Universitätsklinikum Ulm

Institut für Rechtsmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Sebastian Kunz

Innovative Strategien für die forensische Molekularbiologie: Erweiterung des Informationsgewinns aus Tatortspuren

Publikationsbasierte Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Kristina Katharina Schulze Johann

Warendorf

2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Wiegand
2. Gutachter: Prof. Dr. Katja Anslinger

Tag der Promotion: 10.11.2023

Für meine Großeltern

Inhalt

Abkürzungen V

1. Synopse 1

1.1 Stand der Technik und aktuelle Herausforderungen der forensischen Molekulargenetik 1

1.1.1 DNA-Verlust durch Extraktion 3

1.1.2 DNA-Degradierung 4

1.1.3 Spuren mit geringem DNA-Gehalt 6

1.1.4 Unklare Spurenentstehung 8

1.2 Fragestellung und Ziel der Dissertation 11

1.3 Ergebnisse 12

1.4 Zusammenfassende Beantwortung der Forschungsfrage und Ausblick 22

1.5 Zusammenfassung 24

1.6 Literatur 25

2. Publikationen 31

2.1 A proof-of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault 31

2.2 Detecting DNA damage in stored blood samples 40

2.3 Linear-after-the-exponetial (LATE) PCR: improved asymmetric PCR for quantitative DNA-analysis 51

2.4 Whole genome sequencing of artificial single nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces 55

Danksagung 70

Lebenslauf 71

Publikationsliste 72

Anhang 73

Abkürzungen

A	*Adenin*
Bp	*Basepair*
C	*Cytosin*
CE	*Kapillargelelektrophorese*
DI	*Degradation Index*
DIN	*DNA Integrity Number*
DNA	*deoxyribonucleic acid*
DTT	*Dithiothreitol*
G	*Guanin*
GEDNAP	*German DNA Profiling*
GQN	*Genomic Quality Number*
LATE-PCR	*Linear-after-the-exponential PCR*
LTDNA	*low template DNA*
MPS	*massiv-paralleles Sequenzieren*
mtDNA	*mitochondriale DNA*
Nt	*Nukleotid*
PCR	*Polymerasekettenreaktion*
PRV	*percentage reads of variant*
RFLP	*restriction fragment length polymorphisms*
rfu	*relative fluorescence units*
RT-PCR	*realtime* PCR
STR	*Short Tandem Repeats*
T	*Thymin*
TsD	*Time since Deposition*
UNG	*Uracil-DNA-Glykosylase*
WGS	*Whole Genome Sequencing*

1. Synopse

1.1 Stand der Technik und aktuelle Herausforderungen der forensischen Molekulargenetik

Die forensische Molekularbiologie stellt ein junges und sich rasch entwickelndes Forschungsgebiet dar. Bereits kurz nach der Erstveröffentlichung genetischer Polymorphismen zur Identifizierung von Personen durch Jeffreys et al. im Jahr 1985 [49] fand diese Methode Anwendung in der forensischen Fallarbeit [20]. Seitdem erfolgte eine stetige Weiterentwicklung robuster und sensitiver Analysemethoden, die heute die Analyse von sehr geringen DNA-Mengen erlauben. Während zu Beginn noch eine DNA-Menge von mehreren Mikrogramm notwendig war, um ein DNA-Profil zu erstellen, reichen heute wenige hundert Pikogramm (pg) an DNA für eine erfolgreiche Analyse aus [89]. Dadurch können DNA-Identifizierungsmuster nicht nur aus den häufig an Tatorten vorkommenden Körperflüssigkeiten mit hohem DNA-Gehalt (Blut, Speichel und Sperma) erstellt werden, sondern es können auch minimale DNA-Antragungen ausreichend sein, die z.B. durch kurzes Anfassen entstehen (sog. Hautkontaktspuren) [92], um eine erfolgreiche STR-Analyse durchzuführen.

In der forensischen Molekularbiologie werden heute sogenannte Mikrosatelliten (kurze, sich tandemartig wiederholende DNA-Sequenzen, *short tandem repeats* (STRs) genannt) untersucht, die in einer hohen Zahl im gesamten menschlichen Genom vorkommen [27]. Forensisch relevante Mikrosatelliten befinden sich in nicht-kodierenden Bereichen der menschlichen DNA und weisen eine Vielzahl möglicher Allele auf. Durch diesen hohen Polymorphiegrad können Individuen über die kombinierte Darstellung mehrerer STRs identifiziert werden. Dabei beruht die Anwendung dieser Methode auf einem Vergleich zwischen dem DNA-Identifizierungsmuster einer an einem Tatort aufgefundenen biologischen Spur und dem Vergleichsmuster einer Person.

Einen großen Gewinn für die forensische Fallarbeit stellen die DNA-Datenbanken dar, die - erstmals 1995 in Großbritannien - inzwischen in einer Vielzahl von Ländern weltweit Anwendung finden [96]. Der Vertrag von Prüm und die Einigung auf einen europaweit einheitlichen Untersuchungsumfang (European Standard Set of Loci, ESS) ermöglichen heute einen Abgleich auch über Landesgrenzen hinweg [33,96]. In Deutschland werden derzeit üblicherweise sechzehn als unabhängig vererbt angesehene STR-Loci typisiert (s. Abb. 1). Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter PCR-Primer können die Amplifikate über die Kapillargelelektophorese aufgetrennt werden: Mit Hilfe unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen sowie der Fragmentlängenunterschiede der STR-Systeme können durch eine PCR eine Vielzahl von STR-Loci zeitgleich (Multiplex-PCR) analysiert werden.

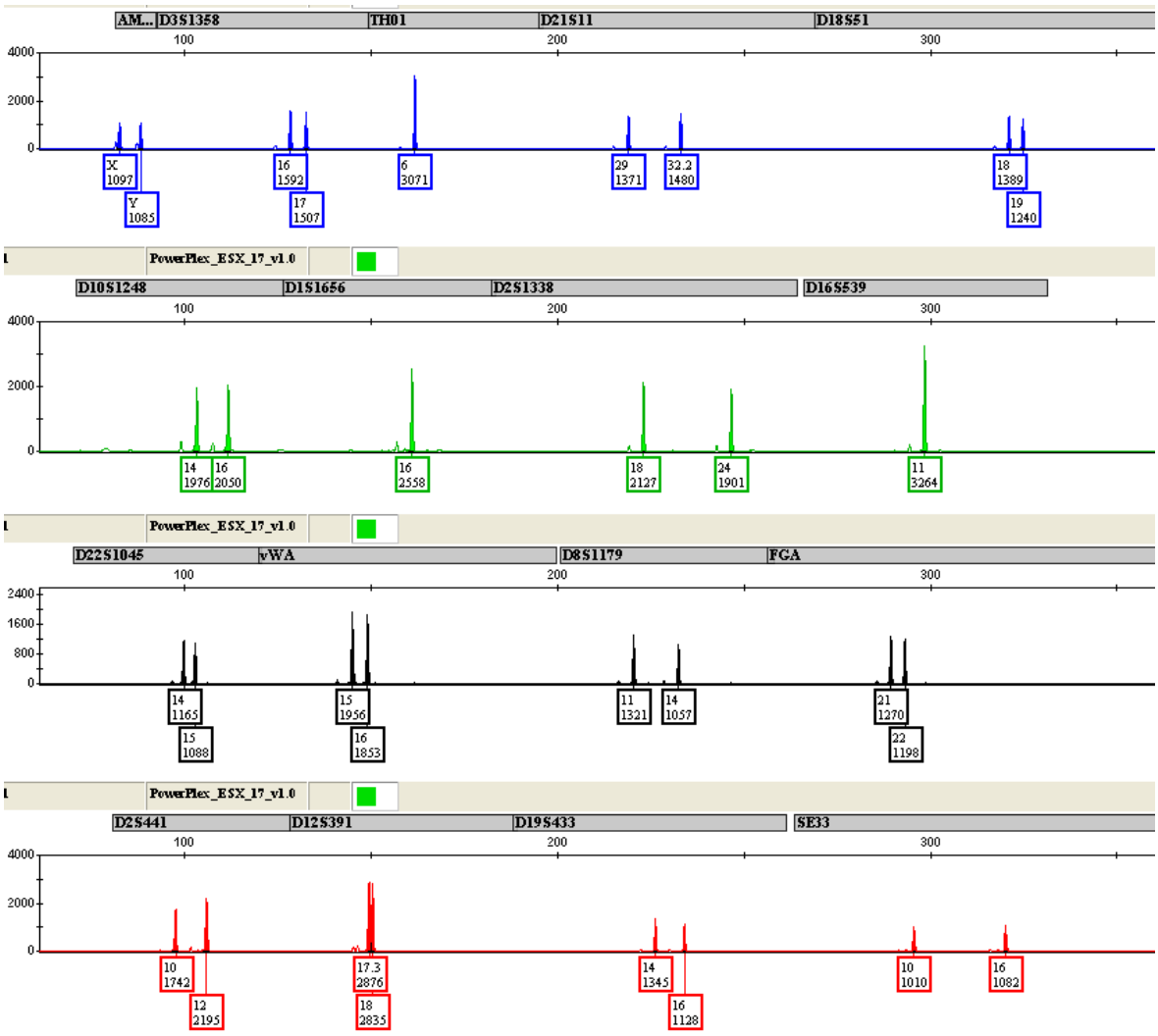


Abbildung 1: STR-Profil mit 16 Markern einer Person

Neben der reinen Identifizierung von Personen etablierten sich weitere wissenschaftliche Schwerpunkte der forensischen Molekulargenetik: Körperflüssigkeiten können inzwischen sehr präzise und humanspezifisch über verschiedene immunchromatographische Schnelltests [43] oder Methylierungsmuster der DNA bestimmt werden [42,67]. So kann beispielsweise Menstruationsblut von peripherem Blut [44] unterschieden werden, was vor allem in Fällen sexualisierter Gewalt von enormer Relevanz sein kann. Auch die Identifizierung verschiedener Körperflüssigkeiten in Mischungen ist möglich [42]. Besonders die Analyse von RNA hat in diesem Bereich große Fortschritte gebracht und ermöglicht einen hohen Informationsgewinn aus Tatortspuren insbesondere in Hinblick auf den Ursprung der Spur [8,77]. Durch die Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) können Aussagen über phänotypische Eigenschaften von Spurenverursachern wie Haar- Haut- und Augenfarbe getroffen werden. [12,95] sowie die biogeographische Herkunft einer Person bestimmt werden [70]. Während ersteres seit 2019 in Deutschland erlaubt ist (§ 81e Abs. 2 StPO), ist die Herkunftsbestimmung zwar technisch möglich, aber noch nicht legalisiert. Methoden, mit denen eine ebenfalls legalisierte Schätzung des Lebensalters des Spurenverursachers über

DNA-Analysen möglich ist, werden derzeit intensiv weiterentwickelt und verbessert [51,82], denn auch derartige Analysen dürfen in Deutschland durchgeführt werden. Durch massiv-paralleles Sequenzieren (MPS), bei dem im Gegensatz zur STR-Typisierung die genaue Sequenz einer Spur an verschiedenen Loci untersucht wird, werden durch diesen erhöhten Informationsgewinn neue Perspektiven und Lösungsansätze zu bisher ungeklärten Fragestellungen aufgezeigt.

Trotz der rasanten Entwicklung der vergangenen Jahrzehnte bestehen weiterhin Schwierigkeiten bei verschiedenen Analyseschritten der inzwischen routinemäßigen Erstellung von DNA-Profilen, die im Folgenden näher betrachtet werden.

1.1.1 DNA-Verlust durch Extraktion

Viele Jahre lang galt eine erfolgreiche Extraktion von DNA als Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Erstellung eines DNA-Identifizierungsmusters aus biologischen Spuren. Mit der Extraktion sollte bestenfalls auch eine Aufreinigung des DNA-Extraktes stattfinden, bei der mögliche Inhibitoren, die die Amplifikation der DNA-Fragmente stören könnten, entfernt werden. Stoffe wie Hämoglobin [2] oder andere Zell- und Gewebebestandteile sowie weitere Substanzen [5,98] können in forensischen Spuren enthalten sein und inhibierend auf die PCR wirken. Diese Inhibitoren könnten ohne vorherige Aufreinigung problematisch für die DNA-Analyse werden, da sie die Amplifikation stören. Aus diesem Grund wurden Extraktionsmethoden entwickelt, die eine Aufreinigung beispielsweise mittels magnetischer Partikel beinhalten. Bei einer solchen Extraktion wird die Probe in einer Pufferlösung thermisch und enzymatisch lysiert und das Lysat über mehrere Waschschritte mittels DNA-bindender Silikat-beschichteter magnetischer Partikel aufgereinigt [21]. Während durch eine solche Extraktion in hoch-reiner DNA-Extrakt gewonnen wird, liegt der Nachteil dieser Methoden darin, dass mit den Aufreinigungsschritten stets ein gewisser DNA-Verlust einhergeht [1,75]. Dieser ist insbesondere bei Proben mit minimalem DNA-Gehalt und bei DNA-Mischungen mit einer sehr geringen Minorkomponente bedeutsam, da diese aufgrund des DNA-Verlusts unter Umständen nicht mehr erfolgreich analysiert werden können.

In Fällen der vermuteten sexualisierten Gewalt liegen häufig vaginale Abstriche vor, die weibliche DNA im Überschuss enthalten. Möglicherweise vorhandene männliche DNA nach sexuellem Kontakt liegt in der Regel als Minorkomponente vor. Gerade bei Spuren mit einer solchen Minorkomponente besteht ein hohes Risiko, diese nach einer Extraktion nicht mehr in ausreichender Qualität darstellen zu können. Daher sollte ein weiterer DNA-Verlust, z.B. durch die Waschschritte der Extraktion, unbedingt vermieden werden.

Seit einigen Jahren wird ein Verzicht auf die Extraktion diskutiert. Bei der sogenannten direkten PCR handelt es sich um eine Methode, bei der ein Teil der biologischen Spur ohne vorherige DNA-Extraktion direkt in die PCR eingesetzt wird. Hierdurch soll DNA-Verlust durch Aufreinigungs- und Waschschritte [19] vermieden werden. Kommerziell erhältliche Kits zur STR Analyse sind inzwischen sehr unempfindlich gegenüber Inhibitoren und benötigen nur eine geringe Templatemenge, um erfolgreich ein DNA-Profil darstellen zu

können [88]. Die Anwendung der direkten PCR konnte in Hautkontaktspuren und Körperflüssigkeiten wie Blut und Speichel bereits erfolgreich angewandt werden [61,63,66].
Wenn Spermien in einer Spur nachgewiesen wurden, kann eine sogenannte differentielle Lyse eingesetzt werden [102]. Dabei werden Mischungen aus weiblichen Schleimhautepithelzellen und männlichen Spermatozoen zunächst unter Zugabe von Proteinase K lysiert. Es hat sich gezeigt, dass Spermien durch ihre spezifische Oberfläche unempfindlich auf diesen Lyseschritt reagieren und intakt bleiben [9,32,100]. Durch Zentrifugation kann ein Pellet, welches die intakten Spermien enthält, von der freien DNA aus den Epithelzellen getrennt und in einem weiteren Schritt gewaschen und unter Zugabe von Dithiothreitol (DTT) lysiert werden [102].
Während die direkte PCR einen DNA-Verlust durch die Bearbeitung verhindert, reichert die differentielle Lyse gezielt männliche Zellen an. Die differentielle Lyse ist seit ihrer ersten Beschreibung als Standardmethode in der forensischen Molekulargenetik fest verankert. Dagegen wurde die direkte PCR bislang noch nicht zur Analyse forensischer Proben eingesetzt, die Sperma enthalten. Jedoch wurde das Prinzip der direkten PCR an Spermien für die medizinische Diagnostik bereits beschreiben [6,91].

1.1.2 DNA-Degradierung

Umwelteinflüsse wie UV-Strahlen und Feuchtigkeit können die DNA in einer biologischen Tatortspur stark schädigen [31,28]. Eine solche Degradierung führt zu Strangbrüchen der DNA, wodurch häufig keine oder nur unvollständige DNA-Profile erstellt werden können.
Durch Degradierung können vor allem längere DNA-Fragmente nicht mehr ausreichend amplifiziert werden. In Profilen degradierter DNA kann dadurch eine deutliche Abnahme der Peakhöhen mit steigender Fragmentlänge beobachtet werden; es kommt zu einem sogenannten *Ski-slope*-Effekt (s. Abb. 2) [18]. Fortgeschrittene Degradierung kann auch zum vollständigen Ausfall eines DNA-Profils führen. Die Interpretation von Mischspuren wird durch den *Ski-slope*-Effekt erschwert, da lange DNA-Fragmente nicht vollständig dargestellt sein können. Besonders die Einschätzung der Anzahl möglicher Spurenverursacher einer DNA-Mischung ist dadurch nicht verlässlich durchführbar [22,79]. Zudem kann es möglich sein, dass nur einzelne Anteile einer DNA-Mischung eine Degradierung aufweisen, wohingegen weitere DNA-Anteile intakt sind.
Um das Ausmaß einer möglichen Degradierung beurteilen zu können, liefern die kommerziell erhältlichen Kits zur DNA-Quantifizierung einen sogenannten Degradations-Index (DI) [29,41]. Dieser Index wird gebildet, in dem ein langes sowie ein kürzeres Target in der *realtime* PCR (RT-PCR) detektiert werden und die erhaltenen Fluoreszenzsignale in ein Verhältnis zueinander gesetzt werden. Häufig überschreitet dieser Wert den kritischen Schwellenwert, während in der Analyse der STRs keine Anzeichen einer DNA-Schädigung zu erkennen sind und umgekehrt. Dieser Degradations-Index ist daher nur als Hinweis auf, nicht als Beweis für qualitativ minderwertige DNA zu sehen.
Zur Verbesserung der Analyse von Tatortspuren mit degradierter DNA wurden die PCR-Primer in den kommerzielle erhältlichen STR-Kits so konzipiert, dass die bei der

Amplifikation entstehenden DNA-Fragmente so kurz wie möglich sind. Diese liegen in dem Kit „PowerPlex ESX 17“ der Firma Promega in einem Größenbereich von 79 bp bis 417 bp [88]. Neun der insgesamt 17 Primerpaare generieren Amplikonlängen unter 200 bp, so dass auch in degradierten DNA-Proben noch ein großer Teil der STR- Marker erfolgreich dargestellt werden kann [89]. Für Proben mit besonders starker Degradierung wurden miniSTR-Primer-Sets entwickelt, die die Amplifikation der gängigsten STR-Marker mit extrem verkürzten Fragmenten ermöglicht [17,101]. Die Analyse von Spuren mit solcher DNA-Schädigung stellt demnach nicht die größte Herausforderung dar. Vielmehr sollte die Detektion des Grades der DNA-Schädigung verbessert werden. Eine bessere Einschätzung der Integrität der DNA nach der DNA-Extraktion kann ausschlaggebend für das weitere Prozessieren der Spur sein und wertvolle Informationen über die Spur liefern. Je nach Degradierungsgrad sollte eine Entscheidung zwischen konventioneller STR-Analyse und mini-STR-Analyse getroffen werden.

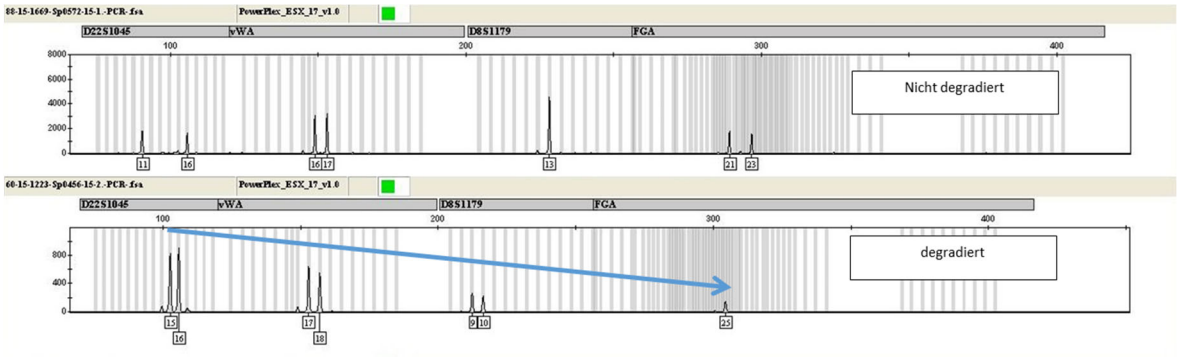


Abbildung 2: Vergleich nicht degradierte (oben) und degradierte Probe (unten) nach Multiplex-PCR und Kapillargelelektrophorese am Beispiel von vier STRs in einer Fluoreszenzmarkierung. Auf der X-Achse ist die Fragmentlänge in Nukleotiden (nt) aufgetragen; die Y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität als *relative fluorescence units* (rfu). Während die nicht degradierte Probe (oben) ein ausbalanciertes DNA-Profil mit ähnlichen rfu-Höhen in den verschiedenen Systemen (=mit grauen Balken überlegt) zeigt, weist das degradierte Profil rfu-Höhen auf, die proportional zur Länge des Fragments abnimmt (Pfeil).

Die meisten Degradierungsassays beruhen auf der indirekten Detektion von Strangbrüchen: ein längeres Fragment hat durch Degradierung eine geringere Wahrscheinlichkeit, erfolgreich amplifiziert zu werden als ein kürzeres Fragment. Es wird daher in das Verhältnis des Detektionssignals eines langen zu einem kurzen DNA-Fragment gemessen [29,41]. Mittels automatisierter Gelelektrophoresen ist es möglich, eine Verteilung der Fragmentgrößen in einem DNA-Extrakt zu ermitteln und so einen Gesamteindruck über die Integrität der DNA in einer Probe zu bekommen [25]. Diese Methoden werden in der forensischen Molekularbiologie überwiegend zur Qualitätskontrolle von Sequenzierbibliotheken für das MPS genutzt [45].

Ein Vorgang, durch den DNA degradieren kann, ist die Deaminierung: Dabei wird durch Verlust einer Aminogruppe aus Cytosin Uracil (siehe Kapitel 1.1.4). Dies führt zu einer Sequenzvariation, da durch das Vorliegen von Uracil anstelle von Cytosin während der PCR eine andere Base eingebaut wird und so eine Scheinmutation festgestellt werden kann. Durch den Einsatz von Uracil-DNA-Glykosylase (UNG) kann Uracil aus der Sequenz

geschnitten werden, was eine abasische Stelle entstehen lässt und zu erhöhter Instabilität des DNA-Stranges führt [58]. In DNA-Analysen wird diese Methode bereits angewendet, um eine Kontamination von DNA-Proben durch bereits amplifizierte DNA zu vermeiden. Dazu wird in der PCR anstelle von Thymin Uracil eingebaut. Vor jeder weiteren PCR erfolgt ein Inkubationsschritt mit UNG, der dafür sorgt, dass bereits amplifizierte DNA in der Probe durch das Entfernen des Uracils so stark fragmentiert wird, dass eine weitere Amplifikation nicht möglich ist [60]. Auch durch natürliche Deaminierung entstandenes Uracil in der DNA wird aus der Sequenz entfernt und abasische Stellen entstehen, die zu einer Instabilität des DNA-Stranges führen. Aus stärker deaminierten Proben würde demnach mehr Uracil entfernt werden, als aus weniger stark deaminierten Proben, was zu einer höheren Fragmentierung der stark deaminierten DNA führt. Ob Deaminierung bei der DNA-Degradierung in biologischen Spuren eine Rolle spielt und ob diese detektiert werden kann, wurde bislang noch nicht untersucht.

1.1.3 Spuren mit geringem DNA-Gehalt

Die zuvor beschriebenen Effekte des DNA-Verlusts sowie der DNA-Degradierung können zu einer verringerten Amplifikationseffizienz während der PCR führen. Eine Herausforderung in der forensischen Molekulargenetik stellen Proben mit sehr geringem DNA-Gehalt dar (*low-template* DNA: LTDNA). Als LTDNA werden Proben bezeichnet, bei denen weniger als 0,2 ng DNA in die Multiplex-PCR eingebracht werden können [32].

Ist zu wenig Template-DNA vorhanden, kann in der PCR entsprechend wenig DNA-Produkt amplifiziert werden. Als Folge wird in der CE kein oder ein unvollständiges DNA-Profil dargestellt. Kommerzielle STR-Kits können mit mindestens 62,5 pg Template-DNA vollständige DNA-Profile erzeugen [88,89]. Häufig ist die Ausgangskonzentration der DNA aus einer Tatortspur nicht hoch genug, um ein zur Detektion und Auswertung ausreichendes Fluoreszenzsignal während der CE zu erhalten. DNA-Profile solcher LTDNA Proben weisen häufig sogenannte allelische Drop-Outs auf. Diese entstehen besonders bei längeren DNA-Fragmente, die in zu geringer Menge amplifiziert werden und dadurch unter der Nachweisgrenze der CE liegen. Die Auswertung solcher LTDNA-Profile kann, insbesondere bei DNA-Mischungen, herausfordernd sein, da es gegebenenfalls schwierig sein kann, eine klare Unterscheidung zwischen LTDNA-Profilen und konventionellen DNA-Profilen zu treffen: durch LTDNA kann eine verfälschte Stutter-Rate oder Heterozygoten-Rate vorgetäuscht werden. Potenzielle Drop-outs könnten übersehen werden. Für die Untersuchung solcher Minimalspuren gibt es bisher keine verlässliche Methode. Einige Empfehlungen schlagen zwar vor, wie solche LTDNA-Spuren bewertet werden sollten [34,69], helfen jedoch wenig, die technische Analyse dieser Spuren zu verbessern. Spuren mit geringem DNA-Gehalt können einer angepassten Analyse unterzogen werden, bei der die Anzahl der PCR-Zyklen oder die Injektionszeit bei der kapillargelelekrophoretischen Auftrennung erhöht werden [15]. Diese Anpassungen der

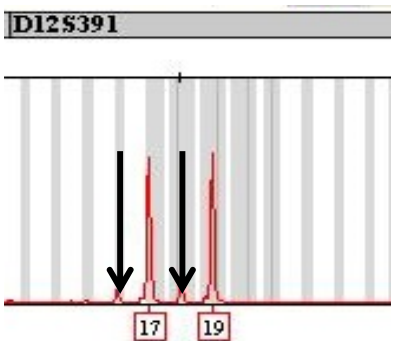


Abbildung 3: Stutter-Peaks

Analyse können die aufgetretenen Probleme nicht immer lösen, da weiterhin stochastische Effekte (Allel-Drop-In und Drop-Out) auftreten können. Auch Artefakte, wie beispielsweise Stutter-Peaks, können stärker dargestellt sein, wodurch die Auswertung der Befunde erschwert wird [37]. Stutter-Peaks sind Peaks, die typischerweise eine Repeateinheit kürzer als der wahre Allelpeak sind (s. Abb. 3). Sie entstehen während der PCR durch die Polymerase und werden auch als DNA-Strang-*slippage*-Produkt bezeichnet [30]. Diese Produkte werden gebildet, wenn der neu synthetisierte Strang während der Elongationsphase der PCR kurzfristig von dem Matritzenstrang gelöst wird und sich anschließend so wieder anlagert, dass sich eine Schlaufe im Matritzenstrang bildet und das letzte Wiederholungsmotiv des neu synthetisierten Strangs um eine Position versetzt an den Matritzenstrang anlagert. Eine Erhöhung der PCR-Zyklenzahl ist zudem nur eingeschränkt sinnvoll, da zum einen Hintergrundsignale stärker hervortreten und da die klassische PCR in einem Plateau endet [55]. Polymerase und Primer werden in den PCR-Zyklen aufgebraucht und die Primer-Bindung muss mit der Bindung des entstandenen Produkts an die Polymerase konkurrieren (Produktinhibierung): Je mehr Amplifikationsprodukt gebildet wird, desto weniger Primerbindung kann stattfinden [48,52]. Auch mit weiteren PCR-Zyklen ist dann eine entsprechende Vermehrung der gewünschten Fragmente nicht mehr möglich.

Um dieses Problem der Produktinhibierung zu umgehen, wurde in der Forschung die sogenannte asymmetrische PCR diskutiert [78]. Hierbei werden der *forward* und *reverse* Primer in stark unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, so dass nach Verbrauch des limitierten Primers die exponentielle Amplifikation in eine lineare Amplifikation von DNA-Einzelsträngen übergeht (englisch: *linear after the exponential*, LATE-PCR). Eine *molecular beacon*-Sonde dient hierbei der Detektion des PCR-Verlaufs [90,97], um zu zeigen, dass die LATE-PCR nicht wie eine herkömmliche PCR in einem Plateau endet, sondern weiter linear amplifiziert wird. Hierbei handelt es sich um DNA-Sonden, die aus einem zur Zielsequenz komplementären *Loop* und zueinander komplementären *Stem*-Sequenzen an beiden Enden der *Loop*-Sequenz bestehen. An den Enden der *Stem*-Sequenzen sind einerseits ein fluoreszierender Reporter und andererseits ein passender Quencher gebunden. So lange der Molecular Beacon in seiner Sekundärstruktur verbleibt, verhindert die räumliche Nähe von Reporter und Quencher ein Fluoreszenzsignal. In Anwesenheit der Zielsequenz öffnet sich der Molecular Beacon und bindet spezifisch an das Target. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher kann nun vom Reporter ein Fluoreszenzsignal emittiert werden (siehe Abb. 4) [90,97].

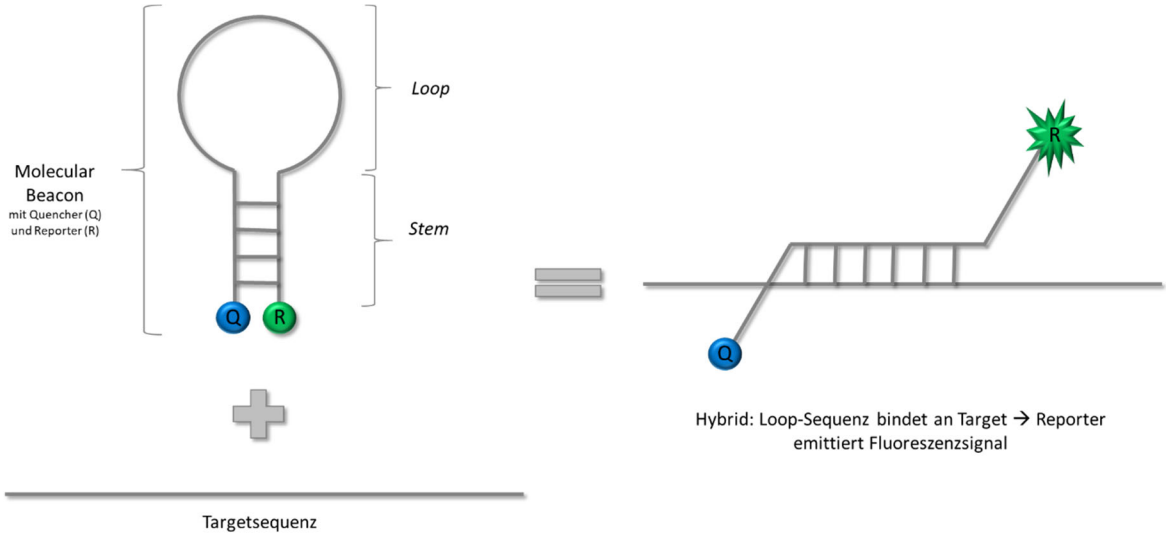


Abbildung 4: Prinzip des *Molecular Beacon*

Diese Methode zeigt jedoch eine verminderte Effizienz von 60-70 % im Vergleich zur konventionellen, symmetrischen PCR. Um diese zu steigern, wurden Primer entwickelt, deren Schmelztemperaturen dem speziellen Einsatz in unterschiedlichen Konzentrationen angepasst wurden. Dabei wird der limitierte Primer so modifiziert, dass seine Schmelztemperatur (T_M^L) höher liegt als die des überschüssigen Primers (T_M^X). Die beste Effizienz und Spezifität konnte bei einem Temperaturverhältnis von T_M^L- $T_M^X \geq 5°C$ festgestellt werden. Diese modifizierte asymmetrische PCR wird *linear after the exponential* (LATE)-PCR genannt [72,78]. Bislang wurde noch nicht untersucht, ob LATE-PCR auch bei der Analyse von DNA-Spuren mit sehr geringem DNA-Gehalt die PCR-Effizienz steigern könnte.

1.1.4 Unklare Spurenentstehung

Jeder Mensch hinterlässt über die Zeit DNA auf Oberflächen jeglicher Art. Dabei kann die DNA kann auf unterschiedlichste Weise sowohl direkt als auch indirekt übertragen werden [71]. Es müssen nicht zwangsläufig die DNA-Merkmale angetragen werden, die die transferierende Person selbst aufweist, es können auch DNA-Merkmale einer weiteren Person auf ein Objekt übertragen werden [35,64]. Man spricht in diesen Fällen vom sogenannten Sekundärtransfer. Auch die Menge der hinterlassenen DNA variiert und hängt vor allem von diversen Umwelteinflüssen, dem Ursprung der DNA (Körperflüssigkeiten oder Hautzellen etc.) [86,93] und der Porosität der Oberflächen ab [94]. Es gibt zahlreiche Studien zu verschiedensten Szenarien von DNA-Transferwegen sowie auch zu der unterschiedlichen Tendenz von Individuen DNA abzugeben bzw. zu transferieren. Diese Tendenz wird mit dem sogenannten Shedder-Status von Personen ausgedrückt [80,83]. Neben dem Übertragungsweg der DNA auf ein Objekt bleibt bei DNA-Analysen der Zeitpunkt der Entstehung einer DNA-Spur unklar. Das Alter bzw. die Liegedauer könnte eine bedeutende Information für die Bewertung einer Spur sein. Biologische Spuren könnten bereits vor der Tat am Fundort hinterlassen worden sein und wären somit nicht relevant

für die Rekonstruktion des Tatherganges. In der forensischen DNA-Analyse gibt es bisher keine Methode, die in der Routinearbeit eingesetzt wird, um die Liegezeit einer Spur zu bestimmen. Somit werden regelmäßig auch solche Spuren analysiert, die nicht in Zusammenhang mit der Tat stehen. Zahlreiche Studien befassen sich mit der Bestimmung des Alters einer Blutspur. Sie beruhen häufig auf optischen Methoden wie Spektroskopie [11,53,68,85,103], dem Nachweis von Hämoglobin-Derivaten [7,46,47,54] oder Proteinanalysen [81]. Durch die Auswahl der Methoden sind diese Studien jedoch auf Blutspuren beschränkt. Erstrebenswert sind Verfahren, die unabhängig vom Spurenursprung sind. Aktuelle Studien zur Bestimmung der *time since deposition* (TsD) befassen sich mit der Möglichkeit, molekulargenetische Methoden, wie beispielsweise die Detektion von RNA-Degradierung in Markern zur Bestimmung von Körperflüssigkeiten [76], zu verwenden. Diese Studien ergeben bisher zwar kein zuverlässiges Verfahren zum Einsatz in der forensischen Fallarbeit [3,4], zeigen aber vielversprechende Ergebnisse für weitere Projekte. Eine DNA-basierte Methode hätte den Vorteil, dass sie einfacher in die Routineabläufe forensischer Labore integrierbar ist als RNA- und Protein-Assays [38,76,99]. Aktuell konzentrieren sich Studien zur Einschätzung des Spurenalters darauf den Erfolg einer konventionellen STR-Analyse zu ermitteln. Sirker et al. zeigten, dass die DNA-Analyse von Spuren unterschiedlicher Herkunft und Lagerung bis zu 17 Monate erfolgreich durchgeführt werden konnte [84].

In lebenden Zellen kommt es ständig zu DNA-Schäden durch hydrolytische, oxidative und strahlungsbedingte Angriffe, die direkt repariert werden. Ex vivo hingegen häufen sich chemische DNA-Schäden und DNA-Fragmentierung, weil die Mechanismen zur Reparatur der Schädigungen in vivo nicht mehr funktionieren [62]. Mit dem Potential mittels MPS DNA-Degradierung genauer analysieren zu können [36,65], bietet sich hier eine Möglichkeit, neue Marker für die Altersbestimmung von Spuren zu finden. Die wichtigsten DNA-Schädigungen durch die DNA-Degradierung stattfindet sind Depurinierung und Deaminierung. Beide Schädigungen sind die Folge von Hydrolyse. Bei der Depurinierung wird durch einen hydrolytischen Angriff die β-N-glycosidische Bindung gespalten, was zu dem Verlust einer Purinbase und einer daraus entstehenden abasischen Seite führt [57].

Bei der Deaminierung [50] kommt es durch chemische Prozesse zu einer Basenänderung. Durch die Abspaltung einer Aminogruppe wird aus Cytosin (C) Uracil (U). Auf ähnliche Weise wird durch Deaminierung aus Guanin (G) Xanthin (bindet Thymin (T)) und aus Adenin (A) Hypoxanthin (bindet Cytosin) gebildet [14,26]. Das verhindert zwar nicht die Amplifikation, kann aber dazu führen, dass während der PCR statt Guanin Adenin eingebaut wird und so eine Scheinmutation in der Sequenz entsteht. Neben diesen hydrolytischen Veränderungen spielen bei Tatortspuren auch oxidative DNA-Schäden eine Rolle. Aus elektrochemischen Untersuchungen weiß man, dass bestimmte Basen und Motive innerhalb der DNA-Sequenz anfälliger für oxidative Abbauprozesse sind als andere. Dennany et al. [23] haben gezeigt, dass aufgrund einer Elektronenverschiebung innerhalb der Elektronenwolke in Abschnitte von vielen aufeinanderfolgenden Guaninbasen ist das letzte Guanin innerhalb dieses Abschnitts am ehesten von der Oxidation betroffen und bildet 8-Oxo-Guanin, eine synthetische Base, die Adenin anstelle von Cytosin bindet. Diese

Veränderung kann nach der PCR-Amplifikation zu einer scheinbaren G>T-Substitution führen. Da häufig nur die Fragmentlängen, nicht aber die Basenaustausche zur Detektion von Degradierung nachgewiesen werden, fällt eine solche Sequenzschädigung in der Regel nicht auf. Durch den Einsatz der MPS-Technologie können derartige Scheinmutationen oder auch *single nucleotide variants* (SNV) nachgewiesen und eine mögliche Korrelation zum Alter der Spur geprüft werden. Die genaueren Kenntnisse über DNA-Degradierung durch MPS in der forensischen Molekulargenetik wurden mit konträren Ergebnissen veröffentlicht. Hanssen et al. beschrieben kürzlich die Analyse alter Blut- und Spermaflecken durch Ganzgenomsequenzierung. Sie konnten keine SNV durch hydrolytische Schäden feststellen. Die Daten *Coverage* wurde verwendet, um die Degradierung im gesamten Genom zu messen, und die Autoren beschreiben, dass der Abbau gleichmäßig über das gesamte Genom erfolgte und es keine Hotspots gab [36]. Rathbun et al. hingegen analysierten SNV in Sequenzierungen der mitochondrialen DNA (mtDNA), um das Risiko einer Fehlinterpretation von Heteroplasmien in der mtDNA zu bewerten. Sie fanden eine Scheinmutationsrate von $8{,}9x10^{-4}$ bis $1{,}5x10^{-2}$ pro Nukleotidposition innerhalb der mtDNA-Kontrollregion in DNA-Extrakten, die bei unterschiedlichen Temperaturen in Wasser gelagert wurden. Ebenso konnten sie mehrere Hotspots identifizieren, die anfälliger für SNV sind als andere Bereiche innerhalb der Kontrollregion [74]. Solche Unterschiede bei der Beobachtung von Fehlkodierungen sind höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Filtereinstellungen bei der Analyse der MPS-Daten zurückzuführen. Folglich sind weitere Experimente erforderlich, um die zeitabhängige Zunahme von SNV in biologischen Tatortspuren zu identifizieren.

1.2 Fragestellung und Ziel der Dissertation

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob mittels innovativer Strategien der Informationsgewinn aus biologischen Tatortspuren erweitert werden kann. Dafür beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit vier Teilaspekten, die alle Analyseschritte der forensischen Genetik umfassen (s. Abb. 5):

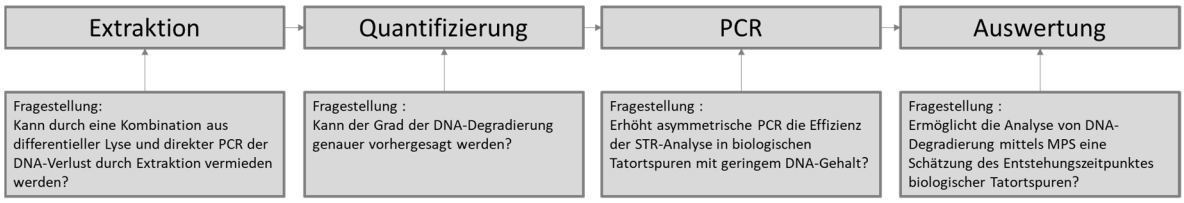


Abbildung 5: chronologischer Verlauf forensischer DNA-Analysen und die bestehenden Fragestellungen in den einzelnen Schritten

1. *Kann durch eine Kombination aus differentieller Lyse und direkter PCR der DNA-Verlust durch Extraktion vermieden werden?*

Es soll geprüft werden, ob ein Einsatz von Spermien in die direkte PCR auch in Kombination mit einer vorherigen differentiellen Lyse möglich ist. Es soll dargestellt werden, ob so die DNA-Spuren aus Fällen sexueller Gewalt erfolgreich analysiert werden können und ein DNA-Verlust durch eine vorherige Extraktion vermieden wird.

2. *Kann der Grad der DNA-Degradierung genauer vorhergesagt werden und kann durch verschiedene Lagerungsbedingungen die Degradierung beeinflusst werden?*

Es soll geprüft werden, ob der Grad der DNA-Degradierung einer Probe mit Hilfe von Modifikationen bekannter RT-PCR-Analysen bzw. der Verwendung automatisierter Elektrophoresemethoden exakter detektiert werden kann, um so ggf. genauere Informationen zu der Schädigung der DNA zu erhalten und die optimale Amplifikationsstrategie zu wählen. Weiter soll geprüft werden, ob verschiedene Lagerungsbedingungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Degradierung haben.

3. *Erhöht asymmetrische PCR die Effizienz der STR-Analyse in biologischen Tatortspuren mit geringem DNA-Gehalt?*

Es soll überprüft werden, ob die Methode der LATE-PCR auf forensische STR-Marker anwendbar ist und Spuren mit geringem DNA-Gehalt mit Hilfe dieser Methode erfolgreich analysiert werden können.

4. *Ermöglicht die Analyse von DNA-Degradierung mittels MPS eine Schätzung des Entstehungszeitpunktes biologischer Tatortspuren?*

Es soll mittels gesamtgenomischer MPS (=*whole genome amplification*, WGA) geprüft werden, ob *single nucleotide variants* (SNV) in DNA-Spuren detektiert werden können, die sich durch Deaminierung erklären lassen. Weiterhin soll geprüft werden, ob der Anteil der

artifiziellen Variante gegenüber dem Ursprungstyp proportional zum Alter der Spuren zunimmt. Schließlich sollen vielversprechende DNA-Stellen für die Schätzung des Entstehungszeitpunktes von Spuren identifiziert werden, die sowohl in Speichel als auch in Blut zur Anwendung kommen könnten.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Extraktion von DNA aus forensisch relevantem Spurenmaterial

Erste Veröffentlichung

Tobe, S.S., Swaran, Y.C., Dennany, L. et al. A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault. Int J Legal Med 131, 87–94 (2017).

Hintergrund

Zur Beantwortung der Forschungsfrage *„Kann durch eine Kombination aus differentieller Lyse und direkter PCR der DNA-Verlust durch Extraktion vermieden werden?“* behandelt die vorliegende Veröffentlichung die Möglichkeit, Spuren, die Sperma enthalten, mittels einer Kombination aus differentieller Lyse und direkter PCR analysieren zu können. Es soll dadurch ein möglicher DNA-Verlust durch die Extraktion zu vermeiden und eine Darstellung der Minorkomponente einer DNA-Mischung ermöglicht werden.

Methoden

Es wurden zudem Sperma-Speichel-Mischungen im Verhältnis 1:10 sowohl in flüssiger Form als auch aufgetragen auf Baumwolle, angelegt. Der hierbei verwendete Speichel stammt von einer weiblichen Spenderin, so dass Spuren, die in Fällen sexualisierter Gewalt häufig vorliegenden simuliert werden konnten. Die differentielle Lyse wurde bei 70°C mit drei unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Der Erfolg der differentiellen Lyse wurde durch morphologische Untersuchungen mittels HE-Färbung (Pellet und Überstand nach differentieller Lyse) sowie Auswertung der STR-Profile überprüft. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand sowie das gewaschene Pellet wurden direkt in die PCR eingesetzt.
Es wurde eine sechsstufige Verdünnungsreihe von Sperma mit HPLC-Wasser hergestellt, die auf sterilen Baumwollstoff aufgebracht und luftgetrocknet wurde. Des Weiteren wurden Proben aus vergangenen Ringversuchen der Spurenkommission (german DNA profiling: GEDNAP) [73] verwendet. Der GEDNAP-Ringversuch findet zweimal jährlich statt und bietet Laboren die Möglichkeit, durch Analyse künstlich angelegter Spurenproben, die Qualität ihrer Analysen darzustellen. Bei den hier verwendeten Ringversuchsproben handelt es sich um Proben aus Sperma oder Mischungen von Sperma mit anderen Körperflüssigkeiten. Diese waren entweder auf Baumwolle aufgetragen worden oder es wurde ein Abrieb der Spur vorgenommen und dieser für die Analyse eingesetzt. Von Proben, die auf Baumwollstoff angelegt wurden, wurden jeweils 2-3 Fasern von 2-3 mm

Länge in die direkte PCR eingesetzt. Von allen PCR-Produkten wurde durch Zentrifugation ein Pellet erstellt, welches mittels HE-Färbung morphologisch untersucht wurde.

Ergebnisse

Die verschiedenen Anteile der Mischproben konnten nach der differentiellen Lyse durch die direkte PCR erfolgreich dargestellt werden. Dass die Spermienfraktion erfolgreich von der weiblichen Schleimhautfraktion getrennt werden konnte, zeigten HE-Färbungen der Pellets nach den verschiedenen Inkubationszeiten. Die beste Differenzierung konnte durch eine 60-minütige Inkubation erzielt werden. Bereits nach einer Inkubation von 15 Minuten fanden sich nur noch wenige zelluläre Strukturen neben den Spermien. In den dargestellten STR-Profilen der Pellets war ein DNA-Profil mit männlichem Amelogeninbefund deutlich von einer Minorkomponente mit weiblichem Amelogeninbefund abgrenzbar.
Durch die direkte PCR konnten vollständige STR-Profile aus Spermaproben bis zu einer Verdünnung von 1:80 dargestellt werden. Auch aus den untersuchten Ringversuchsproben konnten vollständige Profile erstellt werden, in denen die bekannten Sollwerte erreicht wurden.
In den HE-Präparaten der Pellets aus den PCR-Produkten wurden keine intakten Spermien mehr nachgewiesen. Somit fand eine vollständige Lyse der Spermien während der direkten PCR statt.

Diskussion

Proben aus Fällen sexualisierter Gewalt stellen einen hohen Anteil der in der forensischen Molekularbiologie zu untersuchenden Spuren dar. Die Analyse solcher Proben ist sehr zeitintensiv, da neben histologischen Färbungen und Mikroskopie zusätzlich eine differentielle Lyse notwendig ist. Ohne differentielle Lyse ist an typischen Mischspuren mit weiblichen Epithelzellen und Spermien eine Darstellung der DNA-Merkmale der Spermien häufig nicht möglich. Diese können durch einen massiven Überschuss an weiblicher DNA überlagert werden. Es wurde bereits mit verschiedenen Ansätzen eine Trennung der DNA-Anteile durchgeführt, wie beispielsweise durch Lasermikrodissektion [24]. Methoden wie diese führen jedoch zu einem massiven zeitlichen Mehraufwand im Analyseprozess. Um dennoch eine Verkürzung der Analysezeit bewirken zu können besteht eine Möglichkeit darin, die Spur nach der differentiellen Lyse nicht zu extrahieren, sondern direkt in die PCR einzusetzen. Die direkte PCR wird für andere Spurenmaterialien bereits erfolgreich angewandt [61,63,66] und bietet einen weiteren entscheidenden Vorteil: Eine Extraktion mit Aufreinigungsschritten über magnetische Partikel führt immer zu einem Verlust an DNA [19], der durch die direkte PCR vermieden werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass durch direkte PCR sehr geringe Mengen Sperma erfolgreich typisiert werden konnten. Es spricht somit dafür, dass durch den Verzicht der Extraktion ein DNA-Verlust vermieden wird und somit ein sensitiver Nachweis mit minimalem Zeit- und Kostenaufwand möglich ist. Um Spermien in der direkten PCR erfolgreich analysieren zu können, müssen die intakten Spermien im PCR-Prozess durch die Hitze des Denaturierungsschrittes aufgebrochen

werden. Die HE-Färbungen der PCR-Produkte dieser Studie zeigen, dass nach der PCR keine intakten Spermien mehr nachgewiesen werden konnten. Dies spricht für eine erfolgreiche Lyse der Spermien und verdeutlicht, dass das erhaltene DNA-Profil das Profil aus den Spermien repräsentiert.

1.3.2 Detektion der Schädigung einer Spur

Zweite Veröffentlichung

Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Detecting DNA damage in stored blood samples. Forensic Sci Med Pathol (2022).

Hintergrund

Zur Beantwortung der Forschungsfrage *„Kann der Grad der DNA-Degradierung genauer vorhergesagt werden und kann durch verschiedene Lagerungsbedingungen die Degradierung beeinflusst werden?“* behandelt die vorliegende Veröffentlichung die Möglichkeit, Schädigungen der DNA durch bereits etablierte Quantifizierungsmethoden besser detektieren zu können. Dazu soll eine Modifizierung der Methode mittels UNG auf eine mögliche genauere Detektion der Schädigung geprüft werden. Alternative Methoden wie die automatisierten Elektrophoresen FEMTO und Tapestation sollen bezüglich einer Verbesserung der Darstellung des Degradierungsgrades vergleichend getestet werden. Es soll so eine Methode etabliert werden, die genauere Informationen zur Integrität der Spur liefert.

Methode

Für diese Studie wurden Blutflecke aus 40µl Blut unter drei verschiedenen Lagerungsbedingungen (RT, 4°C, 37°C) für bis zu 316 Tage gelagert. Die Quantifizierung aller Proben erfolgte mittels RT-PCR und einem standardmäßig in der forensischen Routinearbeit eingesetzten Quantifizierungskit. Es wurden STR-Profile von Proben drei verschiedener Lagerungszeiten (0, 21 und 83 Tage) mittels PowerPlex ESX 17 System (Promega) generiert und mit den in der Quantifizierung erhaltenen DI verglichen. Für die Modifizierung der klassischen Quantifizierung wurden die Proben zunächst 20min bei 50°C unter der Zugabe von AmpErase™ Uracil N-Glycosylase (UNG) inkubiert. Diese Modifikation wurde für zwei verschiedene Quantifizierungskits (PowerQuant System von Promega und Investigator Quantiplex Pro von Qiagen) durchgeführt. Anschließend wurden die gemessenen DI mit und ohne vorheriger Zugabe von UNG verglichen. Es kamen zwei automatisierte Elektrophoresemethoden zum Einsatz, die in der forensischen Molekulargenetik vor allem zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle von MPS-Seuqenzierbibliotheken eingesetzt werden. Es wurden Blutproben unterschiedlicher Lagerungsdauer- und Bedingungen vergleichend mit der 4150 TapeStation und dem Genomic DNA ScreenTape Assay sowie dem FEMTO Pulse automated pulsed-field CE

instrument der Firma Agilent und dem 165 kb Analyse Kit und der ProSize data analysis software analysiert. Die erhaltenen Integritäts- bzw. Qualitätswerte wurden in Hinblick auf die Lagerungsbedingungen und –Zeiten ausgewertet und verglichen.

Ergebnisse

Die Quantifizierung der unterschiedlich gelagerten Proben mittels RT-PCR zeigt, dass unter allen drei Lagerungsbedingungen kein DNA-Verlust über einen Zeitraum von bis zu 83 Tagen beobachtet werden kann. Es konnte eine signifikant höhere DNA-Ausbeute bei solchen Proben nachgewiesen werden, die bei 37°C gelagert wurden im Vergleich zu den bei Raumtemperatur oder bei 4°C gelagerten Proben. Bei diesen Proben konnte mit längerer Lagerungsdauer eine erhöhte DNA-Konzentration gemessen werden. Dieser Zusammenhang wurde unter den beiden alternativen Lagerungsbedingungen nicht festgestellt. Für jede Probe wurde der DI bestimmt. In allen drei Lagerungsbedingungen konnte ein Anstieg des DI innerhalb der ersten sieben Tage der Lagerung festgestellt werden. Über den gesamten Zeitraum konnte hingegen bei der Lagerung bei 37°C und bei Raumtemperatur ein leicht negativer Trend des DI über die Zeit beobachtet werden. Die STR-Analysen der Proben mit den Lagerungszeiten 0, 21 und 83 Tage haben gezeigt, dass ein deutlicher *Skislope*-Effekt in den DNA-Profilen der Proben nach 21 und 83 Tagen Lagerung sichtbar wird, auch wenn der kritische Wert für den DI noch nicht erreicht wurde. DNA-Degradierung führte zudem zu Allel-Dropouts in STR-Systemen mit großen Amplikonlängen.
Die Modifikation mittels UNG zeigte in den zwei verschiedenen RT-PCR-Kits keinen generellen Anstieg der gemessenen DI mit steigender Lagerungsdauer. Insgesamt konnten durch die Messung mit dem Investigator Quantiplex Pro Kit in Proben, die mit UNG behandelt wurden höhere DI gemessen werden als in unbehandelten Proben. Bei der Messung mittels PowerQuant System konnten in behandelten und unbehandelten Proben vergleichbare DI gemessen werden.
Die mittels automatisierter Elektrophoresemethoden bestimmten DNA-Qualitätsmarker *DNA integrity numbers* (DIN) bei der Messung mit der Tapestation und *Genomic Quality Number* (GQN) bei der Messung durch FEMTO zeigten kein Abfall in Abhängigkeit der Lagerungszeit. Diese Aussage gilt für alle drei Lagerungsbedingungen. Der Median der DIN-Werte der Proben, die bei 37°C gelagert wurden liegt etwas höher als die Mediane der DIN-Werte der beiden weiteren Lagerungsbedingungen. Dies konnte im Vergleich der GQN-Werte der unterschiedlichen Lagerungsbedingungen nicht festgestellt werden.

Diskussion

Es scheint für die DNA-Ausbeute von Blutproben vorteilhaft zu sein, diese bei höheren Temperaturen zu lagern. Vorherige Studien zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen der Lagerungstemperatur und der Quantität sowie Integrität der Blutproben. So zeigten Al Rokayan et al. [3], dass DNA aus Blutproben, die bei -20°C gelagert wurden, ein höheres Molekulargewicht aufwies als Proben, die bei 4°C lagerten. Auch Huang et al. [45] wiesen

Vorteile einer Lagerung bei 24°C gegenüber einer 4°C Lagerung nach, was in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der hier vorgelegten Arbeit steht. In der hier vorliegenden Studie könnte vor allem ein Zusammenhang mit der Luftfeuchtigkeit unter den verschiedenen Lagerungen bestehen. Bei 37°C im Brutschrank lagern die Proben wesentlich trockener als bei Raumtemperatur und insbesondere im Kühlschrank. Insgesamt kann aufgrund der hier vorliegenden Resultate und der Ergebnisse aus vorherigen Studien davon ausgegangen werden, dass im Fall einer Kurzzeitlagerung (ein bis zwei Wochen) von Blutproben eine wesentlich niedrigere oder höhere Temperatur als 4°C vorteilhaft für die genetische Analyse der Spur ist.

Durch Beobachtungen, die in der Routinefallarbeit gemacht wurden, wurde vermutet, dass in der DNA vorliegende Schädigungen nicht ausreichend präzise durch die uns zur Verfügung stehenden Quantifizierungsmethoden abgebildet werden können. Wenn STR-Profile Zeichen der Degradierung aufweisen, liefern die Quantifizierungs-Kits oft keinen kritischen DI-Wert hierfür und umgekehrt. Bestätigt wird dieser Eindruck durch die Ergebnisse dieser Studie und die Ergebnisse der Studie von Bulla et al. [16], die darlegten, dass bei einer Langzeitlagerung von Blutproben zwar mittels RT-PCR ein Quantitätsverlust zu beobachten ist, jedoch keine verminderte Integrität der DNA.

Andere Studien, wie die von Lin et al. [59] zeigten, dass eine künstliche Degradierung von DNA bis zu einer Fragmentgröße von nur noch 300-500bp zwar die Darstellung vollständiger DNA-Profile zulässt, der gemessene DI jedoch stark ansteigt. Der Unterschied zu der hier vorliegenden Studie liegt vor allem in der künstlichen Degradierung. Lin et al. [59] haben die Proben so lange einem Degradierungsvorgang unterzogen, bis die Fragmentierung der DNA sichtbar wurde. In der hier vorliegenden Studie hingegen wurden die Proben über unterschiedlich lange Zeiträume einem natürlichen Degradierungsprozess überlassen. Die hierbei stattfindende Schädigung der DNA entzieht sich den Ergebnissen und Beobachtungen nach den Detektierungsmöglichkeiten der angewandten Methoden. Eine alternative Nachweismethode für derartige Schädigungen würde einen enormen Informationsgewinn über die Integrität der DNA-Probe liefern.

Die hier erhobenen Befunde sollten durch weitere Untersuchungen validiert werden, da eine erhöhte Extraktionseffizienz durch die optimale Lagerung der Spuren zu einer erfolgreicheren Analyse und somit einem möglichen Informationsgewinn aus der Spur führen kann. Holmes et al. [41] beschrieben 2018 eine generell höhere DI-Messung mit dem Investigator Quantiplex Pro Kit der Firma Thermo Fischer verglichen mit dem PowerQuant System der Firma Promega. Dies konnte in dieser Studie bei der Messung der Proben, die mit UNG behandelt wurden, bestätigt werden. Insgesamt konnte eine leichte Erhöhung der Sensitivität der Degradationsmessung mittels Investigator Quantiplex Pro, nicht jedoch mittels PowerQuant System, erreicht werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Größendifferenz zwischen dem autosomalen Target und dem Degradations-Target beim Investigator Quantiplex Pro Kit höher ist als beim PowerQuant System. Der Unterschied zwischen UNG-behandelten und nicht behandelten Proben in der Investigator Quantiplex Pro Messung kann dadurch erklärt werden, dass Hydrolyse der DNA zur Deaminierung des Cytosins führt. Durch Deaminierung wird das Cytosin so

verändert, dass es zu Uracil wird [58]. UNG trennt die N-glykosidische Bindung zwischen dem Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA und der Base, so dass eine Schwachstelle, eine so genannte abasische Stelle, im DNA-Strang entsteht [56]. Durch diese Schwachstelle wird die DNA-Sequenz hier sensibler für Strangbrüche, die in der Quantifizierung nachgewiesen werden können. Messungen UNG-behandelter und unbehandelter Proben mit dem Investigator Quantiplex Pro Kit sollten umfänglicher untersucht werden, da sich hier ein Potential zeigt die Degradierung sensitiver nachzuweisen. Eine Kurzzeitlagerung von Blutproben bei 37°C scheint einen positiven Einfluss auf die Extraktionseffizienz der Proben zu haben, in wie fern dies auch mit dem Degradierungsstatus der Proben korreliert sollte in einer weiteren Studie geprüft werden. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine wärmere und trockenere Lagerung über längere Zeiträume einen positiven Einfluss auf die Degradierung der Proben haben kann.

1.3.3 Spuren mit geringem DNA-Gehalt: LATE-PCR

Dritte Veröffentlichung

Schulze Johann, K, Schürenkamp M, Sibbing U, Lischka C, Pfeiffer H, Vennemann M 2015: Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: improved asymmetric PCR for quantitative DNA-analysis. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 5: e659-e661

Hintergrund

Zur Beantwortung der Forschungsfrage *„Erhöht asymmetrische PCR die Effizienz der STR-Analyse in biologischen Tatortspuren mit geringem DNA-Gehalt?“* behandelt die vorliegende Veröffentlichung die Möglichkeit, Spuren mit besonders geringem DNA-Gehalt mittels der LATE-PCR besser analysieren zu können.

Methode

Für die vorliegende Studie wurde eine *linear-after-the-exponential*-(LATE)-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein international verbreitetes STR-System ausgewählt (TH01), welches eine einfache Repeatstruktur aufweist. Für das STR-System TH01 wurden neue Primer sowie eine *molecular beacon*-Sonde mittels Primer 3 Softeware entwickelt. Schmelzkurvenanalysen zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur der *molecular beacon*-Sonde wurden durchgeführt. Die Primer wurden in einem starken Ungleichgewicht in die PCR eingesetzt, so dass ein Primer nach wenigen PCR-Zyklen verbraucht und anschließend ausschließlich ein DNA-Strang weiter vervielfältigt wurde. Analysiert wurden Verdünnungsreihen des Quantifiler Human DNA-Standards von Life Technologies.

Ergebnisse

Es konnten erfolgreich Primer sowie eine *molecular beacon*-Sonde erstellt werden. Die optimale Temperatur zur Hybridisierung der *molecular beacon*-Sonde wurde durch die Schmelzkurvenanalyse auf 70°C bestimmt. Der Verlauf der RT-PCR konnte mit Hilfe der Sonde erfolgreich detektiert werden. Es wurde dargestellt, dass die angesetzte LATE-PCR nicht wie die klassische PCR in einem Plateau endet, sondern auch über viele weitere Zyklen einen linearen Anstieg des PCR-Produkts zeigt. Der Einsatz unterschiedlicher DNA-Mengen in die LATE-PCR zeigt, dass eine Korrelation zwischen dem Endpunkt der PCR und der eingesetzten Templatemenge der Probe besteht.

Diskussion

Es konnten dargestellt werden, dass durch den Einsatz der LATE-PCR eine massive Erhöhung der PCR-Zyklenzahl möglich ist, ohne dass die PCR durch Produktinhibierung in einem Plateau endet. Somit können Spuren mit geringem DNA-Gehalt mit deutlich mehr Zyklen amplifiziert werden, um mehr Produkte für die Kapillargelelektrophorese zu erhalten. Die Möglichkeit, die Endpunktkonzentration der Probe in der LATE-PCR mit der Ausgangskonzentration der Probe zu korrelieren, bietet die Option zwei Analyseschritte (Quantifizierung und Amplifikation) zu vereinen. Bei Spuren, die einen geringen DNA-Gehalt erwarten lassen, kann dieses Vorgehen Kosten, Zeit und Spurenmaterial sparen. Ebenso wird hierdurch die manuelle Handhabung der Spur reduziert, was vor allem bei Spuren mit sehr geringem DNA-Gehalt das Kontaminationsrisiko deutlich senkt. In Bezug auf die Forschungsfrage bietet die Anwendung der LATE-PCR bei Spuren mit geringem DNA-Gehalt das Potential, diese erfolgreicher amplifizieren zu können, so dass STR-Profile erzeugt werden können, die für Abgleiche geeignet sind. Derzeit liegt noch kein Multiplex-Lösung dieser Methode vor, so dass weitere Studien nötig sind um dieses Hindernis zu überwinden.

1.3.4 Einschätzung des Alters einer Spur

Vierte Veröffentlichung

Schulze Johann K, Bauer H, Wiegand P, Pfeiffer H, Vennemann M. Whole-genome sequencing of artificial single-nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces. Int J Legal Med. 2023 Jan; 137(1):33-45.

Hintergrund

Zur Beantwortung der Forschungsfrage *„Ermöglicht die Analyse von DNA-Degradierung mittels MPS eine Schätzung des Entstehungszeitpunktes biologischer Tatortspuren?“* behandelt die vorliegende Veröffentlichung eine der bisher wichtigsten ungeklärten Fragen der forensischen Molekularbiologie: eine Möglichkeit der Bestimmung der TsD einer Spur.

Dazu soll mit Hilfe eines *Whole genome Sequencings* nach Positionen im Genom gesucht werden, die sich in Abhängigkeit von der Lagerunsgdauer einer Spur verändern.

Methode

Es wurden eine Vorstudie und eine Folgestudie durchgeführt. In der Vorstudie wurden drei Blutproben, die unterschiedlich lange im Trockenen bei Raumtemperatur gelagert wurden (0, 21, 120 Tage), einem *Whole Genome Sequencing* (WGS) unterzogen. Für die Folgestudie wurde das Probenkollektiv um eine weitere Körperflüssigkeit (Speichel) und eine weitere Lagerungsbedingung (feucht) erweitert. Hier wurden insgesamt 10 Proben mit Lagerungsdauern von 0, 22 und 92 Tagen untersucht. Während für die Vorstudie das Gerät NextSeq 500 System (Illumina) verwendet wurde, wurde in der Folgestudie mittels NovaSeq 6000 System (Illumina) sequenziert, was eine höhere Sequenzier-Abdeckung aufweist.
Aus allen Proben wurde die DNA mit dem Maxwell 16 Forensic Instrument extrahiert und mittels PowerQuant System quantifiziert. Die Sequenzierbibliiotheken wurden mit dem NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit erstellt und ihr Qualität durch Messung mit der TapeStation und dem D1000 ScreenTape und Analysis Software 3.1.1 überprüft.
Die Auswertung der MPS-Rohdaten wurde für beide Studien gleich durchgeführt, ebenso die Auswertung der festgestellten Varianten. In einem ersten Schritt wurden Genotypänderungen verglichen zum Referenzgenom ausgewertet, in einem zweiten Schritt die SNV dahingehend gefiltert, welche Basen betroffen sind und wie sie sich ändern. Daraufhin wurden weitere Analysen auf die Varianten G>A und C>T fokussiert, da diese Veränderungen darstellen, die durch Umwelteinflüsse wie Hydrolyse zu erwarten sind. Diese weiterführenden Auswertungen beruhen auf den *read counts* der einzelnen SNV verglichen mit dem Referenzgenom GRCh38. Es wurden vorliegende Genotypen im Vergleich zum Referenzgenom ausgewertet, wobei der Genotyp 0/0 dem Genotyp der Referenz entspricht, 0/1 einen heterozygoten Genotyp darstellt, der das Allel des Referenzgenoms und ein alternatives Allel aufweist und der Genotyp 1/1 homozygot ein alternatives Allel zum Referenzgenom darstellt. Über die *read counts* der festgestellten Varianten und der Gesamt-*read counts* der Position wurde ein prozentualer Anteil der *read counts* der Variante (*percentage reads of variant*, PRV) kalkuliert. Dieser liegt demnach bei einem Genotyp 0/0 bei 0 und bei einem Genotyp 1/1 bei 100.

Ergebnisse

Beide Sequenzierungsläufe konnten erfolgreich durchgeführt werden. Bei der Qualitätskontrolle der Sequenzierbibliotheken (englisch: *libraries*) beider Studien ist eine Verringerung der DNA-Fragmentgröße über die Zeit sichtbar. Es wurden auch in beiden Studien Positionen nachgewiesen, an denen eine Genotypisierung fehlschlug. Die Anzahl dieser Positionen nimmt in beiden Studien mit der Lagerungsdauer der Proben zu. Es wurden stets überwiegend solche SNV nachgewiesen, die eine G-A oder C-T Änderung darstellen.

Vorstudie: Es konnte zum Zeitpunkt 0 überwiegend der Genotyp 0/0 zum Referenzgenom nachgewiesen werden. Bei gealterten Proben nimmt der Anteil homozygoter Genotypen ab und entsprechend der Anteil heterozygoter Genotypen zu. Es konnten 17 SNV nachgewiesen werden, die über den untersuchten Zeitpunkt den homozygoten Genotyp zum Zeitpunkt 0 in den komplementären, homozygoten Genotypen nach 120 Tagen Lagerung geändert haben. Es konnten neun SNV identifiziert werden, die eine signifikante graduelle Veränderung des PRV über die Zeit aufweisen.

Follow-up Studie: Die Verteilung der Genotypen über die Zeit zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den Probenmaterialien. Der Anteil an 1/1 Genotypen zum Zeitpunkt 0 ist in der Speichelprobe zehnmal höher als in der Blutprobe. In den weiteren Proben sind die Genotypverteilungen vergleichbar und entsprechen den Erwartungen aus der Vorstudie. Getrennt betrachtet nach Lagerungsbedingungen und Probenmaterial, konnten auch in der *follow-up* Studie zwischen 12 und 28 SNV festgestellt werden, die über den untersuchten Zeitpunkt ihren homozygoten Genotyp zum Zeitpunkt 0 in den komplementären Genotypen nach 92 Tagen Lagerung geändert haben.
Es konnte eine Vielzahl an G>A und C>T SNV identifiziert werden, die einen signifikanten Anstieg oder eine Verringerung des PRV über den untersuchten Zeitraum zeigen. Aus diesen SNVs konnten 11 SNV ermittelt werden, die sowohl in den Speichel- als auch den Blutproben diesen signifikanten Verlauf des PRV aufweisen. Es handelt sich bei diesen 11 SNV ausschließlich um solche Stellen, die einen ansteigenden PRV zeigen.

Diskussion

Die in der Quantitätsprüfung der *libraries* festgestellte Minderung der Fragmentlängen mit steigender Lagerungsdauer der Spuren entspricht der Annahme, dass DNA-Proben durch die Lagerung und dabei einwirkender Umwelteinflüsse Schädigungen aufweisen, die die DNA-Stränge empfindlicher gegenüber mechanischem *Shearing* machen. Eine Destabilisierung der DNA durch das Vorliegen von abasischen Stellen zeigten bereits Hianik et al [39]. Demnach wurden in älteren Proben durch vermehrte hydrolytische Schäden und mechanischem *Shearing* der DNA kürzere *library* Fragmente amplifiziert.
Der Unterschied in der Häufigkeit der 1/1 Genotypen zwischen der frischen Blut- und Speichelprobe in der *follow-up* Studie ist auffällig. Nach einer Lagerung der Blutprobe für 22 Tage gleicht sich die Anzahl der SNV mit dem Genotyp 1/1 der Speichelprobe an, die diese Häufigkeit bereits in der frischen Probe aufweist. Der Genotyp 1/1 tritt in der Speichelprobe in allen Proben unterschiedlicher Lagerungsdauer in etwa ausgeglichen häufig auf. Dies spricht dafür, dass der für die Speichelprobe angenommene Nullpunkt nicht den wahren Zeitpunkt 0 darstellt. Der für die Studie entnommene Wangenschleimhautabrieb enthält, wie vermutet werden kann, Zellen, die bereits Hydrolyse erfahren haben und dementsprechend erste Zeichen von DNA-Schädigung aufweisen. Diese Vermutung sollte durch weitere Studien genauer untersucht werden. Trost et al. [87] haben ebenfalls dargelegt, dass Blutproben am besten für MPS-Analysen geeignet sind. Es stellen sich Unterschiede zwischen den Proben dar, die im

Zusammenhang mit der Alterung bzw. Schädigung der Probe stehen können. Es zeigen sich demnach überwiegend schrittweise Veränderungen von einem homozygoten Genotyp zu einem heterozygoten und erst nach der Gesamtlagerungszeit Änderungen zum gegenteiligen homozygoten Genotyp. Diese Positionen, die über den untersuchten Zeitraum einen vollständigen Genotypwechsel vollziehen, sind potenziell geeignete Marker für eine Kurzzeit-Altersschätzung. Vor allem solche Positionen, die sich nach dem untersuchten Zeitraum nicht vollständig verändert haben, im Verlauf der Zeit jedoch einen graduellen Anstieg der Variante aufweisen, eignen sich möglicherweise auch für die Bestimmung längerer Lagerungszeiten. Auch die Art der Varianten, die überwiegend Änderungen von G zu A bzw. C zu T darstellen, sprechen für alterungsbedingte Änderungen der DNA. Diverse Studien [10,13,40,87] belegten bereits, dass derartige Varianten bei Depurinierung durch hydrolytische Angriffe entstehen. Rathburn et al. [74] zeigten im Vergleich, dass sie überwiegend A>G und T>C Transitionen nachweisen konnten. Sie erklären diesen Unterschied zu anderen Studien mit der Anwendung anderer Sequenziertechnologien und unterschiedlichen Sequenzierplattformen.

In dieser Teilstudie konnten erfolgreich potentielle Marker identifiziert werden, die sich für die Bestimmung der TsD in Proben verschiedener Herkunft und Lagerung eignen. Die Möglichkeit der Anwendung dieser Marker in der forensischen Fallarbeit würde einen enormen Informationsgewinn über eine Tatortspur bieten, da über die Einschätzung ihrer Lagerungsdauer eine Aussage über eine Tatrelevanz von Spuren möglich würde.

1.4 Zusammenfassende Beantwortung der Forschungsfrage und Ausblick

Die vorliegende Arbeit betrachtet die Frage, ob mit innovativen Strategien eine Erweiterung des Informationsgewinns aus biologischen Tatortspuren möglich ist. Dafür wurden vier untergeordnete Forschungsfragen zu den verschiedenen Analyseschritten der forensischen Molekulargenetik formuliert (siehe Abschnitt 1.2). Die erste Fragestellung betraf den Extraktionsschritt (siehe Abschnitt 1.3.1). So wurde gezeigt, dass die differentielle Lyse erfolgreich mit der direkten PCR kombiniert werden konnte. Diese Kombination kann enorme Vorteile für die Analyse von Spuren bringen, die eine Mischung aus Spermien und Epithelzellen enthalten. Die direkte PCR spart Zeit und Kosten der DNA-Extraktion ein. Es konnte gezeigt werden, dass ein möglicher DNA-Verlust während der Aufreinigungsschritte vermieden wird, was besonders dann von großer Bedeutung sein kann, wenn bei einer männlich-weiblichen DNA-Mischung eine Minorkomponente aus Spermien vorliegt. Somit wird durch die Kombination von differentieller Lyse und direkter PCR ein Informationsgewinn aus Spuren, die nach sexuell motivierter Gewalt gesichert wurden, z.B. in Form von Vaginalabstrichen, überhaupt erst ermöglicht. Die Darstellung eines männlichen DNA-Profils kann bedeutende Hinweise für die Ermittlungsarbeit der Polizei bringen, entweder durch Abgleich mit dem DNA-Muster einer tatverdächtigen Person oder durch Einstellung des DNA-Profils in die DNA-Analysedatei (DAD). In der DAD sind DNA-Profile verurteilter Straftäter gespeichert.

Die zweite Forschungsfrage betrifft die Detektion der Degradierung in einer Spur (siehe Abschnitt 1.3.2). Kommerziell erhältliche Quantifizierungskits bieten einen DI zur Einschätzung der DNA-Qualität einer Spur. Es hat sich in der Routinearbeit gezeigt, dass dieser Wert nicht immer den genauen Zustand der Spur widerspiegelt. In der hier vorliegenden zweiten Publikation wurden dazu verschiedene Methoden verglichen und modifiziert bzw. neue Methoden zur Bestimmung der Degradation getestet, um einen genaueren Wert für den Grad der DNA-Schädigung in einer Spur bestimmen zu können. Vielversprechend scheint hier der Einsatz von UNG kombiniert mit dem Investigator Quantiplex Pro Kit der Firma Qiagen zu sein. Der Einsatz von UNG in DNA-Spuren, die möglicherweise Schädigungen durch Deaminierung aufweisen, könnte ggf. die Detektion des Degradierungsgrades verbessern. Die Entfernung des Uracils mittels UNG führt in der DNA-Struktur zu einer abasischen Stelle, wodurch diese empfindlicher für Strangbrüche wird [56]. Durch die so herbeigeführten Strangbrüche können Schädigungen der DNA, die zwar bereits vorliegen aber ohne UNG Zugabe noch nicht zu einem Strangbruch geführt haben detektiert werden und genauere Informationen über die Integrität der DNA liefern. Für zukünftige Studie wäre denkbar, die hier erzielten Ergebnisse mit denen der vierten Forschungsfrage (siehe unten) zu verknüpfen: Eine logische Fortführung wäre die Überprüfung, ob eine Korrelation der mit dieser Methode bestimmten DI und der Lagerungsdauer der Proben besteht und so über die DNA-Schädigung ein Informationsgewinn hinsichtlich Lagerungsdauer der Spur (Zeit seit der Spurenentstehung) möglich ist.

In einem weiteren Teilaspekt der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch den Einsatz der LATE-PCR eine Steigerung der Amplifikationseffizienz erreicht werden kann. Bisher gelingt es häufig nicht, Proben mit geringem DNA-Gehalt erfolgreich zu amplifizieren und ein vollständiges DNA-Profil zu erhalten. Eine Erhöhung der PCR-Zyklenzahl wäre nicht zielführend, da die klassische PCR in einem Plateau endet. Wir konnten am Beispiel des STR-Markers TH01 zeigen, dass die Erzeugung eines verbesserten PCR-Verlaufs mittels LATE-PCR möglich ist und Proben mit sehr geringem DNA-Gehalt mit deutlich mehr Zyklen amplifiziert werden können. Aus Proben mit einem geringen DNA-Gehalt könnten so verwertbare Profile erstellt werden, die einen Abgleich mit Personen oder anderen Spuren ermöglichen. Die Ergebnisse dieses Teils der vorliegenden Arbeit stellen zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich eine Bestätigung des grundsätzlichen Prinzips dar. Vor einem Einsatz in der forensischen Routinearbeit sind weitere Arbeiten notwendig, zum Beispiel die Prüfung, ob auch in der kombinierten Multiplex-Amplifikation die PCR-Effizienz gesteigert werden kann. Weiterhin sollte herausgearbeitet werden, ob diese Methode eine sinnvolle Ergänzung der im ersten Teilaspekt dieser Arbeit beschriebenen Steigerung des Informationsgewinns durch die Kombination von differentieller Lyse und direkter PCR darstellen könnte und ob diese Erweiterung einen weiteren Vorteil bei der Bearbeitung von Spuren nach sexuell motivierter Gewalt darstellen.
Die hier vorgelegte vierte Publikation befasst sich mit der forensischen Frage, wie lange eine Spur von der Entstehung bis zur Analyse gelagert wurde. Damit verbunden ist die Frage, ob eine biologische Tatortspur tatsächlich zum Zeitpunkt der Tat entstanden ist und somit relevant für die Rekonstruktion des Tatherganges ist. Mittels WGS wurde gezeigt, dass sich Positionen in der DNA finden, die proportional zur Lagerungsdauer eine chemische Änderung durchlaufen. Bislang ist eine Schätzung des Entstehungszeitpunktes einer DNA-Spur nicht in der Routinearbeit forensischer Labore verankert und die im Rahmen dieser Studie identifizierten Positionen sind vielversprechende potentielle Marker für die Etablierung eines zukünftigen Verfahren zur Bestimmung der TsD einer Tatortspur. Für polizeiliche Ermittlungen kann diese Einschätzung ein wichtiger Hinweis vor allem hinsichtlich der Tatrelevanz der Spur sein. Wenn in weiteren Studien mit Hilfe von sogenanntem *targeted sequencing* dieser Stellen ein mathematischer Algorithmus zur Schätzung der TsD aufgestellt werden kann, bietet dieses einen bisher noch fehlenden Informationsgewinn aus Tatortspuren.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass in verschiedenen Analyseschritten durch Modifikationen oder Anwendung innovativer Methoden der Informationsgewinn aus Tatortspuren deutlich erweitert werden kann. Zudem bieten Methoden wie das MPS das Potential, neue Fragestellungen, wie die Schätzung der TsD, klären zu können und neue Informationen aus DNA-Spuren zu gewinnen.

1.5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die verschiedenen Analyseschritte der forensischen Molekulargenetik und zeigt, dass durch Modifikationen und Anwendung innovativer Methoden der Informationsgewinn aus Tatortspuren deutlich erweitert werden kann.
Es wird gezeigt, dass die Kombination aus differentieller Lyse und direkter PCR eine Darstellung vollständiger STR-Profile aus Spuren, die typischer Weise in Fällen sexualisierter Gewalt vorkommen erlaubt. Die Analyse wird zeitsparender und Anteile männlicher DNA in diesen Spuren können im Vergleich zur konventionellen Spurenanalyse erfolgreicher dargestellt werden.
Es wird weiter gezeigt, dass alternative Methoden zur Quantifizierung der DNA das Potential bieten DNA-Degradierung besser abbilden und einschätzen zu können. Dies bietet die Möglichkeit Analysemethoden optimal an die Qualität der Spur anzupassen. Bezüglich der Qualität der Spur wird zudem dargestellt, dass eine wärmere und trockenere Lagerung von Blutproben über längere Zeiträume einen positiven Einfluss auf die Degradierung der DNA haben kann.
Die Anwendung der sogenannten LATE-PCR an Proben mit geringem DNA-Gehalt bietet die Möglichkeit derartige Proben erfolgreicher amplifizieren zu können. Dieses Potential wird in der vorliegenden Arbeit anhand eines STR-Merkmalssystems demonstriert. Eine der wohl wichtigsten Fragen in der forensischen Fallarbeit ist die nach der Liegezeit einer Tatortspur (TsD). In dieser Arbeit werden durch ein WGS potentielle Marker identifiziert, die sich zur Einschätzung der TsD eignen könnten. Die Erkenntnisse dieser Arbeit führen dazu, dass Analyseschritte so angepasst werden können und innovative Methoden so eingesetzt werden können, dass der Informationsgewinn aus Tatortspuren merklich erhöht wird.

1.6 Literatur

1. Adamowicz MS, Stasulli DM, Sobestanovich EM et al. (2014) Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. PLoS One 9(12): e116351
2. Akane A, Matsubara K, Nakamura H et al. (1994) Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci 39(2): 362–372
3. Alshehhi S, Haddrill PR (2019) Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. Forensic Sci Int 298: 58–63
4. Alshehhi S, Haddrill PR (2020) Evaluating the effect of body fluid mixture on the relative expression ratio of blood-specific RNA markers. Forensic Sci Int 307: 110116
5. Al-Soud WA, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 39(2): 485–493
6. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK (2001) Detection of Brucella melitensis in semen using the polymerase chain reaction assay. Vet Microbiol 83(1): 37–44
7. Andrasko J (1997) The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis. J Forensic Sci 42(4): 601–607
8. Bamberg M, Bruder M, Dierig L et al. (2022) Best of both: A simultaneous analysis of mRNA and miRNA markers for body fluid identification. Forensic Sci Int Genet 59: 102707
9. Bedford JM, Bent MJ, Calvin H (1973) Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. J Reprod Fertil 33(1): 19–29
10. Binladen J, Wiuf C, Gilbert MTP et al. (2006) Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. Genetics 172(2): 733–741
11. Blazek V, Lins G (1982) Spektroskopische Alterbestimmung von Blutspuren: neue technische Aspekte. Acta Med Leg Soc (Liege) 32: 613–616
12. Breslin K, Wills B, Ralf A et al. (2019) HIrisPlex-S system for eye, hair, and skin color prediction from DNA: Massively parallel sequencing solutions for two common forensically used platforms. Forensic Sci Int Genet 43: 102152
13. Brotherton P, Endicott P, Sanchez JJ et al. (2007) Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. Nucleic Acids Res 35(17): 5717–5728
14. Budke B, Kuzminov A (2006) Hypoxanthine incorporation is nonmutagenic in Escherichia coli. J Bacteriol 188(18): 6553–6560
15. Budowle B, Eisenberg AJ, van Daal A (2009) Validity ofLow Copy Number Typing and Applications to Forensic Science. Croat Med J 50(3): 207–217
16. Bulla A, Witt B de, Ammerlaan W et al. (2016) Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. Biopreserv Biobank 14(1): 29–38
17. Butler JM, Shen Y, McCord BR (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. J Forensic Sci 48(5): 1054–1064
18. Butler JM (2015) Advanced topics in forensic DNA typing. Academic Press, Oxford, England, San Diego, California
19. Butts ELR, Kline MC, Almeida JL, Vallone PM DNA extraction efficiency: is it what you thought?, State Collage, Pennsylvania, USA
20. Clare M. Tande (1989) DNA Typing: A New Investigatory Tool. Duke Law Journal: 474–494

21. Davis CP, King JL, Budowle B et al. (2012) Extraction platform evaluations: a comparison of AutoMate Express™, EZ1® Advanced XL, and Maxwell® 16 Bench-top DNA extraction systems. Leg Med (Tokyo) 14(1): 36–39
22. Dembinski GM, Sobieralski C, Picard CJ (2018) Estimation of the number of contributors of theoretical mixture profiles based on allele counting: Does increasing the number of loci increase success rate of estimates? Forensic Sci Int Genet 33: 24–32
23. Dennany L, Forster RJ, White B et al. (2004) Direct electrochemiluminescence detection of oxidized DNA in ultrathin films containing Os(bpy)2(PVP)102+. J Am Chem Soc 126(28): 8835–8841
24. Di Martino D, Giuffrè G, Staiti N et al. (2004) Single sperm cell isolation by laser microdissection. Forensic Sci Int 146 Suppl: S151-3
25. Dong L, Yoshizawa J, Li X (2019) Nucleic Acid Isolation and Quality Control. Methods Mol Biol 1897: 325–343
26. Duncan BK, Weiss B (1982) Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in Escherichia coli. J Bacteriol 151(2): 750–755
27. Edwards A, Civitello A, Hammond HA et al. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet 49(4): 746–756
28. Environmental Organic Chemistry for Engineers. Elsevier
29. Ewing MM, Thompson JM, McLaren RS et al. (2016) Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant(®) system. Forensic Sci Int Genet 23: 166–177
30. Forster P, Hohoff C, Dunkelmann B et al. (2015) Elevated germline mutation rate in teenage fathers. Proc Biol Sci 282(1803): 20142898
31. Gates KS (2009) An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. Chem Res Toxicol 22(11): 1747–1760
32. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ (1985) Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature 318(6046): 577–579
33. Gill P, Kimpton C, D'Aloja E et al. (1994) Report of the European DNA profiling group (EDNAP)--towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci. Forensic Sci Int 65(1): 51–59
34. Gill P, Gusmão L, Haned H et al. (2012) DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. Forensic Sci Int Genet 6(6): 679–688
35. Goray M, van Oorschot RAH (2015) The complexities of DNA transfer during a social setting. Leg Med (Tokyo) 17(2): 82–91
36. Hanssen EN, Lyle R, Egeland T et al. (2017) Degradation in forensic trace DNA samples explored by massively parallel sequencing. Forensic Sci Int Genet 27: 160–166
37. Hedell R, Dufva C, Ansell R et al. (2015) Enhanced low-template DNA analysis conditions and investigation of allele dropout patterns. Forensic Sci Int Genet 14: 61–75
38. Heneghan N, Fu J, Pritchard J et al. (2021) The effect of environmental conditions on the rate of RNA degradation in dried blood stains. Forensic Sci Int Genet 51: 102456
39. Hianik T, Wang X, Andreev S et al. (2006) DNA-duplexes containing abasic sites: correlation between thermostability and acoustic wave properties. Analyst 131(10): 1161–1166

40. Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D et al. (2001) DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. Nucleic Acids Res 29(23): 4793–4799
41. Holmes AS, Houston R, Elwick K et al. (2018) Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples. Int J Legal Med 132(3): 691–701
42. Holtkötter H, Beyer V, Schwender K et al. (2017) Independent validation of body fluid-specific CpG markers and construction of a robust multiplex assay. Forensic Sci Int Genet 29: 261–268
43. Holtkötter H, Schwender K, Wiegand P et al. (2018) Improving body fluid identification in forensic trace evidence-construction of an immunochromatographic test array to rapidly detect up to five body fluids simultaneously. Int J Legal Med 132(1): 83–90
44. Holtkötter H, Schwender K, Wiegand P et al. (2018) Marker evaluation for differentiation of blood and menstrual fluid by methylation-sensitive SNaPshot analysis. Int J Legal Med 132(2): 387–395
45. Hussing C, Kampmann M-L, Mogensen HS et al. (2018) Quantification of massively parallel sequencing libraries - a comparative study of eight methods. Sci Rep 8(1): 1110
46. Inoue H, Takabe F, Iwasa M et al. (1991) Identification of fetal hemoglobin and simultaneous estimation of bloodstain age by high-performance liquid chromatography. Int J Legal Med 104(3): 127–131
47. Inoue H, Takabe F, Iwasa M et al. (1992) A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography. Forensic Sci Int 57(1): 17–27
48. Jansson L, Hedman J (2019) Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase. Biomol Detect Quantif 17: 100082
49. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314(6006): 67–73
50. Jung H, Hawkins M, Lee S (2020) Structural insights into the bypass of the major deaminated purines by translesion synthesis DNA polymerase. Biochem J 477(24): 4797–4810
51. Jung S-E, Shin K-J, Lee HY (2017) DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. BMB Rep 50(11): 546–553
52. Kainz P (2000) The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. Biochim Biophys Acta 1494(1-2): 23–27
53. Kind SS, Patterson D, Owen GW (1972) Estimation of the age of dried blood stains by a spectrophotometric method. Forensic Science 1(1): 27–54
54. Kumagai R (1993) Analysis of hemoglobin in bloodstains using high-performance liquid chromatography. Nihon Hoigaku Zasshi 47(3): 213–219
55. Lee JY, Lim H-W, Yoo S-I et al. (2006) Simulation and real-time monitoring of polymerase chain reaction for its higher efficiency. Biochemical Engineering Journal 29(1-2): 109–118
56. Lindahl T, Andersson A (1972) Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. Biochemistry 11(19): 3618–3623
57. Lindahl T, Nyberg B (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry 11(19): 3610–3618
58. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362(6422): 709–715

59. Lin S-W, Li C, Ip SCY (2018) A performance study on three qPCR quantification kits and their compatibilities with the 6-dye DNA profiling systems. Forensic Sci Int Genet 33: 72–83
60. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 93(1): 125–128
61. Mercier B, Gaucher C, Feugeas O et al. (1990) Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. Nucleic Acids Res 18(19): 5908
62. Mouttham N, Klunk J, Kuch M et al. (2015) Surveying the repair of ancient DNA from bones via high-throughput sequencing. Biotechniques 59(1): 19–25
63. Ohhara M, Kurosu Y, Esumi M (1994) Direct PCR of whole blood and hair shafts by microwave treatment. Biotechniques 17(4): 726, 728
64. Otten L, Banken S, Schürenkamp M et al. (2019) Secondary DNA transfer by working gloves. Forensic Sci Int Genet 43: 102126
65. Overballe-Petersen S, Orlando L, Willerslev E (2012) Next-generation sequencing offers new insights into DNA degradation. Trends Biotechnol 30(7): 364–368
66. Panaccio M, Georgesz M, Hollywell C et al. (1993) Direct PCR from solid tissues without DNA extraction. Nucleic Acids Res 21(19): 4656
67. Park J-L, Kwon O-H, Kim JH et al. (2014) Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. Forensic Sci Int Genet 13: 147–153
68. PATTERSON D (1960) Use of reflectance measurements in assessing the colour changes of ageing bloodstains. Nature 187: 688–689
69. Pfeifer CM, Klein-Unseld R, Klintschar M et al. (2012) Comparison of different interpretation strategies for low template DNA mixtures. Forensic Sci Int Genet 6(6): 716–722
70. Phillips C (2015) Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. Forensic Sci Int Genet 18: 49–65
71. Phipps M, Petricevic S (2007) The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. Forensic Sci Int 168(2-3): 162–168
72. Pierce KE, Sanchez JA, Rice JE et al. (2005) Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: primer design criteria for high yields of specific single-stranded DNA and improved real-time detection. Proc Natl Acad Sci U S A 102(24): 8609–8614
73. Rand S, Schürenkamp M, Brinkmann B (2002) The GEDNAP (German DNA profiling group) blind trial concept. Int J Legal Med 116(4): 199–206
74. Rathbun MM, McElhoe JA, Parson W et al. (2017) Considering DNA damage when interpreting mtDNA heteroplasmy in deep sequencing data. Forensic Sci Int Genet 26: 1–11
75. Romsos EL, Vallone PM (2019) Estimation of extraction efficiency by droplet digital PCR. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 7(1): 515–517
76. Salzmann AP, Russo G, Kreutzer S et al. (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
77. Salzmann AP, Bamberg M, Courts C et al. (2021) mRNA profiling of mock casework samples: Results of a FoRNAP collaborative exercise. Forensic Sci Int Genet 50: 102409
78. Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE et al. (2004) Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 101(7): 1933–1938
79. Schmidt M, Schiller R, Anslinger K et al. (2021) Statistefix 4.0: A novel probabilistic software tool. Forensic Sci Int Genet 55: 102570

80. Schmidt M, Bamberg M, Dierig L et al. (2022) Casework-related DNA transfer on footwear in consideration of the shedder status. Forensic Sci Int Genet 56: 102630
81. Schneider TD, Roschitzki B, Grossmann J et al. (2022) Determination of the Time since Deposition of Blood Traces Utilizing a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Proteomics Approach. Anal Chem 94(30): 10695–10704
82. Schwender K, Holländer O, Klopfleisch S et al. (2021) Development of two age estimation models for buccal swab samples based on 3 CpG sites analyzed with pyrosequencing and minisequencing. Forensic Sci Int Genet 53: 102521
83. Schwender M, Bamberg M, Dierig L et al. (2021) The diversity of shedder tests and a novel factor that affects DNA transfer. Int J Legal Med 135(4): 1267–1280
84. Sirker M, Schneider PM, Gomes I (2016) A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. Int J Legal Med 130(6): 1431–1438
85. Stotesbury T, Cossette M-L, Newell-Bell T et al. (2021) An Exploratory Time Since Deposition Analysis of Whole Blood Using Metrics of DNA Degradation and Visible Absorbance Spectroscopy. Pure Appl. Geophys. 178(3): 735–743
86. Thornbury D, Goray M, van Oorschot RAH (2021) Indirect DNA transfer without contact from dried biological materials on various surfaces. Forensic Sci Int Genet 51: 102457
87. Trost B, Walker S, Haider SA et al. (2019) Impact of DNA source on genetic variant detection from human whole-genome sequencing data. J Med Genet 56(12): 809–817
88. Tucker VC, Hopwood AJ, Sprecher CJ et al. (2011) Developmental validation of the PowerPlex(®) ESI 16 and PowerPlex(®) ESI 17 Systems: STR multiplexes for the new European standard. Forensic Sci Int Genet 5(5): 436–448
89. Tucker VC, Hopwood AJ, Sprecher CJ et al. (2012) Developmental validation of the PowerPlex® ESX 16 and PowerPlex® ESX 17 Systems. Forensic Sci Int Genet 6(1): 124–131
90. Tyagi S, Kramer FR (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol 14(3): 303–308
91. van den Brule AJ, Hemrika DJ, Walboomers JM et al. (1993) Detection of Chlamydia trachomatis in semen of artificial insemination donors by the polymerase chain reaction. Fertil Steril 59(5): 1098–1104
92. van Oorschot RA, Jones MK (1997) DNA fingerprints from fingerprints. Nature 387(6635): 767
93. van Oorschot RAH, Goray M, Eken E et al. (2009) Impact of relevant variables on the transfer of biological substances. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2(1): 547–548
94. Verdon TJ, Mitchell RJ, van Oorschot RAH (2013) The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency. Forensic Sci Int Genet 7(1): 167–175
95. Walsh S, Liu F, Wollstein A et al. (2013) The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. Forensic Sci Int Genet 7(1): 98–115
96. Walsh SJ (2004) Recent advances in forensic genetics. Expert Rev Mol Diagn 4(1): 31–40
97. Wang K, Tang Z, Yang CJ et al. (2009) Molecular engineering of DNA: molecular beacons. Angew Chem Int Ed Engl 48(5): 856–870
98. Watson RJ, Blackwell B (2000) Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can J Microbiol 46(7): 633–642

99. Weinbrecht KD, Fu J, Payton M et al. (2017) Time-dependent loss of mRNA transcripts from forensic stains. RRFMS Volume 7: 1–12
100. Wiegand P, Schürenkamp M, Schütte U (1992) DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. Int J Legal Med 104(6): 359–360
101. Wiegand P, Kleiber M (2001) Less is more—length reduction of STR amplicons using redesigned primers. Int J Legal Med 114(4-5): 285–287
102. Yoshida K, Sekiguchi K, Mizuno N et al. (1995) The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. Forensic Sci Int 72(1): 25–33
103. Zadora G, Menżyk A (2018) In the pursuit of the holy grail of forensic science – Spectroscopic studies on the estimation of time since deposition of bloodstains. TrAC Trends in Analytical Chemistry 105(1–3): 137–165

2. Publikationen

2.1 A proof-of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault

Referenz:

Tobe, S.S., Swaran, Y.C., Dennany, L. et al. A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault. Int J Legal Med 131, 87–94 (2017). https://link.springer.com/article/10.1007/s00414-016-1461-x

Eigenanteil:

Optimierung des Versuchsdesigns gemeinsam mit den Co-Autoren, Durchführung der Versuche zur differentiellen Lyse von Sperma-Speichelmischungen und direkter PCR von Spuren auf unterschiedlichen Materialien inklusive HE-Färbungen und CE-Auswertung, Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherche, aktive Mitarbeit bei der Verfassung des Manuskripts sowie der Bearbeitung der Anmerkungen von Co-Autoren und Peer-Reviewern.

Copyright notice:

Reproduced with permission from Springer Nature: Springer, Int J Legal Med, A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault, Tobe SS, Vennemann M ©2016.

Int J Legal Med
DOI 10.1007/s00414-016-1461-x

ORIGINAL ARTICLE

A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault

Shanan S. Tobe[1,2] · **Yuvaneswari C. Swaran**[3,4] · **Lynn Dennany**[3] · **Ursula Sibbing**[5] · **Kristina Schulze Johann**[5] · **Lindsey Welch**[3] · **Marielle Vennemann**[5]

Received: 25 July 2016 / Accepted: 5 October 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Sexual assault samples are some of the most common samples encountered in forensic analysis. These samples can require a significant time investment due to differential extraction processes. We report on the first record of successful direct amplification of semen for STR analysis. Neat seminal fluid, dilutions ranging from 1:5 to 1:160 and GEDNAP samples were successfully amplified using a direct method. A mild differential isolation technique to enrich spermatozoa was developed and successfully implemented to separate and directly amplify a mixture of semen and female epithelial cells. Aliquots of samples subjected to the differential isolation protocol were stained with Haemotoxylin and Eosin for sperm scoring. Samples stained after PCR showed a complete lack of intact spermatozoa demonstrating that the cells are lysed during the PCR process. This paper demonstrates the potential to incorporate direct PCR in cases of sexual assault to more rapidly obtain results and achieve a higher sensitivity.

Keywords Direct PCR · Sexual assault · Semen · Seminal fluid · Differential isolation · Spermatozoa

✉ Shanan S. Tobe
tobes@arcadia.edu

[1] Department of Chemistry and Physics, Arcadia University, 450 S. Easton Rd., Glenside, PA 19038, USA

[2] School of Biological Sciences, Flinders University, Adelaide, Australia

[3] Centre for Forensic Science, WestCHEM, Technology and Innovation Centre, University of Strathclyde, Glasgow, UK

[4] Present address: Forensic Division, Department of Chemistry Malaysia, Jalan Sultan, Malaysia

[5] Institute of Legal Medicine, University of Münster, Münster, Germany

Introduction

Amplification without prior DNA extraction, known as direct PCR, has gained increased interest in forensic science due to the reduced time to DNA profile and increased sensitivity of the technique. Although its application to forensic science is relatively recent, the technique itself has been used since the 1990s [1–3].

Benefits of direct PCR include reduced time and expenses compared to standard DNA extraction prior to amplification. In direct PCR, manual processing of the sample as well as the amount of buffers and consumables needed are limited to a minimum which helps to avoid the introduction of contamination [4, 5]. Furthermore, DNA extraction results in significant loss of DNA from the samples due in part to multiple tube changes and also due to sometimes low DNA recovery rates [6]. This is especially concerning in samples originally containing very low amounts of DNA.

Direct PCR has already been tested successfully for various sample types, including touch DNA (epithelial cells and cell free DNA) [4], blood [1, 2, 7–10], buccal swabs/cells [8–10], hair [2, 11], fingernails [12], tissues [3] and plant material [13]. Other highly significant forensic sample types are those relating to sexual assault allegations, specifically semen and spermatozoa; however, to our knowledge, investigation for the use of direct PCR in these types of crimes has not yet been undertaken. Direct PCR has been used to identify pathogens in semen (e.g. [14, 15]), but never for the identification of the semen donor, as required in forensic investigation. Sexual assault allegations can make up a large proportion of casework samples and can also be more time intensive due to specific aspects such as differential extraction [16] and; microscopy and sperm scoring [17].

Presumptive identification of suspected semen is well documented and mainly consists of the use of acid phosphatase (AP) [18, 19] and prostate-specific antigen (P30/PSA) [20, 21];

Published online: 10 November 2016

however, these presumptive tests are known to cross react with a variety of substances [22–26]. Direct observation of spermatozoa is therefore needed in some regions as conclusive proof of ejaculation so microscopy and sperm scoring may still be required; however, direct PCR would still offer major benefits including minimal amount of sample destruction, faster analysis, greater sensitivity, decreased cost and reduced risk of contamination. Semen can be found on intimate body swabs (often as a mixture), on skin, clothing and bedding items, all of which are routinely submitted for forensic examination [27, 28]. Dependant on if the semen is neat and expected as a single source, as it may be with bedding and clothes, or a mixture is expected, as with intimate swabs, will determine the downstream analysis method. Mixed samples from intimate swabs are processed using a two-step differential extraction [16] to separate the sperm fraction from the epithelial fraction.

As the samples are not purified through an extraction process, direct PCR incorporates all elements of a sample in to the analysis. This includes the total DNA of a sample, but also cellular components and other potential inhibitors, which can have an adverse effect on the PCR process. Semen has been demonstrated to have between 15 and 200 million spermatozoa/mL for males with normal sperm counts [29] and up to 5 million other non-spermatozoa cells/mL, mainly constituting leucocytes and round cells (debris and immature sperm) [30], but which will still contain the donors DNA. Heme, a component of blood, has been shown to act as a PCR inhibitor by blocking the active site of the polymerase [31, 32]. Other cellular or tissue-based inhibitory substances that can be commonly encountered in forensic cases include polysaccharides and humic acid, found in soils and plants [33–35]; urea, found in urine [36]; and calcium, found in bones [37]. Other inhibitory substances such as indigo dye, found in blue jeans, have also been demonstrated to pose problems with the amplification process [38]. The overall inhibitory effect of different substances can be reduced based on the particular polymerase used in the PCR [39, 40], but to date, various sample types have been successfully typed using direct PCR without problem.

In this study, we investigated the potential for direct amplification of spermatozoa and seminal fluid in order to determine the donor. We subjected stains containing seminal fluid (pure and mixtures) to the technique of direct amplification and investigated a differential isolation method prior to direct amplification.

Materials and methods

All samples were collected and obtained in accordance with ethical requirements as set out by the University of Strathclyde.

Semen

Semen was obtained from a fertility clinic and anonymous donors. All samples contained normal sperm counts between 15 and 200 million spermatozoa/mL [29], which equates to between 15,000 and 200,000 spermatozoa/μL and between 48.7 and 649.3 ng/μL DNA.

Samples in cases of sexual assault

Semen dilutions (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 and 1:160) were spotted on sterile cotton, air dried in a safety cabinet and subjected to direct PCR. Dilutions were performed in sterile distilled water to a final volume of 1 mL. Two repetitions at each dilution were performed. Four stains from previous proficiency tests of the German DNA profiling (GEDNAP) group were subjected to direct PCR: stain D of GEDNAP 38 (semen on toilet paper), stain 4 of GEDNAP 43 (blood-semen-mixture on tissue), stain 2 of GEDNAP 45 (semen on condom, stain was transferred to a swab) and stain 2 of GEDNAP 46 (semen on toilet paper). GEDNAP stains were each processed twice to ensure consistency. Neat semen (10 μL) was deposited on to various substrates and allowed to air dry in a safety cabinet to avoid contamination. This was done in duplicate for each substrate.

Differential lysis

Body fluid mixtures often encountered in sexual assault allegations were prepared to test a short differential enrichment protocol. Mixtures of semen and saliva (1:10), to a final volume of 100 μL, were prepared and kept in liquid form and also spotted onto sterile cotton. Saliva was donated by a female volunteer to more closely simulate expected male/female mixtures. Several short fibres, for dried stains, and 5 μL, for liquid samples, were submerged in 18 μL Swab solution (Promega). Proteinase K (2 μL, 20 mg/mL) was added and samples were incubated for 15, 30 and 60 min at 70 °C. After centrifugation, 2 μL of the supernatant was transferred for direct PCR while the pellet was washed twice with 100 μL swab solution and then transferred for direct PCR.

Five microlitres of the resuspended sperm fraction (SF) and non-sperm fraction (NSF) were slide mounted and stained using Haemotoxylin and Eosin (HE). Slides were assessed for spermatozoa using a Leica DM 2500 Microscope (Wetzlar, Germany) with magnification of ×500 (ocular ×10, objective ×50).

Direct PCR

Samples deposited on fabric, including toilet paper and tissue, were collected for direct PCR by taking two to three fibres,

approximately 2–3 mm in length, from the substrate and adding directly to the PCR reagents. NSF samples were added at 8 μL to the PCR and the total pellet from the SF was added, minus the sample removed for sperm scoring.

All samples were amplified without extraction using PowerPlex ESX 16 and 17 Kits (Promega Corp.). All samples were processed according to manufacturer's specifications; reaction volumes were reduced to 12.5 μL for samples processed with ESX 17. Samples treated with the differential enrichment protocol additionally had 1× Amp Solution (Promega) added to the mastermix. For solid substrate samples (fibres, tissue and toilet paper), amplification-grade water was added up to the final volume required by the PCR kit.

Amplification took place in a 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) and all batches were processed with both negative and positive controls. All PCR products were visualised on a 3130 Genetic Analyser (Life Technologies, UK). Data were analysed using Genemapper ID v.3.2.1 software (Life Technologies, UK) with a threshold of 50 rfu used as the limit of detection and 150 rfu as the limit for a homozygote. Local and global balances were calculated according to [41].

Lysis of spermatozoa

To determine if the spermatozoa were being lysed during the PCR process, samples were centrifuged post-PCR and 10 μL was removed from the bottom of the PCR tube (where a pellet would have formed) and then slide mounted, HE stained and examined as previously described.

Results and discussion

Lysis of spermatozoa

Samples HE stained post-PCR showed a complete lack of intact spermatozoa (Fig. 1). This is the first instance that the lysis of spermatozoa during PCR has been demonstrated and supports the use of direct PCR in cases of sexual assault for SF samples. Complete lysis of the spermatozoa indicates that direct PCR can be used for sexual assault samples and that despite the protein coat, samples can be fully analysed without the risk of missing potentially vital genetic material, important with low level samples. In this way, case samples that may previously have yielded insufficient levels of DNA, due to minimal levels of DNA combined with low extraction efficiency, can now be analysed with the total DNA compliment offering resolution of difficult, low level, case samples.

Dilution of semen and GEDNAP samples

The dilution series of seminal fluid produced full profiles at all dilutions to 1:80 demonstrating the potential for direct PCR in cases of sexual assault. Global balance for full profiles ranged from 0.78 (one 1:40 dilution) to 0.91 (one 1:10 dilution) with an average of 0.84. Local balance showed a minimum range from 0.4 (SE33 in one 1:20 dilution) to 0.72 (D19 in one 1:10 dilution) and an average of 0.6. One sample at 1:80 produced a full profile, while the other sample showed one locus (D19) and one allele (THO1) dropping out. Both samples at 1:160 showed higher levels of dropout, with one sample containing 50 % of the expected profile and the other 47 %. Peak heights reduced as the dilution increased (Fig. 2). Stains demonstrating a weak presumptive positive, or which are known to be diluted as in the case of washing, may therefore benefit from the addition of more fibres or concentration via a differential isolation protocol as described below.

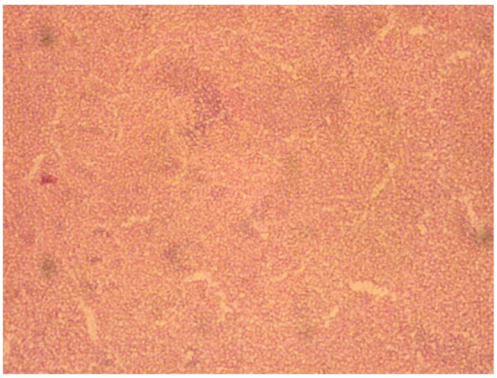


Fig. 1 Post-PCR sample (1:1), centrifuged and pellet area mounted and HE stained; magnified at ×500 demonstrating the lack of intact spermatozoa

All GEDNAP-stains produced low-level, but full and reproducible profiles (Fig. 3) containing the same alleles as when analysed using a traditional differential extraction technique. Total peak height and average peak height were 7570 and 222.65 ± 123.68 for the direct PCR sample, and 52,829 and 1553.79 ± 464.67 for the traditionally extracted sample. The traditionally extracted and amplified sample showed a local allelic balance between 0.79 and 1, with a global balance of 0.928, whereas the direct PCR sample showed a local allelic balance between 0.73 and 1, with a global balance of 0.925. While the average peak height for the direct PCR sample (Fig. 3 top) is 14.3 % the height of the traditionally extracted sample (Fig. 3 bottom), it is still complete and could be fully called using the Genemapper ID v.3.2.1 software. The local and global balances are similar, with only a 0.32 % difference between the global balances, indicating that the direct PCR approach amplified efficiently and as would be expected from a traditionally extracted sample. Considering that only two 2-mm fibres were sampled for direct PCR relative to a sample of approximately 2 mm^2 section for the traditional extraction sample, the direct amplification of seminal fluid and stains is a less destructive process, leaving valuable evidence behind for

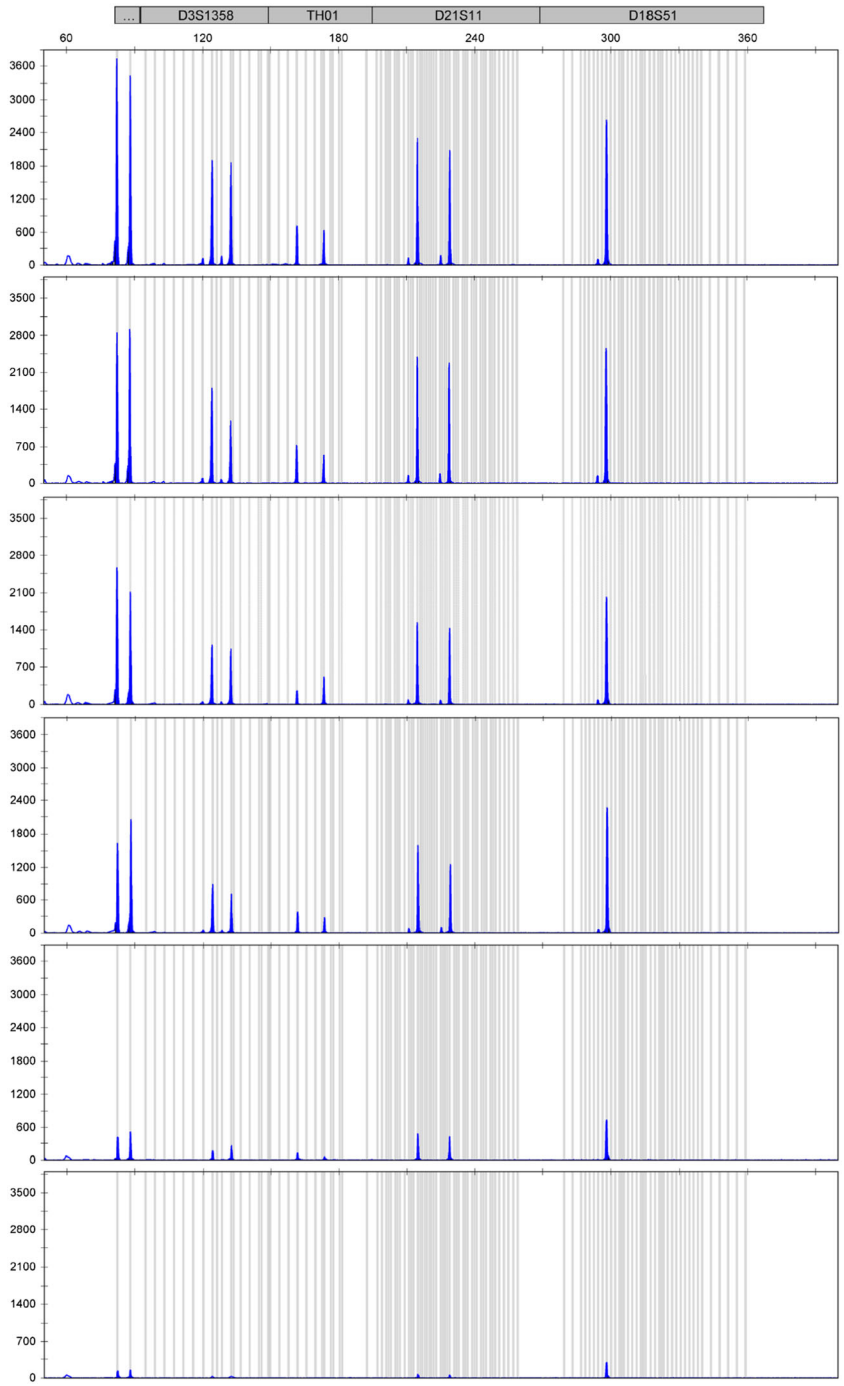


Fig. 2 Blue dye channel of ESX17 showing direct PCR result from dilutions of 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 and 1:160 (*top* to *bottom*)

subsequent analysis or re-evaluation. GENAP samples represent simulated case samples that are used for proficiency testing relating to presumptive testing and STR analysis. The ability to amplify these samples using direct PCR therefore demonstrates the robustness and applicability of direct amplification of semen to forensic casework.

Differential isolation of spermatozoa in male/female mixtures

The ability to distinguish between male and female fractions of a mixed sample in cases of sexual assault is of primary importance to forensic investigators. This has been

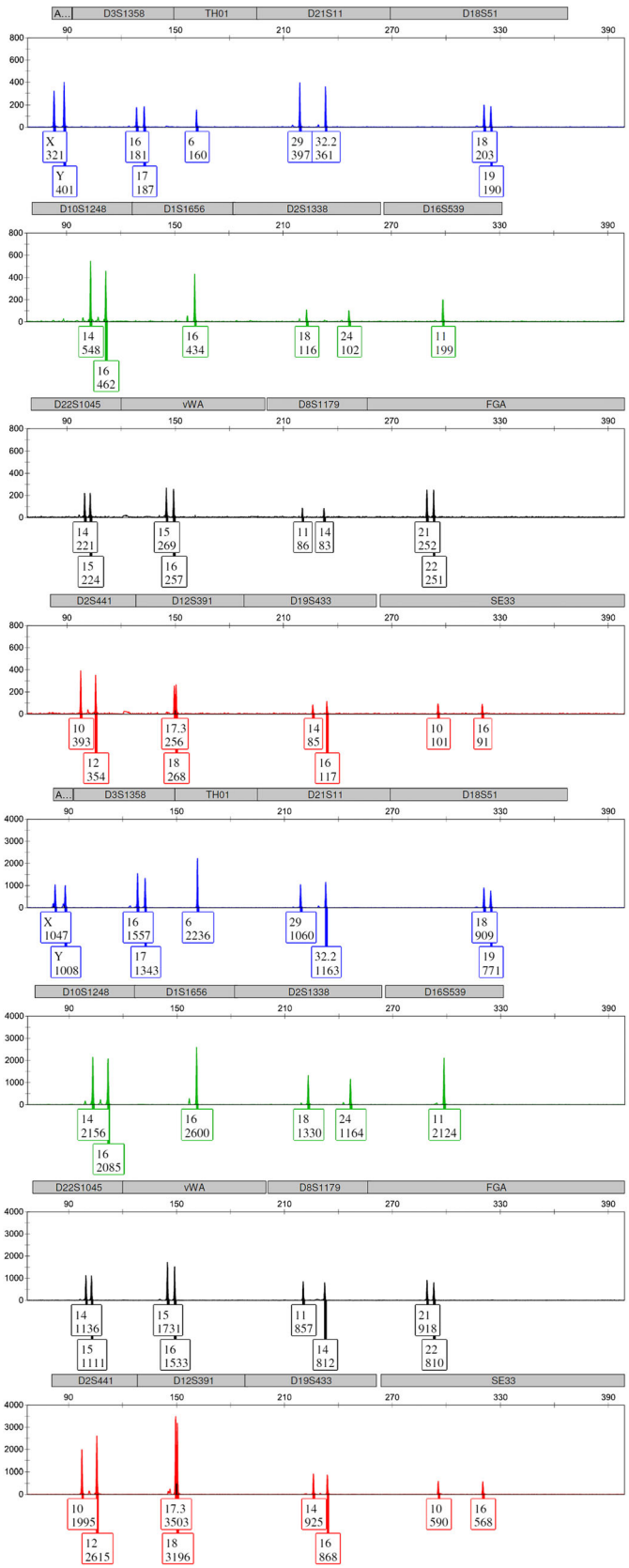


Fig. 3 *Top* Full profile obtained by direct PCR from 2 fibres (2 mm each) of stain 2 of GEDNAP 46 (semen on toilet paper). *Bottom* Full profile obtained by traditional differential extraction of 2 of GEDNAP 46

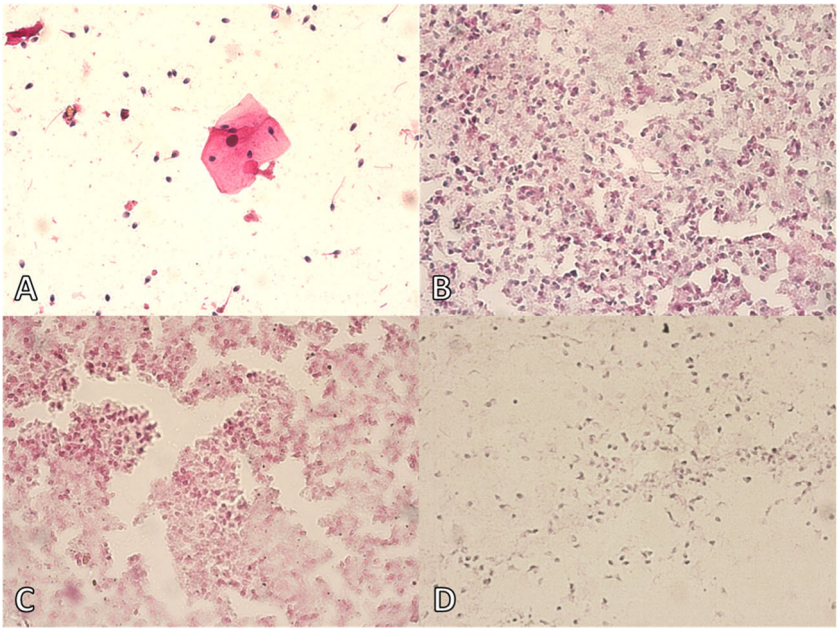


Fig. 4 Differentially isolated samples stained using HE at various incubation times, magnified ×500. **a** No incubation. **b** 15 min incubation. **c** 30 min incubation. **d** 60 min incubation

customarily accomplished using a differential extraction protocol [16] or through other techniques such as laser microdissection of spermatozoa or epithelial cells [42]. These techniques can add several hours to the analysis of sexual assault evidence and contribute to backlogs in the processing of sexual assault casework. A more rapid method for

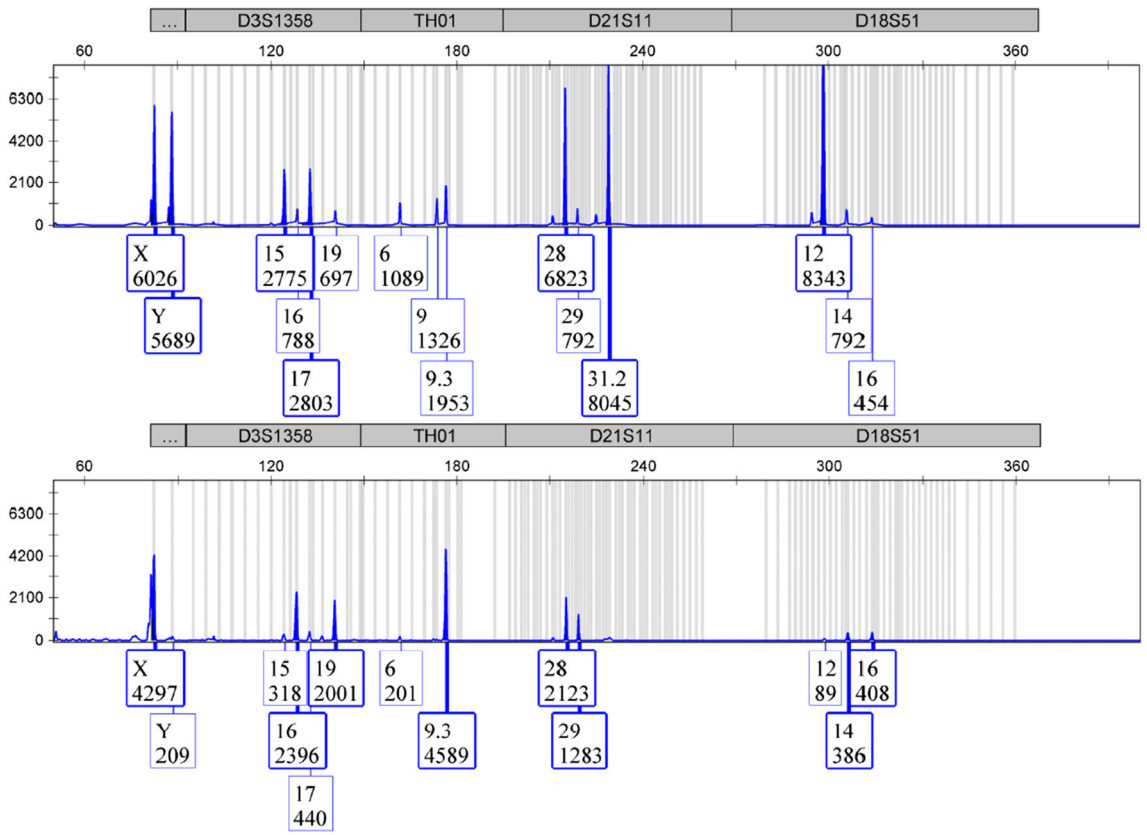


Fig. 5 Direct PCR after differential enrichment of a semen-saliva mixture (1:10). The blue channel of the ESX amplification is shown exemplarily, containing the markers amelogenin, D3S1358, TH01, D21S11 and D18S51. The male DNA profile obtained from the cell pellet after differential lysis (*top*) reveals surprisingly high peaks, while the female fraction in the supernatant (*bottom*) is also clearly distinguishable from the male fraction

differentiating cells from the complainer (female) and accused (male) in allegations of sexual assault would therefore offer obvious benefits in reduction of time for analysis and, in conjunction with a direct amplification approach, greater sensitivity.

The mild differential isolation technique used to enrich spermatozoa and remove the female fraction was successful as demonstrated by the HE-stained samples (Fig. 4). Most non-sperm cellular components were digested after 15 min (Fig. 4b), and after 60 min of incubation, the non-sperm cells were completely digested (Fig. 4d). Our results indicated that the optimal incubation time was 60 min (data not shown). This incubation time showed the best separation between the male and female STR profiles, with the female profile component reducing in intensity as the incubation time increased.

Profiles resulting from the differentially isolated samples show high levels of amplification with good balance across all loci. Global balance ranged from 0.78 to 0.87 for liquid mixtures and 0.78 to 0.9 for dried mixtures on cotton.

While the differential isolation method adds a small amount of time to the direct amplification process, it resulted in strongly enhanced male profiles. Even though the female fraction was still present at low levels after enrichment, the male profile was clearly distinguishable (Fig. 5). The female fraction, derived from the supernatant, similarly showed a mixture with the female fraction accounting for the major contributor (Fig. 5).

We conclude that even in samples with a massive excess of female cells, direct PCR can produce male profiles with surprisingly strong peak heights if combined with the described differential isolation protocol. Using the whole cell pellet directly in the PCR means that little or no genetic material is lost during the DNA extraction processes. This ability to use the whole sample makes direct amplification a powerful technique for forensic analysis.

Conclusion

We have demonstrated that even though spermatozoa are enclosed in a firm cell wall that they can be analysed by direct PCR, without the need of labour and time intensive extraction methods. While the DNA in the sample may in part be derived from the non-spermatozoa cells of the semen donor, our results from the post-PCR HE-stained samples demonstrate that the spermatozoa are being lysed during the PCR process and are directly contributing to the resultant profile.

Simulated case samples and GEDNAP proficiency testing samples were all successfully typed offering significant improvements in time and sensitivity in the analysis of sexual assault evidence. For the first time, the successful direct amplification of semen and spermatozoa on various substrates and in simulated sexual assault samples has been achieved.

Without the need for extraction, up to 5 h (if using differential extraction) can be saved and the chance of success is increased. Standard extraction techniques can lose greater than 70 % of the genetic material; therefore, direct PCR of semen can allow amplification of samples which may have previously failed to yield results. The use of standard equipment and reagents means that this technique can be implemented rapidly into most forensic laboratories with simple validation testing. The successful use of direct PCR with semen samples will allow rapid and more sensitive analyses in sexual assault casework samples.

Acknowledgments YCS was funded through the Government of Malaysia. We would also like to thank Lisa Dierig and Marianne Schürenkamp for the excellent technical assistance and Prof. Peter Schmidt (Münster) for the help with microscopic images.

References

1. Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C (1990) Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. Nucleic Acids Res 18:5908
2. Ohhara M, Kurosu Y, Esumi M (1994) Direct PCR of whole blood and hair shafts by microwave treatment. Biotechniques 17: 726, 8-, 8.
3. Panaccio M, Georgesz M, Hollywell C, Lew A (1993) Direct PCR from solid tissues without DNA extraction. Nucleic Acids Res 21:4656
4. Linacre A, Pekarek V, Swaran YC, Tobe SS (2010) Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. Forensic Sci Int 4:137–141
5. Vallone PM, Hill CR, Butler JM (2008) Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci. Forensic Sci Int 3:42–45
6. Butts ELR, Kline MC, Almeida JL, Vallone PM. (2010) DNA extraction efficiency: is it what you thought? Mid-Atlantic Association of Forensic Scientists. State College, Pennsylvania, USA
7. Aki K, Kawazoe K, Izumi A, Tada T, Minakuchi K, Hosoi E (2014) Direct determination of ABO blood group genotypes from whole blood using PCR-amplification of specific alleles method. Am J BioSci 2:49–55
8. Park SJ, Kim JY, Yang YG, Lee SH (2008) Direct STR amplification from whole blood and blood or saliva spotted FTA® without DNA purification*. J Forensic Sci 53:335–341
9. Wang DY, Chang C-W, Oldroyd NJ, Hennessy LK (2009) Direct amplification of STRs from blood or buccal cell samples. Forensic Sci Int 2:113–114
10. Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Franssen A, Van Nieuwerburgh F, Deforce D (2013) Presence and potential of cell free DNA in different types of forensic samples. Forensic Sci Int 7: 316–320
11. Ottens R, Taylor D, Abarno D, Linacre A (2013) Successful direct amplification of nuclear markers from a single hair follicle. Forensic Sci Med Pathol 9:238–243
12. Tie J, Uchigasaki S (2014) Detection of short tandem repeat polymorphisms from human nails using direct polymerase chain reaction method. ELECTROPHORESIS: n/a-n/a. doi: 10.1002/elps.201400061
13. Gausterer C, Stein C, Stimpfl T (2012) Application of direct PCR in a forensic case of yew poisoning. Int J Legal Med 126:315–319. doi:10.1007/s00414-011-0607-0

14. Amin AS, Hamdy MER, Ibrahim AK (2001) Detection of Brucella melitensis in semen using the polymerase chain reaction assay. Veterinary Microbiology 83: 37-44. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00401-1
15. Van den Brule A, Hemrika D, Walboomers J et al (1993) Detection of Chlamydia trachomatis in semen of artificial insemination donors by the polymerase chain reaction. Fertil Steril 59:1098–1104
16. Yoshida K, Sekiguchi K, Mizuno N et al (1995) The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. Forensic Science International 72: 25-33. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0379-0738(94)01668-U
17. Tobe SS, Dennany L, Vennemann M (2015) An assessment of the subjectivity of sperm scoring. Forensic Sci Int 251:83–86
18. Sivaram S, Bami HL (1971) Identification of seminal stains by the inhibition of acid phosphatase by L(+) tartrate. Journal of the Forensic Science Society 11: 187-94. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0015-7368(71)70652-5
19. Sivaram S (1970) A modified azo-dye method for identification of seminal stains. J Forensic Sci 15:120
20. Balk SP, Ko Y-J, Bubley GJ (2003) Biology of prostate-specific antigen. J Clin Oncol 21:383–391
21. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O et al (1999) Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. J Forensic Sci 44:1057–1060
22. Hooft PJ, van de Voorde HP (1994) Interference of body products, food and products from daily life with the modified zinc test and the acid phosphatase test. Forensic Science International 66: 187-96. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0379-0738(94)90343-3
23. Vennemann M, Scott G, Curran L, Bittner F, Tobe S (2014) Sensitivity and specificity of presumptive tests for blood, saliva and semen. Forensic Sci Med Pathol 10:69–75. doi:10.1007/s12024-013-9515-6
24. Tirimanna ASL (1972) Acid phosphatases in the tea leaf. Experientia 28:633. doi:10.1007/BF01944944
25. Papotti M, Paties C, Peveri V, Moscuzza L, Bussolati G (1988) Immunocytochemical detection of prostate-specific antigen (PSA) in skin adnexal and breast tissues and tumors. Basic Appl Histochem 33:25–29
26. Yu H, Diamandis EP (1995) Prostate-specific antigen in milk of lactating women. Clin Chem 41:54–58
27. Allard JE, Baird A, Davidson G et al (2007) A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. Science & Justice 47: 160-7. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2007.09.010
28. Nittis M (2013) Evidence collection in cases of sexual assault. In Beran RG (Ed) Legal and forensic medicine. Springer, New York, p. 1335-58
29. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S et al (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 16:231–245. doi:10.1093/humupd/dmp048
30. Bellabarba GAD, Tortolero I, Villarroel V, Molina CZ, Bellabarba C, Velazquez E (2000) Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. Syst Biol Reprod Med 45:131–136. doi:10.1080/01485010050193896
31. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K (1994) Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci 39: 362–372
32. Al-Soud WA, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 39: 485–493. doi:10.1128/jcm.39.2.485-493.2001
33. Tsai YL, Olson BH (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58:2292–2295
34. Watson RJ, Blackwell B (2000) Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can J Microbiol 46:633–642. doi:10.1139/w00-043
35. Demeke T, Adams R (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. Biotechniques 12:332–334
36. Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB (1991) Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. J Clin Pathol 44:360–365. doi:10.1136/jcp.44.5.360
37. Powell HA, Gooding CM, Garrett SD, Lund BM, McKee RA (1994) Proteinase inhibition of the detection of Listeria monocytogenes in milk using the polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 18: 59–61. doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00802.x
38. Shutler GG, Gagnon P, Verret G et al (1999) Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. J Forensic Sci 44:623–626
39. Al-Soud WA, Rådström P (1998) Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl Environ Microbiol 64:3748–3753
40. Hedman J, Nordgaard A, Rasmusson B, Ansell R, Rådström P (2009) Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polymerases and statistical modeling of DNA profiles. Biotechniques 47:951–958
41. Hedman J, Ansell R, Nordgaard A (2010) A ranking index for quality assessment of forensic DNA profiles. BMC Res Notes 3:290
42. Di Martino D, Giuffre G, Staiti N, Simone A, Le Donne M, Saravo L (2004) Single sperm cell isolation by laser microdissection. Forensic Sci Int 146:S151–S153

2.2 Detecting DNA damage in stored blood samples

Referenz:

Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Detecting DNA damage in stored blood samples. Forensic Sci Med Pathol (2022). https://doi.org/10.1007/s12024-022-00549-3

Eigenanteil:

Projektplanung gemeinsam mit Frau Prof. Vennemann, Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor, Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherche, Verfassung des Manuskripts sowie der Bearbeitung der Anmerkungen von Co-Autoren und Peer-Reviewern.

Copyright notice:

Reprinted article was published open access: Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Detecting DNA damage in stored blood samples. Forensic Sci Med Pathol (2022). https://doi.org/10.1007/s12024-022-00549-3, used under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Forensic Science, Medicine and Pathology
https://doi.org/10.1007/s12024-022-00549-3

ORIGINAL ARTICLE

Detecting DNA damage in stored blood samples

Kristina Schulze Johann[1] · Hannah Bauer[1] · Peter Wiegand[2] · Heidi Pfeiffer[1] · Marielle Vennemann[1]

Accepted: 18 October 2022
© The Author(s) 2022

Abstract
Several commercially available quantitative real-time PCR (qPCR) systems enable highly sensitive detection of human DNA and provide a degradation index (DI) to assess DNA quality. From routine casework in forensic genetics, it was observed that DNA degradation in forensic samples such as blood samples stored under sub-optimal conditions leads to visible effects in multiplex analyses of short tandem repeat markers (STRs) due to decreased amplification efficiencies in longer amplicons. It was further noticed that degradation indices often remain below the value that is considered to be critical. Thus, the aim of this work was to systematically analyze this effect and to compare conventional qPCR assays with a modified qPCR approach using uracil DNA glycosylase (UNG) and DNA quality assessment methods based on electrophoresis. Blood samples were stored at three different storage temperatures for up to 316 days. Significantly increased DNA recovery was observed from samples stored at high temperatures (37 °C) compared samples stored at room temperature and 4 °C. We observed typical effects of degradation in STR analyses but no correlation between DI and storage time in any of the storage conditions. Adding UNG slightly increased the sensitivity of detecting DNA degradation in one of the qPCR kits used in this study. This observation was not confirmed when using a second qPCR system. Electrophoretic systems did also not reveal significant correlations between integrity values and time. Methods for detecting DNA degradation are usually limited to the detection of DNA fragmentation, and we conclude that degradation affecting forensic STR typing is more complex.

Keywords Degradation · Quantification · UNG · Forensic DNA analysis

Introduction

Over the past decades, DNA profiling of biological crime scene traces by multiplex PCR analysis of short tandem repeat (STR) markers has become a very important tool in the investigation of crime. One of the main challenges forensic scientists encounter when working with biological trace evidence is DNA fragmentation resulting from degradation through chemical damage. Various external factors such as ultraviolet light, radiation, temperature, or humidity damage DNA structure due to the DNA's limited chemical stability. One of the main chemical reactions by which DNA is damaged is hydrolytic degradation, the cleavage of chemical bonds by the addition of water [1–4].There are two main mechanisms by which hydrolysis attacks DNA integrity, that of base loss from the 2′-deoxyribose backbone and that of deamination. Hydrolysis of the DNA backbone attacks the linkage between the deoxyribose carbon atom and the base and is the main reason for DNA degradation in dead tissue [5]. When the DNA bases cytosine, adenine, and guanine undergo the process of spontaneous deamination, hence the removal of an amino group, they will be converted to uracil, hypoxanthine, and xanthine, respectively, and ammonia (this process is reviewed here: [6]). Deamination of DNA bases leads to sequence variation and structure instability: During PCR, uracil is known to pair with adenine, resulting in C-T transitions in the amplicon [7]. Hypoxanthine is known to have a pairing preference with cytosine, resulting in A-G transition [8]. The mechanism by which deamination of cytosine into uracil is repaired is by removal of uracil by uracil DNA glycosylase (UNG). This results in the generation of an abasic site, which are more prone to spontaneous and glycosylase-mediated DNA strand breaks [9]. Mechanisms described above may ultimately lead to DNA strand breaks. Fragmentation of the DNA strand can result

✉ Kristina Schulze Johann
kristina.schulzejohann@ukmuenster.de

[1] Institute of Legal Medicine, University of Münster, Röntgenstr. 23, 48149 Münster, Germany

[2] Institute of Legal Medicine, University of Ulm, Albert-Einstein-Allee 23, 89081 Ulm, Germany

Published online: 10 November 2022

in decreasing PCR efficiency in longer amplicons. In multiplex STR amplification, this phenomenon is well known as "ski-slope effect" visible in electropherorgrams with high peak heights of short amplicons and low peak heights of longer amplicons that might become so low that drop-outs of amplicons occur [10]. Figure 1 shows an example of such a STR profile.

The effect of differing amplification efficiencies in multiplex STR analysis challenges the interpretation of STR typing results, particularly in more complex DNA mixtures: Degradation might lead to a high number of alleles in short amplicon STR markers and low numbers of alleles in longer amplicon markers, making it difficult to estimate the number of contributors to a mixture [11, 12]. This is further complicated if one component of the DNA mixture is degraded, while others are intact. Several DNA quantification tools based on quantitative real-time PCR now also incorporate the detection of DNA fragmentation. For example, the PowerQuant® System (Promega) contains primers and probes for an autosomal target and a "degradation target" with the autosomal target (84 bp) being much shorter compared to the degradation target (296 bp) [13]. The amplification efficiency differs between these two targets in degraded samples but not in intact samples. Similarly, the Investigator Quantiplex® Pro kit (Qiagen) contains an autosomal target of 91 bp and a "degradation target" of 353 bp [14], and the Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) contains an autosomal target of 80 bp and a "degradation target" of 214 bp [14]. In degraded samples, the DNA concentration detected with the degradation targets is expected to be lower than with the autosomal target. Thus, the relative value of DNA concentrations detected with both probes ("degradation index") allows an assessment of DNA degradation before forensic STR analysis is performed.

In casework, however, we regularly observe serious degradation patterns with ski-slope effects and drop-outs of longer amplicons even though the degradation index of quantitative real-time PCR kits remains unobtrusive. The aim of this work was to systematically investigate the potential of quantitative real-time PCR to actually detect DNA degradation and whether or not the use of UNG might increase the sensitivity of these systems to detect degradation. In 1993, Lindahl described for the first time that during DNA degradation, hydrolysis may lead to deamination of cytosine creating uracil [5], making these positions potential targets for UNG.

Furthermore, methods using electrophoresis for assessing DNA quality were investigated as a potential alternative for detecting forensically relevant DNA degradation. Methods for DNA quality assessments based on electrophoresis are regularly used in massively parallel sequencing experiments to assess DNA fragment size distribution as a measure of degradation [15, 16]. Automated capillary electrophoresis and pulse-field capillary electrophoresis systems were used to detect DNA Integrity numbers DIN [17] and Genomic Quality Numbers (GQN) [18], respectively.

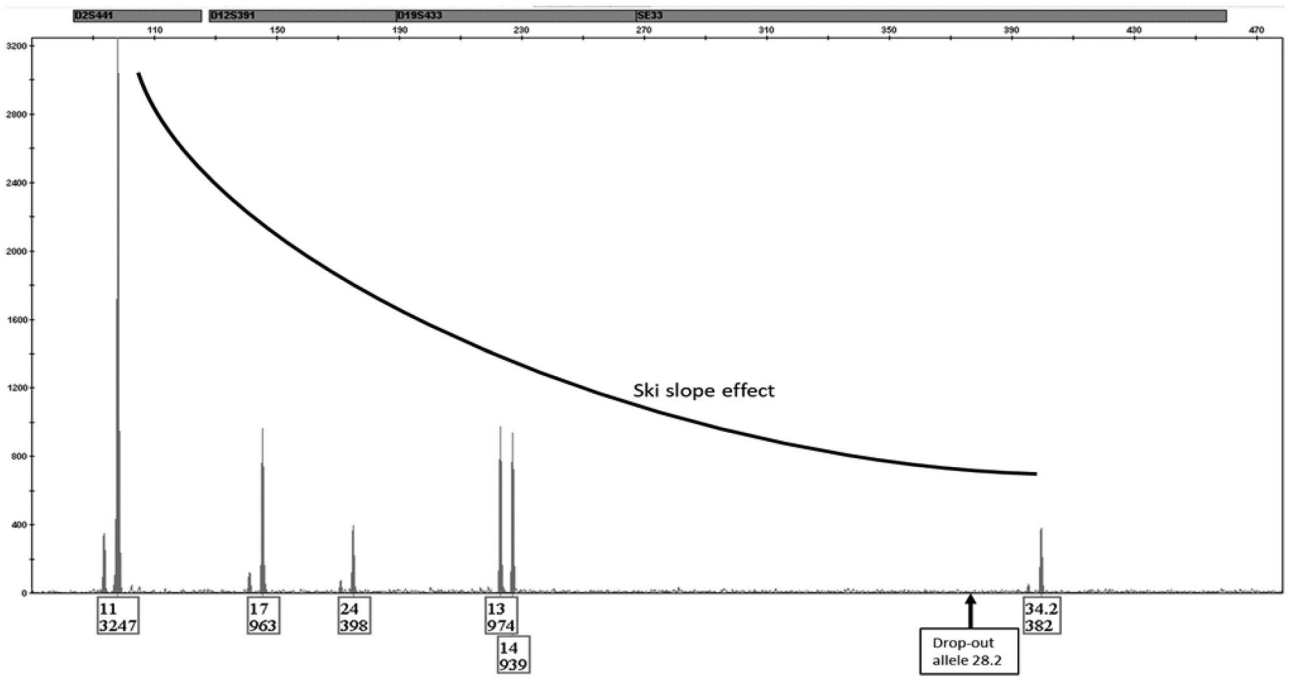


Fig. 1 Ski-slope effect; DNA degradation leads to fragmentation of the DNA strand, which results in a lower amplification efficiency of longer amplicons compared to shorter amplicons with increased risk of drop-out. Labels show allele calls and relative fluorescence units (rfu)

Material and methods

Sample collection and DNA extraction

Blood samples were collected from one individual only to eliminate the risk of interindividual variations caused, i.e., by the general health status of the donors. A blood sample was collected by venipuncture, using EDTA as an anti-coagulant. Spots of 40 µL of blood were immediately placed on sterile cellulose pads, gently inverting the blood tube several times every 4 spots. Pads were stored at three different conditions; room temperature (RT, ~ 21 °C, indoors, protected from direct sunlight), 4 °C (fridge), and 37 °C (incubator). Further information on sampling times and conditions are described below. As a positive control DNA was extracted and quantified immediately after collection. DNA was extracted using the Maxwell® RSC Blood DNA Kit with the Maxwell® 16 Forensic Instrument (Promega, Mannheim, Germany) and eluted in a final volume of 50 µL per blood spot. Extracts were stored at – 20 °C until further analysis.

DNA degradation in multiplex STR analysis

To confirm that DNA degradation producing ski-slope effects is visible with the storage conditions chosen, samples from three time points (0 days, 21 days, and 83 days) were analyzed using the PowerPlex® ESX 17 System (Promega) following manufacturer's recommendations but using a total reaction volume of 12.5 µL. Amplicons were visualized using the 3500 Genetic Analyzer, and data were interpreted using the GeneMapper™ ID-X Software v 1.6 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). Degradation indices (DI) were analyzed using the PowerQuant System (Promega, Madison, US) with 2 µL sample, 5 µL 2 × Master Mix, 0.5 µL 20 × Primer/Probe/IPC Mix, and HPLC-grade water to a reaction volume of 11 µL. qPCR was performed using the 7500 real-time PCR system with the HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 (Thermo Fisher Scientific).

DNA degradation detection by forensic quantitative real-time PCR

For this part of the experiment, samples were stored for up to 83 days at three temperatures, and DNA was extracted every two or 3 days. Thus, 35 time points per temperature condition totaling 105 samples were analyzed. Per condition and time point, duplicate extractions using four spots of 40 µL blood each were extracted separately, and the eluates were subsequently pooled to a total volume of 200 µL per replicate. Samples were quantified using the PowerQuant® System as described above. DNA concentration in each sample and respective degradation indices were used for data analysis.

Influence of uracil DNA glycosylase on detection sensitivity

To investigate if the use of uracil DNA glycosylase enhances the sensitivity of detecting DNA degradation, blood spots on cellulose pads were stored at RT for up to 316 days and extracted at 82 time points during this period. DNA was extracted in duplicates at each time point: One DNA extract was treated with AmpErase™ Uracil N-Glycosylase (UNG, Thermo Fisher Scientific) for 20 min at 50 °C, while the other remained untreated. DNA concentration in each extract and respective degradation indices were analyzed using the PowerQuant System as described above.

To evaluate if results can be confirmed when using an alternative quantification kit, the UNG experiment was repeated using a subset of samples (stored at RT for up to 176 days with 53 time points). Both UNG-treated and untreated DNA extracts were quantified using the Investigator Quantiplex® Pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's recommendations.

Detection of DNA degradation by automated (pulse-field) electrophoresis

To investigate if such electrophoretic methods are better suited for detecting DNA degradation in forensic casework samples, the 4150 TapeStation system (Verogen, San Diego, USA) with the Genomic DNA ScreenTape assay and TapeStation analysis software was used to calculate DNA integrity numbers (DIN). Furthermore, the FEMTO Pulse automated pulsed-field CE instrument (Agilent, Waldbronn) was used with the 165 kb analysis kit and ProSize data analysis software (with a size threshold of 50 000 bp).

Blood spots were stored at three different temperatures (4 °C, 37 °C, and RT) for up to 26 days (TapeStation) or 37 days (Femto). TapeStation analysis was performed after 11 different time points and Femto analysis after 16 different time points, each in duplicates. TapeStation analyses were performed at Agilent Technologies and Femto Pulse analyses were performed at Genomics & Transcriptomics Laboratory (GTL) at Heinrich-Heine-University Düsseldorf.

Statistical analysis

For all calculations and figures, mean values of replicates were used. Statistically significant differences between

degradation indices of different storage temperatures or duration were calculated using the Mann–Whitney *U* test using IBM SPSS Statistics version 28.0.1.0. The Mann–Whitney *U* test was chosen because there are no strict requirements to data distribution like normal or bivariate distribution and it can be used even in small sample sizes. Correlation between degradation indices and time were calculated using Pearson correlation using Microsoft Excel 2016. A value of $p < 0.005$ was considered statistically significant.

Results

DNA degradation in multiplex STR analysis

Apart from the control sample (0 days), DNA degradation was observed in samples from all storage conditions after 21 and 83 days. As an example, Fig. 1 shows the results of the PowerPlex® ESX amplification in a sample stored at 37 °C for 21 days. A ski-slope effect is visible, and a drop-out occurred of allele 28.2 in the longest amplicon representing SE33. The degradation indices (DI) of all samples remained below the critical value of 2 recommended by the manufacturer [13, 14]. The sample depicted in Fig. 1, for example, revealed a DI of 1.2.

DNA degradation detection by forensic quantitative real-time PCR

First, total DNA concentration within each extract was quantified to detect any overall loss of DNA or extraction efficiency over time. No statistically significant DNA loss over time was observed for any of the three storage conditions (Fig. 2).

Statistically significant differences in DNA concentrations were observed between storage conditions with much higher DNA amounts extracted from samples stored at 37 °C compared to samples stored at 4 °C ($p < 0.001$) and RT ($p < 0.001$). Furthermore, instead of DNA loss over time, a clear increase of DNA concentrations over time was observed for samples stored at 37 °C (Fig. 2a, Pearson correlation coefficient 0.536, $p = 0.0009$). No such correlations were observed for samples stored at 4 °C and RT. Thus, DNA extraction efficiency was increased in samples stored at 37 °C for a prolonged time period.

The DI was subsequently analyzed. At all storage conditions, an increase of DI was observed within the first seven days of storage, which seems to level out over time (Fig. 3). Over the total storage time, a slightly negative correlation between DI and time was observed for samples stored at 37 °C (Pearson correlation $r = -0.464$; $p = 0.0049$) and RT ($r = -0.533$; $p = 0.0009$). There is no significant correlation

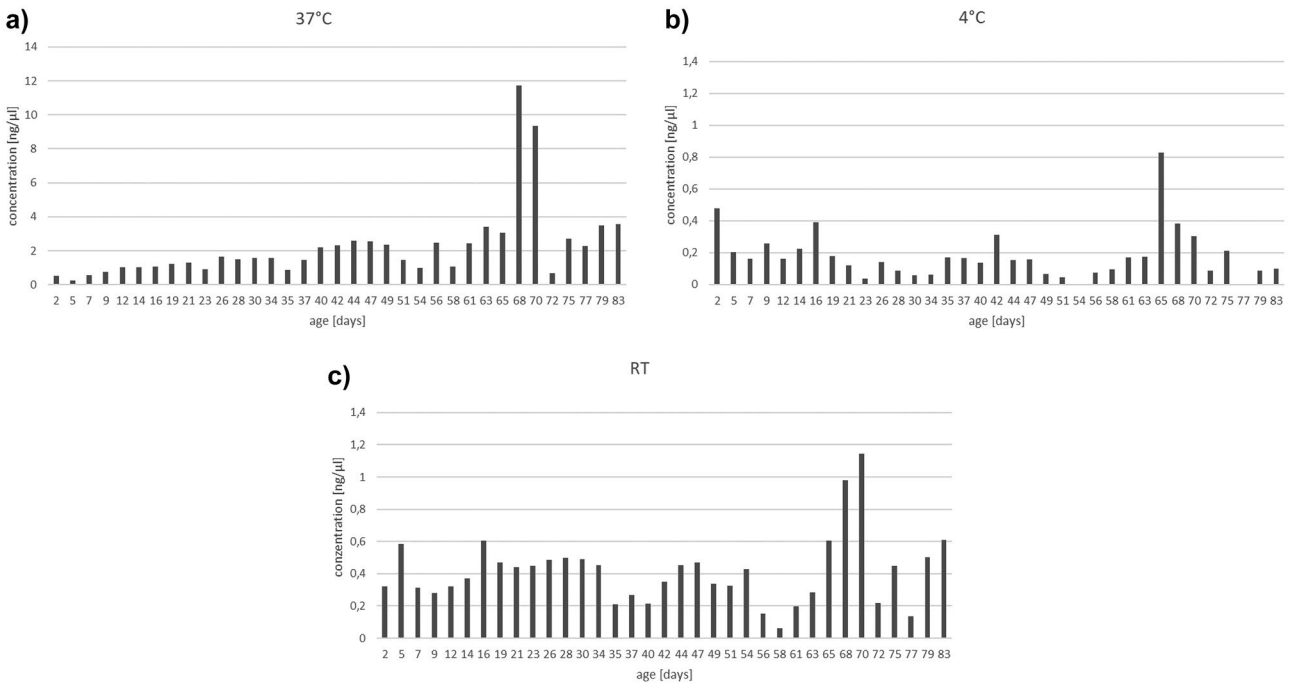


Fig. 2 DNA concentration in ng/µL extracted from samples stored at three different temperatures (**a** 37 °C, **b** 4 °C, and **c** room temperature, RT). All samples were eluted in identical extraction volumes. Please note that the scaling of the *y*-axis in (**a**) differs from (**b**) and (**c**). No statistically significant loss of DNA over time was observed, but overall DNA concentrations were significantly higher in extracts from samples stored at 37 °C (**a**) compared to 4 °C (**b**) and RT (**c**)

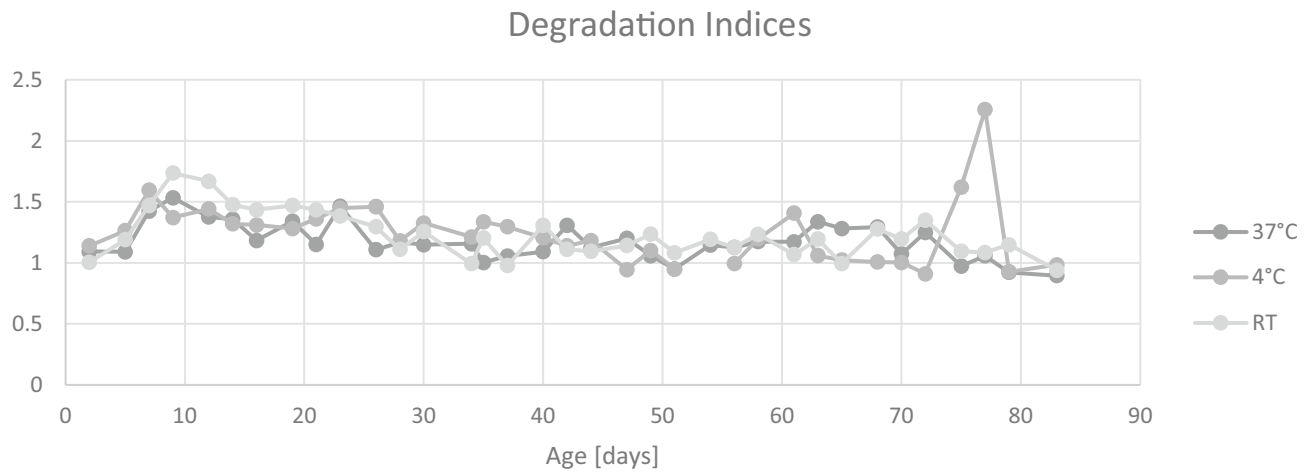


Fig. 3 Degradation indices obtained by PowerQuant analysis over time under three different storage conditions

between DI and time in samples stored at 4 °C ($r = -0.236$; $p = 0.172$). This data confirms previous studies, for example one by Bulla et al., who reported loss of DNA quantity but not integrity in long-term storage of blood samples [19].

Influence of uracil DNA glycosylase on detection sensitivity

Figure 4 shows the differences in DI between samples treated with UNG and untreated samples measured with the PowerQuant® System. No clear trend of a significant increase in degradation index over time in samples treated with UNG was observed in either treated or untreated DNA extracts.

Results obtained with the Investigator Quantiplex Pro Kit (Fig. 5) provided a similar outcome to results obtained with PowerQuant System, and no statistically significant correlation between DI and storage time was found.

Samples analyzed with the Quantiplex® Pro, however, showed a general difference in DI between samples treated with UNG and untreated samples ($p < 0.001$) indicating an increased sensitivity of degradation detection (Fig. 6a). This effect was not observed with the PowerQuant® System (Fig. 6b).

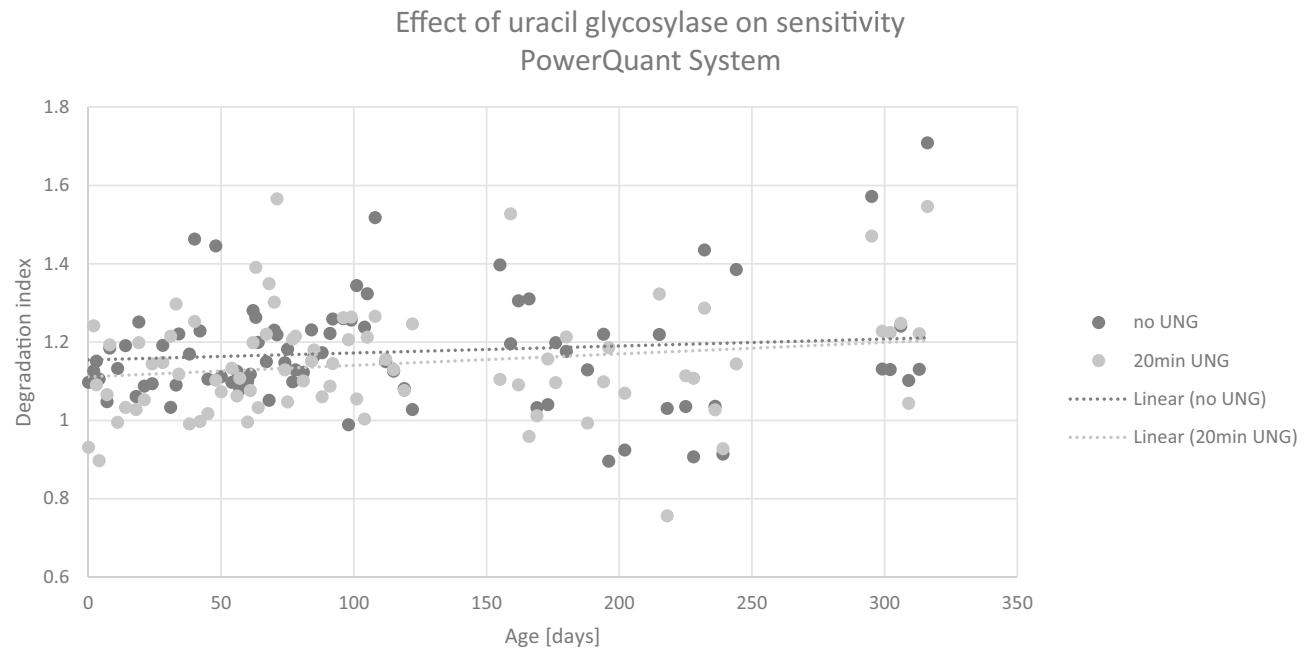


Fig. 4 Effect of uracil DNA glycosylase on the detection sensitivity of DNA degradation with the PowerQuant System. No correlation was found between DI and storage time

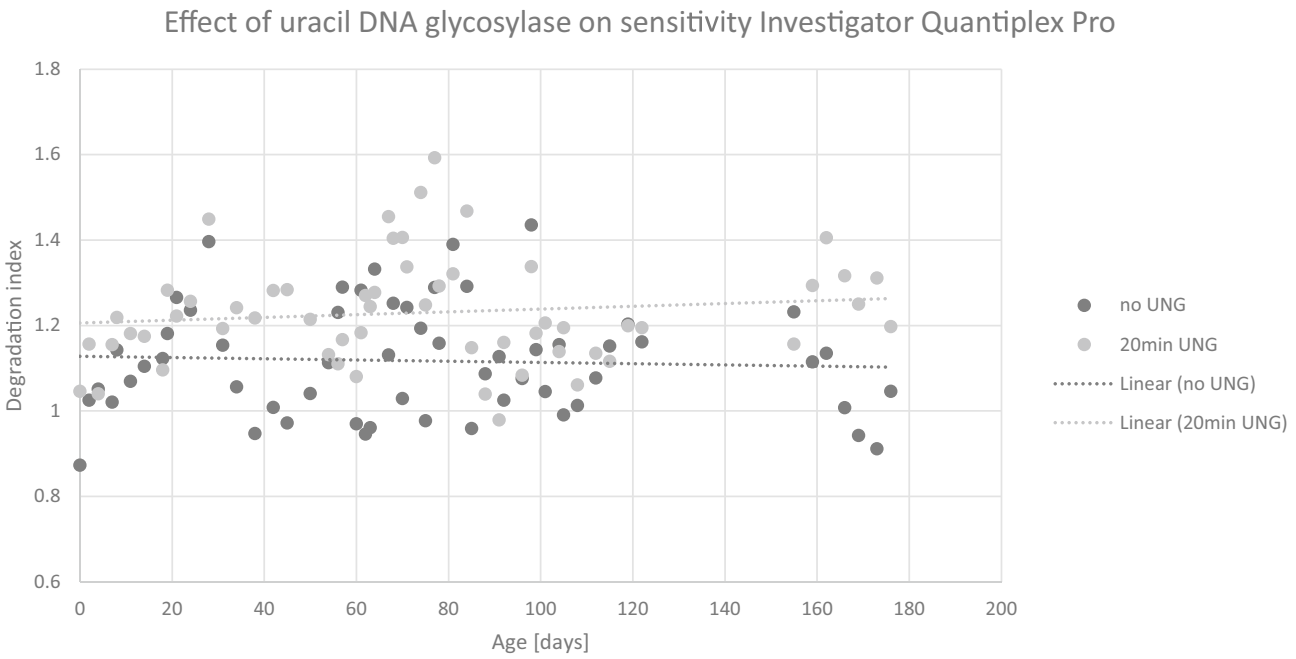


Fig. 5 Effect of uracil DNA glycosylase on the detection sensitivity of DNA degradation with the Investigator Quantiplex Pro. No correlation was found between DI and storage time. But a generally higher DI was observed in samples treated with UNG compared to untreated samples ($p < 0.001$)

DNA degradation analysis by automated (pulse-field) electrophoresis

No significant correlation between DIN and storage time was observed at any of the temperatures (37 °C, $p = 0.99$; 4 °C, $p = 0.2$; RT, $p = 0.85$). Comparing DIN values between storage conditions, the median is considerably higher in samples stored at 37 °C compared to the other two storage conditions (Fig. 7).

Similar to the DIN results, GQN does not correlate with the storage duration in any storage temperature (4 °C $p = 0.3$; 37 °C $p = 0.98$; RT $p = 0.91$). The mean GQN of the different storage temperatures does not show any significant differences between storage conditions (Fig. 8).

Discussion

DNA degradation in multiplex STR analysis

Our results confirm experiences obtained from real casework samples, in which degradation was observed in STR analyses, while DIs obtained from quantitative real-time PCR remained unobtrusive. Recently, Lin et al. observed that after artificially degrading DNA to fragment sizes of 300 to 500 bp, full or nearly full STR profiles were obtained. Even when DNA was extremely degraded to fragment sizes of 150 bp, still partial profiles were obtained. Degrading DNA at such a low level, autosomal, and degradation quantification values of all quantification kits compared in their study dropped and DI increased [20]. One explanation for the differing observations compared to our study might be that Lin et al. used artificial degradation until fragmentation was actually visible. Our study, on the other hand, did not artificially enhance degradation but relied on natural degradation over time. Thus, degradation might have been less severe in our samples and degradation mechanisms other than fragmentation might have occurred (see below).

DNA degradation detection by forensic quantitative real-time PCR

No significant loss of DNA over time was observed in any of the storage conditions. On the contrary, DNA extraction efficiency was increased in samples stored at 37 °C for a prolonged time period. There is certainly no straight-forward explanation for this observation. We hypothesize, however, that drying of samples (loss of humidity) might play a crucial role here: Colder storage environments might lead to higher humidity, which, in turn, enables bacterial growth. Another hypothesis is that substances inhibiting extraction and/or detection processes might decompose faster at this temperature compared to DNA.

Several previous studies investigated the influence of storage temperature on DNA quantity and integrity in blood samples: For example, Al Rokayan found in 2000 that DNA extracted from blood samples showed higher molecular

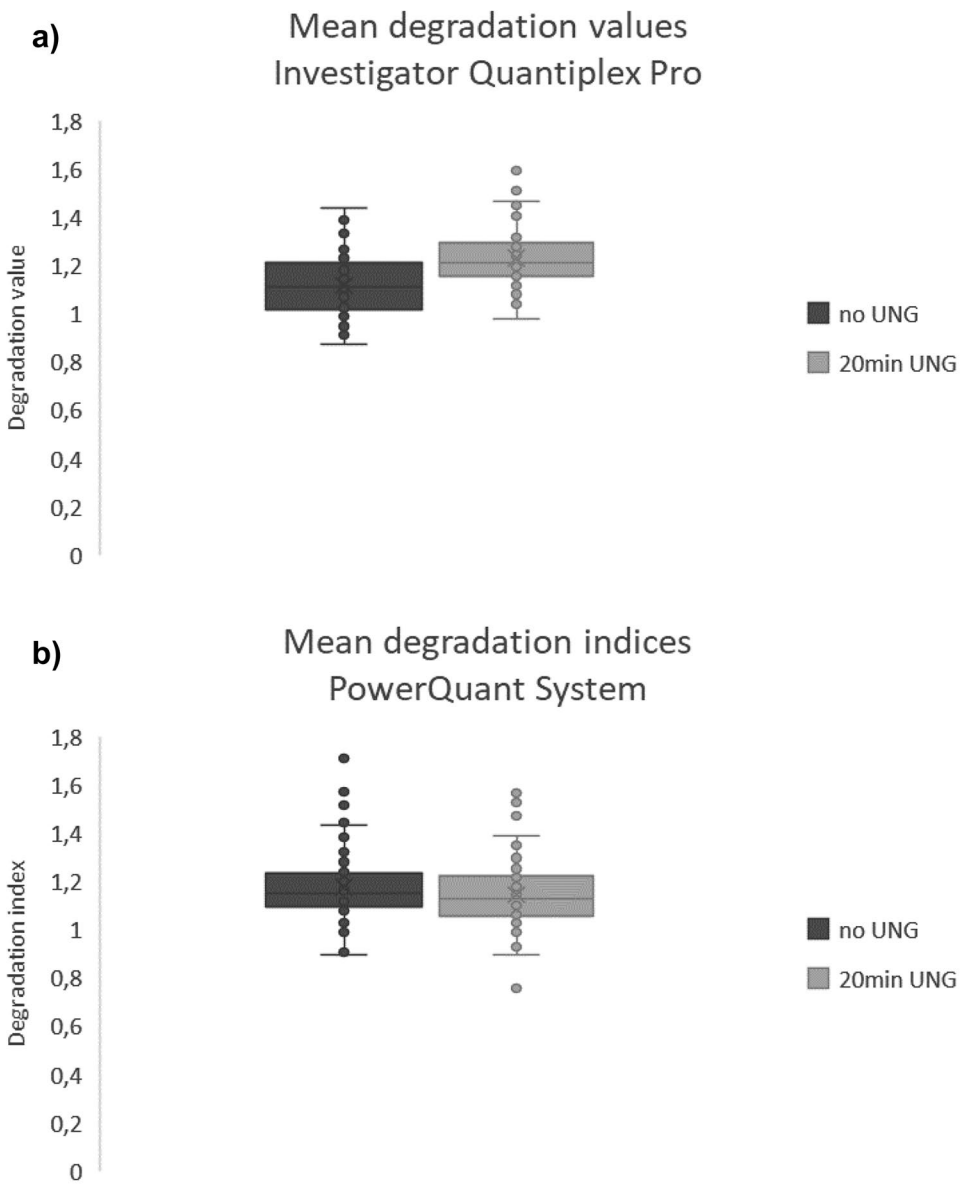


Fig. 6 Overall mean degradation in samples treated with UNG compared to untreated, measured with the Investigator Quantiplex Pro (**a**) and PowerQuant System (**b**)

weight and less shearing if blood samples were stored at − 20 °C compared to samples stored at 4 °C and RT [21]. Huang et al. [22] described in 2017 a loss in DNA concentration from blood samples stored at 24 °C over 15 days and that this loss correlated with a decrease in white blood cell (WBC) counts [22]. They also reported that samples stored at a low temperature (4 °C) showed stronger loss in WBC counts compared to storage at 24 °C, explaining this by cell lysis due to stress [22]. Most laboratories use 4 °C for short-term storage of blood samples. Our results along with previously published data suggest that even for shorter storage periods of one to 2 weeks, storage at − 20 °C or an increased temperature is preferable over 4 °C.

No significant increase of DI over time was observed even though these samples showed signs of degradation in multiplex STR PCR analyses. Our data confirm previous studies, for example, by Bulla et al., who reported loss of DNA quantity but not integrity in long-term storage of blood samples [19]. Data obtained by Investigator Quantiplex Pro without UNG treatment also showed no increase in DI over time. This means that the limited sensitivity in detecting DNA degradation by qPCR is not kit specific but might be explained by a more general underlying principle, which we will discuss below.

Thus, DNA degradation affecting STR analysis proved to be surprisingly difficult to detect at all. This might be because we initiated natural degradation by storage over time, while previous studies mainly used artificially enhanced degradation. DI only detects DNA fragmentation, but DNA fragmentation might not be the only mechanism

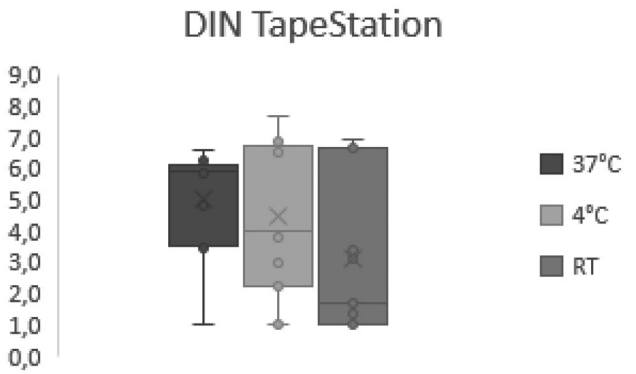


Fig. 7 Boxplots showing DIN obtained with the TapeStation analysis in samples stored at different temperatures. A higher median DIN was observed in samples stored at 37 °C compared to 4 °C and RT, without reaching statistical significance

behind the ski-slope effect. Other mechanisms of DNA degradation might play a crucial role here. For example, chemical alterations of bases as described above might reduce the efficiency of primer binding due to mismatched positions in the presence of uracil and hypoxanthine instead of cytosine and adenine. Mismatched positions in primer binding sites are known to have a stronger effect on STR markers with longer amplicons, such as SE33 [23].

Influence of uracil DNA glycosylase on detection sensitivity

A slightly higher sensitivity in detecting degradation in samples treated with UNG compared to untreated samples was observed in Investigator Quantiplex® Pro but not in PowerQuant® System. This difference might be caused by the slightly higher difference in amplicon length between the autosomal and degradation targets in the Quantiplex® Pro compared to the PowerQuant® System with a 212 bp and 262 bp difference, respectively [14]. It is to be expected

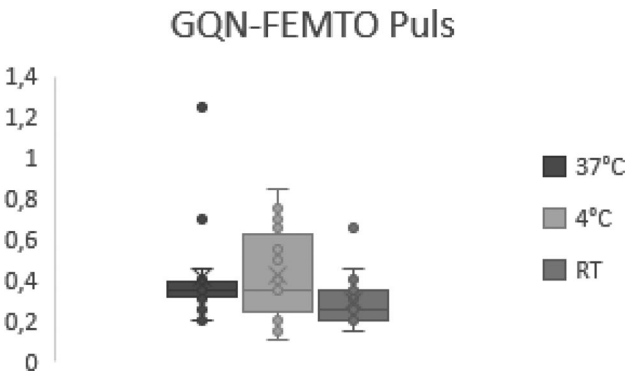


Fig. 8 Boxplots showing GQN obtained with the Femto Pulse analysis in samples stored at different temperatures. No statistical significant differences between storage temperatures were observed

that higher amplicon differences between the two targets lead to stronger differences in PCR efficiency. Our findings confirm observations recently described by Holmes et al. [24], who observed generally higher DI values with Investigator Quantiplex® Pro compared to PowerQuant® System.

We explain the difference between samples treated with UNG and untreated samples in the Investigator Quantiplex® Pro by the samples having suffered from deamination of cytosine due to hydrolytic damage, changing cytosine to uracil (e.g., [5]). UNG directly attacks uracil positions and eliminates uracil by cleaving the N-glycosidic bond between the base and the sugar-phosphate backbone of DNA, creating an abasic site in the DNA structure [25]. Such abasic sites comprise the weakest point in a DNA strand and enable the strand to break easily [9], for example, by heat stress during the first cycle of PCR. Changes in DI, however, were only minor. Further analyses of the correlation between degradation and storage time after UNG treatment, using a larger sample set and samples stored under different conditions, might provide interesting data on the detection of DNA degradation over time, which in turn might serve as a potential measure for the determination of the time since deposition of forensic traces.

DNA degradation analysis by automated (pulse-field) electrophoresis

No significant correlation between DIN or GQN and storage time was observed in any of the conditions analyzed. Consequently, electrophoretic systems for assessing DNA integrity could not be found to provide a suitable alternative to quantitative real-time PCR and did not improve the detection of DNA degradation. Taking into account the ability of some highly sensitive qPCR kits, such as the PowerQuant® System, to reliably point out samples that contain no or too little DNA for successful STR analysis [26], makes these kits highly useful in forensic genetics.

We did, however, observe a trend towards higher DIN numbers in samples stored at 37 °C compared to samples stored at RT and 4 °C. This trend is not statistically significant but correlates well with our previous findings of higher DNA recovery from samples stored at 37 °C compared to lower storage temperatures as described above.

Key points

1. STR multiplex PCR analysis of forensic trace samples can show signs of DNA degradation even though the degradation index (DI) measured by quantitative real-time PCR is unobtrusive.
2. Degradation indices measured by quantitative real-time PCR showed no correlation with storage time in samples

stored at three different temperatures for up to 316 days and no significant loss of DNA was observed.
3. Adding Uracil DNA glycosylase to enhance the sensitivity of detecting hydrolytic DNA damages improved the identification of DNA degradation. Thus, degradation effects other than fragmentation, such as deamination of DNA bases, play a role in reducing PCR efficiency of longer amplicons.
4. Electrophoretic methods did not improve degradation detection in forensic samples and are not superior over conventional quantitative real-time PCR.
5. Surprisingly, DNA recovery was significantly higher in samples stored at elevated temperatures (37 °C) compared to samples stored at room temperature or low temperatures (4 °C).

Acknowledgements We thank Marianne Schürenkamp, Sabrina Banken, and Ursula Sibbing for excellent technical support and helpful discussions. We further thank Dr. Felix Blumenthal from Agilent for Tapestation analyses and Dr. Kerstin Becker from BMFZ for performing FEMTO Pulse analyses.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Marrone A, Ballantyne J. Hydrolysis of DNA and its molecular components in the dry state. Forensic Sci Int Genet. 2010;4:168–77.
2. Gates KS. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. Chem Res Toxicol. 2009;22:1747–60.
3. Environmental Organic Chemistry for Engineers, Elsevier, 2017.
4. Speight JG. Hydrolysis, in: Reaction mechanisms in environmental engineering. Elsevier 2018;203–229.
5. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature. 1993;362:709–15.
6. Budke B, Kuzminov A. Hypoxanthine incorporation is nonmutagenic in Escherichia coli. J Bacteriol. 2006;188:6553–60.
7. Duncan BK, Weiss B. Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in Escherichia coli. J Bacteriol. 1982;151:750–5.
8. Schouten KA, Weiss B. Endonuclease V protects Escherichia coli against specific mutations caused by nitrous acid. Mutation Research/DNA Repair. 1999;435:245–54.
9. Lindahl T, Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. Biochemistry. 1972;11:3618–23.
10. Butler JM. Advanced topics in forensic DNA typing: interpretation, academic press. Oxford: England, San Diego, California; 2015.
11. Dembinski GM, Sobieralski C, Picard CJ. Estimation of the number of contributors of theoretical mixture profiles based on allele counting: does increasing the number of loci increase success rate of estimates? Forensic Sci Int Genet. 2018;33:24–32.
12. Schmidt M, Schiller R, Anslinger K, Wiegand P, Weirich V. Statistefix 4.0: A novel probabilistic software tool, Forensic science international. Genetics. 2021;55:102570.
13. Ewing MM, Thompson JM, McLaren RS, Purpero VM, Thomas KJ, Dobrowski PA, DeGroot GA, Romsos EL, Storts DR. Human DNA quantification and sample quality assessment: developmental validation of the PowerQuant(®) system. Forensic Sci Int Genet. 2016;23:166–77.
14. Holmes AS, Houston R, Elwick K, Gangitano D, Hughes-Stamm S. Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples. Int J Legal Med. 2018;132:691–701.
15. Podnar J, Deiderick H, Hunicke-Smith S. Next-generation sequencing fragment library construction. Curr Protocols Mol Biol. 2014;107:7.17.1–16.
16. Serrao E, Cherepanov P, Engelman AN. Amplification, Next-generation sequencing, and genomic DNA mapping of retroviral integration sites. J Vis Exp JoVE. 2016.
17. Morlote D, Janowski KM, Siniard RC, Guo RJ, Winokur T, DeFrank G, Harada S. Effects of improved DNA integrity by punch from tissue blocks as compared to pinpoint extraction from unstained slides on next-generation sequencing quality metrics. Am J Clin Pathol. 2019;152:27–35.
18. Pocernich C, Uthe J, Wong KS. Genomic DNA sizing and quality control on the Agilent Femto .Pulse System: App Note Genomics. 2017.
19. Bulla A, de Witt B, Ammerlaan W, Betsou F, Lescuyer P. Blood DNA yield but not integrity or methylation is impacted after long-term storage. Biopreservation and biobanking. 2016;14:29–38.
20. Lin S-W, Li C, Ip SCY. A performance study on three qPCR quantification kits and their compatibilities with the 6-dye DNA profiling systems. Forensic Sci Int Genet. 2018;33:72–83.
21. AlRokayan SAH. Effect of storage temperature on the quality and quantity of DNA extracted from blood. Pakistan J Biol Sci. 2000;3:392–4.
22. Huang L-H, Lin P-H, Tsai K-W, Wang L-J, Huang Y-H, Kuo H-C, Li S-C. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. PLoS ONE. 2017;12:e0184692.
23. Heinrich M, Müller M, Rand S, Brinkmann B, Hohoff C. Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. Int J Legal Med. 2004;118:361–3.
24. Morrison J, McColl S, Louhelainen J, Sheppard K, May A, Girdland-Flink L, Watts G, Dawnay N. Assessing the performance of quantity and quality metrics using the QIAGEN Investigator® Quantiplex® pro RGQ kit. Sci Justice J Forensic Sci Soc. 2020;60:388–97.
25. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990;93:125–8.

26. Poetsch M, Konrad H, Helmus J, Bajanowski T, von Wurmb-Schwark N. Does zero really mean nothing?-first experiences with the new PowerQuant™ system in comparison to established real-time quantification kits. Int J Legal Med. 2016;130:935–40.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2.3 Linear-after-the-exponetial (LATE) PCR: improved asymmetric PCR for quantitative DNA-analysis

Referenz:

Schulze Johann, K, Schürenkamp M, Sibbing U, Lischka C, Pfeiffer H, Vennemann M 2015: Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: improved asymmetric PCR for quantitative DNA-analysis. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 5: e659-e661. https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.246

Eigenanteil:

Projektplanung gemeinsam mit Frau Prof. Vennemann, Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor, Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherche, Verfassung des Manuskripts sowie der Bearbeitung der Anmerkungen von Co-Autoren und Reviewern.

Copyright notice:

The manuscript may be used for this dissertation as permission is generally granted by Elsevier for “authors to include their articles in full or in part in a thesis or dissertation for non-commercial purposes” (www.elsevier.com).

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5 (2015) e659–e661

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: Improved asymmetric PCR for quantitative DNA-analysis

K. Schulze Johann, M. Schürenkamp, U. Sibbing, C. Lischka, H. Pfeiffer, M. Vennemann*

Institute of Legal Medicine, University of Münster, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 September 2015
Accepted 21 September 2015
Available online 22 October 2015

ABSTRACT

Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR describes a novel approach to asymmetric PCR which uses adjusted melting temperatures of the limited primer to increase PCR efficiency. In this proof-of-principle study we show that linear amplification is possible over a wide range of amplification cycles. The curve characteristics of the real time PCR show that the plateau effect of conventional PCR can be avoided by this innovative technique.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR describes a novel approach to asymmetric PCR [1]. Conventional PCR is known to plateau stochastically due to competition of binding between primers and PCR products: The more PCR products bind to the target, the less efficient the reaction becomes, because no *de novo* synthesis takes place. Consequently, an increase in the number of PCR cycles does not necessarily lead to an increase in the total amount of PCR product, once the plateau phase has been reached. Furthermore, there is no correlation between the total amount PCR product and the amount of starting target.

To avoid the plateau, asymmetric PCR was described in which massively different primer concentrations are used to transform the exponential enrichment of PCR products into a linear, single stranded synthesis. Previous attempts to asymmetric PCR showed limited PCR efficiency due to differences in the optimal annealing temperature between the limited and the excess primer. To overcome this limitation, primers were designed with adjusted melting temperatures, namely by an increased length of the limited primer. This leads to increased amplification efficiencies as described in [2].

Here we present a proof-of-principle study for this innovative technique using the STR system humTH01. To test the exact curve characteristic of LATE-PCR, all reactions were performed as real time PCR. Due to the fact that linear amplification leads to the formation of a single stranded PCR product, the real time PCR signal detection was performed using a molecular beacon dye.

Material and methods

Primer design

Primers and molecular beacon probes were designed using primer3 (http://primer3.sourceforge.netsoftware), BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and AutoDimer [3]. Primer and probe sequences are given in Table 1.

DNA analysis

Real-time-PCR was performed in an ABI PRISM® 7500 Real-time PCR System (Life Technologies). PCR-Mastermix contains 1,85 µl HPLC, 1,75 µl $MgCl_2$ (25 mM), 0,5 µl BSA (20 mg/ml), 1,25 µl buffer (10×), 2 µl dNTP (10 mM), 0,15 µl AmpliTaq Gold (5 U/µl).

Results and discussion

The optimal temperature for hybridization of the molecular beacon has been determined by melt curve analysis and was found

Table 1
Primer and probe sequences for TH01.

Sequence (5′-3′)	T_m [°C]	
ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG GGT GA	62.5	Limited primer
GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT	58	Excess primer
CGCGA-CCA TGG AGT CTG TGT TCC CTG TGA CCT -TCGCG	72	Molecular beacon

* Corresponding author.
E-mail address: marielle.vennemann@ukmuenster.de (M. Vennemann).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.246
1875-1768/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

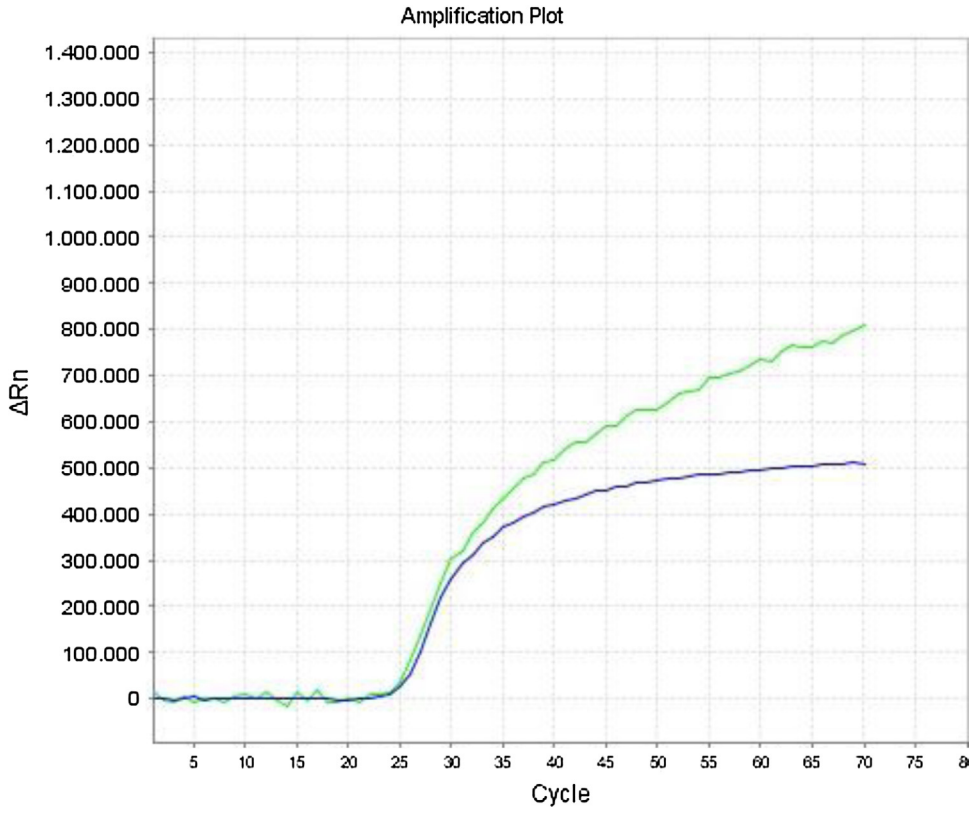


Fig. 1. Comparison of conventional PCR (blue) and LATE-PCR of TH01 (green). The plateau phase is clearly visible for conventional PCR while the LATE-PCR shows constant increase of the PCR product amount up to 70 cycles.

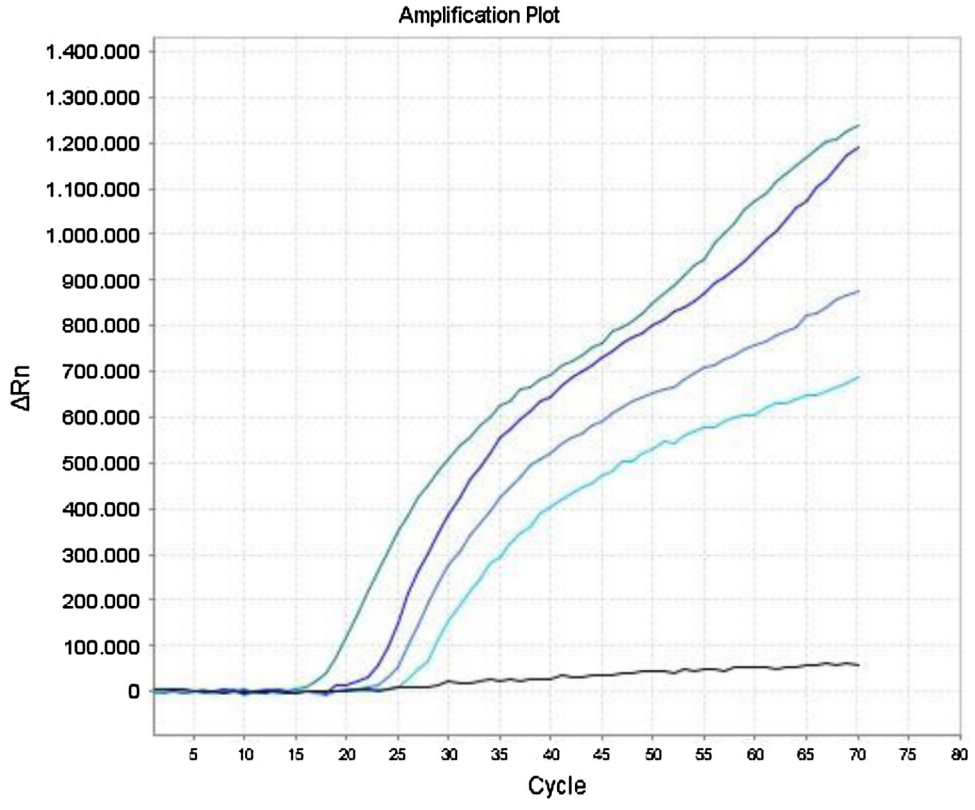


Fig. 2. Comparison of different DNA-concentrations in LATE-PCR of TH01. A clear relationship between end point quantities and target quantities seem to exist; however, further optimization is needed to improve the correlation coefficient.

to be 70 °C. Consequently, for all subsequent reactions this temperature was used for signal detection.

LATE-PCR does not reach the characteristic plateau like conventional PCR, but ends in a nearly linear phase (Fig. 1). This is an indication that there is no more product annealing, because after the first cycles the limited primer is depleted. Thus, more PCR cycles are possible without the creation of additional artefacts. Consequently, the amplification of samples with low DNA content is more successful with the regard to the final concentration of the amplicon.

Furthermore, the fluorescence signal at the end point of the amplification seems to correspond with the target amount (Fig. 2). However, further optimization is needed to obtain full correlation between end point fluorescence and DNA concentration.

The main benefit of LATE-PCR is that for samples comprising low quantity and/or quality of DNA, additional cycles can be used for amplification without the problem of plateauing. Furthermore, the amplification of typical STR artefacts, such as the incorporation of a non-matching base, is avoided because in LATE-PCR, linear amplification is more likely to use the original DNA strand as template compared to conventional PCR.

References

[1] J.A. Sanchez, K.E. Pierce, J.E. Rice, L.J. Wangh, Linear-After-The-Exponential (LATE)? PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis, Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (2004) 1933–1938.
[2] K.E. Pierce, J.A. Sanchez, J.E. Rice, L.J. Wangh, Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: primer design criteria for high yields of specific single-stranded DNA and improved real-time detection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 8609–8614.
[3] P.M. Vallone, J.M. Butler, AutoDimer a screening tool for primer-dimer and hairpin structures, Biotechniques 37 (2) (2004) 226–231.

2.4 Whole genome sequencing of artificial single nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces

Referenz:

Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Whole-genome sequencing of artificial single-nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces. Int J Legal Med 137, 33–45 (2023). https://doi.org/10.1007/s00414-022-02911-0

Eigenanteil:

Projektplanung gemeinsam mit Frau Prof. Vennemann, Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor, Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherche, Verfassung des Manuskripts sowie der Bearbeitung der Anmerkungen von Co-Autoren und Reviewern.

Copyright notice:

Reprinted article was published open access: Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Whole-genome sequencing of artificial single-nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces. Int J Legal Med 137, 33–45 (2023). https://doi.org/10.1007/s00414-022-02911-0, used under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

International Journal of Legal Medicine
https://doi.org/10.1007/s00414-022-02911-0

ORIGINAL ARTICLE

Whole-genome sequencing of artificial single-nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces

Kristina Schulze Johann[1] · Hannah Bauer[1] · Peter Wiegand[2] · Heidi Pfeiffer[1] · Marielle Vennemann[1]

Received: 24 August 2022 / Accepted: 19 October 2022
© The Author(s) 2022

Abstract
The aim of this study was to identify artificial single-nucleotide variants (SNVs) in degraded trace DNA samples. In a preliminary study, blood samples were stored for up to 120 days and whole-genome sequencing was performed using the Snakemake workflow dna-seq-gatk-variant-calling to identify positions that vary between the time point 0 sample and the aged samples. In a follow-up study on blood and saliva samples stored under humid and dry conditions, potential marker candidates for the estimation of the age of a blood stain (= time since deposition) were identified. Both studies show that a general decrease in the mean fragment size of the libraries over time was observed, presumably due to the formation of abasic sites during DNA degradation which are more susceptible to strand breaks by mechanical shearing of DNA. Unsurprisingly, an increase in the number of failed genotype calls (no coverage) was detected over time. Both studies indicated the presence of artificial SNVs with the majority of changes happening at guanine and cytosine positions. This confirms previous studies and can be explained by depurination through hydrolytic attacks which more likely deplete guanine while deamination leads to cytosine to thymine variants. Even complete genotype switches from homozygote 0/0 genotypes to the opposite 1/1 genotypes were observed. While positions with such drastic changes might provide suitable candidate markers for estimating short-term time since deposition (TsD), 11 markers were identified which show a slower gradual change of the relative abundance of the artificial variant in both blood and saliva samples, irrespective of storage conditions.

Keywords Whole-genome sequencing · Crime scene trace · Time since deposition · DNA degradation

Introduction

Forensic DNA profiling has become a routinely used tool in analyzing forensic evidence. Autosomal short tandem repeat (STR) markers are utilized to generate DNA profiles that may identify a person of interest or even link them to the scene of a crime. One major challenge analysts face when working with biological material is DNA degradation as it limits the correct interpretation of STR typing results. However, DNA degradation might also have its benefits: the degree of degradation has been linked to the age of a biological stain [1] and knowledge of the time since deposition (TsD) of a biological trace found at the scene can be important intelligence for criminal investigation. Knowing whether a trace has been deposited before, after, or at the estimated time point of the crime could help to determine the relevance of a trace to the investigation at hand. This information saves resources by avoiding cost-intensive and time-consuming analyses of irrelevant trace material.

Several studies on the estimation of the age of a biological trace have been published e.g., [2], based on optical detection strategies like visible absorbance spectroscopy [3–7] or the analysis of the presence of hemoglobin derivatives [8–11]. While these methods are highly promising for bloodstains, alternative approaches are needed for other biological materials, and in recent publications the TsD was estimated using molecular methods like quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. Various mRNA and miRNA markers were identified and successfully applied for the estimation of TsD not only in blood, but also in menstrual fluid, saliva, semen, and vaginal secretion samples by analyzing their RNA degradation patterns [12]. Even though robustness is not yet considered to be at the level needed for

✉ Kristina Schulze Johann
kristina.schulzejohann@ukmuenster.de

[1] Institute of Legal Medicine, University of Münster, Röntgenstr. 23, 48149 Münster, Germany

[2] Institute of Legal Medicine, University of Ulm, Albert-Einstein-Allee 23, 89081 Ulm, Germany

Published online: 10 November 2022

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

forensic casework [13, 14], such methods are highly promising for future investigations. More recently, microbes were investigated for estimating the TsD of saliva samples but it was indicated that the high inter-individual variation surpasses the time-dependent variation [1]. Schneider et al. demonstrated the general feasibility of LC–MS-based proteomics to determine the TsD over a period of 2 months and samples stored under two different storage conditions [15].

Any method based on DNA analysis is generally easier incorporated into the standard workflow of forensic genetic laboratories compared to RNA- or protein-based technologies [12, 16, 17]. Overballe-Peterson et al. stated that massively parallel sequencing (MPS) allows further insight into DNA degradation over time [18] because this technique allows the detection of all results of DNA degradation.

Various external factors such as ultraviolet light, radiation, temperature, or humidity damage DNA structure due to the DNA's limited chemical stability. One of the main chemical reactions by which DNA is damaged is hydrolytic degradation, i.e., the cleavage of chemical bonds by the addition of water [19–22]. There are two main mechanisms by which hydrolysis attacks DNA integrity, that of base loss from the 2′-deoxyribose backbone and that of deamination. Hydrolysis of the DNA backbone attacks the linkage between the deoxyribose carbon atom and the base, and is the main reason for DNA degradation in dead tissue [23]. When the DNA bases cytosine (C), adenine (A), and guanine (G) undergo the process of spontaneous deamination, they will be converted to uracil, hypoxanthine, and xanthine, respectively, and ammonia. Deamination of DNA bases leads to structure instability and sequence variation: xanthine is known to base pair with both cytosine and thymine (T), while hypoxanthine predominantly pairs with cytosine to promote A to G mutations [24].

While newly developed forensic DNA typing strategies are consistently validated to produce high-quality data from low-quality DNA, information on the exact mode of DNA degradation and their time-dependent characteristics in forensic crime scene traces are poorly studied [25]. Consequently, the aim of our study aimed was to investigate signs of DNA degradation in whole-genome sequencing (WGS) data. Here, we focus on artificial single-nucleotide variants (SNVs) that are products of DNA damage over time. In a preliminary study we show that SNVs are present in blood samples stored for up to 120 days. Based on these observations, a follow-up study was performed to analyze the effect of different storage conditions (dry and humid) and potential differences between body fluids (blood and saliva). Again, three different time points were analyzed in the follow-up study similar to the time points in the preliminary study to confirm changes over a longer storage duration. The follow-up study of saliva and blood samples stored under humid and dry conditions proofs the concept and allows the identification of potential markers worthy of further investigation for their ability to estimate TsD.

Material and methods

Samples

Samples were collected with informed consent from one individual only to eliminate interindividual variations caused, i.e., by the general health status of the donor. In a preliminary study, blood samples ($n = 3$) were collected by venipuncture and stored at room temperature (RT) for 0, 21, and 120 days. For the larger-scale follow-up study, a blood sample from one donor was collected by venipuncture and spots of 40 µL of blood were prepared on sterile cellulose pads. Saliva samples ($n = 5$) from the same donor were collected by swabbing the inside of the cheek with a forensic swab. A total of 5 blood samples and 5 saliva samples were stored for 0, 22, and 92 days under humid and dry conditions, respectively. Samples stored under dry conditions were stored in transparent plastic boxes protected from direct UV light. Samples stored under humid conditions were stored in transparent plastic boxes with water-covered base. Time point 0 was used as a positive control.

DNA extraction and quantification

DNA from blood samples was extracted using the Maxwell® RSC Blood DNA Kit on the Maxwell® 16 Forensic Instrument (Promega, Mannheim, Germany) and eluted in a final volume of 50 µL. Per sample, four spots of 40 µL blood were extracted separately and the eluates were subsequently pooled to a total volume of 200 µL. DNA from saliva samples was extracted using Maxwell® FSC DNA IQ™ Casework Kit (Promega, Mannheim, Germany). Samples were quantified using Promega's PowerQuant® System using 5 µL of PowerQuant 2 × MM, 0.5 µL of 20 × Primer/Probe/IPC-Mix, 3.5 µL HPLC, and 2 µL of the sample. Prior to NGS library construction, DNA was sheared mechanically to allow analysis of natural strand breaks at positions weakened due to depurination in future analyses of these datasets [18]. Shearing to 250 bp was performed following the manufacturer's guideline for the Covaris® M220 Focused-ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA) with a duty cycle of 10%, intensity 4, and 200 cycles per burst for 80 s. After shearing, the DNA was quality checked by 2100 Bioanalyzer Instrument with High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Waldbronn).

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

Library preparation and whole-genome sequencing

Libraries were prepared using the NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit according to manufacturer's recommendations (New England Biolabs). Library quality was checked by a TapeStation using D1000 ScreenTape with the TapeStation Analysis Software 3.1.1. The initial three blood samples of the preliminary study were sequenced on the NextSeq 500 System (Illumina, CA, USA) using a high-output of 300 cycles (2 × 150 cycl., 20 × coverage). The samples for the follow-up study were sequenced on Illumina's NovaSeq 6000 System with a S4 flow cell (2 × 150 cycl., 30 × coverage). Sequencing was performed at Genomics & Transcriptomics Laboratory (GTL) at Heinrich-Heine-University Düsseldorf.

Bioinformatics and data analysis

Raw data analysis consisted of quality control and paired-end read alignment to the GRCh38 reference with Burrows-Wheeler Alignment (BWA) [26] subsequent variant calling, and was performed by the Core Facility Genomics of the University (Westfälische-Wilhelms Universität Münster) based on the Genome Analysis Toolkit (GATK) best-practice workflow [27] implemented by the Snakemake workflow dna-seq-gatk-variant-calling by Kösters et al. [28, 29].

Further data exploration, calculations and descriptive statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2016 and the IBM® SPSS®-Software version 28. A Mann–Whitney *U* test was applied to calculate statistically significant differences between 21 and 120 days in the preliminary study as well as 22 and 92 days in the follow-up study. Statistically significant differences between dry and humid conditions were calculated accordingly.

All analyses were based on read counts at single-nucleotide variant (SNV) sites with regard to GRCh38. Genotype allocations are based on read counts at each position. Genotype 0/0 represents the homozygote allele as given in GRCh38, genotype 0/1 represents the heterozygote genotype with the allele of refGenome38 and the alternative allele, and 1/1 represents the homozygote alternative allele. The total number of reads per SNV position (of all detected alleles) and the number of reads for the alternative allele was used to calculate the percentage of read counts of the variant allele (short: percentage reads of variant, PRV). A PRV of 0% represents the 0/0 genotype, a PRV of 100% represents genotype 1/1, while values in between represent the heterozygous genotype. The day 0 blood sample was considered to show the "true" genotype of the donor. Any differences between day 0 and stored samples were regarded as changes during storage. In addition to changes of the genotype calls between day 0 and stored samples, PRV changes over time were analyzed. Data obtained from whole-genome sequencing contain a plethora of information, which cannot be covered in a single manuscript. This study analyzed single-nucleotide variants (SNV) only while other forms of DNA damage, such as strand breaks, will be the subject of future analyses of the same data set.

Firstly, genotype allocations were analyzed relative to the reference genome. In a second step, SNVs were further characterized regarding affected DNA bases. In a third step, analysis focused on G > A and C > T changes only because such transitions are expected to be the most frequent base substitutions due to hydrolytic attacks. Finally, we identified potential candidate markers for the estimation of TsD based on gradual changes in PRV.

Results

Library quality check

Preliminary study

Library concentrations varied between 0.48 ng/µl and 0.53 ng/µl. The quality control showed a decrease of average fragment size in the library area between 163 and 951 bp. The fragment size decreased from 457 bp at time point 0 day of storage to 444 bp at time point 21 days of storage to 411 bp at time point 120 days of storage.

Follow-up study

Library concentrations varied between 0.36 ng/µl and 8.88 ng/µl. The quality control again showed a decrease of average fragment size in the library area between 200 and 1000 bp. Comparing the median values of the average fragment size of all samples at the different time points, a decrease from 535 bp at time point 0 to 527 bp at time point 1 (22 days) of storage and to 492 bp at time point2 (92 days of storage) was observed.

Identification of artificial SNVs by WGS

Preliminary study

Sequencing of the initial three samples was successful. The sequencing run showed a Q30-value > 94%. Sequencing data were filtered to positions showing differences between the day 0 sample and the two samples stored for 21 and 120 days, respectively. A total of 12,261 base changes between day 0 and day 21 or 120 were identified.

Firstly, genotype allocations were analyzed relative to the reference genome. A first effect of storage was observed by an increase in failed genotype calls (due to no coverage). While all genotypes were called in the day 0 sample, day

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

21 sample showed 507 and the day 120 sample showed 883 failed genotype callings out of 12,261 variant calls.

While in day 0, the majority of positions showed a homozygote genotype identical to the reference genome GRCh38 (0/0; Table 1), samples stored for 21 or 120 days showed mainly heterozygote genotypes (0/1). Table 1 clearly shows that positions with a 0/0 genotype change into a 0/1 genotype during storage. This effect is visible between day 0 and day 21 while no further increase in 0/1 genotypes was observed between day 21 and day 120. Furthermore, the number of homozygote 1/1 genotypes decreased during storage.

Since the day 0 blood sample is considered to be the positive control representing the true genotype of the donor, differences between this sample and the stored samples have to be a product of changes during storage time.

We observed the highest number of genotype changes between the day 0 and the day 21 sample. A total of 9270 genotype changed from 0/0 in the day 0 sample to 0/1 in the day 21 sample were observed. Five positions showed a gradual change from genotype 0/0 in the day 0 sample to 0/1 in the day 21 sample to 1/1 in the day 120 sample with a gradually increasing PRV (Table 2). In addition, 989 homozygote 1/1 genotypes in the day 0 sample changed into a 0/1 genotype in the day 21 sample. Of these, 12 positions showed a gradual decrease of PRV and a further change to a 0/0 genotype in the 120 day sample (see Table 2 for details).

In a second step, SNVs were further characterized. Due to hydrolytic damage of DNA, it was expected to observe mainly G-A and C-T transitions. Analyzing the bases affected by changes induced during storage it was indeed observed that generally more than 50% of changes were G to A and C to T changes or vice versa (Fig. 1):

Figure 1 shows by example bases affected by genotype changes from 0/0 to 0/1 between the day 0 sample and the day 120 sample. All other genotype changes reveal very similar distributions (see Online Resource 1 for details). As expected, changes of guanine and cytosine were found more frequently ($n = 2474$ and $n = 2362$) compared to changes of adenine and thymine ($n = 2084$ and $n = 2108$).

In a third step, analysis focused on G > A and C > T changes only, using a threshold of 10 read counts to eliminate changes that can be explained by sequencing errors. Because the majority of changes observed were between the day 0 sample and the day 21 sample and concerned mainly genotype changes from homozygote 0/0 or 1/1 to heterozygote 0/1, these positions are the most interesting for further analysis: a total of 1120 C > T changes and 1134

Table 1 Distribution of genotypes over time — initial study

Variants called to reference genome GRCh38			
	day0	day21	day120
0/0	9565	539	352
0/1	1041	10639	10463
1/1	1060	107	72

Table 2 Variants that change from a homozygote genotype in the day 0 sample into the opposite homozygote genotype in the day 120 sample — initial study

				day 0		21 days		120 days	
CHROM	POS	REF	ALT	Genotype	PRV	Genotype	PRV	Genotype	PRV
chr14	52168455	C	T	0/0	0	0/1	72.73	1/1	100
chr2	212360701	G	C	0/0	0	0/1	75.00	1/1	100
chr4	119550816	C	T	0/0	0	0/1	61.54	1/1	100
chr1	72189047	A	G	0/0	0	0/1	38.10	1/1	92.31
chr6	167178167	T	C	0/0	0	0/1	16.67	1/1	90.91
chr4	43002214	G	A	1/1	93.75	0/1	40.91	0/0	0
chr1	7877377	C	T	1/1	90.91	0/1	45.45	0/0	0
chr17	26936514	A	G	1/1	100	0/1	61.90	0/0	0
chr4	49145325	C	G	1/1	50	0/1	9.09	0/0	0
chr7	126756908	G	A	1/1	100	0/1	64.29	0/0	0
chr3	165295224	A	G	1/1	100	0/1	50.00	0/0	0
chr14	28636078	T	A	1/1	100	0/1	63.64	0/0	0
chr6	76689033	G	A	1/1	100	0/1	47.06	0/0	0
chr13	61672809	G	T	1/1	100	0/1	46.67	0/0	0
chr7	128420742	G	A	1/1	91.67	0/1	60.00	0/0	0
chr4	43002187	T	G	1/1	91.67	0/1	38.89	0/0	0
chr10	42271279	C	T	1/1	91.67	0/1	15.38	0/0	0

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

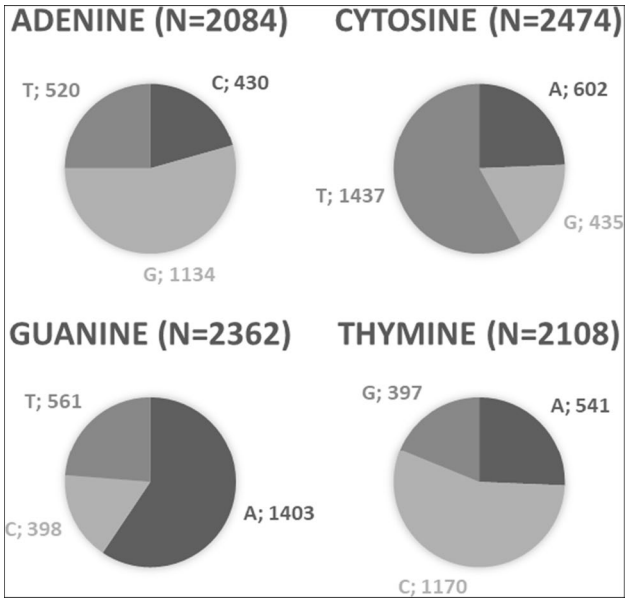


Fig. 1 The majority of base changes occur at guanine and cytosine positions comprising mainly G-A and C-T changes. Changes from 0/0 genotypes to 0/1 genotypes between day 0 and day 120

G > A changes over time were observed in positions showing a 0/0 genotype in the day 0 sample. A total of 108 C > T and 109 G > A changes over time were observed in positions showing a homozygote 1/1 genotype. Of these positions, 605 C > T changes and 627 G > A changes showed an increase or decrease of the relative detection intensity PRV of the new variant (Fig. 2). Statistically significant differences of PRV between the different storage times were observed (ANOVA: $p < 0.001$).

Of all positions depicted in Fig. 2, nine positions were identified that show ideally distributed PRVs over time (Table 3). These positions are even better suited as potential marker candidates for estimation of TsD than positions that show a full genotype change from one homozygote into the opposite homozygote.

Results of this preliminary study confirmed the hypothesis that artificial SNVs do occur during storage of blood samples for up to 120 days and that PRV of such positions increase or decrease over time. It was further confirmed that cytosine and guanine are more susceptible to DNA damage compared to adenine and thymine. Based on these observations, a follow-up study was performed to analyze the effect of different storage conditions (dry and humid) and potential differences between body fluids (blood and saliva).

Follow-up study

All 10 samples in the follow-up study were successfully sequenced. In this study, Illumina NextSeq 500 System was used to increase coverage of sequencing. Increase in coverage resulted in more SNVs being detected rather than in higher read counts of single positions: a total of 550,448 SNVs found in blood samples and 547,170 SNV in saliva samples that occur in stored samples but not in the fresh samples at day 0. This follow-up study confirmed findings of the preliminary study that there are changes between the day 0 sample (positive control) and stored samples:

Again, a clear increase in failed genotype calls (no coverage) was observed over time (Table 4). The day 0 samples of saliva showed more failed genotyped calls compared to the day 0 sample of blood. The increase of the number of failed genotype calls was stronger under humid conditions compared to dry conditions over the full-storage period.

Again, genotype changes were analyzed first. Similar to the preliminary study, a high number of genotype changes from 0/0 in the day 0 sample towards 0/1 genotypes in the day 22 samples (both humid and dry) was observed. The strongest increase, however, was observed regarding the number of 1/1 genotypes in blood samples between the day 0 sample and the day 22 samples (both humid and dry). This effect was not visible in saliva samples (Table 5). This might be due to a surprisingly higher number of 1/1 genotypes in the day 0 sample of saliva than in the day 0 sample of blood (numbers highlighted in bold). Similar to genotype changes described in the preliminary study, the majority of changes was detected within the first 22 days of storage. Interestingly, there were no clear changes in the total number of genotypes over time in saliva samples. Furthermore, a significantly lower number of changes from 0/1 genotypes to

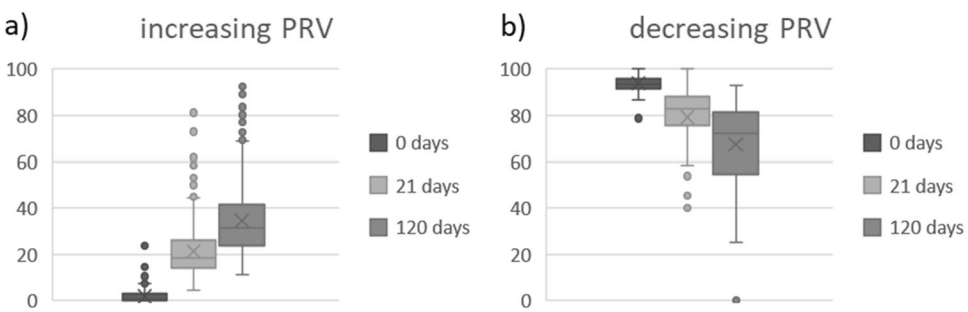


Fig. 2 PRV of G > A and C > T changes that show an increase (**a**) or decrease (**b**) over time

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

Table 3 Nine positions that are suitable candidate markers for TsD estimation with gradually changing PRV

				Day 0		21 days		120 days		PRV difference	
Chrom	Pos	Ref	Alt	Genotype	PRV	Genotype	PRV	Genotype	PRV	0 to 21 days	21 to 120 days
chr20	29108152	C	T	0/0	0	0/1	35.71	0/1	90.90	35.71	55.19
chr17	21681175	C	T	0/0	0	0/1	18.18	0/1	69.23	18.18	51.04
chr1	41795406	C	T	0/0	0	0/1	33.33	0/1	83.33	33.33	50
chr3	75862712	G	A	0/0	0	0/1	33.33	0/1	92.30	33.33	58.97
chr17	26949150	G	A	0/0	0	0/1	18.18	0/1	75	18.18	56.81
chr20	29875648	G	A	0/0	0	0/1	21.43	0/1	77.78	21.42	56.34
chr22	11471357	G	A	0/0	0	0/1	30	0/1	85.71	30	55.71
chr10	47382220	G	A	0/0	0	0/1	18.18	0/1	68.75	18.18	50.56
chr13	17268210	C	T	1/1	78.57	0/1	58.33	./.	0	20.23	58.33

Table 4 Total number of failed genotype calls (out of 550,448 SNVs in blood and 547,170 SNV in saliva samples) due to no coverage in the follow-up study. An increase of failed genotype calls over time was observed in both samples and in both storage conditions

	day 0	Day 22	Day 92
Blood humid	3194	9671	15724
Blood dry		11263	12403
Saliva humid	3292	7205	16509
Saliva dry		8173	13763

Table 5 Distribution of genotypes over time — follow-up study

	Genotype	Day 0	Day 22		Day 92	
			Humid	Dry	Humid	Dry
blood	0/0	164 465	188 686	192 167	187 100	189 386
	0/1	362 088	115 835	111 312	118 075	122 656
	1/1	**23 895**	240 466	241 119	240 662	235 980
saliva	0/0	190 447	189 173	187 641	183 447	188 945
	0/1	115 264	116 993	118 328	120 606	121 889
	1/1	**241 459**	240 068	240 538	240 113	236 220

1/1 genotypes were observed in saliva samples compared to blood samples, after both 22 and 92 days of storage.

Extreme genotype changes from a homozygote genotype in the day 0 sample to a 0/1 genotype in the day 22 sample and the opposite homozygote in the day 92 sample were observed. Table 6 gives an overview of the total number of positions detected, while full details of these positions are given in the Online Resource 2. Most positions identified in the dry and humid samples were not identical. In blood, only two identical positions under humid and dry conditions were identified; both changed their genotype from 0/0 to 1/1. In saliva, there were three matching sites between conditions changing their genotype from 1/1 to 0/0.

Analyzing the bases affected by changes over time, it was again observed that more than 50% of changes were G > A or C > T changes in both saliva and blood samples. This

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

Table 6 Total number of positions that change from a homozygote genotype in the day 0 sample into the opposite homozygote genotype in the day 92 sample — follow-up study

	Blood		Saliva	
	Humid	Dry	Humid	Dry
0/0 to 0/1 to 1/1	25	19	19	23
1/1 to 0/1 to 0/0	16	12	22	28

was true for changes between day 0 and day 22 as well as day 0 and day 92 and between day 22 and day 92, respectively. Figure 3 shows by example the variations between the positive control and the day 92 samples. Finally, a significantly stronger increase in the relative number of spanning deletions designated as asterisk (*) over time was observed in saliva samples compared to blood samples (chi^2 test, $p < 0.05$). In humid samples, we observed only 3818 changes between day 0 and day 92 in saliva, while in blood, 217,624 changes were observed (see Fig. 3). A similar effect was observed for dry samples (3110 changes in saliva versus 215,316 changes in blood); see Online Resource 3 for further details.

In a further step, analysis focused again on G > A and C > T changes only, using a threshold of 10 read counts to eliminate changes that can be explained by sequencing

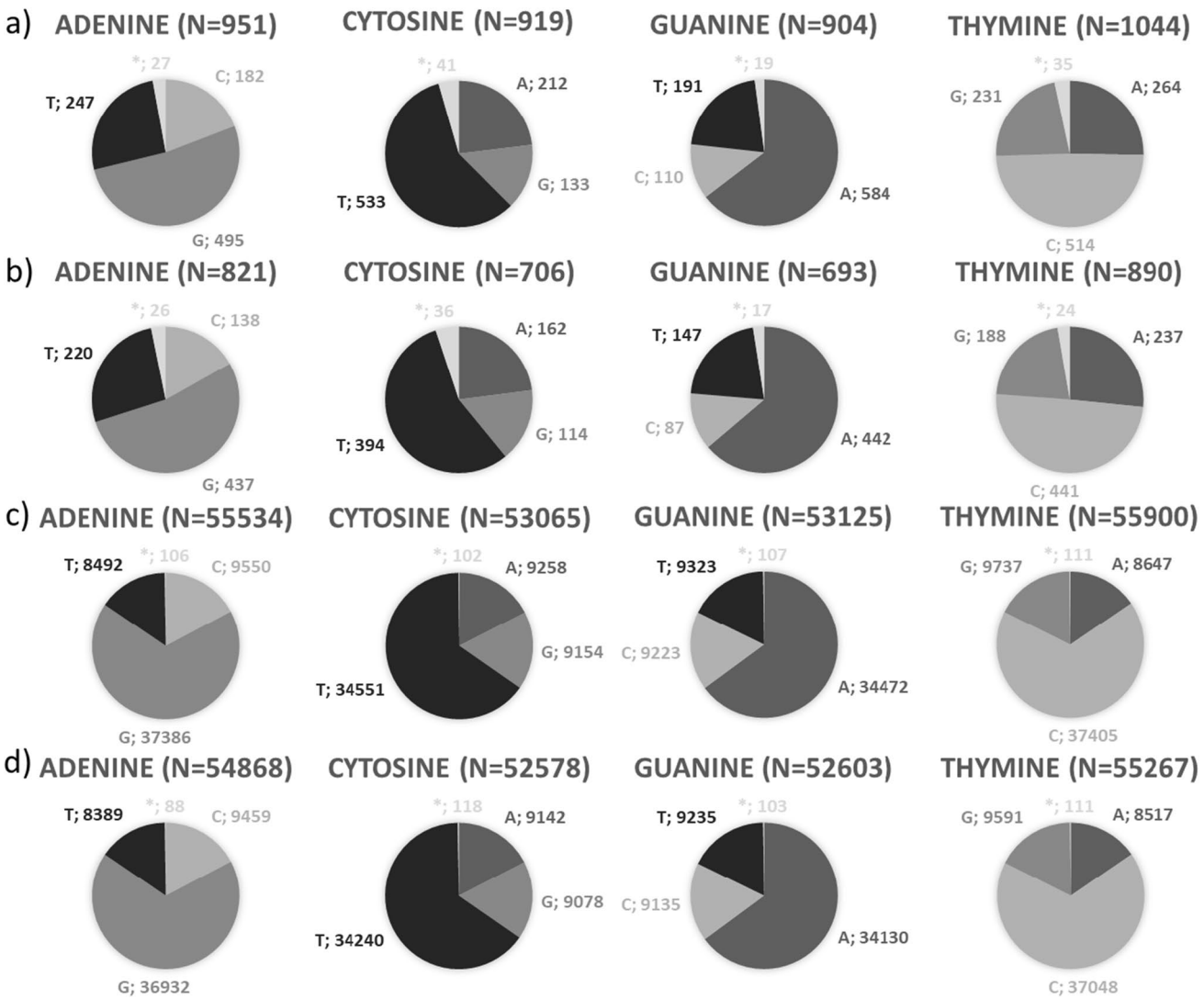


Fig. 3 Genotype changes from day 0 = 0/1 to day 92 = 1/1 in the follow-up study. (**a**) Saliva humid (total $n = 3818$), (**b**) saliva dry (total $n = 3110$), (**c**) blood humid (total $n = 217{,}624$), and (**d**) blood dry (total $n = 215{,}316$). Majority of changes represent G-A or C-T changes

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

errors. Because the majority of changes observed were between the day 0 sample and the day 22 sample, similar to the preliminary study, these positions remain the most interesting for further analysis. In accordance with the preliminary study, we analyzed increased and decreased PRV, in positions showing a homozygote genotype in the day 0 samples. In each combination of biological matrix and storage condition, over 1000 G > A and C > T changes were identified that show an increase or decrease in PRV over time (ANOVA: $p < 0.001$ for every combination; Fig. 4).

Similar to the preliminary study, we further analyzed all positions detailed in Fig. 4 above to identify positions that show a decrease or increase in PRV that is ideally distributed PRVs over time. These positions are better suited as potential marker candidates for the estimation of longer TsD while positions that show a full genotype change from one homozygote into the opposite homozygote might be more suitable for shorter TsD.

Numerous such positions were identified, which are highly promising candidate markers for TsD estimation. Details on these positions are given as Online Resource 4.The main aim of this follow-up study, however, was to identify potential markers for the estimation of TsD. Ideally, such a marker is suitable for blood and saliva and is

a)

	G>A				C>T			
	Blood		Saliva		Blood		Saliva	
	Humid	Dry	Humid	Dry	Humid	Dry	Humid	Dry
Increasing PRV	1324	1153	1109	1162	1223	1077	1103	1092
Decreasing PRV	48	36	52	67	60	52	82	87

b)

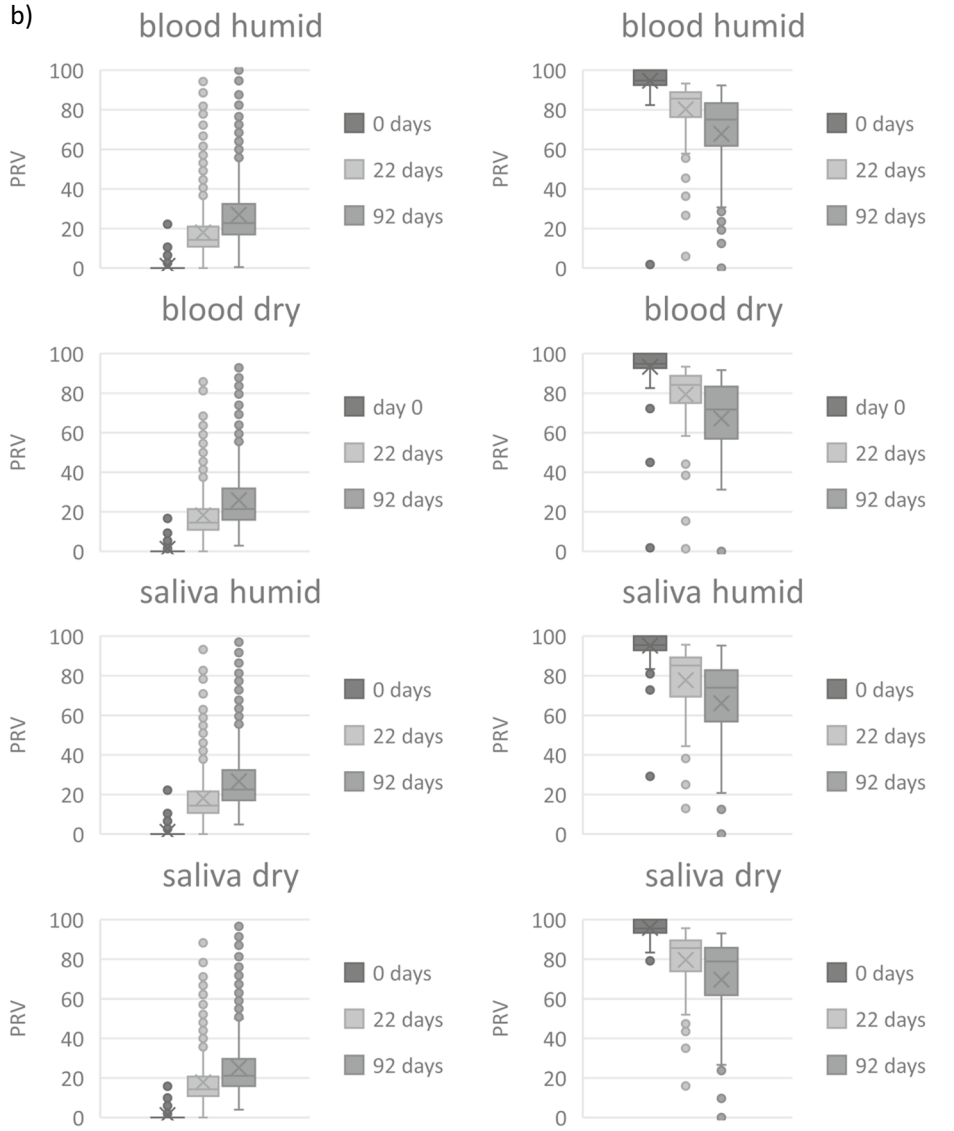


Fig. 4 (**a**) Total numbers of C > T and G > A changes that exceed a threshold of 10 read counts and show an increase or decrease of PRV over time, separated by sample origin and storage condition. (**b**) PRV of C > T and G > A changes that show an increase or decrease over time for each combination of biological matrix and storage condition.

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

not affected by storage conditions. A total of 11 SNVs were identified that fulfill these conditions (Table 7). Interestingly, all these SNVs represent G > A or C > T changes and comprise positions with increasing PRV only. These positions are considered to be potential candidate markers for future assays to determine the age of a blood or saliva trace.

Further analysis of these most promising positions for TsD estimation revealed that all of them comprise clear increasing PRV over time (Fig. 5) with statistically significant changes in every combination ($p < 0.001$).

Discussion

Library quality check

The decrease in fragment size that was observed in the library quality check of the preliminary study was confirmed by the results of the follow-up study. While no statistical calculation of significance was performed due to the small sample size, the results confirm the expectation

Table 7 Potential markers for future TsD assays identified in the follow-up study. Positions displayed show an increase in PRV over time in both saliva and blood samples, irrespective of the storage condition

Blood														
				0 days		dry				humid				
						22 days		92 days		22 days		92 days		
CHROM	POS	REF	ALT	GT	PRV	GT	PRV	GT	PRV	GT	PRV	GT	PRV	
18	15346877	G	A	0/0	0.00	0/1	15.38	0/1	19.23	0/1	11.54	0/1	12.20	
19	27642919	C	T	0/0	5.71	0/1	10.71	0/1	18.33	0/1	9.30	0/1	18.60	
19	54597325	G	A	0/0	0.00	0/1	10.20	0/1	11.11	0/1	10.81	0/1	13.11	
22	22349323	G	A	0/0	0.00	0/1	18.60	0/1	39.66	0/1	18.64	0/1	25.53	
22	22349337	C	T	0/0	0.00	0/1	17.02	0/1	32.73	0/1	17.31	0/1	22.92	
22	22349378	G	A	0/0	0.00	0/1	12.77	0/1	36.67	0/1	18.00	0/1	20.45	
3	75723734	C	T	0/0	0.00	0/1	11.63	0/1	16.13	0/1	8.47	0/1	13.21	
6	32536281	G	A	0/0	0.00	0/1	15.00	0/1	16.13	0/1	13.33	0/1	23.53	
7	146932494	G	A	0/0	0.00	0/1	11.43	0/1	20.00	0/1	19.05	0/1	19.64	
GL000225.1	35879	C	T	0/0	0.00	0/1	6.56	0/1	40.17	0/1	9.84	0/1	10.53	
KI270730.1	97182	G	A	0/0	0.00	0/1	7.14	0/1	18.42	0/1	3.45	0/1	6.15	
Saliva														
				0 days		dry				humid				
						22 days		92 days		22 days		92 days		
CHROM	POS	REF	ALT	GT	PRV	GT	PRV	GT	PRV	GT	PRV	GT	PRV	
18	15346877	G	A	0/0	0.00	0/1	11.90	0/1	12.77	0/1	9.52	0/1	23.08	
19	27642919	C	T	0/0	0.00	0/1	15.38	0/1	20.93	0/1	17.95	0/1	26.67	
19	54597325	G	A	0/0	0.00	0/1	8.33	0/1	9.46	0/1	13.73	0/1	16.33	
22	22349323	G	A	0/0	0.00	0/1	27.59	0/1	27.87	0/1	18.60	0/1	27.69	
22	22349337	C	T	0/0	0.00	0/1	20.41	0/1	23.81	0/1	17.07	0/1	22.41	
22	22349378	G	A	0/0	0.00	0/1	17.31	0/1	24.64	0/1	18.18	0/1	32.73	
3	75723734	C	T	0/0	6.25	0/1	12.50	0/1	15.69	0/1	9.84	0/1	18.18	
6	32536281	G	A	0/0	0.00	0/1	11.54	0/1	22.73	0/1	11.76	0/1	15.00	
7	146932494	G	A	0/0	0.00	0/1	20.00	0/1	22.64	0/1	15.22	0/1	27.78	
GL000225.1	35879	C	T	0/0	0.00	0/1	12.83	0/1	23.74	0/1	13.25	0/1	36.06	
KI270730.1	97182	G	A	0/0	0.00	0/1	0.00	0/1	4.69	0/1	2.78	0/1	6.94	

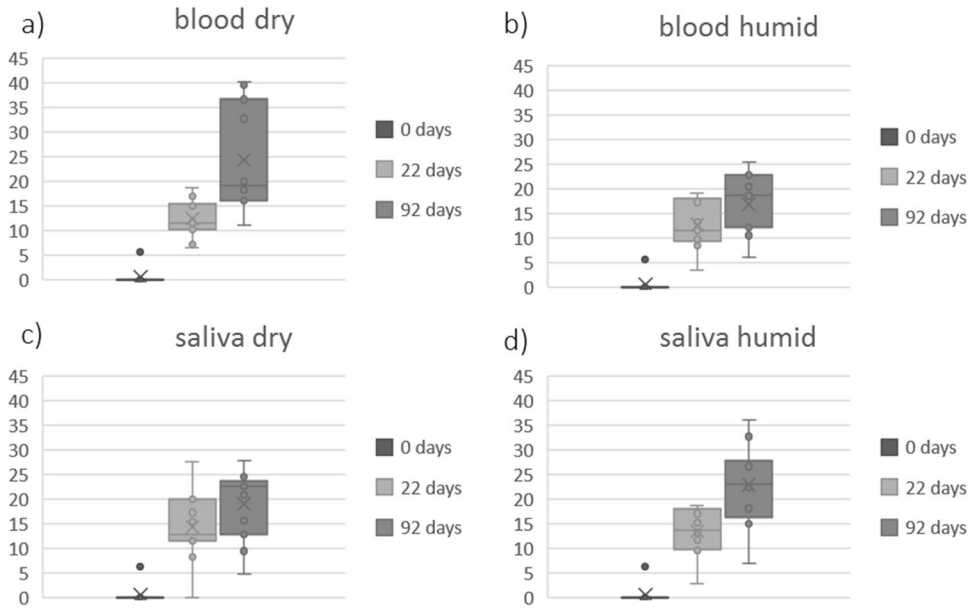


Fig. 5 Boxplots of PRV changes of all positions displayed in Table 7

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

that samples stored for longer durations seem to be more sensitive for mechanical shearing because of the formation of abasic sites caused by hydrolytic attack of DNA. Hianik et al. [30] showed that abasic sites lead to a dramatic destabilization of DNA. Consequently, there are shorter library fragments produced by library preparation in samples that were stored for longer time periods.

Identification of artificial SNVs by WGS

Total number of artificial SNVs

Due to an increased coverage in the follow-up study, a higher number of artificial SNVs were identified compared to the preliminary study. Differences in the total number of SNVs detected in the day 0 blood samples of the preliminary study and the day 0 blood sample of the follow-up study were observed, even though the samples originate from the same donor and the day 0 blood sample was considered to reflect the true genotype of the donor. The data analysis pipeline leads to such differences between the two studies: only positions that show a difference between the three time points analyzed were called. Consequently, positions listed after filtering of all sequencing data for the day 0 blood sample do not reflect all positions in which the donor carries a different allele than the GRCh38, but all positions in which the day 0 sample differs from either or both stored samples. Thus, the differences observed between the two studies were expected.

In general, it is not possible to determine the amount of "artificial SNVs" that actually originate from sequencing errors rather than from real sequence changes as a result of DNA damage. Stoler et al. recently discussed the challenges of determining an exact error rate for sequencing runs but found that the NovaSeq6000 sequencer used for our follow-up study showed a fourfold lower median error rate compared to the NextSeq500 used in our preliminary study [31]. Even though we applied a threshold of ten reads [32] to eliminate some stochastic effects, we expect a slightly higher number of falsely called artificial SNVs in our preliminary study compared to our follow-up study due to the different sequencers. All sequencing in the preliminary as well as the follow-up study were conducted in single sequencing runs. Consequently, we expect comparable error rates for all samples within each study. The analysis pipeline focused on sequence differences between the time points and differences found between these time points cannot be explained by sequencing error rates but were considered to be time-dependent.

In both the preliminary and follow-up studies, the majority of genotype changes over time happened between day 0 and day 21. A surprising difference was observed between the day 0 samples of blood and saliva, with fewer 1/1 genotypes in blood compared to saliva (Table 5). After a storage period of 22 days, both blood samples (humid and dry) showed an increase of 1/1 genotypes equal to the number of 1/1 genotypes in all three saliva samples. Interestingly, saliva samples did not show any further genotype changes over time. While it is well known that the majority of differences between samples from the same donor can be explained by differences in filtering data in the initial data analysis pipeline after WGS, this cannot explain the differences observed between over time in this study: our follow-up study used an identical data analysis pipeline for blood and saliva samples, which were analyzed in the same sequencing run. The day 0 sample was expected to show no signs of DNA degradation, particularly not though hydrolysis. Nevertheless, a saliva sample, or more precisely in this case a mouth mucosa sample collected by rubbing the inside of the donor's cheek, might already have been altered by hydrolysis. Even though scraping the inside of the inner cheek reaches mainly the non-keratinized squamous epithelium with intact cells, there will most certainly always be a proportion of liquid saliva present, carrying cell-free DNA from keratinized cells from other areas of the oral cavity. We hypothesize that DNA might already have suffered from hydrolytic attacks within the mouth and might already show base changes. Consequently, this means that while the day 0 sample of blood truly represents the donor's genotype and comprise mainly intact, living cells at the time point of collection, the "day 0" saliva sample is not really a time point 0 sample, but might contain extracellular DNA that is stored under humid conditions for at least several hours. Further studies on sequencing differences between saliva and blood samples are needed to prove this point. Samson et al. [33] demonstrated that short sequences of non-human origin can align to the human reference genome and therefore result in false-positive variant and genotype calling. They and other studies like Trost et al. [34] concluded that analyzing DNA from blood samples is the best option for variant analysis in WGS.

Increase of failed genotype calls over time

Both studies showed an increase of failed genotype calls (no sequencing coverage) over time in all biological matrices and storage conditions. Contrary to microdeletions, these positions show no sequencing coverage. One explanation might be that base changes increasingly affect positions within primer binding regions, thus inhibiting the amplification and sequencing reaction. Furthermore, depurination leads to DNA fragmentation and this obviously leads to decreased amplification efficiency of longer amplicons during library preparation.

In the follow-up study, a much higher number of failed genotype calls were observed in the day 0 saliva sample compared to the day 0 blood sample. Again, this might be due to beginning degradation in the saliva/mouth mucosa sample as discussed above.

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

Genotype changes during storage

In both studies, genotype changes over time were observed. The most extreme changes comprise gradual homozygote switches, i.e., from a homozygote 0/0 or 1/1 genotype into a 0/1 genotype and further on into the opposite homozygote genotype after the full length of storage. These positions show a very clear storage effect and might be considered the most suitable candidate markers for future TsD estimation. Furthermore, the majority of genotype changes in both studies was observed between the day 0 samples and the day 21 or day 22 samples, respectively. Changes observed here, however, are fast and a complete change was reached during the storage time analyzed here. Thus, from data obtained here it remains unclear how fast exactly this change occurs. Consequently, such positions might be useful candidate markers in the estimation of very short TsD periods and further analyses of such positions with more time points, particularly within the first 3 weeks of storage, will shed light on the suitability of these positions as TsD markers.

For longer storage periods, however, the ideal candidate markers for TsD do not necessarily show a complete genotype change, but a slow and gradual change of PRV over time (see below).

Analysis of base changes over time

The majority of artificial SNVs comprised G to A and C to T changes, respectively, and vice versa. This is in line with the well-accepted concept that G-A and C-T transition mutations are generated at higher frequency transversion mutations, due to their specific molecular mechanisms. Earlier studies provided by, e.g., Rathburn et al., Binladen et al., and Brotherton et al. [32, 35, 36], also pointed out that depurination by hydrolytic attacks more likely deplete guanine and deamination leads to cytosine to thymine variants.

Our results obtained from both blood and saliva samples sequenced with a higher coverage and a more sensitive instrument as part of the follow-up study confirmed the assumption that C and G are the bases effected with the highest frequency. Consequently, such storage-induced artificial SNVs might be the most promising candidate markers for TsD estimation. Further analysis of our dataset focused mainly on positions showing such transitions. Rathburn et al. [32] observed a higher number of type 1 transitions (A > G and T > C) during storage compared to type 2 transition (G > A and C > T). Our data, however, confirm data presented by Hofreiter et al. [37] with observation of a higher number of type 2 transitions. Rathburn et al. [32] explain such differences by different sequencing technologies and platforms.

Potential candidate markers for TsD estimation

In the preliminary study, nine positions were identified that showed gradual changes of PRV over time making them potential candidates for TsD estimation in blood samples. The sequencing coverage and sensitivity was slightly lower in the preliminary study and further analyses in a larger sample set and with increased sequencing coverage are needed to confirm their potential use as TsD markers (see below). The follow-up study identified markers that might enable estimation of TsD in two different body fluids (blood and saliva) and two different storage conditions (humid and dry).

As mentioned above, there might be a difference between positions which are suitable for estimating short-term TsD and the ones more suitable for longer term TsD periods. While fast and complete genotype changes as described above might be more suitable for estimating short-term TsD, the aim of the follow-up study was to identify candidate markers for medium- to long-term TsD which are suitable for both saliva and blood samples. The introduction of a threshold of 10 read counts eliminated artificial SNVs that cannot be distinguished from mere sequencing errors, as described by Rathburn et al. [32].

We identified 11 positions which fulfill such criteria and show an ideal distribution of PRV changes over time. In this case, ideal means that in positions with a 0/0 genotype in the day 0 sample, the PRV of the alternative allele (1) increases relative to the storage time, e.g., to up to 20% in the day 22 sample to close to 100% in the day 92 sample. These 11 positions showed such gradually decreasing or increasing PRV over time irrespective of the biological matrix and the storage conditions. The positions describe the evolution of homozygous-heterozygous only. These positions can be informative for TsD estimation even if the respective position in an original trace DNA profile is heterozygote because gradual changes in PRV can still be observed and are more informative than genotype changes, as mentioned above. We are aware that focusing on homozygote positions introduces an amount of bias into the analyses and further positions with gradual PRV changes over time might be found in future analyses of the same data set.

Future analysis of these 11 markers in a large sample set comprising saliva and blood samples from numerous donors is necessary to assess their true potential as candidate markers for an assay to estimate TsD in biological traces.

Conclusion

The aim of this study was to identify artificial single-nucleotide variants (SNVs) that are products of DNA damage over time. Future analyses of the same data set can focus on the analysis of indels and strand breaks, for example.

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

In this study, artificial SNVs were observed in high numbers, mainly affecting guanine and cytosine, as expected. A stepwise search revealed potential candidate markers for estimating short-term TsD and medium- to long-term TsD. Further investigation of these candidate markers in targeted sequencing approaches including multiple donors will reveal their suitability for TsD estimation. After confirmation of the candidate markers and development of a prediction algorithm, full forensic validation is needed to understand the influence of parameters such as various storage conditions, individual characteristics of the donor (e.g., sex and age), and different biological matrices.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00414-022-02911-0.

Acknowledgements We thank Marianne Schürenkamp, Sabrina Banken, and Ursula Sibbing for the excellent technical support. We thank our colleagues from the Institute of Legal Medicine in Zurich for the helpful discussions.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This project was funded by the German Research Foundation (DFG; VE822/4).

Data availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and informed consent. Blood samples were collected with informed consent using procedures approved by the local ethical committee (Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster).

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Díez López C, Kayser M, Vidaki A (2021) Estimating the time since deposition of saliva stains with a targeted bacterial DNA approach: a proof-of-principle study. Front Microbiol 12:647933.
2. Bremmer RH, de Bruin KG, van Gemert MJC, van Leeuwen TG, Aalders MCG (2012) Forensic quest for age determination of bloodstains. Forensic Sci Int 216:1–11
3. Patterson D (1960) Use of reflectance measurements in assessing the colour changes of ageing bloodstains. Nature 187:688–689
4. Kind SS, Patterson D, Owen GW (1972) Estimation of the age of dried blood stains by a spectrophotometric method. Forensic Sci 1:27–54
5. Blazek V, Lins G (1982) Spektroskopische Alterbestimmung von Blutspuren: neue technische Aspekte. Acta Med Leg Soc 32:613–616
6. Zadora G, Menżyk A (2018) In the pursuit of the holy grail of forensic science — spectroscopic studies on the estimation of time since deposition of bloodstains. TrAC, Trends Anal Chem 105:137–165
7. Stotesbury T, Cossette M-L, Newell-Bell T, Shafer ABA (2021) An exploratory time since deposition analysis of whole blood using metrics of DNA degradation and visible absorbance spectroscopy. Pure Appl Geophys 178:735–743
8. Inoue H, Takabe F, Iwasa M, Maeno Y (1991) Identification of fetal hemoglobin and simultaneous estimation of bloodstain age by high-performance liquid chromatography. Int J Legal Med 104:127–131
9. Inoue H, Takabe F, Iwasa M, Maeno Y, Seko Y (1992) A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography. Forensic Sci Int 57:17–27
10. Andrasko J (1997) The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis. J Forensic Sci 42:601–607
11. R. Kumagai, Analysis of hemoglobin in bloodstains using high-performance liquid chromatography, Nihon hoigaku zasshi = The Japanese journal of legal medicine 47 (1993) 213–219.
12. Salzmann AP, 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
13. Alshehhi S, Haddrill PR (2019) Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. Forensic Sci Int 298:58–63
14. Alshehhi S, Haddrill PR (2020) Evaluating the effect of body fluid mixture on the relative expression ratio of blood-specific RNA markers. Forensic Sci Int 307:110116
15. Schneider TD, Roschitzki B, Grossmann J, Kraemer T, Steuer AE (2022) Determination of the time since deposition of blood traces utilizing a liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics approach. Anal Chem 94:10695–10704
16. Heneghan N, Fu J, Pritchard J, Payton M, Allen RW (2021) The effect of environmental conditions on the rate of RNA degradation in dried blood stains. Forensic Sci Int Genet 51:102456
17. Weinbrecht KD, Fu J, Payton M, Allen R (2017) Time-dependent loss of mRNA transcripts from forensic stains. RRFMS 7:1–12
18. Overballe-Petersen S, Orlando L, Willerslev E (2012) Next-generation sequencing offers new insights into DNA degradation. Trends Biotechnol 30:364–368
19. Marrone A, Ballantyne J (2010) Hydrolysis of DNA and its molecular components in the dry state. Forensic Sci Int Genet 4:168–177
20. Gates KS (2009) An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. Chem Res Toxicol 22:1747–1760
21. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden Dm (2017) Environmental organic chemistry, 3 edn ed., Wiley, Hoboken
22. Speight JG (2018) Hydrolysis, in: Reaction Mechanisms in Environmental Engineering. Elsevier 203–229
23. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362:709–715
24. Jung H, Hawkins M, Lee S (2020) Structural insights into the bypass of the major deaminated purines by translesion synthesis DNA polymerase. Biochem J 477:4797–4810

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

25. Hanssen EN, Lyle R, Egeland T, Gill P (2017) Degradation in forensic trace DNA samples explored by massively parallel sequencing. Forensic Sci Int Genet 27:160–166
26. Li H, Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics (Oxford, England) 26:589–595
27. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernytsky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nat Genet 43:491–498
28. Johannes Köster, micwessolly, Elias Kuthe (2021) Wouter De Coster, snakemake-workflows/dna-seq-gatk-variant-calling: Version 2.1.1, Zenodo
29. Mölder F, Jablonski KP, Letcher B, Hall MB, Tomkins-Tinch CH, Sochat V, Forster J, Lee S, Twardziok SO, Kanitz A, Wilm A, Holtgrewe M, Rahmann S, Nahnsen S, Köster J (2021) Sustainable data analysis with Snakemake. F1000Res 10:33.
30. Hianik T, Wang X, Andreev S, Dolinnaya N, Oretskaya T, Thompson M (2006) DNA-duplexes containing abasic sites: correlation between thermostability and acoustic wave properties. Analyst 131:1161–1166
31. Stoler N, Nekrutenko A (2021) Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments, NAR genomics and bioinformatics 3 lqab019
32. Rathbun MM, McElhoe JA, Parson W, Holland MM (2017) Considering DNA damage when interpreting mtDNA heteroplasmy in deep sequencing data. Forensic Sci Int Genet 26:1–11
33. Samson CA, Whitford W, Snell RG, Jacobsen JC, Lehnert K (2020) Contaminating DNA in human saliva alters the detection of variants from whole genome sequencing. Sci Rep 10:19255
34. Trost B, Walker S, Haider SA, Sung WWL, Pereira S, Phillips CL, Higginbotham EJ, Strug LJ, Nguyen C, Raajkumar A, Szego MJ, Marshall CR, Scherer SW (2019) Impact of DNA source on genetic variant detection from human whole-genome sequencing data. J Med Genet 56:809–817
35. Binladen J, Wiuf C, Gilbert MTP, Bunce M, Barnett R, Larson G, Greenwood AD, Haile J, Ho SYW, Hansen AJ, Willerslev E (2006) Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. Genetics 172:733–741
36. Brotherton P, Endicott P, Sanchez JJ, Beaumont M, Barnett R, Austin J, Cooper A (2007) Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. Nucleic Acids Res 35:5717–5728
37. Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, von Haeseler A, Pääbo S (2001) DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. Nucleic Acids Res 29:4793–4799

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

Terms and Conditions

Springer Nature journal content, brought to you courtesy of Springer Nature Customer Service Center GmbH (“Springer Nature”).
Springer Nature supports a reasonable amount of sharing of research papers by authors, subscribers and authorised users (“Users”), for small-scale personal, non-commercial use provided that all copyright, trade and service marks and other proprietary notices are maintained. By accessing, sharing, receiving or otherwise using the Springer Nature journal content you agree to these terms of use (“Terms”). For these purposes, Springer Nature considers academic use (by researchers and students) to be non-commercial.
These Terms are supplementary and will apply in addition to any applicable website terms and conditions, a relevant site licence or a personal subscription. These Terms will prevail over any conflict or ambiguity with regards to the relevant terms, a site licence or a personal subscription (to the extent of the conflict or ambiguity only). For Creative Commons-licensed articles, the terms of the Creative Commons license used will apply.
We collect and use personal data to provide access to the Springer Nature journal content. We may also use these personal data internally within ResearchGate and Springer Nature and as agreed share it, in an anonymised way, for purposes of tracking, analysis and reporting. We will not otherwise disclose your personal data outside the ResearchGate or the Springer Nature group of companies unless we have your permission as detailed in the Privacy Policy.
While Users may use the Springer Nature journal content for small scale, personal non-commercial use, it is important to note that Users may not:

1. use such content for the purpose of providing other users with access on a regular or large scale basis or as a means to circumvent access control;
2. use such content where to do so would be considered a criminal or statutory offence in any jurisdiction, or gives rise to civil liability, or is otherwise unlawful;
3. falsely or misleadingly imply or suggest endorsement, approval , sponsorship, or association unless explicitly agreed to by Springer Nature in writing;
4. use bots or other automated methods to access the content or redirect messages
5. override any security feature or exclusionary protocol; or
6. share the content in order to create substitute for Springer Nature products or services or a systematic database of Springer Nature journal content.

In line with the restriction against commercial use, Springer Nature does not permit the creation of a product or service that creates revenue, royalties, rent or income from our content or its inclusion as part of a paid for service or for other commercial gain. Springer Nature journal content cannot be used for inter-library loans and librarians may not upload Springer Nature journal content on a large scale into their, or any other, institutional repository.
These terms of use are reviewed regularly and may be amended at any time. Springer Nature is not obligated to publish any information or content on this website and may remove it or features or functionality at our sole discretion, at any time with or without notice. Springer Nature may revoke this licence to you at any time and remove access to any copies of the Springer Nature journal content which have been saved.
To the fullest extent permitted by law, Springer Nature makes no warranties, representations or guarantees to Users, either express or implied with respect to the Springer nature journal content and all parties disclaim and waive any implied warranties or warranties imposed by law, including merchantability or fitness for any particular purpose.
Please note that these rights do not automatically extend to content, data or other material published by Springer Nature that may be licensed from third parties.
If you would like to use or distribute our Springer Nature journal content to a wider audience or on a regular basis or in any other manner not expressly permitted by these Terms, please contact Springer Nature at

onlineservice@springernature.com

Danksagung

Die Danksagung wurden zum Zweck des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

*Die persönlichen Angaben wurden zum Zweck des Datenschutzes entfernt***.**

Promotion	
Seit 05.2015	wissenschaftl. Mitarbeiterin, Institut für Rechtsmedizin Münster, Forensische Molekulargenetik
Berufserfahrung	
11.2013- 05.2015	Institut für Forensische Genetik GmbH, Münster
Masterstudium	
10.2011- 11.2013	**Abschluss: Master of Science (FH)** **Zusatz: Ingenieur-/in** *Fachhochschule Münster:* Studiengang Biomedizinische Technik
04.2013-10.2013	**Masterthesis** *Institut für Rechtsmedizin Münster, Forensische Molekulargenetik*
10.2012-03.2013	**Forschungsprojekt (Studieninhalt)** *Institut für Rechtsmedizin Münster, Forensische Molekulargenetik*
Bachelorstudium	
10.2008- 09.2011	**Abschluss: Bachelor of Science (FH)** *Fachhochschule Münster:* Studiengang Physikalische Technik
06.2010-08.2010	**Bachelorthesis** *Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH, Bochum*
Schulabschluss	
06.2008	**Allgemeine Hochschulreife** *Städtisches Gymnasium Borghorst*

Publikationsliste

Schulze Johann, K, Schürenkamp M, Sibbing U, Lischka C, Pfeiffer H, Vennemann M Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: improved asymmetric PCR for quantitative DNA-analysis. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 5: e659-e661.

Schwender, K., Holtkötter, H., Johann, K.S. et al. Sudden infant death syndrome: exposure to cigarette smoke leads to hypomethylation upstream of the growth factor independent 1 (GFI1) gene promoter. Forensic Sci Med Pathol 12, 399–406 (2016).

Tobe, S.S., Swaran, Y.C., Dennany, L. et al. A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault. Int J Legal Med 131, 87–94 (2017).

H. Holtkötter, V. Beyer, K. Schwender, A. Glaub, K.S. Johann, M. Schürenkamp, U. Sibbing, S. Banken, P. Wiegand, H. Pfeiffer, L. Dennany, M. Vennemann, EUROFORGEN-NoE Consortium, Independent validation of body fluid-specific CpG markers and construction of a robust multiplex assay, Forensic Sci. Int. Genet. (2017).

S. Ingold et al. Body fluid identification and assignment to donors using a targeted mRNA massively parallel sequencing approach – results of a second EUROFORGEN / EDNAP collaborative exercise, Forensic Sci. Int. Genet. (2020)

Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Whole-genome sequencing of artificial single-nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces. Int J Legal Med 137, 33–45 (2023).

Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Detecting DNA damage in stored blood samples. Forensic Sci Med Pathol (2022).

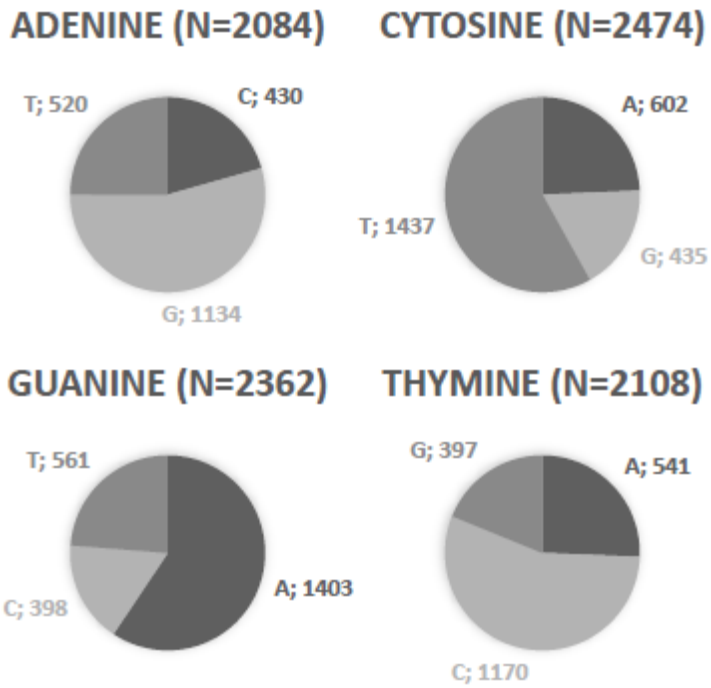
Anhang

Im Anhang wird das *Supplementary Material* der Veröffentlichung

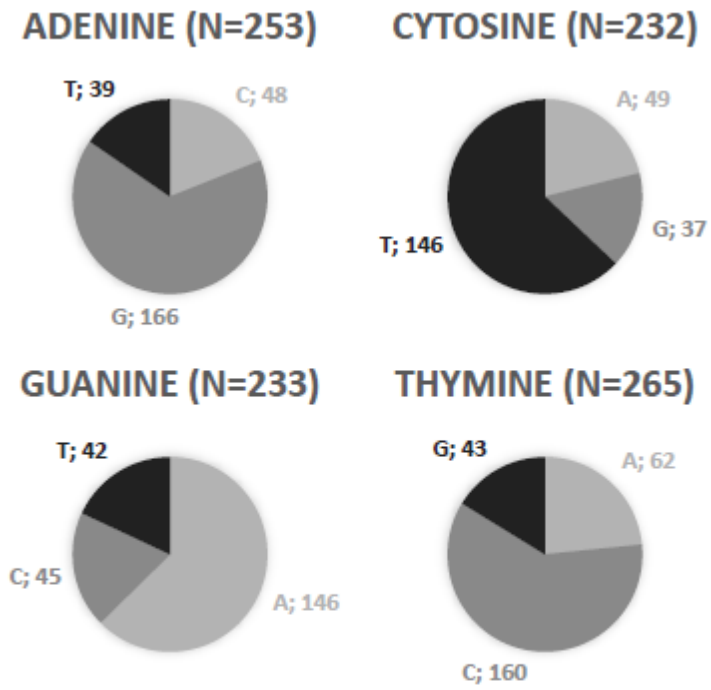
Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P. et al. Whole-genome sequencing of artificial single-nucleotide variants induced by DNA degradation in biological crime scene traces. Int J Legal Med 137, 33–45 (2023). https://doi.org/10.1007/s00414-022-02911-0, used under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

so wie es im Journal veröffentlicht wurde zur Verfügung gestellt.

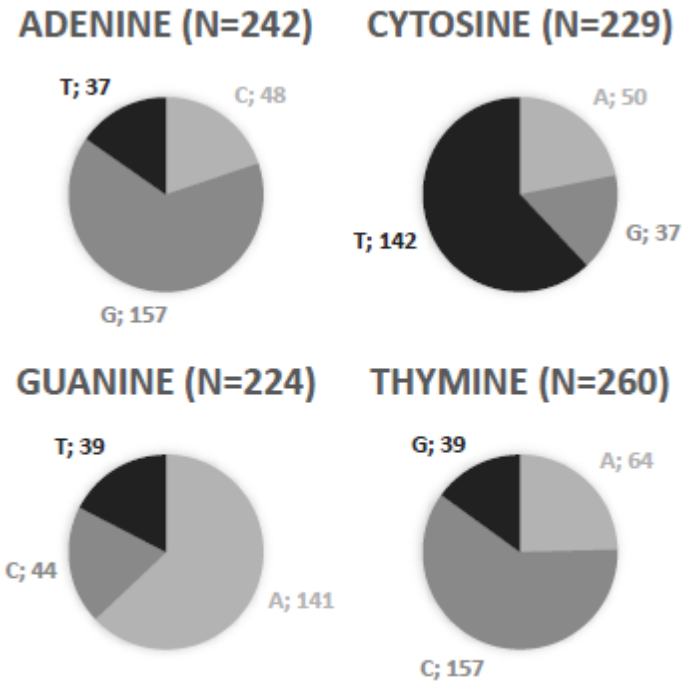
Online Resource 1



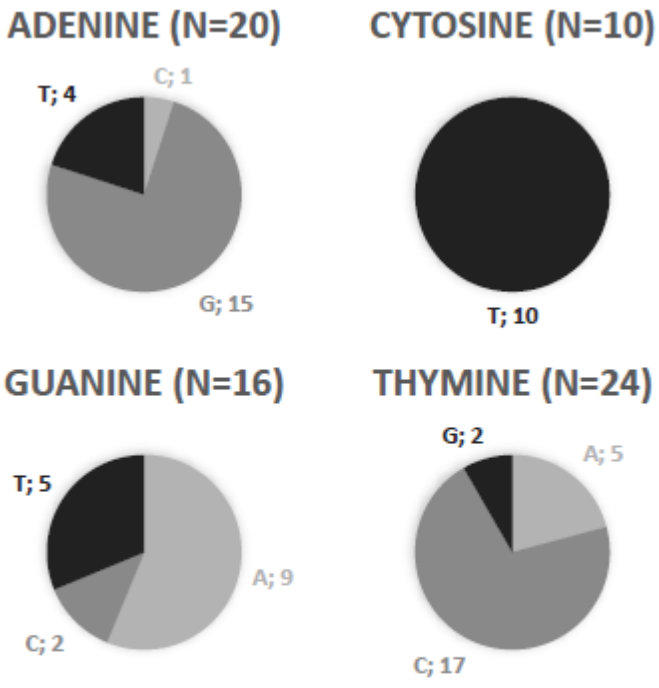
day0=0/0; day120=0/1



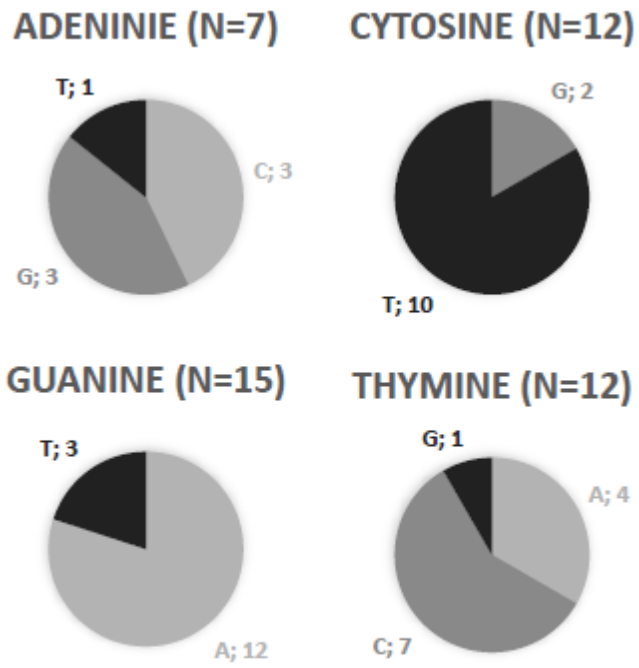
day0=1/1; day21=0/1



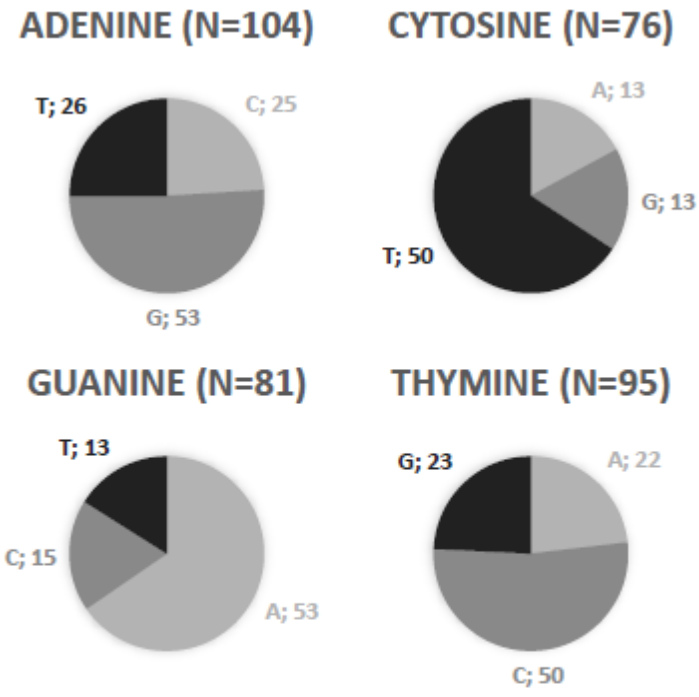
day0=1/1; day120=0/1



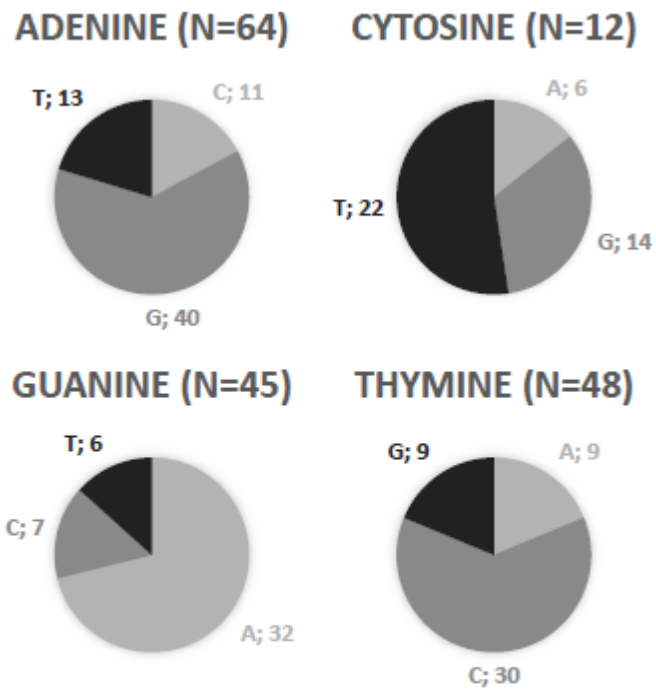
day0=0/1; day21=1/1



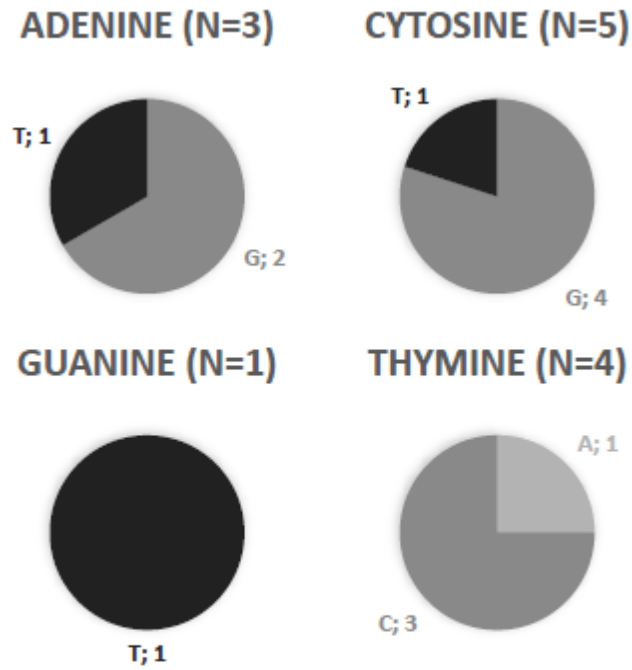
day0=0/1; day120=1/1



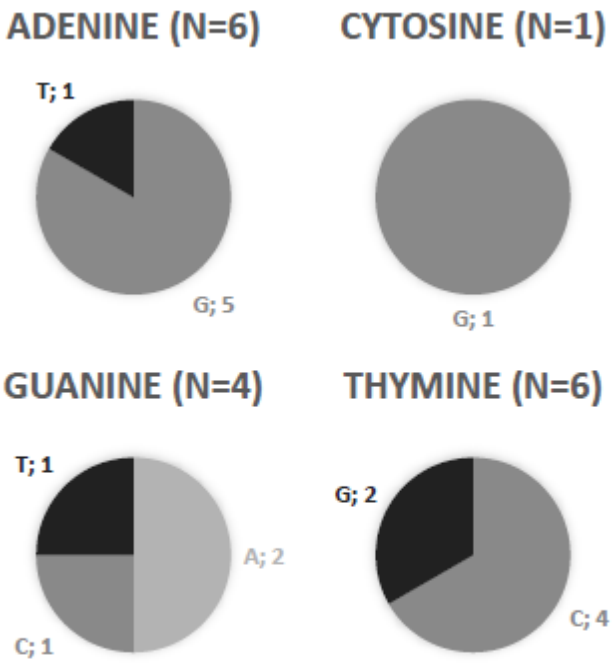
day0=0/1; day21=0/0



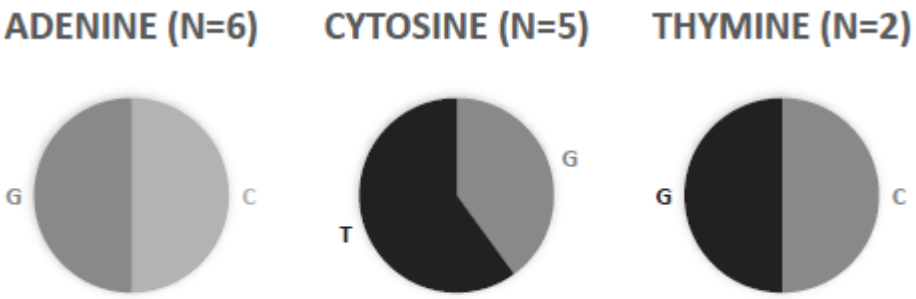
day0=0/1; day120=0/0



day0=1/1; day21=0/0



day0=1/1; day120=0/0



day0=0/0; day21=1/1 (no variants in guanine)

A>G	2
C>T	2
G>C	1
T>C	1

day0=0/0; day120=1/1

Online Resource 2

blood humid										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT.156	PRV 0 days	GT.152	PRV 22 days	GT.148	PRV 92 days
1	39914524	T	G	2119.84	0/0	0,00	0/1	81,25	1/1	81,25
10	71759852	C	T	3353.87	0/0	0,00	0/1	78,57	1/1	78,57
11	1095960	T	C	1783.74	0/0	0,00	0/1	47,62	1/1	47,62
12	61526033	G	A	972.78	0/0	0,00	0/1	38,10	1/1	38,10
13	49805119	G	A	2399.87	0/0	0,00	0/1	47,83	1/1	47,83
15	91048340	T	C	1924.16	0/0	0,00	0/1	28,57	1/1	28,57
16	27146900	T	C	1257.78	0/0	13,64	0/1	30,77	1/1	30,77
17	82151215	A	G	5680.17	0/0	0,00	0/1	66,67	1/1	66,67
17	82151217	C	A	6056.82	0/0	0,00	0/1	75,00	1/1	75,00
2	227497739	T	G	3622.97	0/0	0,00	0/1	73,33	1/1	73,33
2	230466204	C	A	1041.28	0/0	0,00	0/1	24,14	1/1	24,14
21	30816284	A	T	3050.98	0/0	0,00	0/1	50,00	1/1	50,00
4	49121061	T	A	131241.0	0/0	7,95	0/1	29,63	1/1	29,63
4	83299368	A	G	4348.23	0/0	0,00	0/1	84,62	1/1	84,62
4	187828524	A	G	3564.37	0/0	0,00	0/1	84,62	1/1	84,62
4	190065458	C	T	2239.15	0/0	0,00	0/1	84,21	1/1	84,21
4	190065475	G	A	3027.14	0/0	0,00	0/1	83,33	1/1	83,33
4	190065481	C	T	2980.69	0/0	0,00	0/1	83,33	1/1	83,33
4	190065492	C	G	2983.69	0/0	0,00	0/1	83,33	1/1	83,33
4	190065502	G	A	2847.86	0/0	0,00	0/1	77,78	1/1	77,78
4	190065503	C	A	2847.86	0/0	0,00	0/1	77,78	1/1	77,78
5	22698743	T	A	1672.68	0/0	0,00	0/1	83,33	1/1	83,33
6	115299630	G	A	3241.34	0/0	0,00	0/1	69,23	1/1	69,23
6	148324137	C	A	1920.05	0/0	0,00	0/1	54,55	1/1	54,55
7	158407676	G	C	2186.39	0/0	0,00	0/1	47,37	1/1	47,37
11	22986487	T	C	3282.34	1/1	100,00	0/1	55,56	0/0	0,00
11	42580062	A	C	1564.19	1/1	88,89	0/1	50,00	0/0	0,00

15	54172705	T	C	5671.2	1/1	100,00	0/1	75,00	0/0	0,00
15	54172707	T	G	5671.2	1/1	100,00	0/1	75,00	0/0	0,00
20	63445759	G	A	6507.09	1/1	94,12	0/1	86,36	0/0	0,00
20	63445764	A	G	6231.61	1/1	93,75	0/1	84,09	0/0	0,00
20	63445765	C	T	6273.05	1/1	93,55	0/1	84,09	0/0	0,00
20	63445766	C	T	6153.64	1/1	93,33	0/1	84,09	0/0	0,00
20	63445769	G	A	6186.73	1/1	93,55	0/1	84,09	0/0	0,00
5	49666291	C	A	18314.8	1/1	95,24	0/1	52,88	0/0	0,00
7	152796876	T	G	2186.95	1/1	91,67	0/1	30,77	0/0	0,00
8	34102150	T	G	2655.25	1/1	90,48	0/1	72,00	0/0	0,00
8	88639146	T	A	280.26	1/1	57,14	0/1	54,55	0/0	16,00
X	29803366	T	C	4797.66	1/1	100,00	0/1	64,71	0/0	0,00
X	66337760	G	A	2590.18	1/1	100,00	0/1	54,55	0/0	0,00
KI270438.1	106965	G	C	631479.0	1/1	94,45	0/1	85,93	0/0	0,00
blood dry										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT.156	PRV 0 days	GT.154	PRV 22 days	GT.150	PRV 92 days
X	103483997	A	T	859.41	0/0	15,38	0/1	26,67	1/1	100,00
13	22762661	T	G	4768.07	0/0	0,00	0/1	42,86	1/1	100,00
22	43165913	A	G	4401.57	0/0	0,00	0/1	43,75	1/1	58,54
4	83299368	A	G	4348.23	0/0	0,00	0/1	38,46	1/1	95,24
6	6603611	A	C	3882.07	0/0	0,00	0/1	42,86	1/1	100,00
19	410809	A	G	3755.02	0/0	0,00	0/1	88,89	1/1	100,00
2	227497739	T	G	3622.97	0/0	0,00	0/1	80,00	1/1	100,00
6	6603606	A	C	3485.07	0/0	0,00	0/1	35,71	1/1	100,00
8	142975055	G	A	3252.93	0/0	0,00	0/1	61,29	1/1	96,15
8	142975048	G	A	3118.37	0/0	0,00	0/1	69,70	1/1	92,86
4	183350055	T	C	2800.05	0/0	0,00	0/1	64,71	1/1	100,00
6	23125380	A	C	2577.55	0/0	0,00	0/1	62,50	1/1	86,96
6	120912516	G	A	2571.35	0/0	0,00	0/1	38,10	1/1	88,24

11	21745052	T	G	2164.25	0/0	0,00	0/1	61,54	1/1	86,21
3	150493153	T	C	1915.99	0/0	0,00	0/1	27,78	1/1	92,86
19	3332267	C	T	1773.96	0/0	0,00	0/1	25,00	1/1	90,91
15	24835000	G	C	1483.96	0/0	0,00	0/1	53,85	1/1	100,00
21	45746193	C	T	1238.11	0/0	0,00	0/1	68,42	1/1	91,67
4	1531316	T	G	1176.68	0/0	0,00	0/1	11,54	1/1	100,00
1	42385827	C	T	5064.9	1/1	100,00	0/1	76,47	0/0	0,00
15	100001992	C	A	2163.77	1/1	100,00	0/1	72,73	0/0	21,05
2	89671813	G	A	7801.27	1/1	100,00	0/1	36,36	0/0	0,00
21	42994322	G	A	1906.61	1/1	100,00	0/1	61,54	0/0	0,00
21	42994323	T	G	1906.62	1/1	100,00	0/1	61,54	0/0	0,00
21	43336855	C	T	6368.4	1/1	100,00	0/1	81,82	0/0	0,00
4	115022374	T	C	3705.17	1/1	100,00	0/1	40,54	0/0	0,00
7	47389118	A	C	2961.92	1/1	100,00	0/1	66,67	0/0	0,00
7	47389119	A	G	2924.31	1/1	100,00	0/1	69,23	0/0	0,00
8	7381029	A	C	2464.01	1/1	88,89	0/1	61,54	0/0	0,00
X	103483994	C	T	3087.0	1/1	90,91	0/1	72,73	0/0	0,00
KI270442.1	16899	A	G	646.52	1/1	100,00	0/1	15,38	0/0	0,00
saliva humid										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT.157	PRV 0 days	GT.153	PRV 22 days	GT.149	PRV 92 Days
12	12801903	T	*	416.98	0/0	0,00	0/1	29,41	1/1	100,00
12	69362984	T	A	2695.63	0/0	0,00	0/1	30,00	1/1	100,00
14	103302533	T	C	1791.55	0/0	0,00	0/1	41,38	1/1	94,74
15	20342259	A	G	6850.85	0/0	0,00	0/1	79,12	1/1	95,16
16	88251556	T	G	2307.42	0/0	0,00	0/1	89,47	1/1	94,74
18	12211828	T	C	1151.29	0/0	0,00	0/1	21,05	1/1	100,00
19	15616116	C	T	1212.49	0/0	0,00	0/1	46,67	1/1	91,67
2	3199831	G	T	5030.67	0/0	0,00	0/1	83,33	1/1	94,74
2	43308758	C	A	2432.11	0/0	0,00	0/1	45,00	1/1	100,00

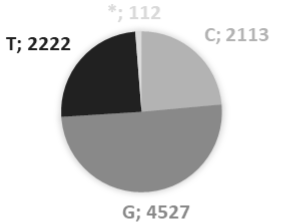
2	227497740	T	G	561.97	0/0	0,00	0/1	22,22	1/1	100,00
4	181605532	A	T	2747.23	0/0	0,00	0/1	62,50	1/1	100,00
5	100378909	A	C	1383.04	0/0	0,00	0/1	40,00	1/1	89,47
6	83027462	G	A	2638.96	0/0	0,00	0/1	83,33	1/1	100,00
6	106130787	T	C	1408.34	0/0	0,00	0/1	17,86	1/1	88,24
7	2491839	T	C	1135.87	0/0	0,00	0/1	41,67	1/1	100,00
8	7381029	A	C	2464.01	0/0	0,00	0/1	38,89	1/1	93,33
8	47956978	C	A	2536.44	0/0	0,00	0/1	29,41	1/1	100,00
Y	11292489	C	T	9894.13	0/0	0,00	0/1	6,50	1/1	100,00
Y	56829566	C	T	15393.5	0/0	0,00	0/1	12,63	1/1	100,00
1	1981466	C	A	4345.33	1/1	100,00	0/1	77,42	0/0	0,00
1	1981476	T	A	3764.87	1/1	100,00	0/1	77,27	0/0	0,00
1	1981479	C	G	3342.87	1/1	100,00	0/1	73,68	0/0	0,00
1	1981482	G	A	2907.87	1/1	100,00	0/1	70,59	0/0	0,00
1	112219219	A	C	438.37	1/1	88,89	0/1	16,67	0/0	0,00
11	17711478	C	T	819.64	1/1	90,91	0/1	44,44	0/0	0,00
12	130392780	A	G	2297.91	1/1	91,67	0/1	50,00	0/0	0,00
14	103302534	T	C	634.4	1/1	92,86	0/1	25,00	0/0	0,00
14	105703230	T	A	953.4	1/1	90,00	0/1	40,00	0/0	0,00
17	3375247	C	T	1033.53	1/1	80,00	0/1	41,18	0/0	0,00
17	47359518	T	G	2823.71	1/1	91,67	0/1	41,94	0/0	13,33
17	53981464	T	G	3053.71	1/1	91,30	0/1	75,00	0/0	0,00
2	43308757	C	A	1967.34	1/1	100,00	0/1	55,00	0/0	0,00
2	47085051	A	T	1714.22	1/1	100,00	0/1	54,84	0/0	0,00
20	37603410	T	C	3359.04	1/1	100,00	0/1	46,67	0/0	0,00
4	49645539	G	C	3311.73	1/1	46,15	0/1	80,95	0/0	0,00
4	131962788	A	G	2815.02	1/1	100,00	0/1	75,00	0/0	0,00
4	179037032	T	C	2901.75	1/1	96,88	0/1	85,71	0/0	0,00
4	181605536	A	T	3567.26	1/1	100,00	0/1	31,25	0/0	0,00

6	31338358	T	C	3320.13	1/1	100,00	0/1	12,90	0/0	0,00
7	91013658	T	G	4029.47	1/1	96,15	0/1	78,13	0/0	0,00
8	124865502	T	C	1718.07	1/1	92,31	0/1	66,67	0/0	0,00
saliva dry										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT.157	PRV 0 days	GT.155	PRV 22 days	GT.151	PRV 92 days
10	38528054	C	G	83473.5	0/0	0,00	0/1	82,46	1/1	90,00
10	38528169	A	T	111384.0	0/0	0,00	0/1	83,45	1/1	89,68
10	98852115	G	A	3311.02	0/0	0,00	0/1	37,50	1/1	100,00
11	120328869	A	T	3219.28	0/0	0,00	0/1	72,22	1/1	94,44
11	121765655	C	*	189.01	0/0	0,00	0/1	52,63	1/1	75,00
12	16215231	C	A	1003.51	0/0	0,00	0/1	82,35	1/1	100,00
14	89511276	T	C	3000.96	0/0	0,00	0/1	61,11	1/1	100,00
14	89511280	T	C	2843.4	0/0	0,00	0/1	55,56	1/1	100,00
14	89511284	T	C	2864.91	0/0	0,00	0/1	50,00	1/1	100,00
16	138607	G	T	5572.61	0/0	0,00	0/1	44,12	1/1	93,33
18	61538582	T	G	3093.88	0/0	0,00	0/1	61,90	1/1	100,00
18	63086836	C	T	3122.21	0/0	0,00	0/1	20,83	1/1	75,00
19	410759	G	A	6189.16	0/0	0,00	0/1	78,26	1/1	96,55
19	410796	C	A	4476.2	0/0	0,00	0/1	77,78	1/1	100,00
2	76366234	C	T	2149.09	0/0	0,00	0/1	88,24	1/1	100,00
20	3441132	G	A	3413.61	0/0	0,00	0/1	46,34	1/1	100,00
5	174743308	T	C	1955.7	0/0	0,00	0/1	84,21	1/1	92,31
6	114423468	T	G	1238.85	0/0	0,00	0/1	34,78	1/1	85,19
7	24239714	T	A	1900.1	0/0	0,00	0/1	88,24	1/1	96,88
7	24239716	T	C	1903.03	0/0	0,00	0/1	84,21	1/1	96,77
7	150660065	C	A	3351.54	0/0	0,00	0/1	43,48	1/1	100,00
8	588396	G	A	3446.1	0/0	0,00	0/1	65,22	1/1	86,96
Y	11329952	A	C	241783.0	0/0	0,00	0/1	93,48	1/1	95,64
10	124522	T	A	1997.9	1/1	100,00	0/1	30,00	0/0	0,00

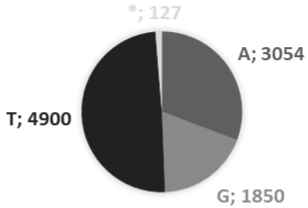
10	346611	G	A	6351.89	1/1	95,45	0/1	56,10	0/0	0,00
10	92730571	C	T	1066.18	1/1	100,00	0/1	86,67	0/0	0,00
10	92730574	C	T	1063.24	1/1	100,00	0/1	92,86	0/0	0,00
10	92730577	C	T	1192.59	1/1	100,00	0/1	88,24	0/0	0,00
10	92730580	C	T	1144.35	1/1	100,00	0/1	88,24	0/0	0,00
11	17711478	C	T	819.64	1/1	90,91	0/1	38,10	0/0	0,00
11	44523523	A	G	3045.36	1/1	92,86	0/1	57,89	0/0	0,00
11	44523545	G	A	3378.8	1/1	92,86	0/1	47,83	0/0	0,00
12	9953386	C	T	2765.37	1/1	100,00	0/1	92,86	0/0	0,00
13	102276380	T	C	2503.3	1/1	92,31	0/1	72,22	0/0	0,00
14	103302534	T	C	634.4	1/1	92,86	0/1	16,00	0/0	9,68
16	74854753	T	G	5410.26	1/1	100,00	0/1	57,14	0/0	0,00
17	76794698	T	G	4107.65	1/1	100,00	0/1	78,57	0/0	0,00
18	1540939	G	T	126.29	1/1	0,00	0/1	23,53	0/0	0,00
18	71247053	A	T	3225.85	1/1	97,14	0/1	55,00	0/0	0,00
2	47085051	A	T	1714.22	1/1	100,00	0/1	25,00	0/0	0,00
2	67792639	G	A	3657.94	1/1	85,71	0/1	31,58	0/0	0,00
20	3441131	C	T	4435.73	1/1	100,00	0/1	53,66	0/0	0,00
22	10722901	C	T	8764.77	1/1	94,12	0/1	91,43	0/0	0,00
22	10722902	A	G	8749.65	1/1	93,94	0/1	94,12	0/0	0,00
22	27001314	T	A	1155.25	1/1	92,31	0/1	56,25	0/0	0,00
3	75927982	T	C	2489.61	1/1	100,00	0/1	58,33	0/0	0,00
4	49646439	T	A	1871.32	1/1	50,00	0/1	55,56	0/0	0,00
4	57084787	G	A	2985.77	1/1	100,00	0/1	81,25	0/0	0,00
5	49602326	T	A	45483.0	1/1	98,13	0/1	80,26	0/0	0,00
7	156266503	C	A	5228.64	1/1	93,75	0/1	63,33	0/0	0,00
7	156266504	T	C	5228.64	1/1	93,75	0/1	64,52	0/0	0,00

Online Resource 3

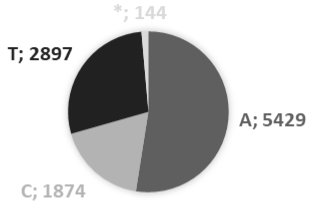
a) ADENINE (N=8974)



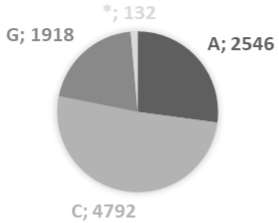
CYTOSINE (N=9931)



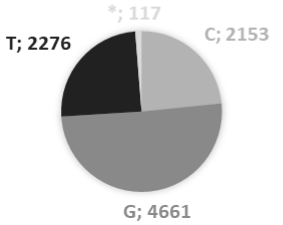
GUANINE (N=10344)



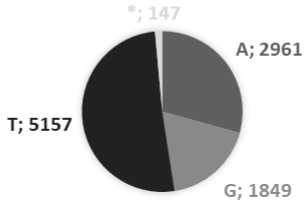
THYMINE (N=9388)



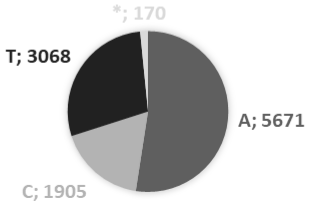
b) ADENINE (N=9207)



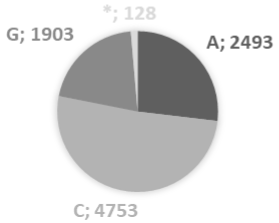
CYTOSINE (N=10144)



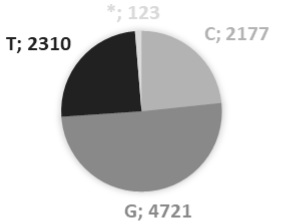
GUANINE (N=10814)



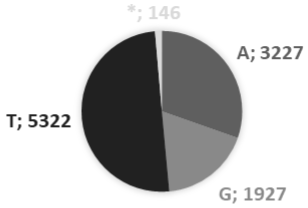
THYMINE (N=9277)



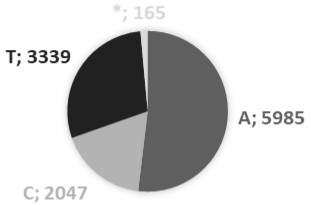
c) ADENINE (N=9331)



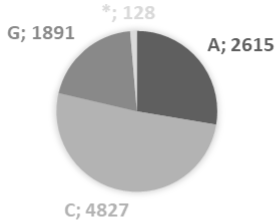
CYTOSINE (N=10622)



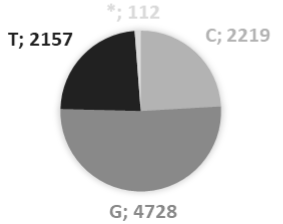
GUANINE (N=11536)



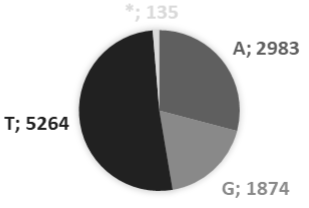
THYMINE (N=9461)



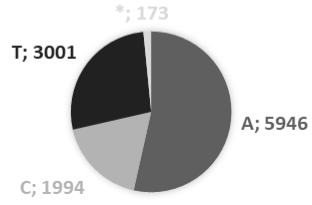
d) ADENINE (N=9216)



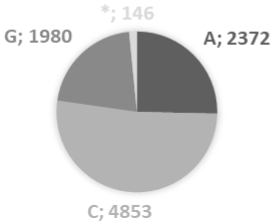
CYTOSINE (N=10256)



GUANINE (N=11114)



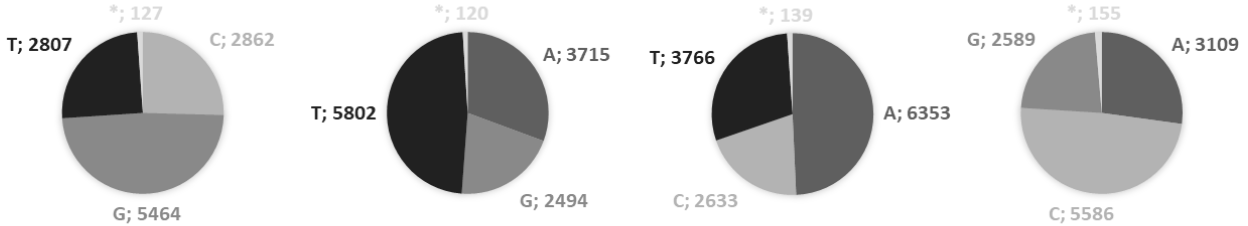
THYMINE (N=9351)



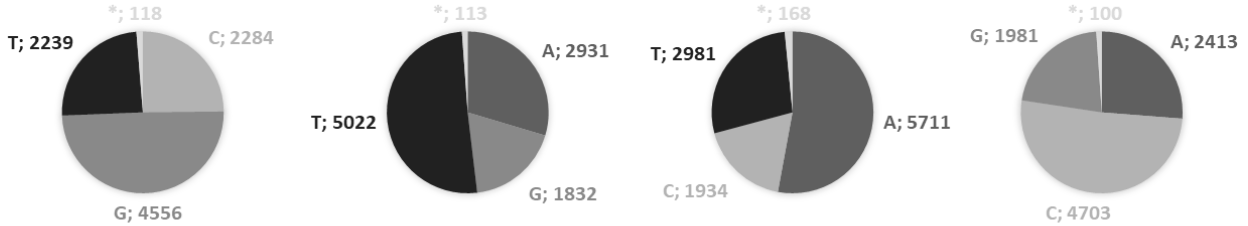
day0=0/0; day22=0/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry

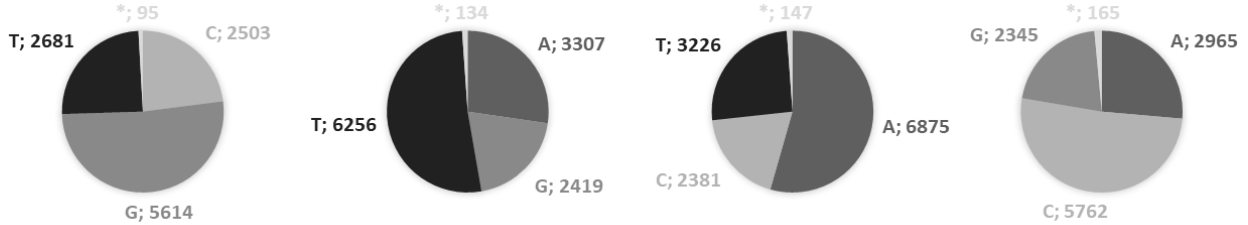
a) ADENINE (N=11260) CYTOSINE (N=12131) GUANINE (N=12891) THYMINE (N=11439)



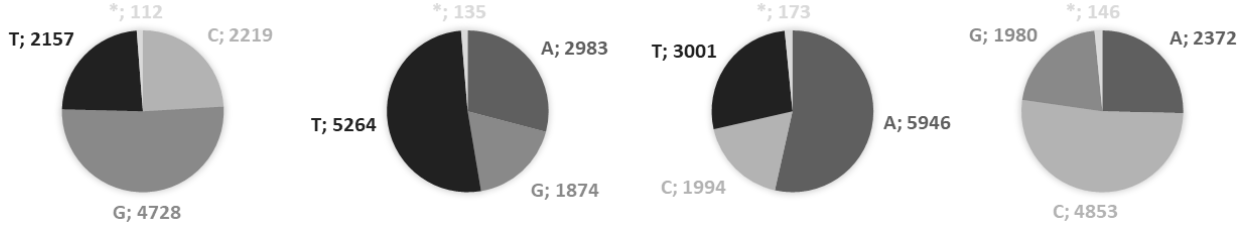
b) ADENINE (N=9197) CYTOSINE (N=9898) GUANINE (N=10794) THYMINE (N=9197)



c) ADENINE (N=10893) CYTOSINE (N=12116) GUANINE (N=12629) THYMINE (N=11237)



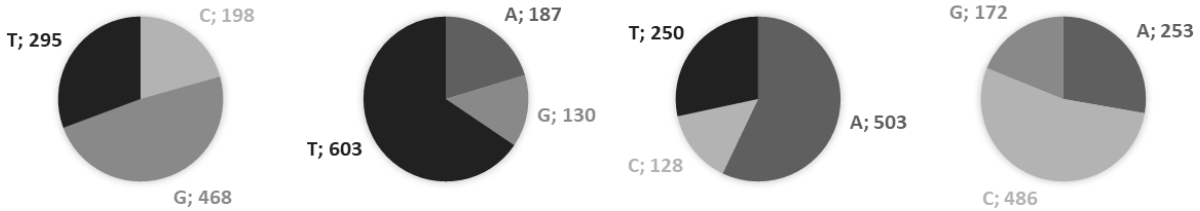
d) ADENINE (N=9216) CYTOSINE (N=10256) GUANINE (N=11114) THYMINE (N=9351)



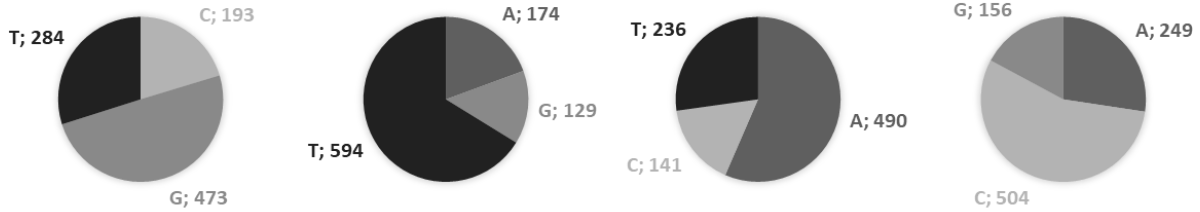
day0=0/0; day92=0/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry

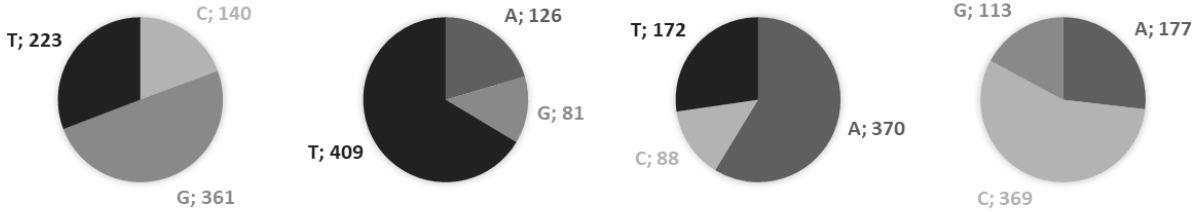
a) ADENINE (N=961) CYTOSINE (N=920) GUANINE (N=881) THYMINE (N=911)



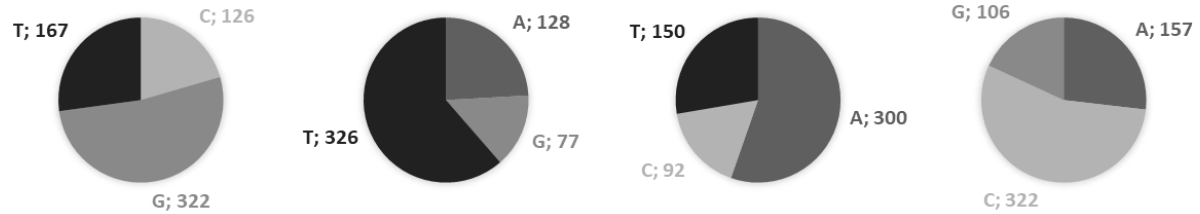
b) ADENINE (N=950) CYTOSINE (N=897) GUANINE (N=867) THYMINE (N=909)



c) ADENINE (N=724) CYTOSINE (N=616) GUANINE (N=630) THYMINE (N=659)



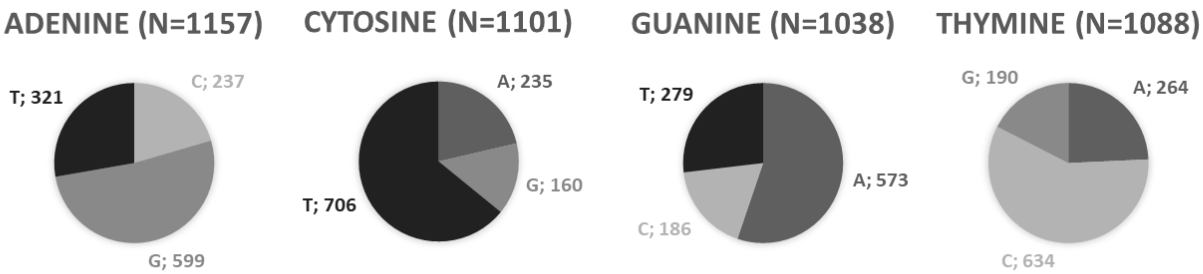
d) ADENINE (N=615) CYTOSINE (N=531) GUANINE (N=542) THYMINE (N=585)



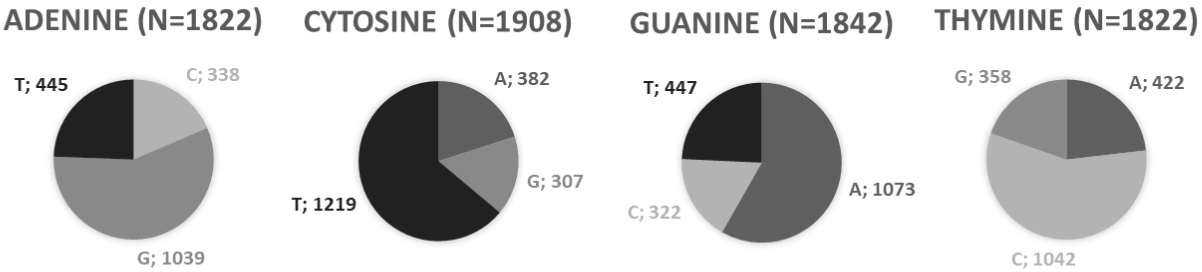
day0=1/1; day22=0/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry

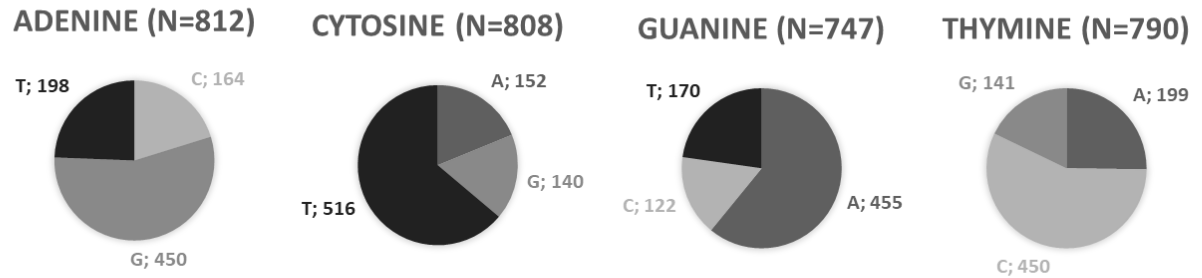
a)



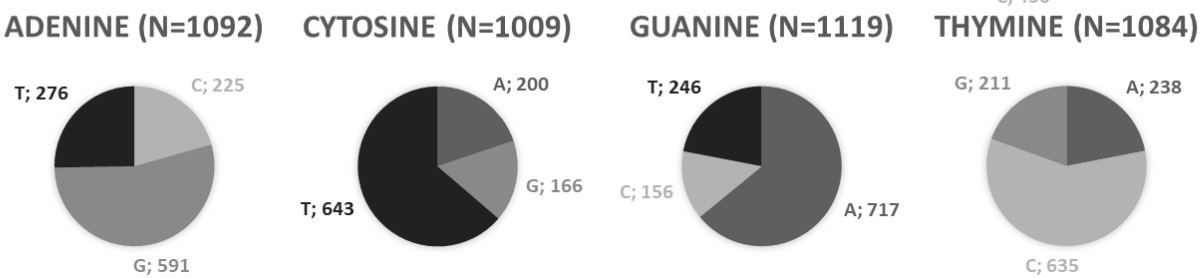
b)



c)



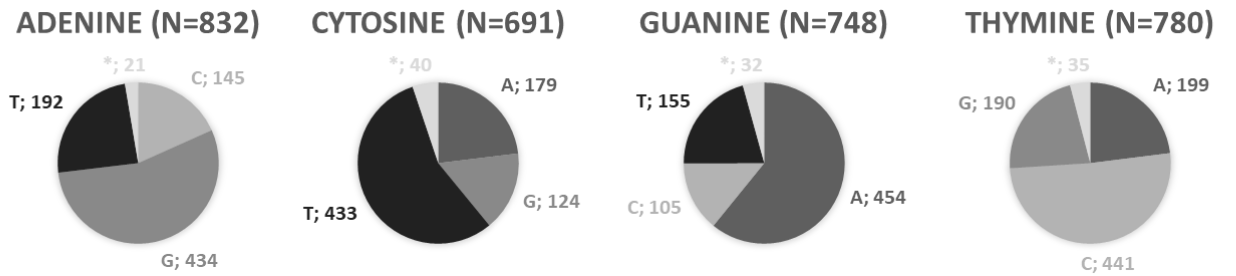
d)



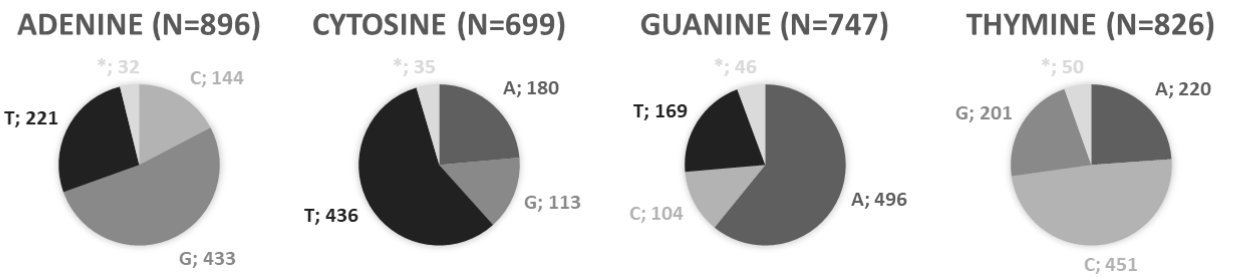
<u>day0=1/1; day92=0/1:</u>

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry

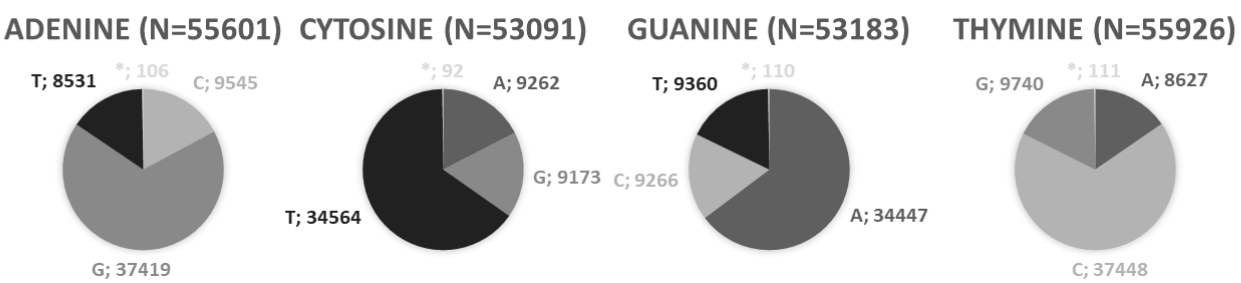
a)



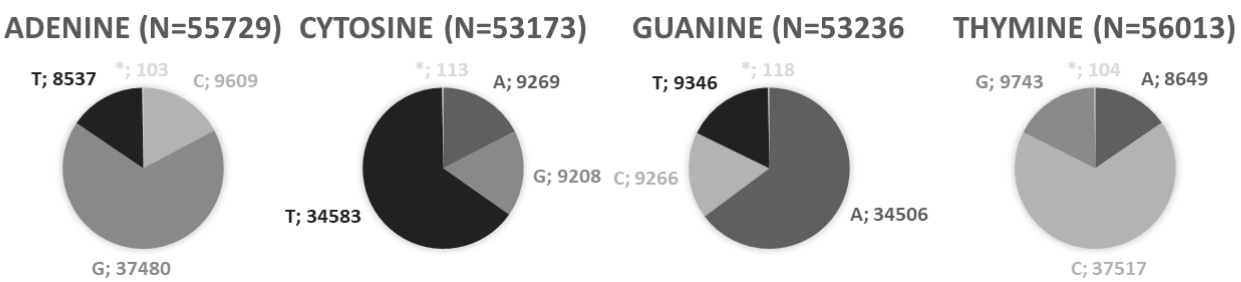
b)



c)



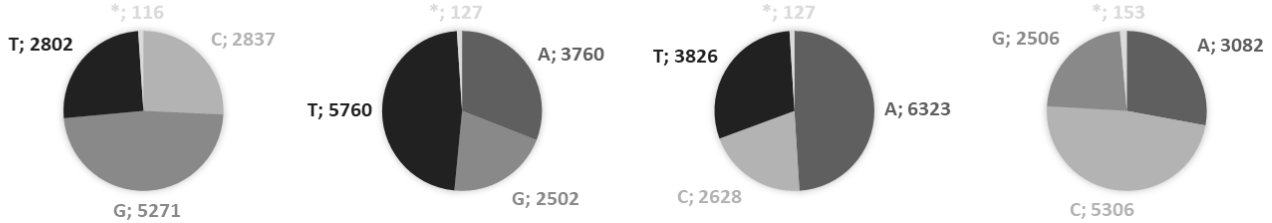
d)



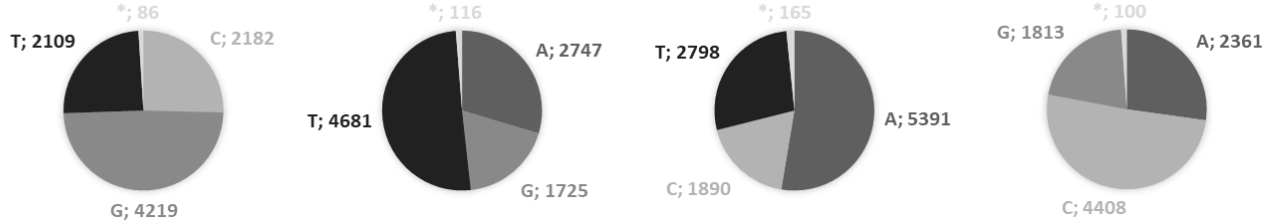
day0=0/1; day22=1/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry

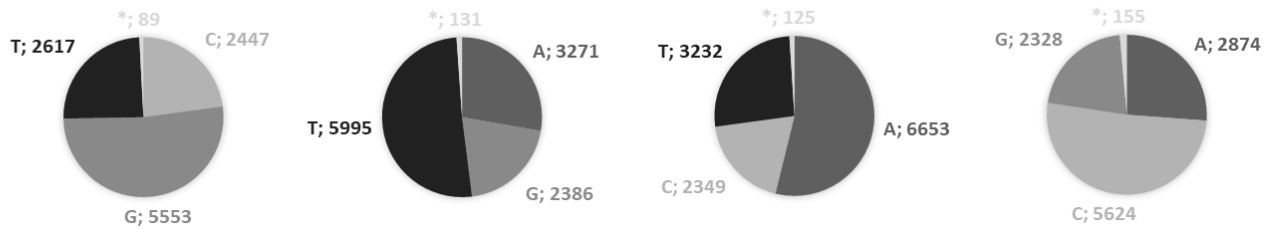
a) ADENINE (N=11026) CYTOSINE (N=12149) GUANINE (N=12904) THYMINE (N=11047)



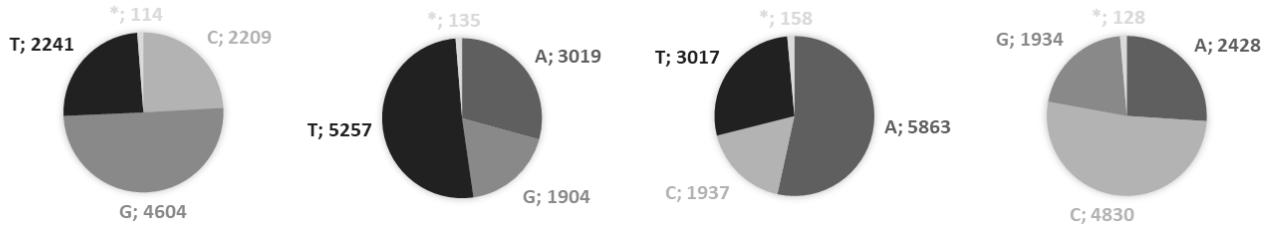
b) ADENINE (N=8596) CYTOSINE (N=9269) GUANINE (N=10244) THYMINE (N=8682)



c) ADENINE (N=10706) CYTOSINE (N=11783) GUANINE (N=12359) THYMINE (N=10981)

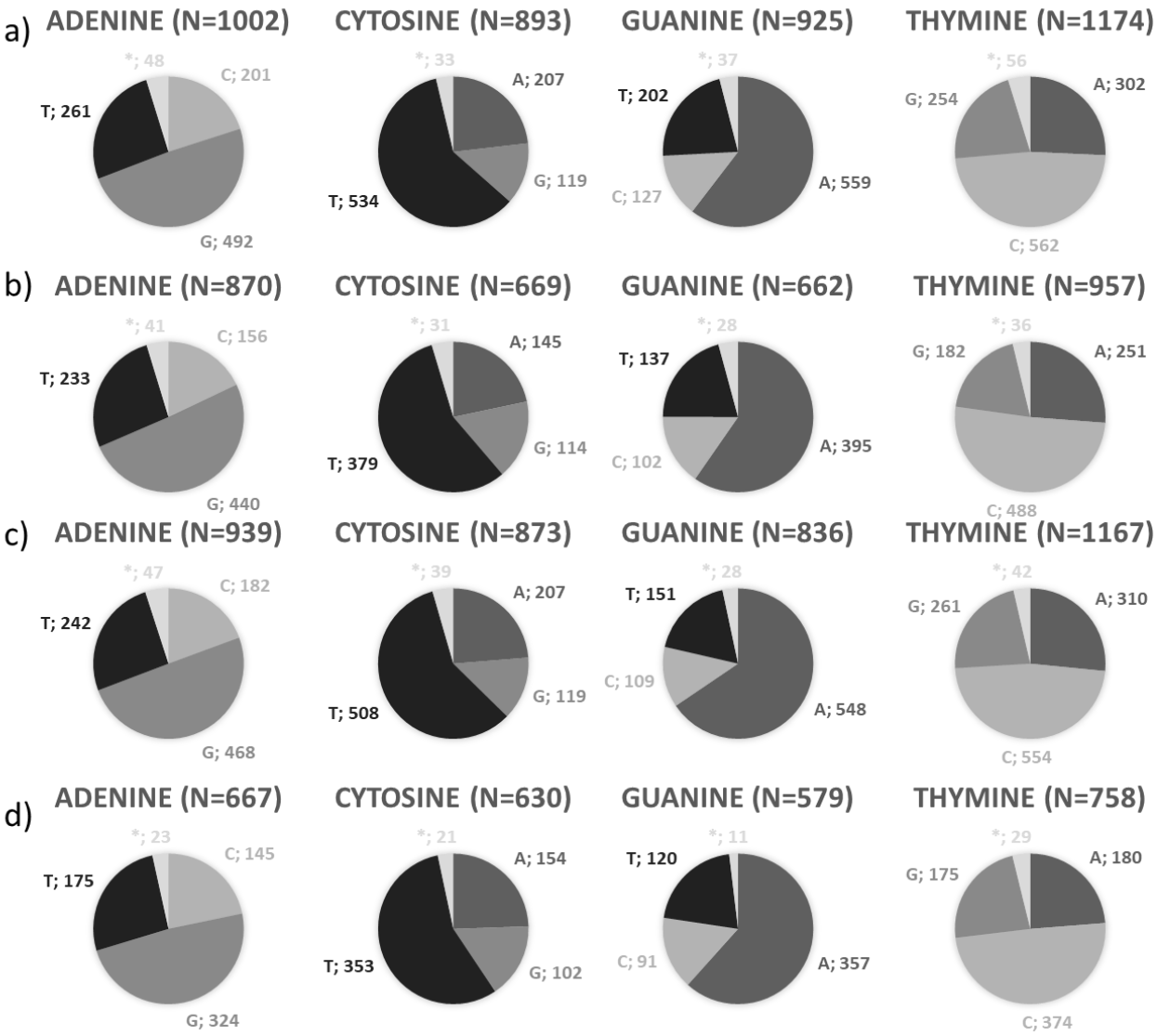


d) ADENINE (N=9168) CYTOSINE (N=10315) GUANINE (N=10975) THYMINE (N=9320)



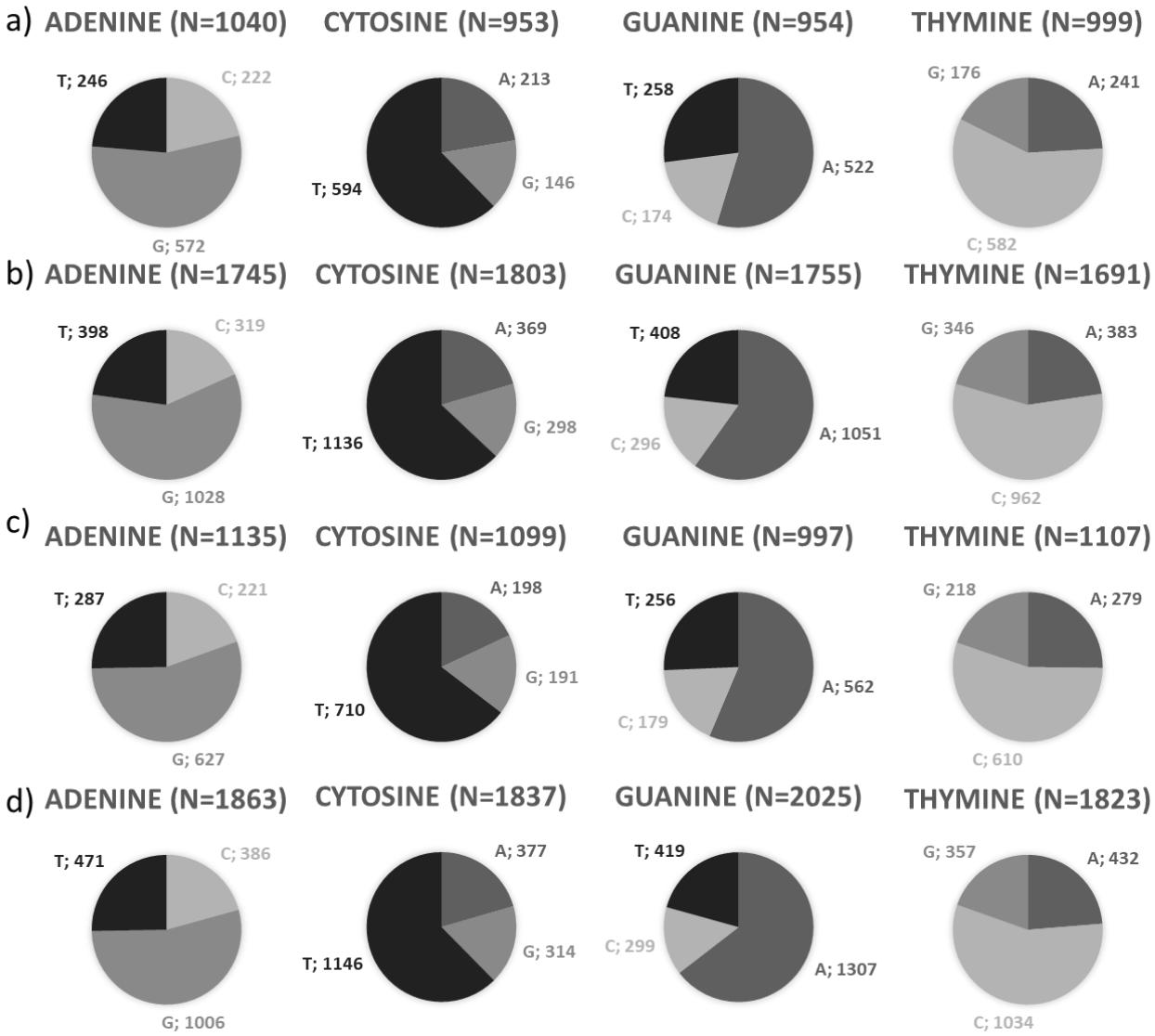
day22=0/0; day92=0/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry



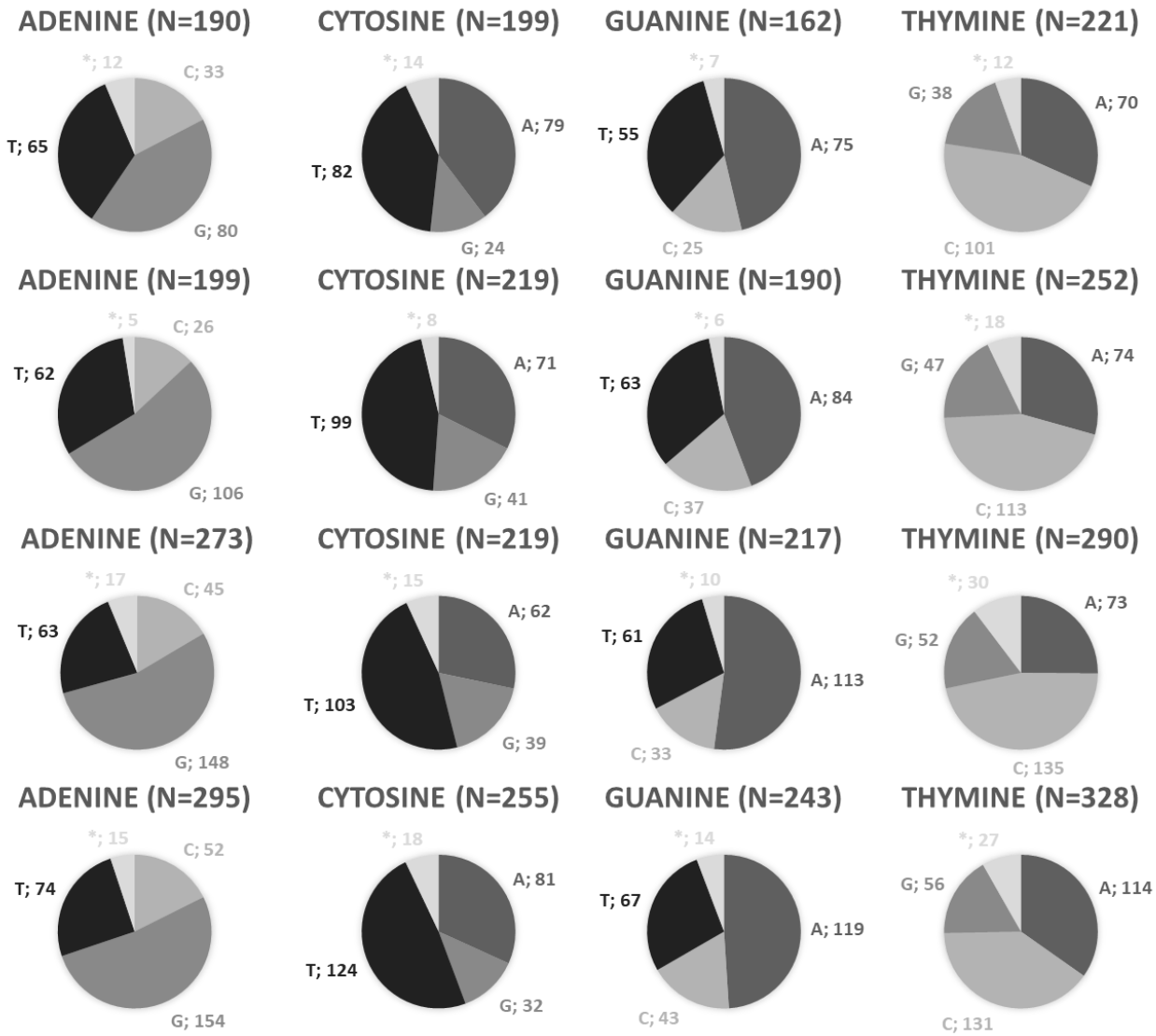
day22=0/1; day92=1/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry



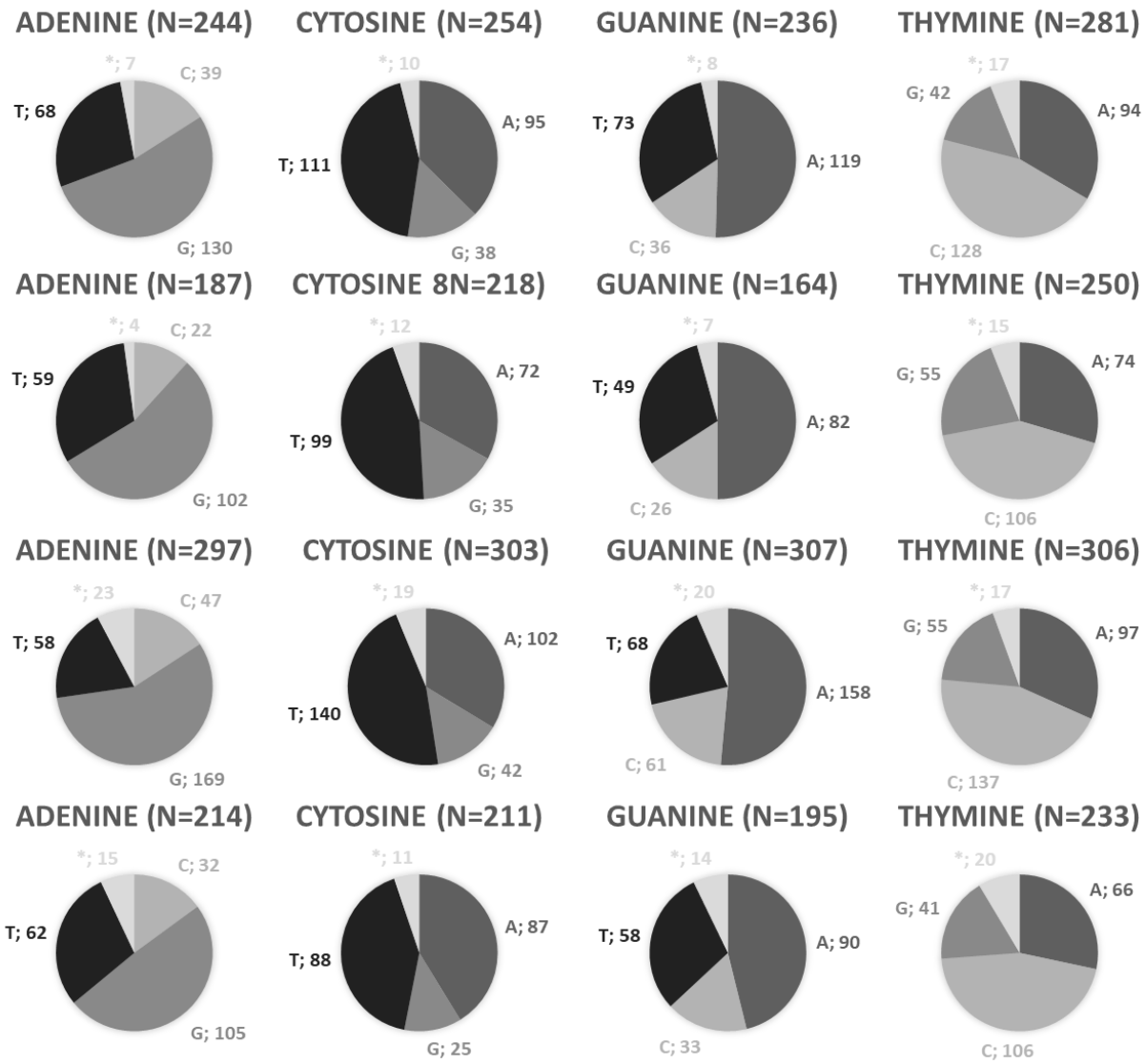
day22=1/1; day92=0/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry



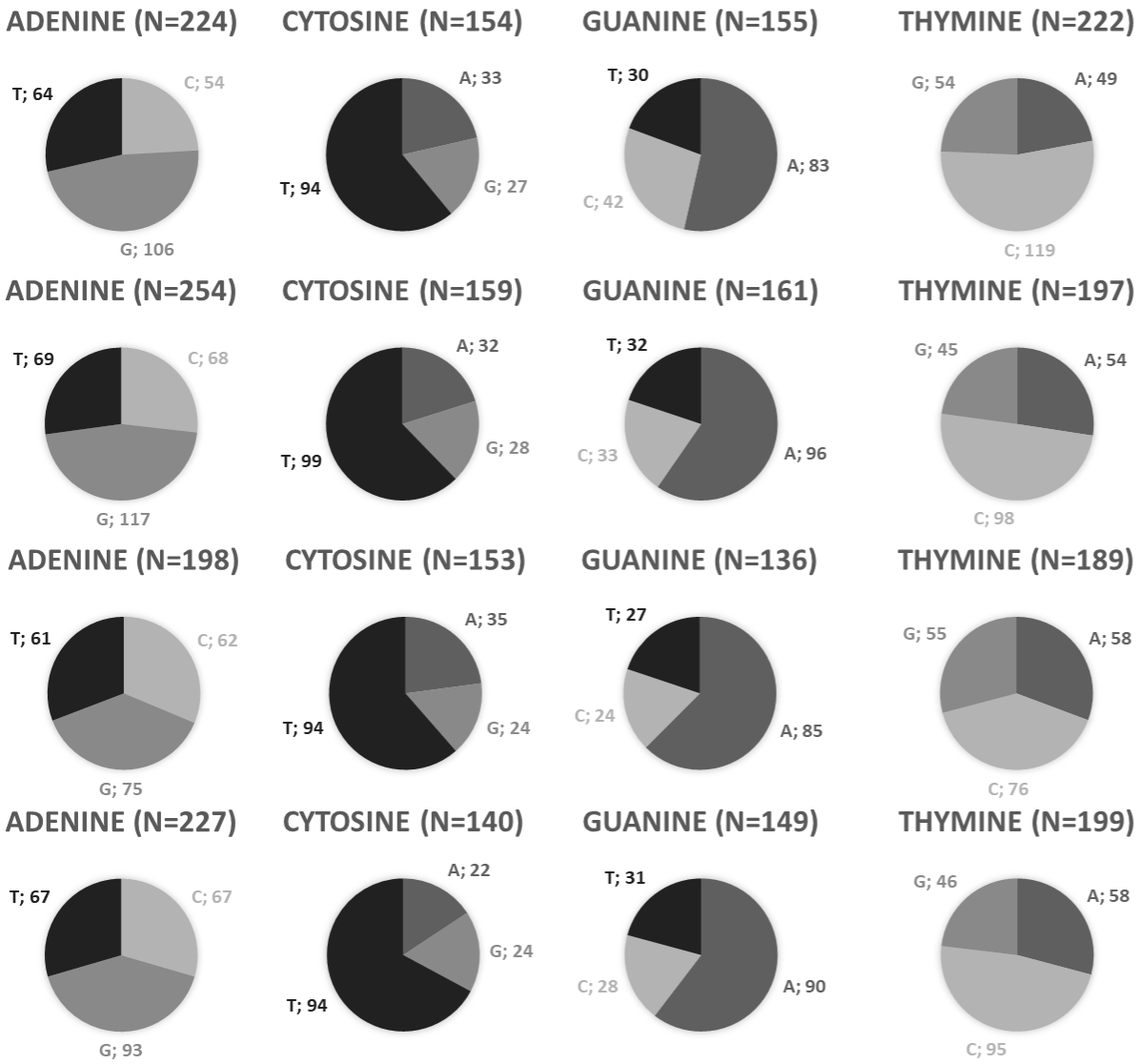
day0=0/0; day22=1/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry



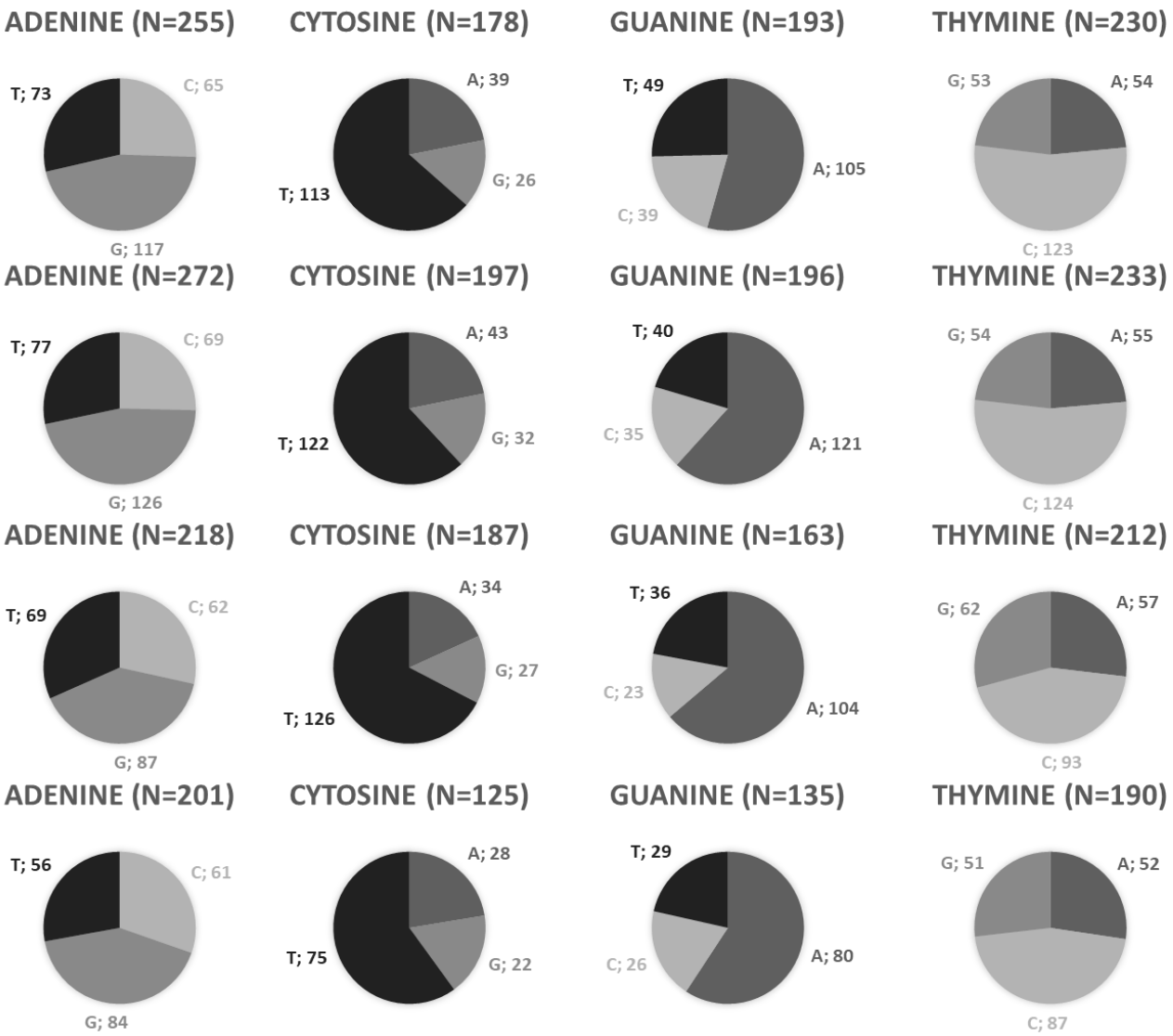
day0=0/0; day92=1/1:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry



day0=1/1; day22=0/0:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry



day0=1/1; day92=0/0:

a) saliva humid,
b) saliva dry,
c) blood humid,
d) blood dry

Online Resource 4

blood humid										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT 0 days	PRV 0 days	GT 22 days	PRV 22 days	GT 92 days	PRV 92 days
1	43904897	C	T	3894.69	0/0	0,00	0/1	31,58	0/1	52,94
11	21741151	C	T	612.99	0/0	11,11	0/1	21,05	0/1	53,85
11	76719528	C	T	4388.76	0/0	0,00	0/1	34,78	0/1	59,46
11	102731150	C	T	1749.96	0/0	4,55	0/1	28,57	0/1	66,67
12	107414722	C	T	2466.02	0/0	6,67	0/1	31,82	0/1	59,26
17	3031690	C	T	2699.75	0/0	0,00	0/1	34,62	0/1	61,54
17	78143099	C	T	4381.03	0/0	0,00	0/1	34,48	0/1	61,11
17	78143107	C	T	4242.91	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	55,00
19	1951819	C	T	1625.53	0/0	0,00	0/1	25,00	0/1	56,52
20	48510285	C	T	2524.98	0/0	0,00	0/1	32,43	0/1	53,19
22	11268337	C	T	2944.04	0/0	6,25	0/1	22,22	0/1	51,61
5	18096826	C	T	2890.02	0/0	0,00	0/1	28,57	0/1	53,33
6	32680262	C	T	1447.33	0/0	0,00	0/1	18,75	0/1	52,00
6	170265063	C	T	1183.1	0/0	0,00	0/1	22,22	0/1	62,96
7	116345921	C	T	1842.03	0/0	0,00	0/1	21,43	0/1	54,55
7	156035318	C	T	3902.76	0/0	0,00	0/1	25,93	0/1	53,57
7	158959904	C	T	3148.94	0/0	0,00	0/1	27,27	0/1	58,82
8	57204132	C	T	8030.76	0/0	0,00	0/1	31,82	0/1	59,70
9	113739953	C	T	1173.33	0/0	0,00	0/1	30,77	0/1	52,17
1	152534268	G	A	693.38	0/0	0,00	0/1	30,43	0/1	55,00
10	41843751	G	A	1484.02	0/0	9,09	0/1	20,00	0/1	51,28
10	42087342	G	A	2735.98	0/0	0,00	0/1	23,68	0/1	52,63
12	128783149	G	A	660.45	0/0	0,00	0/1	27,27	0/1	75,00
14	21887296	G	A	4424.41	0/0	0,00	0/1	34,48	0/1	61,29
14	74280670	G	A	474.43	0/0	14,29	0/1	29,41	0/1	66,67
17	21988482	G	A	952.47	0/0	0,00	0/1	20,69	0/1	54,55
2	740078	G	A	2009.48	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	65,12

2	25725731	G	A	4280.76	0/0	0,00	0/1	34,21	0/1	52,38
2	86545437	G	A	2742.92	0/0	0,00	0/1	31,25	0/1	51,28
5	1513773	G	A	3371.58	0/0	0,00	0/1	28,57	0/1	75,00
6	48507977	G	A	1569.53	0/0	0,00	0/1	30,00	0/1	61,54
6	60230561	G	A	6575.01	0/0	0,00	0/1	23,08	0/1	64,06
7	56764914	G	A	2646.97	0/0	7,14	0/1	25,00	0/1	66,67
7	56764920	G	A	2361.05	0/0	7,69	0/1	28,57	0/1	69,23
7	91888412	G	A	2528.76	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	52,17
8	57204104	G	A	7371.76	0/0	0,00	0/1	29,55	0/1	58,21
8	57204117	G	A	7540.76	0/0	0,00	0/1	31,11	0/1	59,09
8	139958904	G	A	1010.62	0/0	6,25	0/1	22,73	0/1	64,29
9	74346794	G	A	3380.98	0/0	0,00	0/1	29,17	0/1	57,14
KI270730.1	98453	G	A	2724.29	0/0	0,00	0/1	30,56	0/1	59,00
KI270756.1	4692	G	A	8588.76	0/0	0,00	0/1	28,38	0/1	52,13
1	168749522	A	G	4001.89	1/1	100,00	0/1	73,68	0/1	57,14
14	89333986	A	G	2918.07	1/1	84,62	0/1	65,00	0/1	52,63
14	103372214	A	G	4809.55	1/1	100,00	0/1	76,92	0/1	30,77
15	48578690	A	G	8419.99	1/1	100,00	0/1	76,00	0/1	61,54
16	58808204	A	G	2120.46	1/1	93,75	0/1	36,36	0/1	27,27
19	36827090	A	G	3476.45	1/1	93,33	0/1	57,14	0/1	50,00
20	833025	A	G	3121.3	1/1	100,00	0/1	64,71	0/1	56,52
3	85884979	A	G	5229.99	1/1	100,00	0/1	70,37	0/1	62,50
12	11883290	T	C	4588.11	1/1	94,74	0/1	75,00	0/1	63,64
12	11883293	T	C	4626.37	1/1	95,00	0/1	78,57	0/1	63,64
14	103372221	T	C	4956.41	1/1	100,00	0/1	73,33	0/1	23,53
20	6807051	T	C	6264.24	1/1	94,12	0/1	75,00	0/1	70,00
3	105402942	T	C	3526.19	1/1	90,00	0/1	76,47	0/1	60,71
3	195785374	T	C	10801.9	1/1	100,00	0/1	69,44	0/1	68,29
4	79062030	T	C	5360.62	1/1	90,00	0/1	76,19	0/1	70,97

4	110255848	T	C	2729.58	1/1	82,35	0/1	72,73	0/1	62,96
5	80548919	T	C	5757.85	1/1	100,00	0/1	73,68	0/1	60,00
5	80548921	T	C	6481.15	1/1	100,00	0/1	73,68	0/1	63,64
6	32552241	T	C	14504.0	1/1	96,30	0/1	68,89	0/1	60,42
6	32588210	T	C	13440.0	1/1	96,88	0/1	67,86	0/1	43,59
6	168611420	T	C	1480.45	1/1	94,12	0/1	45,45	0/1	40,91
7	31598404	T	C	4076.9	1/1	90,32	0/1	76,47	0/1	75,68
7	77008435	T	C	4336.88	1/1	100,00	0/1	76,92	0/1	61,11
8	89699534	T	C	5951.1	1/1	92,86	0/1	57,89	0/1	44,44
KI270442.1	162796	T	C	6650.99	1/1	96,43	0/1	27,03	0/1	20,24
KI270438.1	106744	T	C	446612.0	1/1	93,69	0/1	75,00	0/1	72,54
blood dry										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT 0 days	PRV 0 days	GT 22 days	PRV 22 days	GT 92 days	PRV 92 days
12	128473363	C	T	5075.05	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	76,74
6	160851964	C	T	4493.76	0/0	0,00	0/1	29,17	0/1	54,76
11	76719528	C	T	4388.76	0/0	0,00	0/1	31,75	0/1	53,66
3	106073828	C	T	3601.76	0/0	0,00	0/1	24,53	0/1	57,14
5	176530309	C	T	3407.33	0/0	0,00	0/1	34,62	0/1	63,16
22	16321529	C	T	3332.33	0/0	0,00	0/1	31,58	0/1	53,85
11	2332600	C	T	2795.76	0/0	0,00	0/1	31,91	0/1	52,94
17	3031690	C	T	2699.75	0/0	0,00	0/1	27,50	0/1	60,87
6	32549273	C	T	2667.46	0/0	0,00	0/1	23,81	0/1	56,52
6	32587198	C	T	2290.75	0/0	0,00	0/1	19,23	0/1	52,63
19	3332267	C	T	1773.96	0/0	0,00	0/1	25,00	1/1	90,91
16	32562232	C	T	1671.04	0/0	0,00	0/1	34,78	0/1	56,25
X	125540459	C	T	1454.09	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	60,87
Y	6535086	G	A	8112.29	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	57,35
GL000225.1	7762	G	A	5672.71	0/0	0,00	0/1	22,58	0/1	64,71
5	59291735	G	A	4216.76	0/0	0,00	0/1	25,93	0/1	54,55

16	160828	G	A	3987.76	0/0	0,00	0/1	26,67	0/1	57,89
3	106073860	G	A	3865.76	0/0	0,00	0/1	24,07	0/1	58,54
1	121792430	G	A	2557.56	0/0	0,00	0/1	25,00	0/1	61,54
8	3022166	G	A	2420.91	0/0	0,00	0/1	31,03	0/1	58,82
1	220537597	T	C	4027.67	1/1	94,12	0/1	68,42	0/1	66,67
1	224210605	T	C	6106.15	1/1	96,88	0/1	69,23	0/1	68,75
1	247195316	T	C	2390.8	1/1	94,44	0/1	60,00	0/1	44,00
12	113716530	T	C	3289.29	1/1	100,00	0/1	75,00	0/1	70,00
14	56727330	T	C	4836.25	1/1	87,50	0/1	78,95	0/1	65,22
14	103372221	T	C	4956.41	1/1	100,00	0/1	58,33	0/1	54,55
14	104809555	T	C	3872.1	1/1	100,00	0/1	76,92	0/1	72,73
16	27143319	T	C	2283.35	1/1	45,00	0/1	58,82	0/1	40,00
17	52226338	T	C	6247.38	1/1	83,33	0/1	78,95	0/1	64,52
20	53643079	T	C	4514.46	1/1	83,33	0/1	44,12	0/1	40,00
3	105587336	T	C	2980.49	1/1	96,00	0/1	75,00	0/1	60,87
3	164537139	T	C	4601.92	1/1	95,24	0/1	73,33	0/1	63,89
5	71165963	T	C	2783.48	1/1	100,00	0/1	69,23	0/1	63,64
6	32552241	T	C	14504.0	1/1	96,30	0/1	72,73	0/1	57,63
KI270438.1	1148	T	C	76962.0	1/1	90,76	0/1	74,40	0/1	73,81
10	13692138	A	G	7252.8	1/1	100,00	0/1	77,78	0/1	66,67
10	56161455	A	G	3840.98	1/1	100,00	0/1	75,00	0/1	64,29
14	103372214	A	G	4809.55	1/1	100,00	0/1	63,64	0/1	52,17
18	11521560	A	G	1708.58	1/1	72,22	0/1	38,46	0/1	37,04
19	36827090	A	G	3476.45	1/1	93,33	0/1	71,43	0/1	42,31
20	833025	A	G	3121.3	1/1	100,00	0/1	59,26	0/1	53,85
8	124417079	A	G	7819.79	1/1	96,00	0/1	75,00	0/1	60,98
9	10476750	A	G	4902.83	1/1	92,86	0/1	63,33	0/1	55,17

saliva humid										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT 0 days	PRV 0 days	GT 22 days	PRV 22 days	GT 92 days	PRV 92 days
1	158726686	C	T	3693.73	0/0	0,00	0/1	31,43	0/1	56,52
1	161281670	C	T	5267.76	0/0	0,00	0/1	31,71	0/1	51,35
1	161281686	C	T	5081.76	0/0	0,00	0/1	28,21	0/1	53,13
1	227698472	C	T	2343.16	0/0	11,11	0/1	27,27	0/1	57,14
1	229431534	C	T	4360.25	0/0	0,00	0/1	18,75	0/1	61,68
10	111574458	C	T	2893.76	0/0	0,00	0/1	30,56	0/1	51,85
12	12653350	C	T	1649.01	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	52,94
12	59860589	C	T	2785.31	0/0	0,00	0/1	30,00	0/1	68,75
16	19671819	C	T	4953.76	0/0	0,00	0/1	30,77	0/1	51,52
17	80665523	C	T	898.05	0/0	0,00	0/1	23,53	0/1	71,43
22	23947001	C	T	1052.05	0/0	0,00	0/1	20,00	0/1	52,94
4	140762703	C	T	1655.98	0/0	0,00	0/1	28,57	0/1	53,85
5	102779964	C	T	1932.76	0/0	0,00	0/1	23,81	0/1	52,94
5	175115104	C	T	4907.41	0/0	0,00	0/1	19,57	0/1	79,84
6	32525519	C	T	997.83	0/0	0,00	0/1	23,53	0/1	66,67
6	60234652	C	T	2065.18	0/0	3,33	0/1	31,25	0/1	68,00
Y	56834056	C	T	17563.3	0/0	0,00	0/1	26,08	0/1	51,49
KI270519.1	67309	C	T	10673.9	0/0	0,00	0/1	25,45	0/1	53,92
1	229431529	G	A	4294.25	0/0	0,00	0/1	18,75	0/1	60,95
14	89333961	G	A	3171.94	0/0	0,00	0/1	25,00	0/1	64,71
16	4484481	G	A	3653.76	0/0	0,00	0/1	20,69	0/1	54,55
17	21857649	G	A	8857.44	0/0	0,00	0/1	28,92	0/1	53,00
18	77061261	G	A	5137.84	0/0	0,00	0/1	32,26	0/1	60,00
2	17964542	G	A	1404.53	0/0	0,00	0/1	32,00	0/1	56,25
2	71618254	G	A	594.66	0/0	0,00	0/1	20,00	0/1	56,25
20	37679438	G	A	1298.19	0/0	10,00	0/1	33,33	0/1	55,56
21	37655257	G	A	3677.98	0/0	0,00	0/1	29,41	0/1	52,17

22	35491901	G	A	1332.49	0/0	0,00	0/1	31,25	0/1	62,50
5	175115110	G	A	5000.41	0/0	0,00	0/1	19,57	0/1	79,84
5	175115115	G	A	5028.41	0/0	0,00	0/1	19,57	0/1	79,20
8	41721686	G	A	1747.94	0/0	0,00	0/1	22,22	0/1	52,63
X	112160900	G	A	4755.76	0/0	0,00	0/1	30,77	0/1	61,29
KI270726.1	26363	G	A	1455.95	0/0	0,00	0/1	30,00	0/1	55,00
11	44509824	T	C	4184.57	1/1	90,91	0/1	68,42	0/1	25,00
22	38207442	T	C	3193.62	1/1	93,75	0/1	62,07	0/1	31,58
6	32511676	T	C	5596.76	1/1	100,00	0/1	51,22	0/1	22,22
6	32511735	T	C	6119.94	1/1	95,83	0/1	53,57	0/1	30,00
6	32573800	T	C	7472.32	1/1	100,00	0/1	51,11	0/1	31,25
1	17202425	A	G	2781.43	1/1	90,91	0/1	38,24	0/1	20,83
2	238908991	A	G	5674.6	1/1	96,77	0/0	46,15	0/1	33,85
3	128500975	A	G	1876.5	1/1	93,75	0/1	44,44	0/1	30,43
saliva dry										
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	GT 0 days	PRV 0 days	GT 22 days	PRV 22 days	GT 92 days	PRV 92 days
10	111574458	C	T	2893.76	0/0	0,00	0/1	23,33	0/1	51,72
13	113033373	C	T	1783.1	0/0	0,00	0/1	30,00	0/1	76,00
15	17022929	C	T	4455.53	0/0	0,00	0/1	20,00	0/1	62,77
16	48952007	C	T	4920.76	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	55,81
17	47131890	C	T	1650.9	0/0	0,00	0/1	30,77	0/1	69,23
18	63086836	C	T	3122.21	0/0	0,00	0/1	20,83	1/1	75,00
20	37603403	C	T	3266.25	0/0	0,00	0/1	32,00	0/1	52,63
21	45739055	C	T	1384.48	0/0	0,00	0/1	31,82	0/1	53,33
6	32513794	C	T	7242.76	0/0	0,00	0/1	22,58	0/1	58,49
6	46744323	C	T	1981.86	0/0	0,00	0/1	32,14	0/1	53,57
6	46744337	C	T	1883.78	0/0	0,00	0/1	29,63	0/1	54,17
6	46744349	C	T	1915.86	0/0	0,00	0/1	32,00	0/1	53,85
6	73602363	C	T	2874.76	0/0	0,00	0/1	32,35	0/1	55,88

7	158959904	C	T	3148.94	0/0	0,00	0/1	28,95	0/1	52,78
KI270722.1	107938	C	T	2048.11	0/0	0,00	0/1	33,33	0/1	57,58
KI270333.1	215	C	T	38188.5	0/0	0,00	0/1	28,57	0/1	91,33
13	113033327	G	A	1287.56	0/0	0,00	0/1	31,25	0/1	81,25
16	82032	G	A	1700.05	0/0	0,00	0/1	26,47	0/1	54,55
16	87975901	G	A	3491.33	0/0	0,00	0/1	30,95	0/1	54,55
4	3567911	G	A	3259.41	0/0	5,88	0/1	30,00	0/1	55,56
4	26215337	G	A	1679.76	0/0	0,00	0/1	26,32	0/1	54,55
4	119074970	G	A	3004.53	0/0	0,00	0/1	31,43	0/1	52,17
4	186821744	G	A	3457.53	0/0	0,00	0/1	31,82	0/1	52,17
7	393457	G	A	1525.76	0/0	0,00	0/1	28,57	0/1	60,00
8	143168375	G	A	1368.22	0/0	0,00	0/1	32,35	0/1	54,55
X	1350469	G	A	4998.01	0/0	0,00	0/1	29,73	0/1	56,36
KI270722.1	36048	G	A	4480.94	0/0	0,00	0/1	26,09	0/1	55,32
KI270438.1	47014	G	A	6841.09	0/0	0,00	0/1	30,43	0/1	62,69