

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20927> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Westen, Antoinette-Andrea

**Title:** Human identification & forensic analyses of degraded or low level DNA

**Issue Date:** 2013-06-06

# Epilogue

Summary  
Curriculum vitae  
List of publications  
Nederlandse samenvatting  
Dankwoord



## Summary

The research described in this thesis was aimed at the development of additional or alternative methods to extract information from a person's DNA when standard DNA methodology is not sufficient for human identification.

When collecting samples for human identification, it is important to minimise the risk of (cross-) contamination and to keep the samples in optimal condition, especially when working under mass disaster circumstances. In **Chapter 1** we proposed standard operating procedures for the excision of femur and rib samples and the extraction of molars or teeth. In addition, practical advice was given on 1) inexpensive and simple solutions for excision tools, such as the use of a hacksaw with disposable blades instead of an amputation saw that becomes blunt from the aggressive decontamination fluid, 2) preparation of decontamination fluid to clean instruments and body locations before sample excision in order to prevent cross-contamination from DNA from other victims, and 3) preservation of the samples, for instance by cooling the sample containers in ice-water baths, until the samples are genotyped in dedicated laboratories.

In **Chapter 2** we assessed whether we could obtain more short tandem repeat (STR) genotyping information from a sample with low DNA content by increasing the capillary electrophoresis (CE) injection voltage or extending the CE injection time. Changing the CE settings from 3 kV for 10 s to 9 kV for 15 s led to the best results, with good peak morphology, relatively low baseline noise and a six-fold increase in signal strength, resulting in the detection of additional alleles. Interestingly, compared to an increased number of PCR cycles (28 + 6 cycles, for SGM Plus™), the percentage of detected alleles for samples with 8 or 16 pg DNA input were similar for both methods, while the peak heights upon boosted injection were much lower. These lower peak heights are practical for the analysis of unequal mixtures, as these enable improvement of the genotyping results from the minor component, without over-amplifying or overloading the major component (as would be the case with performing additional PCR cycles). This method is regarded as a low template DNA technique and it is therefore recommended to perform replicate analyses. The method has been accredited for casework in our laboratory.

When not all STR information can be retrieved from a sample due to degradation of the DNA, different marker types that allow analysis in smaller amplicons can be used for identification. Short insertion/deletion polymorphisms and single nucleotide polymorphisms (SNPs) can be used for this purpose, but they are usually bi-allelic and thereby less efficient in detecting mixtures than STRs. In **Chapter 3** we explored the possibility of using a specific subclass of SNPs that exhibits three alleles (instead of the usual two) to improve genotyping results. We developed an algorithm to find these tri-allelic SNP markers in the NCBI SNP database and developed three multiplexes

---

that analyse a total of 16 tri-allelic SNPs. The tri-allelic SNPs showed the possibility to provide valuable genotyping information for samples in which the higher molecular weight STR markers are not detected anymore. In addition, mixtures with ratios between 8 : 1 and 1 : 8 could be successfully detected by the presence of a third allele on a locus. We determined allele frequencies for the tri-allelic SNP candidates in 153 Dutch and 111 Netherlands Antilles donors. Since not all candidates showed the three NCBI-described alleles in these two sample sets we searched for these alleles in 59 (YCC panel) samples from worldwide populations, but did not find them. Of the 16 candidate SNPs in the multiplexes 11 were detected to be tri-allelic, of which two were only tri-allelic in the Netherlands Antilles (and (South) African) and not in the Dutch samples. Therefore, certain tri-allelic SNPs seem interesting as ancestry informative markers as well.

In **Chapter 4** a comparison was made between several techniques to genotype artificially degraded (UV-irradiated) DNA. The following techniques were compared: STR genotyping using SGM Plus™ (which was the standard kit at the NFI at that time) or MiniFiler™ (with reduced size amplicons), DNA repair with the enzyme cocktails PreCR™ or Restorase™ followed by SGM Plus™, and SNP genotyping using bi-allelic (GenPlex™) or tri-allelic SNPs (as described in Chapter 3). For severely degraded samples, the average percentage of detected alleles after PreCR™ or Restorase™ DNA repair was on average slightly higher than for SGM Plus™ alone (15 %, 23 % and 13 %, respectively). However, the results were not consistent and for a single sample the results could be substantially worse after the repair procedure than without. MiniFiler™ showed much better results with an average of 60 % detected STR alleles. Even higher percentages were detected for tri-allelic SNPs (73 %) and bi-allelic SNPs (88 %). These results showed that the use of reduced size amplicons for mini-STRs and SNPs is effective for genotyping (severely) degraded DNA.

During in-house validation of the AmpFISTR® NGM™ kit we evaluated, amongst others, the aspects as described in **Chapter 5**. We found that the increased sensitivity, compared to previous AmpFISTR® kits, required elevation of the stochastic threshold. When regarding various CE injection settings, values of 175 rfu for 3 kV/5 s, 300 rfu for 3 kV/10 s and 400 rfu for 3 kV/15 s are required to have 99 % of the single alleles on heterozygous loci below the stochastic threshold. Stutter peak heights appeared not to be normally distributed and therefore we determined the locus-specific stutter ratio thresholds empirically using the 99<sup>th</sup> percentile approach. Based on 2085 DNA profiles of Dutch volunteers, thirteen -1 stutter ratio filters could be lowered by up to 1.79 % compared to the ones provided by Applied Biosystems, and two had to be elevated slightly (with a maximum of 0.06 %). All loci showed +1 stutter peaks when high DNA inputs were used, and they were seen for locus D22S1045 with low inputs as well. For all loci a general +1 stutter filter was set at 2.50 %, except for D22S1045 for which it was determined to be 7.27 %. For low template DNA analysis 9 kV/10 s CE injection

settings can be used, and only for the very low DNA inputs (<31 pg) the use of 29 + 5 cycles is recommended. We advise to determine the abovementioned parameters in-house before introducing a new kit for (standard use in) forensic casework, in order to optimise the analyses of complex mixtures and low template DNA samples.

The Investigator™ HDplex™ kit contains nine STRs that are additional to the commonly used forensic markers. These STRs can be used to increase the discrimination power; which may for instance be useful in complex kinship analyses and when alleles are missing due to degradation of the DNA. In **Chapter 6** we evaluated whether the 30 markers in NGM™, Identifiler™ and HDplex™ (from which 17 syntenic STR pairs can be formed) can be regarded as independent. Based on 335 Dutch reference DNA profiles for these three kits, no linkage disequilibrium could be detected and we inferred that the product rule can be applied for profile probability calculations in unrelated individuals. Using five three-generation CEPH pedigrees we studied linkage between the syntenic STRs by determining their recombination fractions, and we compared these to the physical and genetic distances between the markers. The presence of (loose) physical linkage, as found for some of the assessed marker pairs, may influence the interpretation of genotyping data from (closely) related individuals. For an explanation on which type of pedigree could be affected by linkage and how to account for this effect using recombination fractions (as determined in our study), we referred to a paper by Gill et al. (*Forensic Sci Int Genet* 6:477-486, 2011). HDplex™ has many non-overlapping markers with NGM™ and Identifiler™, and the power of discrimination per marker is on average higher than for the other kits, which makes HDplex™ a good complementary STR kit that may aid complex kinship and degraded DNA analyses.

DNA profiles from degraded samples often suffer from information loss at the longer STR loci. Sensitising the reactions by performing additional PCR cycles or increasing the CE injection settings carries the risk of over-amplifying or overloading the shorter loci. In **Chapter 7** we explored whether the use of a size-selective post-PCR purification method, based on AMPure® XP beads, could increase the information obtained from the longer STR loci in degraded samples. This method was compared to unselective purification (DTR gel filtration) and no purification of the PCR products. Besides a set of 39 differently and serially degraded single source samples, unequal mixtures of degraded DNAs in the ratios 1:5, 1:10 and 1:15 (with  $n = 5$  per mixture ratio) were analysed in order to extract more genotyping information for the minor contributor without overloading the major component at the shorter loci. DTR gel filtration resulted in an approximately two-fold increase in allele peak heights for all loci, while AMPure® purification showed a three- to fourfold increase at the longer loci and no increase at the shorter loci. Both post-PCR purification methods showed more detected alleles than the non-purified samples, with, on average, slightly more detected alleles (especially on the longer loci) after AMPure® purification.

---

In **Chapter 8**, several aspects of DNA-based human identification were discussed, with emphasis on low quality and/or quantity of the DNA, and choices both at a technical and an ethical level were reviewed. The focus of this general discussion lay on (disaster) victim identification, although human identification also applies to relationship testing and forensic analyses.

## Curriculum vitae

Antoinette-Andrea (Toineke) Westen was born in Leiderdorp, the Netherlands on the 1<sup>st</sup> of July, 1980. She attended high school (Gymnasium-β) at the R.K. Scholengemeenschap Alverna in Leiden and graduated in 1998. In the same year she started with her course on Biomedical Sciences at Leiden University. She did a combined seven-month research traineeship at the centres for Audiology and Clinical Genetics Leiden (KGCL), both connected to the Leiden University Medical Centre (LUMC). During this internship she set up a clinical trial and DNA-diagnostic method to link a specific type of hereditary hearing loss to defects in the connexin gene. An eleven-month research traineeship on improvement of the working of cochlear implants was performed at the LUMC department of Ear, Nose and Throat Surgery (ENT). Here, she developed a surgical method for implanting cochlear implants in guinea pigs (a common animal model in this field) and measured their nerve fibre responses. She graduated in August 2002. Thereafter, she started a course on Industrial Design at the Technical University Eindhoven, and she received her propaedeutic certificate in 2003.

In 2003, she accepted a position as scientist at the ENT department of the LUMC to proceed with the research on cochlear implants, where she worked until 2005 under supervision of Dr Jeroen J. Briaire and Prof. Dr Johan H.M. Frijns. In the years 2004 and 2005, she additionally performed physical anthropological research on human remains from the cloister garth of the Koningsveld priory in the city of Delft at the LUMC department of Anatomy and Embryology, under supervision of W.J. (Mike) Groen and Prof. Dr George J.R. Maat.

Since 2006 Toineke is employed at the Netherlands Forensic Institute as a scientist in the R&D group of the Human biological traces department. Part of the results that she obtained, are described within this thesis. Most of this work was supervised by Dr Titia Sijen and chaperoned by Prof. Dr Peter de Knijff. In 2009 she was rewarded with a Young Investigators Award during the 6<sup>th</sup> ISABS conference in Split, Croatia. After completing her PhD, she will continue as a post-doctoral scientist within this R&D group.



---

## List of publications

### Publications on which this thesis was based

- A.A. Westen, R.R.R. Gerretsen and G.J.R. Maat, Femur, rib, and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification. *Forensic Sci. Med. Pathol.* (2008) 4:15-21.
- A.A. Westen, J.H. Nagel, C.C. Benschop, N.E. Weiler, B.J. de Jong and T. Sijen, Higher capillary electrophoresis injection settings as an efficient approach to increase the sensitivity of STR typing. *J. Forensic Sci.* (2009) 54:591-598.
- A.A. Westen, A.S. Matai, J.F.J. Laros, H.C. Meiland, M. Jasper, W.J.F. de Leeuw, P. de Knijff and T. Sijen, Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples. *Forensic Sci. Int. Genet.* (2009) 3:233-241.
- A.A. Westen and T. Sijen, Degraded DNA sample analysis using DNA repair enzymes, mini-STRs and (tri-allelic) SNPs. *Forensic Sci. Int. Genet. Supp. Ser.* (2009) 2:505-507.
- A.A. Westen, L.J.W. Grol, J. Harteveld, A.S. Matai, P. de Knijff and T. Sijen, Assessment of the stochastic threshold, back- and forward stutter filters and low template techniques for NGM. *Forensic Sci. Int. Genet.* (2012) 6:708-715.
- A.A. Westen, H. Haned, L.J.W. Grol, J. Harteveld, K.J. van der Gaag, P. de Knijff and T. Sijen, Combining results of forensic STR kits: HDplex validation including allelic association and linkage testing with NGM and Identifiler loci. *Int. J. Legal Med.* (2012) 126:781-789.
- A.A. Westen, K.J. van der Gaag, P. de Knijff and T. Sijen, Improved analysis of long STR amplicons from degraded single source and mixed DNA. *Int. J. Legal med.* (2013) DOI 10.1007/s00414-012-0816-1.

### Publications beside this thesis

- C. Tomas, I. Bastisch, C. Børsting, A. Carracedo, M.D. Coble, A. Eisenberg, R. Fang, S. Frisk Fredslund, C. Haas, A.J. Hansen, P. Hoff-Olsen, B. Lindblom, H.S. Mogensen, M. Prinz, M. Stangegaard, P.M. Vallone, A.A. Westen and N. Morling, SNP typing of forensic samples with the GenPlex™ HID system: A collaborative study. *Forensic Sci. Int. Genet. Supp. Ser.* (2009) 2:508-509.

- C.C. Benschop, C.P. van der Beek, H.C. Meiland, A.G. van Gorp, A.A. Westen and T. Sijen, Low template STR typing: effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results. *Forensic Sci. Int. Genet.* (2011) 5:316-328.
- C. Tomas, G. Axler-DiPerte, Z.M. Budimlija, C. Børsting, M.D. Coble, A.E. Decker, A. Eisenberg, R. Fang, M. Fondevila, S. Frisk Fredslund, S. Gonzalez, A.J. Hansen, P. Hoff-Olsen, C. Haas, P. Kohler, A.K. Kriegel, B. Lindblom, F. Manohar, O. Maroñas, H.S. Mogensen, K. Neureuther, H. Nilsson, M.K. Scheible, P.M. Schneider, M.L. Sonntag, M. Stangegaard, D. Syndercombe-Court, C.R. Thacker, P.M. Vallone, A.A. Westen and N. Morling, Autosomal SNP typing of forensic samples with the GenPlex™ HID System: Results of a collaborative study. *Forensic Sci. Int. Genet.* (2011) 5:369-375.
- A.A. Westen, D.M.T. Dekker, J.J. Briaire and J.H.M. Frijns, Stimulus level effects on neural excitation and eCAP amplitude. *Hear. Res.* (2011) 280:166-176.
- A.A. Westen, W.J. Groen and G.J.R. Maat, Human remains from the cloister garth of the 'Koningsveld' priory near the medieval city of Delft – Ca. 1450-1572 AD. *Barge's Anthropologica* 13:1-53, Amsterdam (2013) ISBN/EAN: 978-90-78943-03-7.

---

# Nederlandse samenvatting

## Humane identificatie & forensische analyses van afgebroken of minimale hoeveelheden DNA

Humane identificatie kan nodig zijn in situaties zoals (massa)rampen, terroristische aanvallen, vermiste personen en forensisch onderzoek. Deze identificatie kan gebaseerd worden op lichaamskarakteristieken (bijvoorbeeld gezichtsherkenning, vingerafdrukken en gebitsstatus) of DNA bewijs. Vooral deze laatste methode is zeer bruikbaar gebleken voor lichamen die niet meer compleet of onherkenbaar zijn.

Om een DNA profiel van een persoon te kunnen maken, moet het DNA van voldoende kwaliteit en kwantiteit zijn. Wanneer de tijd tussen het intreden van de dood en het ontdekken van het lichaam lang is en/of het lichaam is blootgesteld aan extreme omstandigheden (zoals vuur, onderwater, lucht met een hoge vochtigheidsgraad, aarde met een hoge zuurgraad, chemische middelen, etc.) kan het DNA sterk worden afgebroken of sterk teruglopen in hoeveelheid.

Het onderzoek dat in dit proefschrift staat beschreven, is gericht op het ontwikkelen van onderzoeksmethoden voor humane identificatiezaken waarin het DNA slecht van kwaliteit en/of laag in kwantiteit is. Het doel van dit onderzoek is om tot additionele of alternatieve methoden te komen om informatie vanuit iemands DNA te halen wanneer standaard DNA typeringsmethoden niet voldoen voor humane identificatie.

De DNA profielen die worden gebruikt bij humane identificatie zijn meestal gebaseerd op "short tandem repeats" (*STRs*): korte stukjes DNA die in een variabel aantal achter elkaar herhaald worden. Deze STR varianten (ook wel *allelen* genoemd; weergegeven als pieken in het DNA profiel) verschillen tussen personen. Een combinatie van allelen voor verschillende *markers* (locaties op het DNA die worden onderzocht) vormt een DNA profiel dat (vrijwel) uniek is per persoon wanneer voldoende markers worden gebruikt. Vooral in omstandigheden zoals die zich voordoen na een massaramp, worden lichamen (of monsters die daarvan genomen zijn) gemakkelijk gecontamineerd met DNA van andere slachtoffers. Om een DNA profiel van een zo hoog mogelijke kwaliteit te verkrijgen, is het van belang dat de uitgenomen monsters voor DNA onderzoek worden gehanteerd en opgeslagen onder de meest optimale condities, totdat ze worden geanalyseerd in een gespecialiseerd DNA laboratorium. In **hoofdstuk I** is hiervoor een standaard werkvoorschrift beschreven. Instructies zijn gegeven voor het uitnemen van monsters uit het dijbeen, uit een rib of van tanden en kiezen. Daarnaast wordt praktisch advies gegeven voor goedkoop en eenvoudig gereedschap om monsters mee uit te nemen, voor het bereiden van decontaminatievloeistof en voor het conserveren van de monsters.

Om een DNA profiel te kunnen maken, worden specifieke markergebieden van het DNA vermenigvuldigd door middel van een "polymerase chain reaction" (*PCR*).

Wanneer de kwantiteit van het DNA laag is, hebben DNA profielen lagere piekhoogtes en kunnen stochastische vermenigvuldigingseffecten optreden, zoals disbalans in piekhoogtes, het uitvallen van allelen en/of markers (wat resulteert in incomplete DNA profielen) en het detecteren van extra allelen of verhoogde stotterpieken (dit zijn artefacten die lijken op echte allelen). Deze effecten bemoeilijken de interpretatie van de DNA profielen en kunnen de identificatie van een persoon daardoor belemmeren. Om meer informatie over de DNA donor te verkrijgen, werd een techniek ontwikkeld om de DNA detectie (die plaatsvindt door middel van capillaire elektroforese (CE)) gevoeliger te maken en deze is beschreven in **hoofdstuk 2**. Deze techniek is gebaseerd op het verhogen van het injectievoltage en het verlengen van de injectietijd tijdens CE om daarmee hogere piekhoogtes en meer informatie te verkrijgen uit DNA monsters van één of meerdere (ongelijk gemengde) donoren. De beste resultaten werden verkregen na de CE instellingen te hebben veranderd van 3 kV voor 10 seconden naar 9 kV voor 15 seconden. Met deze instellingen behielden de signalen een mooie piekvorm, ontstond relatief weinig ruis in de basislijn, waren de pieken zesmaal hoger en werden meer allelen gedetecteerd. Deze methode is universeel toepasbaar op diverse DNA marker systemen, die gebruikt worden in forensische laboratoria. Aangezien de methode gebruik maakt van het overgebleven deel van het PCR product (dat anders enige tijd na standaard DNA analyse zou worden weggegooid) hoeft er geen extra DNA extract te worden verbruikt. De methode wordt gezien als een "low template DNA" techniek, een techniek waarmee DNA profielen worden gemaakt van zeer weinig DNA, en daarom wordt aanbevolen om meerdere onafhankelijke analyses uit te voeren. Deze techniek is geaccrediteerd voor gebruik in zaakwerk binnen het Nederlands Forensisch Instituut (NFI).

De *amplicons* (DNA fragmenten die tijdens de PCR worden vermenigvuldigd) van de STR kits die gebruikt werden in het eerste gedeelte van dit proefschrift variëren in lengte van 100 tot ongeveer 400 *basenparen* (basen zijn de bouwstenen van het DNA). Wanneer de kwaliteit van het DNA door (sterke) afbraak laag is, kunnen de DNA fragmenten korter worden dan sommige van de STR amplicons. In zulke gevallen zullen de pieken die de langere STRs representeren in het DNA profiel lager worden of zelfs afwezig zijn. Een ander soort DNA marker is de "single nucleotide polymorphism" (SNP). SNPs die worden toegepast bij humane identificatie hebben meestal ampliconlengtes van 55 tot ongeveer 115 basenparen, wat hen interessant maakt voor de analyse van afgebroken DNA. In **hoofdstuk 3** is het onderzoek beschreven aan een speciale subklasse van SNPs die drie verschillende allelen kunnen hebben (in plaats van de gebruikelijke twee). Deze eigenschap maakt hen zeer interessant voor toepassing in humane identificatie en forensisch onderzoek, omdat de detectie van mengsels (die kunnen worden herkend door de aanwezigheid van een derde allel binnen één marker) veel gemakkelijker is voor tri-allelische dan voor bi-allelische SNPs (die alleen herkend kunnen worden aan verschillen in de balans tussen

---

piekhoogtes). Een zoekalgoritme werd ontwikkeld om tri-allelische SNPs te kunnen vinden in de NCBI SNP databank. Vervolgens werden drie *multiplex-assays* (testen waarin meerdere markers tegelijkertijd kunnen worden vermenigvuldigd door middel van PCR) opgezet om in totaal 16 SNPs te kunnen analyseren. Met behulp van deze assays bleek waardevolle DNA informatie verzameld te kunnen worden, wanneer de langere STR markers niet meer konden worden gedetecteerd (door afbraak van het DNA). Daarnaast konden mengsels in de verhoudingen 8 : 1 tot 1 : 8 succesvol worden herkend door de aanwezigheid van een derde allel op één marker. Allelfrequenties voor de tri-allelische SNP-kandidaten werden bepaald voor 153 Nederlandse en 111 Nederlands-Antilliaanse donoren. Omdat in deze twee populaties niet voor alle kandidaat-SNPs de drie allelen (zoals beschreven in de NCBI SNP databank) werden gevonden, is hier naar gezocht in 59 monsters van wereldwijde populaties, maar dit bleek tevergeefs. Van de 16 kandidaat-SNPs werden er 11 aangemerkt als tri-allelisch, waarvan twee alleen tri-allelisch waren in de Nederlands-Antilliaanse (en (Zuid-) Afrikaanse) en niet in de Nederlandse monsters. Deze laatste vinding maakt bepaalde tri-allelische SNPs ook interessant als markers voor geografische herkomstbepaling.

In **hoofdstuk 4** werd een vergelijking gemaakt tussen een aantal verschillende technieken om artificeel afgebroken (UV-bestraald) DNA te analyseren. De volgende technieken werden met elkaar vergeleken: STR analyse met behulp van SGM Plus™ (de standaard multiplex-assay die op dat moment op het NFI gebruikt werd) of MiniFiler™ (een STR assay met verkorte amplicons), DNA reparatie door gebruik van de enzymcocktails PreCR of Restorase gevolgd door SGM Plus™ en SNP analyse met behulp van bi-allelische (GenPlex™) of tri-allelische SNPs (zoals beschreven in hoofdstuk 3). Voor sterk afgebroken DNA monsters lag het percentage gedetecteerde allelen na PreCR™ of Restorase™ DNA reparatie gemiddeld iets hoger dan voor SGM Plus™ alleen (respectievelijk 15 %, 23 % en 13 %). De resultaten waren echter niet consistent en voor een afzonderlijk monster konden de resultaten soms aanzienlijk slechter zijn na de reparatieprocedure dan zonder reparatie. MiniFiler™ gaf veel betere resultaten met een gemiddeld percentage gedetecteerde STR allelen van 60 %. Nog hogere percentages werden gedetecteerd voor tri-allelische SNPs (73 %) en bi-allelische SNPs (88 %). Deze resultaten tonen dat het gebruik van verkorte amplicons voor mini-STRs en SNPs effectief is voor het analyseren van (sterk) afgebroken DNA.

Nadat de Europese Raad besloten had om vijf extra STR markers toe te voegen aan de Europese standaard STR set, werden nieuwe STR assays met 15 STRs of meer ontwikkeld door verschillende bedrijven. In deze kits werden zo veel mogelijk mini-STRs (met ampliconlengtes vanaf 70 basenparen) opgenomen om meer informatie te kunnen verkrijgen uit afgebroken DNA; de gevoeligheid van de assays werd verhoogd door het gebruik van geoptimaliseerde buffers en één of meer extra PCR vermenigvuldigingscycli. Het NFI besloot om met de AmpFISTR® NGM™ assay te gaan werken. Deze assay werd vervolgens intern gevalideerd en specifieke aspecten

van deze validatie staan beschreven in **hoofdstuk 5**. Wanneer een DNA profiel allelen bevat met piekhoogtes onder de *stochastische drempelwaarde*, moet men rekening houden met het uitvallen van allelen en stochastische vermenigvuldigingseffecten. Deze stochastische drempelwaarde is bepaald voor gebruik bij verschillende CE instellingen. Daarnaast is per marker bepaald op welke waarde de filters ingesteld moesten worden om tenminste 99 % van de stotterpieken (één van de stochastische vermenigvuldigingseffecten) weg te filteren, op basis van 2085 DNA profielen van Nederlandse vrijwilligers. Voor de analyse van low template DNA bleek een CE instelling van 9 kV voor 10 seconden optimaal te zijn en alleen voor zeer lage DNA starthoeveelheden (minder dan 31 picogram) wordt het gebruik van extra PCR vermenigvuldigingscycli aanbevolen. Wij adviseren om voornoemde parameters per laboratorium vast te stellen, voordat een nieuwe assay wordt geïntroduceerd als (standaard) assay voor forensisch zaakwerk, om de analyse van complexe mengsels en low template DNA te optimaliseren. De voor NGM™ bepaalde stotterfilters en stochastische drempelwaarden zijn binnen het NFI ingevoerd voor al het zaakwerk sinds 2011.

Soms hebben de 15 STRs die aanwezig zijn in de huidige STR assays niet voldoende onderscheidend vermogen voor de analyse van complexe verwantschapszaken, of wordt het onderscheidend vermogen verminderd doordat incomplete profielen zijn verkregen uit afgebroken DNA. Een redelijk nieuwe assay op de forensische markt (HDplex™) bevat 9 STRs die niet standaard worden toegepast in forensisch DNA onderzoek en analyse van deze markers kan het onderscheidend vermogen vergroten. Met de komst van nieuwe markers wordt het onvermijdelijk dat meerdere markers op hetzelfde chromosoom worden onderzocht. Om de vraag te beantwoorden of deze markers als onafhankelijk van elkaar kunnen worden beschouwd, is onderzoek verricht aan de 30 verschillende STRs die aanwezig zijn in de NGM™, HDplex™ en Identifiler™ assays, zoals beschreven in **hoofdstuk 6**. Op basis van 335 Nederlandse referentie DNA profielen voor deze drie assays zijn geen aanwijzingen gevonden dat twee of meer markers gekoppeld overerven op populatieniveau. Om genetische koppeling binnen families te onderzoeken, werd het DNA van vijf stambomen bestaande uit drie generaties (elk met vier grootouders, twee ouders en zeven tot elf kinderen) onderzocht. Voor een aantal STR paren werd een zwakke genetische koppeling gevonden die effect kan hebben op de interpretatie van DNA gegevens van (sterk) verwante individuen (voor een methode om hier rekening mee te houden bij berekeningen wordt verwezen naar een artikel van Gill en collega's (Forensic Sci Int Genet 6:477-486, 2011)). HDplex™ heeft veel niet-overlappende markers met NGM™ en Identifiler™ en het onderscheidend vermogen per marker ligt gemiddeld hoger dan voor de andere assays; dit maakt HDplex™ een goede, complementaire STR assay die van nut kan zijn in complexe verwantschapszaken en de analyse van afgebroken DNA.

---

In DNA profielen van afgebroken monsters ontbreekt vaak informatie over de langere STR fragmenten. Het gevoeliger maken van de reacties door middel van het uitvoeren van extra PCR vermenigvuldigingscycli of het verhogen van de CE instellingen brengt het risico met zich mee dat de kortere STR fragmenten te veel vermenigvuldigd of overladen worden tijdens de PCR of de CE. In **hoofdstuk 7** is uitgezocht of meer informatie uit de langere STR fragmenten kan worden verkregen door het gebruik van een lengtespecifieke *post-PCR* (uitgevoerd na de PCR) zuiveringsmethode. Deze methode, die gebaseerd is op AMPure® XP bolletjes, is vergeleken met een niet-selectieve zuivering (door middel van DTR gel filtratie) en geen zuivering van de PCR producten. Naast een serie van 39 verschillend afgebroken enkelvoudige DNA monsters werden ook ongelijke mengsels in de verhoudingen 1:5, 1:10 en 1:15 geanalyseerd om meer informatie over de DNA kenmerken van de nevendonor te kunnen verzamelen zonder dat de kortere STR fragmenten van de hoofddonor overladen werden. Na DTR gel filtratie werd een ongeveer tweevoudige toename in piekhoogte gevonden voor allelen op alle markers, terwijl AMPure® zuivering een drie- tot viervoudige toename in piekhoogte veroorzaakte voor de langere maar geen toename voor de kortere STR fragmenten. Beide *post-PCR* zuiveringsmethoden leverden meer gedetecteerde allelen op, met gemiddeld iets meer gedetecteerde allelen (vooral voor de langere fragmenten) na AMPure® zuivering.

Humane identificatie op basis van DNA vindt toepassing in zowel (massa) slachtofferidentificatie, als verwantschaps- en forensisch onderzoek. In **hoofdstuk 8** worden verschillende aspecten van humane identificatie bediscussieerd, met nadruk op de gevolgen van lage kwaliteit en kwantiteit van het DNA. Daarnaast worden de keuzes aangaande humane identificatie op zowel technisch als ethisch niveau besproken.

## Dankwoord

Bijna is het zover. De artikelen zijn geschreven, het proefschrift gelay-out en dan straks de verdediging. Zover had ik niet kunnen komen zonder de steun van velen, zowel op werk als thuis. Heel erg bedankt dat jullie er voor me waren!

Titia, tijdens mijn promotietraject ben jij zonder twijfel mijn belangrijkste leermeester geweest; heel inspirerend vind ik de passie waarmee en de wijze waarop jij experimenten opzet samen met anderen. Grote waardering heb ik voor het feit dat je vele uren van jouw privétijd aan mijn manuscripten besteedde, zodat je ze bijna altijd binnen twee dagen gecorrigeerd weer aan mij terug kon geven; op die manier kon ik "momentum en focus" houden. Peter, vol energie kwam ik altijd terug van de gesprekken die we voerden over nieuwe technieken, de voortgang van mijn onderzoek en onze gezamenlijke liefde voor natuurfotografie. Ik vind het bijzonder dat ik als eerste bij jou mag promoveren. Wiljo, mijn functie als wetenschappelijk medewerker en de mogelijkheid om te promoveren bij het NFI heb ik aan jou te danken en mijn waardering hiervoor is zeer groot. Wim, jouw rustige en beschouwende manier van reageren vind ik heel leerzaam. Natuurlijk wil ik al mijn directe collega's van het R&D team, de stagiairs en de collega's van HBS, NHBS en het FLDO bedanken voor hun hulp bij allerhande zaken, interessante discussies en gezelligheid in en buiten het lab. Ook wil ik graag al mijn coauteurs hartelijk danken voor hun bijdragen aan onze gezamenlijke publicaties. Corina, jou wil ik bedanken voor al je hulp, je openheid, leuke gesprekken en dat je altijd voor me klaar staat; ik vind het fijn dat je me tijdens de verdediging bij wilt staan als paranimf.

Mijn familie en vrienden wil ik bedanken omdat ze er altijd voor me zijn. Een aantal van jullie wil ik hier graag met name noemen. Lise, Jennifer, Frank en E., zonder jullie zou ik niet zijn wie ik nu ben. Dankjewel voor alle gezelligheid, een luisterend oor, een kritische noot en al het plezier dat ik met jullie heb mogen beleven. Elisabeth, ik ben blij dat je me als paranimf terzijde wilt staan.

Jopie en Rolf, mam en pap, ik wil jullie graag bedanken voor jullie onvoorwaardelijke liefde, grote zorgzaamheid en dat jullie er altijd voor me zijn. Andrea, Gezinus en Thies, zonder jullie is mijn familie niet compleet. Bep, Leo, Maartje, Martijn, Amélie en Sophie, wat een geluk dat ik zo'n leuke schoonfamilie heb getroffen.

Jasper, dankjewel voor je prachtige ontwapenende uitspraken en de glimlach die je op mijn gezicht kunt toveren, ook als ik er even doorheen zit.

Lieve Hugo, bedankt voor je wetenschappelijke bijdrage aan dit proefschrift, maar vooral voor al het andere. Jouw ondernemersgeest inspireert me tot het zetten van nieuwe stappen en ik ga graag de volgende uitdaging samen met jou aan!



