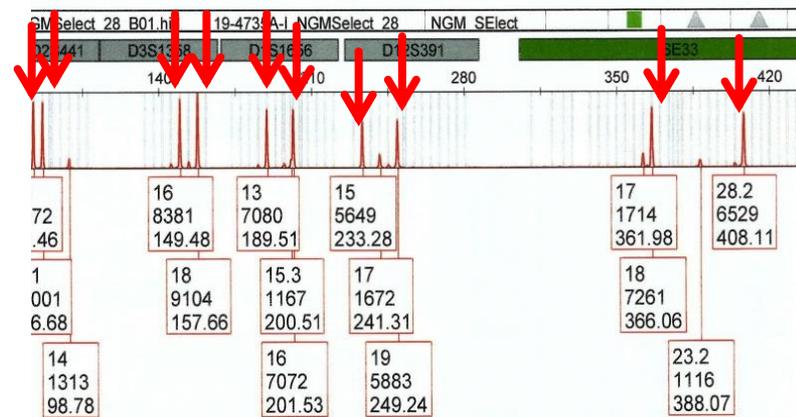
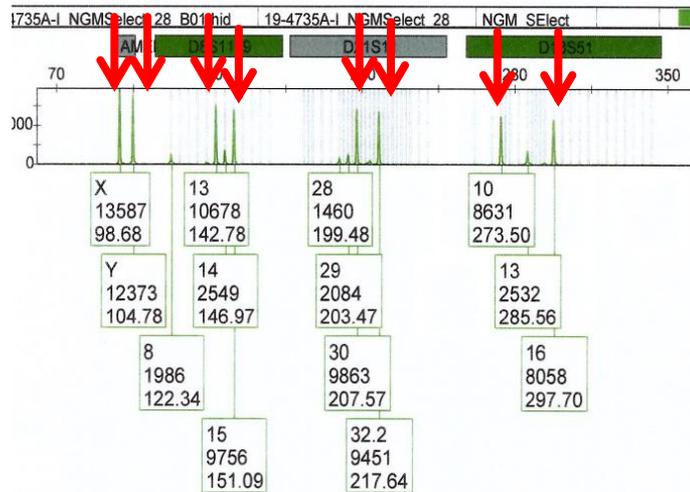
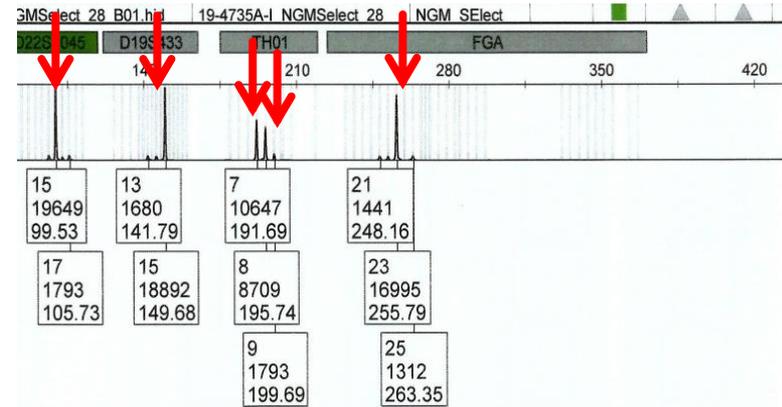
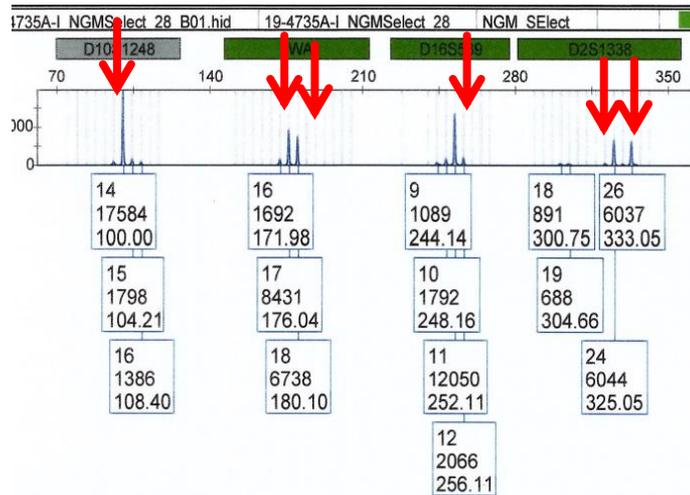
Ohne Vergleichsperson: **NEU Recherche in der DAD, smart rank**

**Typ B:** deutlich unterscheidbarer Haupt- und Nebenverursacher; durchgängiges Mindest-Verhältnis der Peakhöhen von ca. 4:1 (Haupt- zu Nebenkomponente) für alle heterozygoten Systeme; keine stochastischen Phänomene.

# GEDNAP 58 Spur 2 – 20 µl Blut **Mischspur Typ B**



# GEDNAP 58 Spur 2 – 20 µl Blut **Mischspur Typ B**



Ohne Vergleichsperson: **Ableitung eines DAD-Meldebogens**

Ohne Vergleichsperson: **Ableitung eines DAD-Meldebogens**

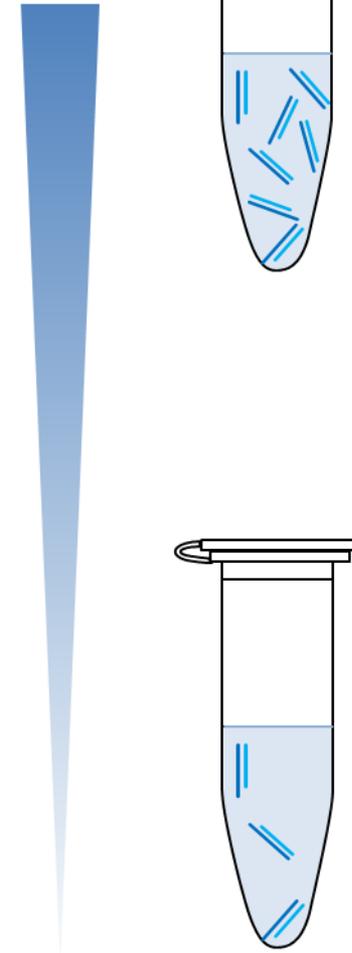
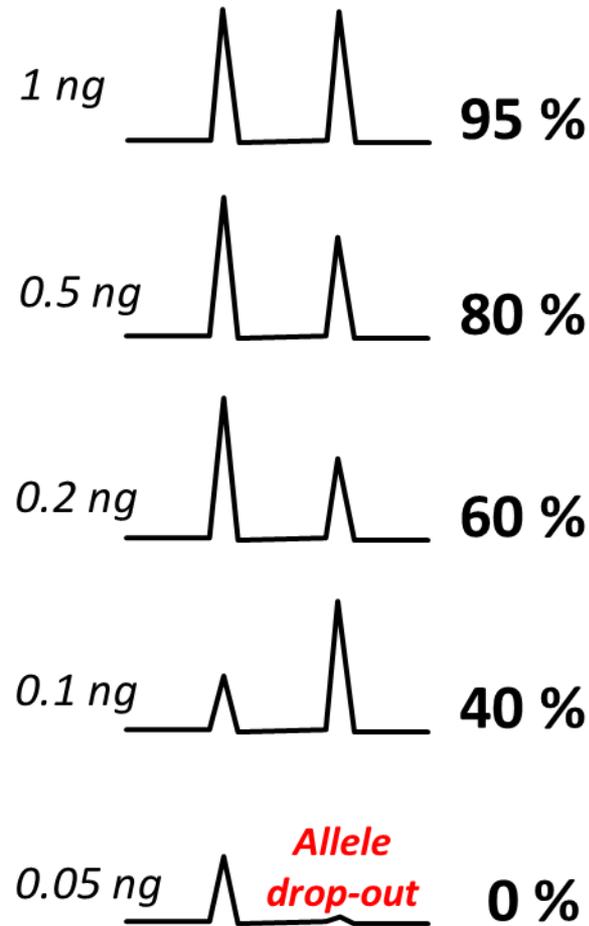
Mit Vergleichsperson(en): **Direktvergleich (Biostatistik  
Hauptkomponente wie Einzelspur)**

**Typ C:** Mischspuren ohne deutliche(n) Hauptverursacher und mit Ergebnissen im stochastischen Bereich.

Durch Amplifikation von Proben mit geringer DNA-Quantität und/oder Qualität entstandene DNA-Profile, bei denen Verdacht auf **allelic drop out** und/oder **locus drop out** besteht.

# Heterozygotenimbalance: Peakvarianzen

- Hb variiert nach - **Konzentration**<sub>[Template-DNA]</sub>

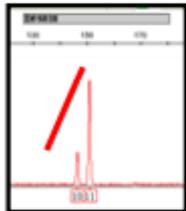


nach Butler J.M. (2015); erweitert

# Typ C: Mischspuren ohne deutliche(n) Hauptverursacher und mit Ergebnissen im stochastischen Bereich

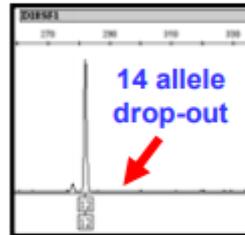
## Loss of True Signal (False Negative)

Heterozygote  
Peak Imbalance



Identifiler, 30 pg  
DNA, 31 cycles

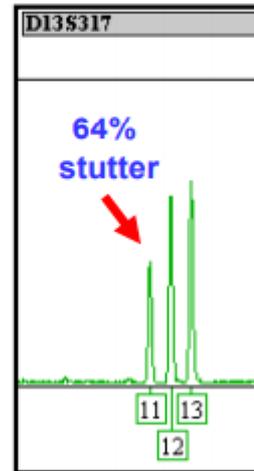
Allelic  
Drop-out



Identifiler, 30 pg  
DNA, 31 cycles

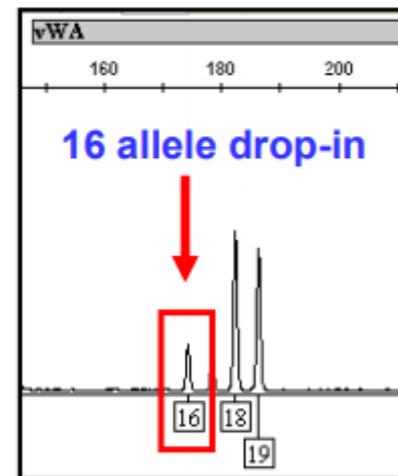
## Gain of False Signal (False Positive)

Higher Stutter



Identifiler, 10 pg  
DNA, 31 cycles

Allelic Drop-in



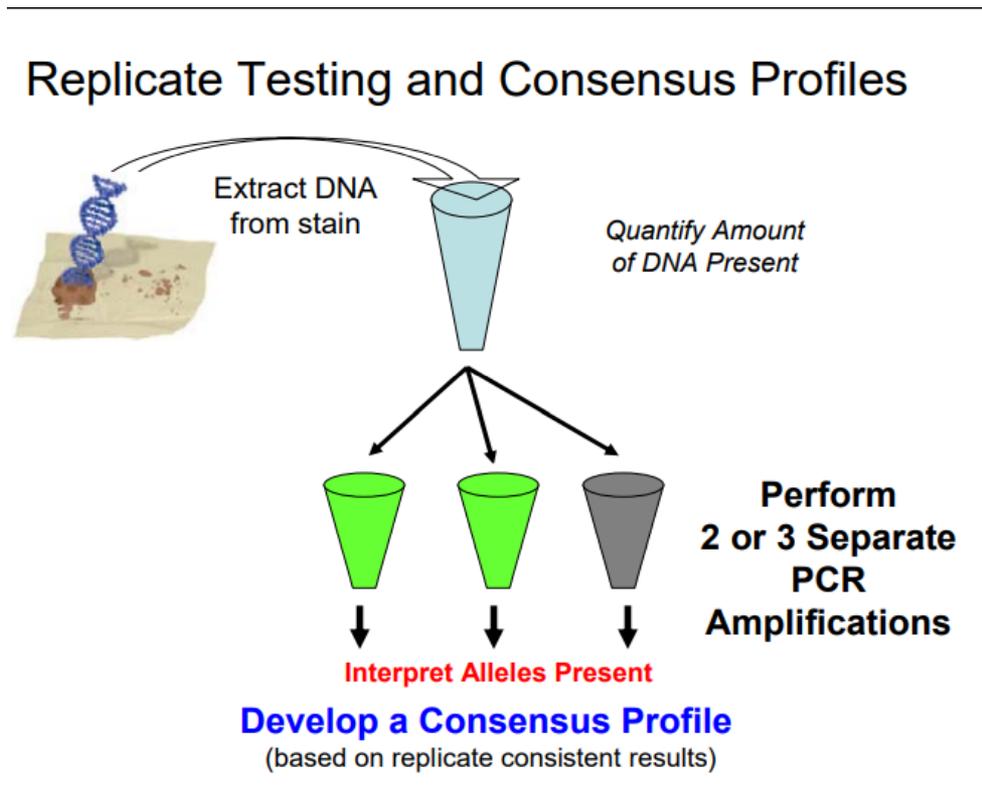
Identifiler, 10 pg  
DNA, 31 cycles

**Typ C:** Mischspuren ohne deutliche(n) Hauptverursacher und mit Ergebnissen im stochastischen Bereich.

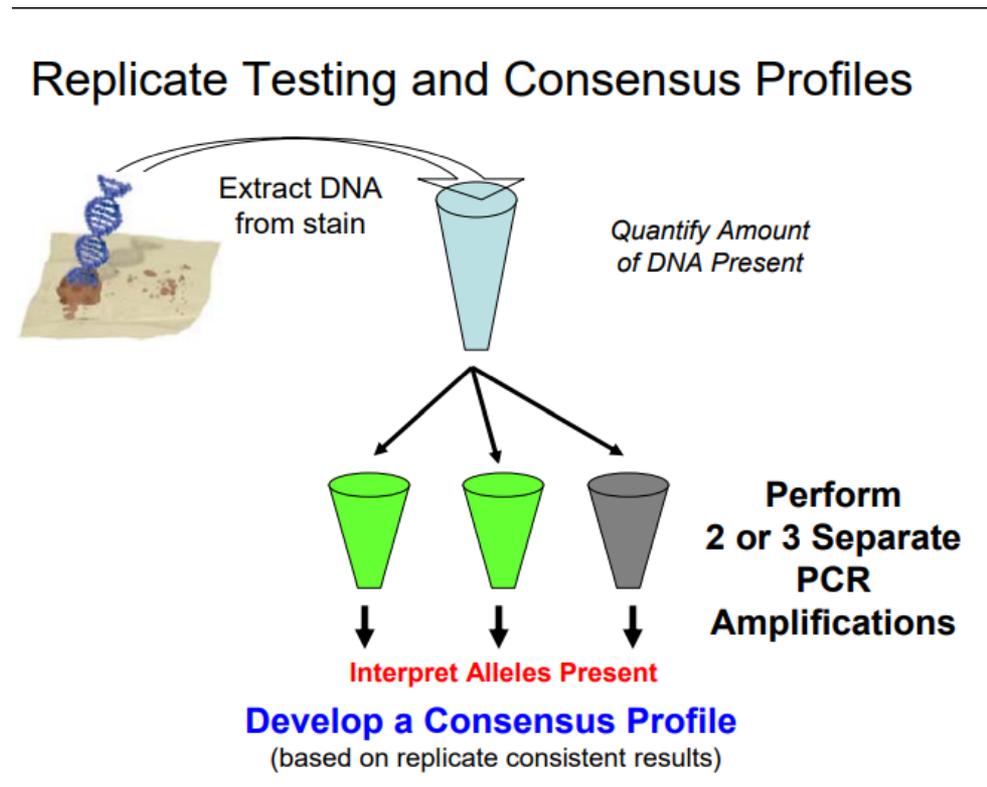
...aufgrund der Komplexität der Mischung hinsichtlich der Mengenverhältnisse mit drop out Ereignissen zu rechnen, die eine eindeutige Festlegung in Bezug auf Ein- oder Ausschluss über alle betrachteten DNA-Systeme erschweren können.

Die Entscheidung zwischen Einschluss und Ausschluss muss im Einzelfall erfolgen und verbal präzisiert und differenziert dargestellt werden; ggf. muss ausgedrückt werden, dass eine eindeutige Entscheidung nicht möglich ist.

**Typ C:** Mischspuren ohne deutliche(n) Hauptverursacher und mit Ergebnissen im stochastischen Bereich.

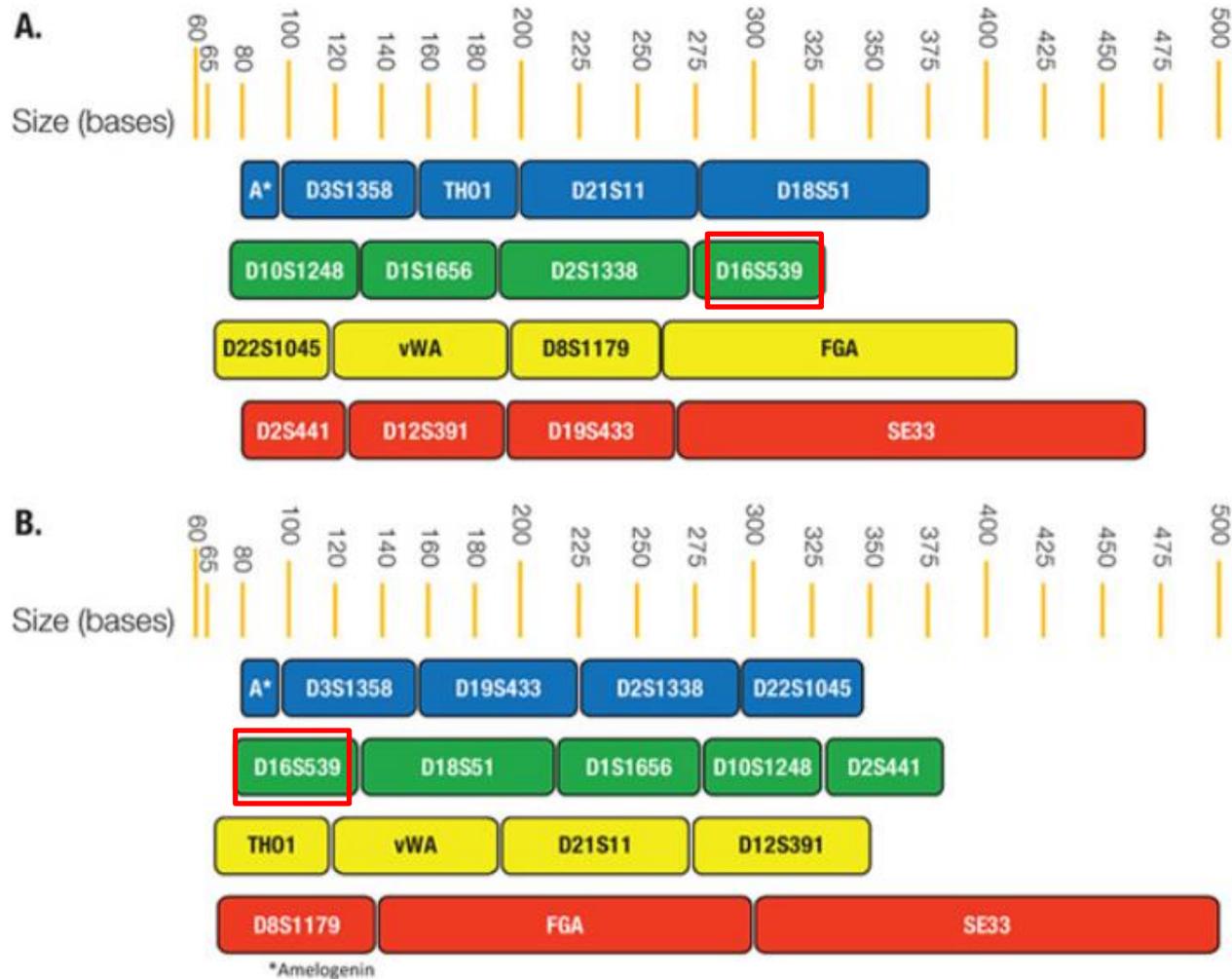


**Typ C:** Mischspuren ohne deutliche(n) Hauptverursacher und mit Ergebnissen im stochastischen Bereich.



Bei degradiertem DNA: **2 x 2 PCR mit unterschiedlichen Kits**

Bei degradierteter DNA: **2 x 2 PCR** mit unterschiedlichen Kits



**Typ C:** Mischspuren ohne deutliche(n) Hauptverursacher und mit Ergebnissen im stochastischen Bereich.

**Nach welchem Verfahren werden die Befunde in der Tabelle erhoben?**

Consensus oder composite?

**Kann gerechnet werden?**

**Binär [RMNE oder LQ]?**

**Einsatz probabilistischer Software?**

**Folgender Vortrag von Katja Anslinger**

---

## forensische Genetik – quo vadis?

- **NGS/MPS in der forensischen DNA-Analyse** [Technologie]
- **Kontinuierliche, probabilistische Modelle** [Statistik]
- ***Forensische DNA-Phänotypisierung*** [Recht]

## • MPS vs CE

[Technologie]

- Hochdurchsatz-Sequenzierung
- Verschiedene Hersteller mit verschiedenen Sequenziermechanismen
  - Pyrosequencing, sequencing-by-synthesis, Halbleitertechnologie...
- Anzahl der Sequenzen vs Fluoreszenzintensität

Methode	Vorteile	Nachteile
CE	<ul style="list-style-type: none"><li>• Etabliertes Verfahren</li><li>• Einfacher Arbeitsablauf</li><li>• Vor Gericht akzeptiert</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>begrenzt Multiplex-fähig</b></li><li>• Komplexe Mischspur-Analyse</li><li>• Genotypisierung <b>nur</b> auf Sequenzlänge beruhend</li></ul>
MPS	<ul style="list-style-type: none"><li>• Genotypisierung auf <b>Länge UND Sequenz</b> beruhend</li><li>• <b>hohe Multiplex-Fähigkeit</b></li><li>• Potential zur besseren Mischspuren-Analyse<ul style="list-style-type: none"><li>• Analyse kleinerer Amplikons möglich</li></ul></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hohe Kosten pro Probe</li><li>• Große Datenmengen generierend</li><li>• Zusammenführen von Proben zur Kostenreduzierung</li><li>• Wenige Guidelines/Konventionen</li></ul>

### Fazit:

→ MPS ergänzt CE, aber ersetzt sie noch nicht

# massively parallel sequencing in der forensischen DNA-Analyse

FOASTR beta

DASHBOARD

ANALYSES

PANELS

MANUAL



CALLLED READS ⓘ

3199

STUTTER THRESHOLD ⓘ

10 %

AUTOSOMAL

D1S1656

D2S1338

D2S441

D3S1358

FGA

CSF1PO

SE33

D7S820

D8S1179

D10S1248

TH01

D12S391

VWA

D13S317

PENTA E

D16S539

D18S51

**D19S433**

D21S11

PENTA D

SEX TYPING

AMEL

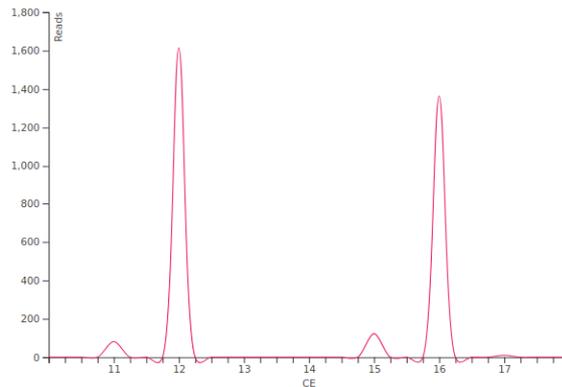
← back to run summary

59PA ▾ / **D19S433**

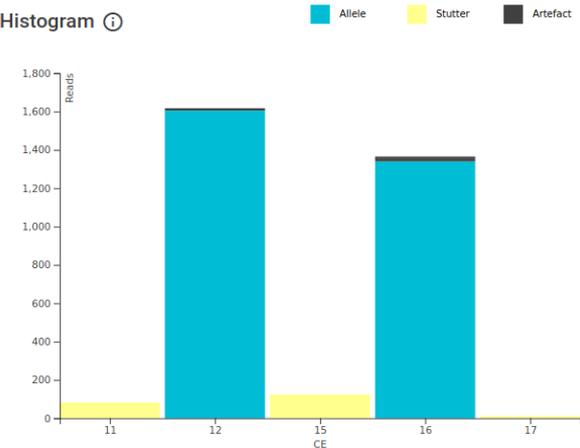
ANALYTICAL THRESHOLD 10 reads

CALLING THRESHOLD 2 % (63 reads)

Electropherogram ⓘ



Histogram ⓘ

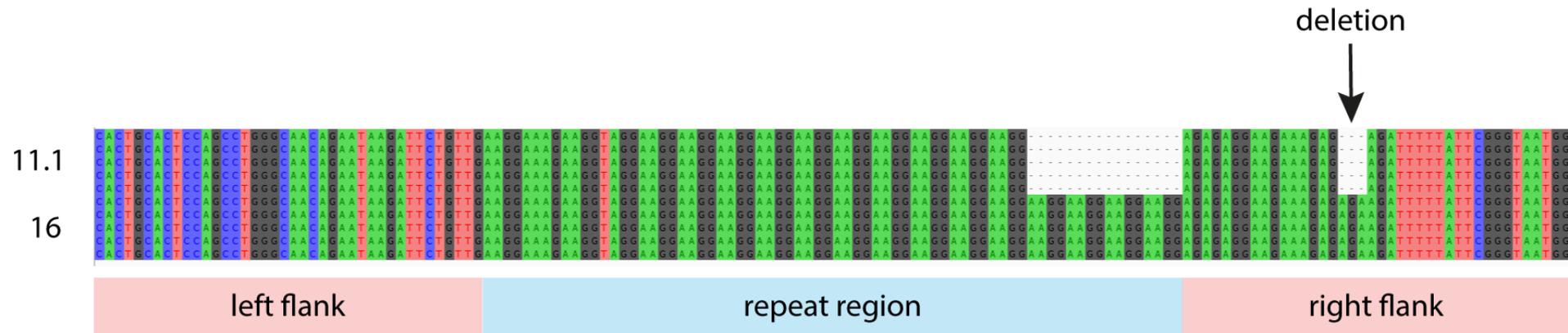


Show alleles  Show stutter  Show artefacts  Show source

REPORTED	CE	STATUS	COVERAGE	EXPECTED STUTTER	SEQUENCE
	11	Stutter	82	161	AAGG AAAG AAGG TAGG [AAGG]9
✓	12	Allele	1605	1	AAGG AAAG AAGG TAGG [AAGG]10
	12b	Artefact	12	0	AAGG AAAG AAGG CAGG [AAGG]10
	15	Stutter	124	134	AAGG AAAG AAGG TAGG [AAGG]13
✓	16	Allele	1340	2	AAGG AAAG AAGG TAGG [AAGG]14
	16b	Artefact	14	0	AAGG AAAG AAGG CAGG [AAGG]14
	16c	Artefact	11	0	AAGG AAAG [AAGG]16

FEEDBACK

# massively parallel sequencing in der forensischen DNA-Analyse



## **Check box**

- **Qualifikation Labor + SV prüfen, Gutachten, Befund-Tabelle**
- **externen SV einschalten**
- **Quantifizierungsbefunde, Elektropherogramme, Info zum DNA-Einsatz pro Reaktion anfordern**
- **Resultate der Kontrollen (EPK, ERK, APK, ARK)**
- **Erfolgte die Auswertung nach QM-System? Wie viele PCR? Consensus oder composite?**
- **Ggf. Auszüge aus QM-System anfordern**
- **wurde überhaupt gerechnet? Auf welcher Grundlage? Belege anfordern**
- **source level vs activity level**



Prof. Dr. med. Bernd Brinkmann

**IFG**

Institut für Forensische Genetik



**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit !**

