

Reproduktion von einzelnen Allelen in einer Merkmalsmischung

Grommek K, Bayer B, Anslinger K
Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Einleitung

Die Untersuchung bzw. statistische Bewertung von DNA-Mischungen stellt eine zurzeit viel diskutierte und untersuchte Problematik der molekularbiologischen Spurenuntersuchung dar [1-3]. Im forensischen Untersuchungsgut findet sich eine Vielzahl solcher Mischungen. Oftmals können, bedingt durch schlechte DNA-Qualität in Kombination mit geringen DNA-Ausgangsmengen bzw. ungünstigen Mischungsverhältnissen, nicht alle Merkmale der an einer Mischung beteiligten Person reproduzierbar nachgewiesen werden. Ein besseres Verständnis dieser Drop out Phänomene ist jedoch Grundlage für die nachfolgende Interpretation der Ergebnisse bzw. der möglichen biostatistischen Beurteilungen. Bundesweit gültige Richtlinien bzgl. der statistischen Interpretation dieser Datensätze liegen bis dato nicht vor.

In dieser Studie soll die locuspezifische Häufigkeit eines solchen Ausfalls (Allelic oder Locus Drop out), in Bezug zur Gesamt-DNA-Menge der Probe, mit zwei verschiedenen Multiplex-PCR-Kits ermittelt und mit der Drop out -Häufigkeit bei Ein-Personen-Spuren verglichen werden. Dazu wurden die Elektropherogramme von 300 Mischspuren, jeweils getestet mit zwei verschiedenen Multiplex-Systemen und über 100 Einzelspuren aus dem Routinespurenmaterial des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwigs-Maximilians-Universität München, ausgewertet und die Ergebnisse statistisch bewertet. Vergleichsproben der an den jeweiligen Mischungen beteiligten Personen lagen vor.

Material und Methoden

DNA wurde aus den Spuren nach externer Lyse mit Hilfe der Biorobots EZ1 oder M48 (Qiagen) isoliert bzw. gereinigt [4]. Die extrahierte DNA wurde in 50µl Aqua Bidest eluiert und gemäß Herstellerangaben mittels Quantifiler Human DNA Quantification Kit (AB) quantifiziert (Threshold 0,2, Slop zwischen -2,9 und 3,2). Durch Überprüfung der IPC konnte eine Hemmung der Proben ausgeschlossen werden. Doppelbestimmungen wurden durchgeführt und der arithmetische Mittelwert errechnet. Zur Genotypisierung der Proben wurden zwei Multiplex-PCRs (Nonaplex QS Multiplex PCR, Biotype und AmpFISTR®SEfiler™, AB) gemäß Herstellerangaben in Reaktionsvolumina von jeweils 25µl durchgeführt (30 Zyklen). Die Menge an zugegebener Template-DNA wurde, wenn möglich, auf ca. 300pg eingestellt. Bei Proben mit geringerem DNA-Gehalt wurden 10µl der unverdünnten DNA dem PCR-Ansatz zugegeben. Die Fragmentlängenbestimmung der Amplifikate wurde auf dem Kapillarelektrophoresensystem ABI PRISM® 3130XL Genetic Analyser (AB) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der GeneScan®-Analyse bzw. Genotyper Software (AB). Als Mindesthöhe zur Benennung eines Allels wurde ein Cut-Off von 50rfu gewählt.

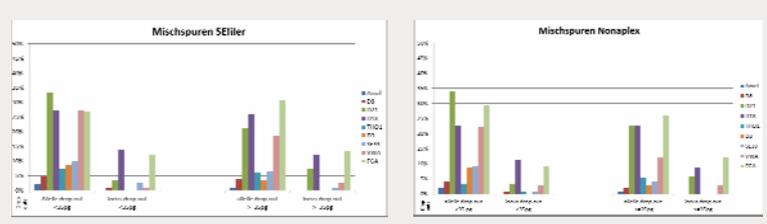
Elektropherogramme von 300 Mischspuren (Zwei- bzw. Drei-Personen-Mischungen) und über 100 Einzelspuren aus dem Routinespurenmaterial des Instituts wurden bzgl. des Auftretens von Drop out-Artefakten ausgewertet und die Ergebnisse statistisch, unter Berücksichtigung der Quantifizierungsergebnisse, bewertet. Gemäß den Ergebnissen der Real-Time-PCR erfolgte eine Gruppierung der Proben in ≥ 35 pg und < 35 pg DNA/µl Eluat, was pro PCR-Ansatz einer Gesamtmenge von ≥ 350 pg bzw. < 350 pg DNA entspricht.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Darstellung und Vergleich der prozentualen Häufigkeiten von Allelic und Locus Drop outs an den einzelnen Genorten. Darüber hinaus wurde ein Vergleich der Drop out-Häufigkeiten der Multiplex-PCR-Systeme Nonaplex und SEfiler bei Mischspuren anhand des Kappa-Wertes, der ein Maß für die Übereinstimmung zweier Messreihen ist, durchgeführt. Völlige Übereinstimmung der Messreihen symbolisiert der Kappa-Wert 1. Ab einem Kappa-Wert von 0,61 spricht man von guter Übereinstimmung. Der Kappa-Wert liefert, im Gegensatz zu relativen Drop out-Häufigkeiten, auch bei Randverteilungen aussagekräftige Werte.

Ergebnisse und Diskussion

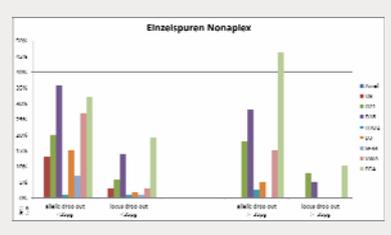
1. Häufigkeiten der Drop outs in den einzelnen Systemen

Folgende Diagramme stellen die locuspezifischen Häufigkeiten von Allelic bzw. Locus Drop outs in Abhängigkeit von der DNA-Menge bei Verwendung der verschiedenen Multiplex-PCR-Systeme dar.



Literatur

[1] Buckleton J, Curran J, Gill P, Towards understanding the effect of uncertainty in the number of contributors to DNA stains, Forensic Sci Int Genet 1 (2007) 20-28
 [2] Budowle B, Eisenberg A, van Daal A, Low copy number typing has yet to achieve "general acceptance", Forensic Sci Int Gene.Suppl (2009)
 [3] Gill P, Buckleton J, A universal strategy to interpret DNA profiles that does not require a definition of low-copy-number, Forensic Sci Int Genet (2009)
 [4] Anslinger K, Bayer B, Roff B, Keil W, Eisenmenger W, Application of the biorobot EZ1 in a forensic laboratory, Legal Medicine 7 (2005) 164-168
 [5] Tvedebrink T, Eriksen PS, Mogensen HS, Morling N, Statistical model for degraded DNA samples and adjusted probabilities for allelic drop-out. Manuscript in preparation
 [6] Hamed H, Forensic: An open-source initiative for the evaluation of statistical methods in forensic genetics. FSIGEN-593, available online
 [7] Gill P, Curran J, Elliot K, A graphical simulation model of the entire DNA process associated with the analysis of short tandem repeat loci. Nucleic Acid Research 33 (2005): 632-643.



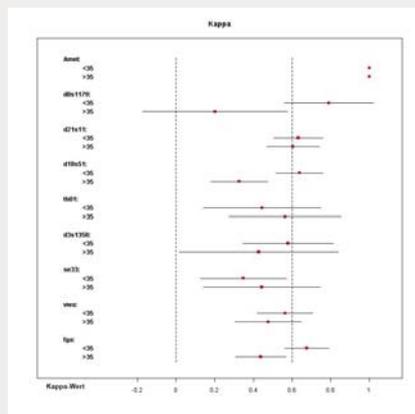
Unabhängig von den verwendeten Reagenzien und der eingesetzten Menge DNA werden für beide Kategorien (Einzel- bzw. Mischspuren) die wenigsten Ausfälle im Amelogeninsystem beobachtet. Als wesentlich stabiler, insbesondere auch gegenüber Locus drop out, erweisen sich darüber hinaus die Genorte D8S1179 und TH01. Sehr anfällig für Drop outs hingegen sind die Loci D21S11, D18S51, VWA und besonders FGA. Im System FGA kommt es, unabhängig von der DNA-Konzentration und dem verwendeten Multiplexsystem, bei mehr als jeder dritten Probe zu einem Ausfall.

Die unabhängig vom verwendeten Multiplex-PCR-System beobachtete, geringere Drop out-Wahrscheinlichkeit der Loci Amelogenin, D8S1179 und TH01, läßt sich zum Teil sicherlich auch durch die Kürze der Amplikons erklären. Längere Loci, wie z.B. FGA, D21S11, D18S51 neigen vermehrt zu Drop outs. Für eine Abhängigkeit der Drop out-Häufigkeit von der Amplikonlänge spricht auch der Vergleich der Multiplex-PCR-Systeme Nonaplex und SEfiler am Genort VWA: Der SEfiler, dessen Amplikons für diesem Genort länger sind, weist hier eine größere Anzahl von Drop outs auf als bei der Amplifikation mit dem Nonaplex-System. Gegen eine alleinige Abhängigkeit der Drop out Häufigkeit von der Amplikonlänge sprechen aber die Ergebnisse des SE33-Locus, der trotz hoher Amplikonlängen in beiden Systemen recht stabil ist.

Unterschiede in den gemessenen Höhen der Peaks einzelner Loci und ggf. damit verbundene Drop outs werden zudem von den unterschiedlichen Stärken der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe beeinflusst. Da die Peakhöhe der Loci, die mit dem gleichen Farbstoff markiert wurden, unabhängig von der Amplikonlänge stark variiert (Daten hier nicht dargestellt) ist dieser Einfluss aber sicherlich als sekundär anzusehen. Unterschiede der Drop Out-Häufigkeiten einzelner Systeme zwischen Mischungen und Ein-Personen-Spuren zeigen, dass das Verhältnis der einzelnen Bestandteile einer Mischung ebenfalls berücksichtigt werden muss.

2. Vergleich der Multiplexsysteme bei Mischspuren

Im folgenden Diagramm wird der Kappa-Wert durch einen roten Punkt dargestellt. Die schwarze durchgezogene Linie stellt das 95%-Konfidenzintervall des Kappa-Wertes dar.



Ein Vergleich der Kappa-Werte zeigt, dass es beispielsweise an den Genorten D8S1179 und D18S51 (Kategorie ≥ 35 pg/µl DNA) einen großen Unterschied der Drop out-Häufigkeit für die beiden Multiplex-Systeme gibt (kleine Kappa-Werte). Dagegen liegt der Kappa-Wert für das Amelogenin-System bei 1. Eine Abhängigkeit der Drop out-Häufigkeit einzelner Loci vom verwendeten Multiplex-PCR-System konnte somit ebenfalls belegt werden. Auch wird deutlich, dass die einzelnen Multiplexsysteme unterschiedlich auf die eingesetzte DNA-Konzentration reagieren (Bsp. D18S51).

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Neigung zu Drop outs Locus-spezifisch ist und zudem von den verwendeten Reagenzien, Primern und den daraus resultierenden Amplikonlängen, teilweise auch der Stärke der Fluoreszenzfarbstoffe, abhängt. Derzeit beschäftigen sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Entwicklung statistischer Modelle, die die Berücksichtigung der oben aufgeführten Parameter ermöglichen [5,6]. Für eine adäquate biostatistische Beurteilung müssen die einzelnen Einflüsse bewertet bzw. gewichtet werden [7]. Um eine solche Wertung vornehmen zu können ist die Erhebung von Daten, wie oben dargestellt, unerlässlich. Für eine realistische, ggf. auch laborspezifische Gewichtung der einzelnen Faktoren und zur Prüfung der Reproduzierbarkeit bzw. Übertragbarkeit der präsentierten Daten auf andere Multiplexsysteme bzw. andere Laboratorien, bedarf es jedoch noch der Auswertung weiterer Datensätze.