



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Advancing forensic RNA profiling

Berge, M.W. van den

Citation

Berge, M. W. van den. (2018, June 28). *Advancing forensic RNA profiling*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62865>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62865>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62865> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Berge, Margreet van den

Title: Advancing forensic RNA orofiling

Date: 2018-06-28

Chapter I I

Summary

Nederlandse samenvatting

List of publications

Dankwoord

Curriculum vitae

Summary

This thesis describes studies that assisted the expanding and advancement of forensic RNA profiling assays used for the inference of body fluids and organ tissues.

Even though DNA and RNA profiling are generally performed alongside and simultaneous to each other, both processes present their own challenges and require distinct expertise and interpretation strategies. **Chapter 1** describes a collaborative exercise undertaken between partners of the European Forensic Genetics Network of Excellence (EUROFORGEN-NoE) on mRNA-based body fluid typing and the interpretation of RNA and DNA data. Nine laboratories participated in the project for which an RNA assay and samples of increasing complexity were centrally prepared and thoroughly tested prior to distribution. The study aimed to give information on the overall sensitivity and specificity of the RNA assay and the reliability of the scoring system. Results of the study support the usefulness of this scoring system, which builds on replicate RNA analysis and the ratio between the number of observed and possible signals for each cell type. This study raises awareness regarding various potential interpretation pitfalls of RNA profiling, such as the realization that the same cell type can be donated by multiple donors, the same donor can donate multiple cell types, cell types can be masked by co-expressed cell-types (e.g. blood in a menstrual secretion sample) and cell types can provide RNA but no DNA (e.g. seminal fluid of an azoospermic male).

Chapter 2 describes various topics assessed to improve RNA profiling. Amongst others, bodily secretions that may be encountered at a crime scene whilst not targeted by the RNA assay were examined for false positive signals. This prompted us to identify a nasal mucosa marker, as 1) nasal mucosa carries a large number of human cells and represents therefore a likely alternative scenario and 2) markers for vaginal mucosa and menstrual secretion can be co-expressed in nasal mucosa. In addition, bacterial markers (*Lactobacillus*) are described to be unsuitable as an alternative for vaginal mucosa RNA markers, as background signals were detected in penile swabs that appeared devoid of female DNA. Furthermore, it is described that vaginal mucosa RNA marker MUC4 is best not considered when penile swabs are analysed. Also, a differential extraction protocol is proposed to facilitate RNA and DNA analysis of both the sperm and non-sperm fraction in sexual assault samples with highly deviating cell type ratios, such as in case of a surplus of (vaginal) epithelial cells and few sperm cells. Next, the relation between DNA and RNA profiling sensitivity was examined by comparing the percentage of alleles or markers on DNA and RNA level when analysing decreasing sample amounts. The associating of DNA and RNA results is discouraged, as the relative sensitivity of the two profiling systems varies for different cell types, donors and markers. Lastly, we show the necessity of using replicate analysis for interpretation of RNA data, as variations can be found even for true technical

replicates.

Alike for DNA profiling, increased noise signals can arise in RNA profiles that difficult interpretation of amplified signals and lead to false positive scoring of absent markers. In **Chapter 3**, various causes and solutions were considered to reduce low level noise signals detected in RNA profiles. The RNA typing multiplexes described in this thesis use custom-made fluorescently labelled primers in combination with commercially available multiplex amplification chemicals. As an increase in noise signals was observed also without the presence of template DNA, it is assumed that noise is caused by destabilisation or aggregation of the fluorescently labelled primers. However, as the composition of the commercial buffer is unknown, we cannot speculate what components may cause this instability.

In recent years, the sensitivity of profiling methodologies has increased tremendously and now allows for analysis of minute evidentiary samples that were previously regarded unsuitable for profiling. Especially when minute evidentiary traces are analysed, background cell material unrelated to the crime may contribute to detectable levels in the genetic analyses. **Chapter 4** describes a study that increased the understanding of the composition of human cell material residing on surfaces contributing to background in evidentiary traces. Samples were selected by considering events contributing to cell material deposits in exemplary activities (e.g. dragging a person by the trouser ankles), and can be grouped as public objects, private samples, transfer-related samples and washing machine experiments. To maximize profiling information, DNA and RNA extracts were concentrated prior to profiling when DNA yields were low. This study shows that high DNA yields do not necessarily relate to an increased number of contributors or to the detection of other cell types than skin, which is the cell type predominantly observed on any type of public or private item. Background cellular material may be found on any type of public or private item. When a major contributor can be deduced in DNA profiles from private items, this can be a different person than the owner of the item. Also, when a “perpetrator” performs a specific activity and the areas of physical contact are analysed, the “perpetrator” does not necessarily represent the major contributor in the DNA profile. While it was confirmed that the presence of sebum can promote DNA transfer, a less strong effect was seen for the presence of sweat, which may be because sweat itself contains only limited amounts of DNA. Washing machine experiments for saliva and bloodstains showed that transfer and persistence during laundry is limited for DNA, and cell type dependent for RNA.

Unlike in the activity-related experimental design described in Chapter 4, forensic casework does not allow for the analysis of pre-activity background samples from the exact same location as post-activity samples. **Chapter 5**, a sequel of Chapter 4, describes therefore the analysis of post-activity background samples taken from an untouched area, that were simultaneously collected post-dragging. This chapter highlights the relevance of including appropriate control region specimens for STR-

profiling in activity-related scenarios. While in post-activity samples alleles matching a perpetrator can be distinguished from background signals, both pre- and post-activity control region samples may yield alleles matching a perpetrator, that are however indistinguishable from background alleles.

The first five chapters of this thesis mainly focus on the RNA-based identification of body fluids, while in forensic cases, such as the event of a violent crime, knowledge regarding the tissue type may be of aid in the reconstruction of the event surrounding the crime. **Chapter 6** describes the development of a novel RNA-based tool for the inference of organ tissues. After applying various selection rounds including target and non-target tissues, markers regarded tissue-specific were combined in a multiplex assay. This assay allows for the inference of seven organ tissue types that are most likely to be found on trauma-causing objects, namely brain, lung, liver, skeletal muscle, heart, kidney and skin tissue. This tool can be of aid for example in shootings, where inferring what type of cell material resides on which bullet is useful for crime scene reconstruction. For complex cases involving multiple shooters, specific bullets with particular organ tissues may be linked to the individual firearms thereby indicating from which gun the lethal shot was fired.

For the applicability of the organ tissue typing assay in forensic casework, primate and target specificity of the system are essential as the presence of animal, rather than human tissue, is an alternative scenario (such as bullets carrying cell material from a hunting event) to be proposed. In **Chapter 7**, primate specificity of the Organtyper assay was confirmed by assessing organ tissue RNAs of various animals. Cross-testing results of both the Organtyper and the Cell-typer assay against target types covered by the other assay stress the importance of using multiple markers per cell type, as single markers may be detected in non-target tissues and the use of increased number of markers per cell type will allow inference with more certainty. Additionally, this chapter emphasizes the importance of awareness regarding unintended marker detection in non-target tissues that is crucial when applying mRNA profiling in casework, as this may lead to incorrect associations.

When postmortem intervals (PMIs) increase such as with longer burial times, human remains suffer increasingly from the taphonomic effects of decomposition processes such as autolysis and putrefaction. It is often assumed that RNA is less stable than DNA and may therefore be unsuitable for forensic analysis. In **Chapter 8**, an RNA-based organ typing assay and a range of DNA profiling techniques were applied to organ tissue samples obtained from excavated graves with burial times ranging from 4 to 42 years. The severely degraded organ tissues either showed poor overall profiling results or varying results for DNA and RNA profiling success, with sometimes DNA and other times RNA profiling being more successful. The association of DNA and/or RNA degradation and the postmortem interval is discouraged, as no relations were observed between nucleic acid profiling results and the PMI. Additionally, no relations were

observed between DNA and RNA profiling success, which is important knowledge for the interpretation of combined RNA and DNA profiling data. Furthermore, results show that not only DNA but also RNA molecules can be remarkably stable (successful for a tissue buried for over 40 years), which corroborate forensic applications. Lastly, insight that the brain and heart tissues tend to provide the best profiling results may change sampling policies in identification cases of degrading cadavers.

In forensics, DNA profiling is used for the identification of the donor of a trace, while mRNA profiling can be applied to identify the cellular origin such as body fluids or organ tissues. In **Chapter 9**, a novel application of RNA typing was explored, namely for the inference of sex. While the presence of male cell material can readily be inferred on DNA level from Y-chromosomal markers in quantitation or DNA profiling, no forensic markers exist for the positive identification of female cell material. The presence of female cell material is inferred only indirectly, *i.e.* from absence or unbalanced response of the Y-chromosomal marker. Female-specific markers may, however, be found on RNA level as certain cellular processes are specific to females. In mammals, the inactivation of one X-chromosome provides X-chromosomal dosage equivalence between XY males and XX females. Since this process involves specific RNA molecules, it was examined if such a marker could be used to identify female cellular material. Additionally, RNAs expressed from the Y-chromosome were examined for the identification of male material. After assessing for sex-specificity, sensitivity, suitability of identifying male-female mixtures and performance on degraded samples, the two sex-specific markers were incorporated in existing RNA assays. This is the first forensic assay enabling positive identification of female cellular material, and the first overlapping information in DNA and RNA profiles.

Chapter 10 is the general discussion of this thesis, which describes amongst others various general aspects regarding cell type inference, such as the use of alternative markers other than mRNA or the use of mRNA for alternative purposes. An overview is given regarding the development of RNA profiling assays at the NFI and their application to casework. Additionally, various concerns or beliefs that may arise concerning RNA profiling in forensic settings, and future developments regarding RNA-based cell type inference are discussed.

Nederlandse samenvatting

In forensisch strafrechtelijk onderzoek is DNA-onderzoek een belangrijk en vaak gebruikt hulpmiddel voor het identificeren van de donor van een spoor. In hedendaags forensisch onderzoek is de vraag echter niet alleen van wie een spoor afkomstig kan zijn, maar steeds vaker ook hoe het spoor daar is gekomen. Een aspect dat informatief kan zijn voor het bepalen van de ontstaanswijze van een spoor is het type cellen dat in het spoor aanwezig is. Het menselijk lichaam bestaat uit triljoenen cellen en tenminste 400 verschillende celtypen, zoals vetcellen en rode- of witte bloedcellen, die ieder hun eigen morfologie en functie hebben. Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar het identificeren van celtypen met behulp van messenger RNA (mRNA). mRNA speelt een belangrijke rol in het bepalen van de functie van een cel, omdat het fungeert als boodschapper tussen de informatie vanuit genen in DNA en het uiteindelijke eiwitproduct dat het echte werk in de cel verzet. mRNA fungeert in een cel als de architect die de bouwtekeningen in het DNA leest en de opbouw van de eiwitten dirigeert. Het is niet zo dat in alle cellen van ieder gen mRNA en eiwit wordt gemaakt. De expressie van genen kan gelimiteerd zijn tot een specifiek celtype; genen die coderen voor eiwitten die betrokken zijn in zuurstoftransport komen bijvoorbeeld wel tot expressie in rode bloedcellen, maar niet in vetcellen. Andere genen kunnen in ieder celtype aanwezig zijn, zoals zogenaamde “huishoudgenen”. Hoewel de genomische informatie (DNA) van een persoon voor alle cellen gelijk is (met uitzondering van de geslachtscellen die elk de helft van het genoom bevatten), komt in elke cel slechts een subset van de genen als mRNA tot expressie. Dit aspect is bruikbaar in forensisch RNA-onderzoek om af te leiden met welk(e) celtype(n) we te maken hebben in een spoor.

De RNA-gebaseerde celtype-identificatiemethoden (assays) van het Nederlands Forensisch Instituut (NFI) richten zich op genen die hoofdzakelijk tot expressie komen in forensisch relevante lichaamsvloeistoffen (met name bloed, speeksel, vaginale mucosa, menstruele secretie, sperma en nasale mucosa (beter bekend als nasaal vocht) die onderscheiden kunnen worden met de “Cell-typer” assay) en orgaan weefsels (met name hersen-, long-, lever-, spier-, hart- en nierweefsel die onderscheiden kunnen worden met de “Organtyper” assay). Deze assays kunnen bijvoorbeeld worden toegepast in zedendelicten waarin de aanwezigheid van vaginale cellen of sperma ter discussie staat, of kunnen bijvoorbeeld van hulp zijn in de reconstructie van een geweldsmisdrijf door het eventueel aanwezige orgaanweefsel op een mes, kogel of ander betrokken voorwerp te onderzoeken.

Op het NFI is mRNA-profilering voor het onderscheiden van lichaamsvloeistoffen voor het eerst toegepast in forensisch zaakonderzoek in 2010. Drie jaar later werd de mRNA-gebaseerde orgaantypering-assay geïntroduceerd in zaakonderzoek. Sinds de

eerste toepassing in een NFI-zaak in 2010 en de tijd van schrijven (december 2017) zijn onderdelen van RNA-profilering in meer dan 200 zaken toegepast. Tot op heden zijn de RNA-resultaten in tien van deze zaken meegenomen in uitspraken in een Nederlandse rechtbank en twee keer in een buitenlandse rechtbank.

De verschillende hoofdstukken van dit proefschrift hebben het onderzoek naar het uitbreiden en verbeteren van forensische RNA-profilering voor het identificeren van lichaamsvloeistoffen en orgaanweefsels als leidraad. Dit onderzoek richtte zich niet alleen op de technische aspecten van de assays maar ook op het toetsen van interpretatierichtlijnen en het uitbreiden van de achtergrondkennis. Hierbij moet gedacht worden aan het aanpassen van de markers in zowel de lichaamsvloeistof- als de orgaantypering-assay wegens uiteenlopende redenen, een Europees samenwerkingsonderzoek naar onder andere de effectiviteit van interpretatierichtlijnen bij RNA-profilering, onderzoek naar de aanwezigheid van achtergrondcelmateriaal en naar de gevoeligheid, specificiteit en robuustheid van de assays bij monsters (samples) van allerlei origine (zoals dierlijk of uit opgegraven lichamen). Onderstaande alinea's geven een meer gedetailleerde samenvatting per hoofdstuk.

Hoewel DNA- en RNA-profilering in het algemeen vanuit eenzelfde bemonstering en op vergelijkbare wijze worden uitgevoerd, kennen beide processen hun eigen uitdagingen en vereisen ze specifieke expertise en interpretatiestrategieën. **Hoofdstuk I** van dit proefschrift beschrijft een samenwerkingsonderzoek uitgevoerd tussen partners van het European Forensic Genetics Network of Excellence (EUROFORGEN-NoE) met betrekking tot RNA-gebaseerde lichaamsvloeistoftypering en de interpretatie van RNA- en DNA-data. Negen laboratoria deden mee in het project waarvoor een RNA-assay en samples van toenemende complexiteit centraal werden voorbereid en grondig werden getest voordat ze over de verschillende laboratoria werden verspreid. De studie had als doel om informatie over de algehele gevoeligheid en specificiteit van de RNA-assay en de betrouwbaarheid van het scoringssysteem te verkrijgen. Resultaten van dit onderzoek ondersteunen de bruikbaarheid van dit scoringssysteem, dat bouwt op herhaalde RNA-analyse en het percentage waargenomen ten opzichte van het aantal mogelijke signalen voor ieder celtype. Deze studie verhoogt het bewustzijn met betrekking tot verschillende mogelijke interpretatievalkuilen van RNA-profilering, zoals het besef dat hetzelfde celtype door meerdere donoren kan worden gedoneerd (bijvoorbeeld speeksel van twee verschillende personen), dezelfde donor meerdere celtypen kan bijdragen (bijvoorbeeld bloed en speeksel van dezelfde persoon), celtypen kunnen worden gemaskeerd door celtypen met gedeelde expressie (bijvoorbeeld bloed in het geval van menstruele secretie) en er celtypen zijn die wel RNA, maar geen DNA bijdragen (bijvoorbeeld spermavloeistof van een azoöspermische man (zoals in geval van sterilisatie)).

Hoofdstuk 2 beschrijft verschillende onderwerpen die zijn onderzocht om RNA-

profilering te verbeteren. Onder andere zijn lichaamsvloeistoffen die wel op een plaats delict kunnen worden aangetroffen maar niet onderscheiden kunnen worden met de RNA-assays onderzocht op de mogelijkheid van het geven van vals-positieve signalen (denk hierbij aan urine, feces, tranen en zweet). Dit heeft geleid tot de identificatie van een nasale mucosa-marker, omdat nasale mucosa een groot aantal menselijke cellen bevat en niezen een gangbare gebeurtenis is. Zodoende is de aanwezigheid van nasale mucosa een realistische bron van celmateriaal van een verdachte (in forensische termen: een realistisch alternatief scenario). De nasale mucosa-marker helpt ook om bloedneusbloed of uitgedamd bloed te kunnen identificeren. Daarnaast kunnen de markers voor vaginale mucosa en menstruele secretie soms ook tot expressie komen in nasale mucosa en met de aanwezigheid van een nasale mucosa-marker in de assay kan nu herkend worden dat het dan niet om vaginale mucosa of menstruele secretie gaat maar om nasale mucosa. Daarnaast werd getoetst of markers voor de bacteriële soort *Lactobacillus*, die in de literatuur waren beschreven als vaginale markers, hiervoor inderdaad geschikt waren. Echter omdat achtergrondsignalen werden gedetecteerd in penisafstrijkjes waar geen vrouwelijk DNA in aangetoond werd, zijn deze bacteriële markers verworpen. Het onderzoek aan deze penisafstrijkjes liet bovendien zien dat de vaginale mucosa RNA-marker MUC4 beter buiten beschouwing gelaten kan worden wanneer dergelijke bemonsteringen worden geanalyseerd omdat er vals-positieve signalen kunnen ontstaan. In zedenzaken kan bij inwendige bemonstering van vrouwen een speciaal protocol worden toegepast waardoor het DNA uit de grote overmaat van vaginale cellen en het DNA uit de weinige eventueel aanwezige spermacellen in andere fracties terecht komt (de sperma- en de niet-spermafractie). Dit heet differentiële extractie en er werd een protocol voorgesteld om naast DNA ook het RNA in deze twee fracties te extraheren. Daarnaast is de relatie tussen DNA- en RNA-profielgevoeligheid onderzocht door het percentage gedetecteerde kenmerken of markers op DNA- en RNA-niveau te vergelijken bij het analyseren van samples met afnemende hoeveelheid materiaal. Omdat de gevoeligheid op DNA- en op RNA-niveau niet gelijk op gaat en kan verschillen tussen de verschillende celtypen, donoren en de verschillende markers binnen hetzelfde celtypen wordt het associëren van DNA- en RNA-resultaten afgeraden. Ten slotte wordt de noodzaak van het uitvoeren van herhaalde RNA-analyses voor de interpretatie van RNA-gegevens benadrukt, omdat zelfs in technische herhalingen variaties kunnen worden gevonden.

Net als bij DNA-profilering kunnen verhoogde ruissignalen ontstaan in RNA-profielen, welke de interpretatie kunnen bemoeilijken en in het ergste geval zouden kunnen leiden tot het vals-positief scoren van afwezige markers. In **hoofdstuk 3** zijn verschillende oorzaken en oplossingen voor het verminderen van deze ruissignalen in RNA-profielen getoetst. De RNA-assays beschreven in dit proefschrift maken gebruik van zelfontworpen primerparen (deze primerparen bepalen welk deel in een sequentie wordt geamplificeerd) met een fluorescent label aan één van de primers

en deze primers worden gebruikt in combinatie met commercieel verkrijgbare amplificatiechemicaliën. Omdat een toename van ruissignalen ook werd waargenomen zonder de aanwezigheid van celmateriaal, wordt aangenomen dat de ruis wordt veroorzaakt door destabilisatie of aggregatie van de fluorescent gelabelde primers. Omdat de samenstelling van de commercieel verkrijgbare buffer onbekend is, kunnen we echter niet achterhalen welke componenten deze instabiliteit kunnen veroorzaken; wel blijken de ruissignalen sterk te verminderen wanneer primers en buffer zo kort mogelijk hoog-geconcentreerd gemengd zijn.

In de afgelopen jaren is de gevoeligheid van de profileringsmethoden enorm toegenomen, wat het analyseren van minimale hoeveelheden celmateriaal, voorheen ongeschikt geacht voor profilering, mogelijk maakt. Vooral wanneer minimale hoeveelheden celmateriaal worden geanalyseerd kan achtergrondcelmateriaal dat geen verband houdt met het misdrijf gedetecteerd worden in de genetische analyse.

Hoofdstuk 4 beschrijft een onderzoek dat de kennis en het begrip vergroot aangaande de aanwezigheid van humaan celmateriaal op oppervlakken die bijdragen aan de “achtergrond” materie in bewijsmateriaal. Bemonsteringen werden geselecteerd door het beschouwen van gebeurtenissen die bijdragen aan het achterlaten van celmateriaal in activiteitgerelateerde scenario's (bijvoorbeeld het slepen van een persoon aan de broekspijpen). Onderzoek is gedaan naar openbare voorwerpen (denk aan deurklinken), privé-objecten (bijvoorbeeld kleding maar ook handen), bemonsteringen na een activiteit (het slepen van een vrijwilliger aan de enkels van de broekspijpen) en bemonsteringen na wasmachine-experimenten (is een broek echt helemaal vrij van humaan celmateriaal na wassen?). Deze studie leverde een aantal inzichten zoals: 1) hoge DNA-opbrengsten hebben niet noodzakelijkerwijs betrekking op een groot aantal donoren of de detectie van andere celtypen dan huid (het celtype dat voornamelijk wordt gedetecteerd op een openbaar of privé-voorwerp); 2) de donor waarvan afgeleid kan worden dat deze het meest heeft bijgedragen in de bemonstering (de zogenaamde DNA-hoofddonor) kan een ander persoon zijn dan de eigenaar van het item; 3) ook de persoon die de “daderrol” had bij een specifieke activiteit is maar in een beperkt percentage van de bemonsteringen de hoofddonor in het DNA-profiel. Deze inzichten helpen het interpreteren van resultaten in de forensische praktijk, met name wanneer niet zozeer betwist wordt of het celmateriaal van een verdachte op een stuk van overtuiging aanwezig is, maar vooral hoe het daar gekomen is (interpretatie op activiteitsniveau). Ook werd gekeken of de conditie van de huid een effect had op het bevorderen van DNA-overdracht; een sterk positief effect werd gevonden voor talg (de huid van de handpalmen bevat geen talgklieren, die op het gezicht en hoofdhuid wel; gewoontes als aanraken van gezicht of hoofdhuid bevorderen dus DNA-overdracht). Een beperkt effect werd gezien voor zweet, mogelijk omdat zweet zelf maar een beperkte hoeveelheid DNA bevat. De wasmachine-experimenten met speeksel- en bloedvlekken toonden aan dat overdracht en persistentie tijdens het wassen beperkt

zijn voor DNA en celtype-afhankelijk zijn voor RNA (speeksel en bloed wordt vrijwel helemaal weggewassen, terwijl huid nog enigszins detecteerbaar blijft).

In tegenstelling tot de activiteitgerelateerde experimentele opzet beschreven in Hoofdstuk 4, is het in forensisch zaakwerk niet mogelijk om achtergrondbemonsteringen af te nemen van exact dezelfde locatie vóór als na een bepaalde activiteit. **Hoofdstuk 5**, een vervolg op Hoofdstuk 4, beschrijft daarom de analyse van bemonsteringen van de kniegebieden van de broekspijpen wanneer vrijwilligers werden versleept door vastpakken bij de enkel. Voor een deel van de enkelbemonsteringen genomen na het slepen, worden duidelijk de DNA-kenmerken overeenkomend met de “dader” gedetecteerd; in de enkelbemonsteringen vóór slepen en de kniebemonsteringen na slepen komen de kenmerken die zouden kunnen overeenkomen met de “dader” niet boven de achtergrond uit. Daarmee benadrukt dit hoofdstuk de relevantie van het meenemen van bemonsteringen van geschikte controlegebieden bij activiteitgerelateerde scenario's.

De eerste vijf hoofdstukken van dit proefschrift richten zich voornamelijk op de RNA-gebaseerde identificatie van lichaamsvloeistoffen, terwijl in forensisch zaakonderzoek, zoals in het geval van een gewelddadig misdrijf, kennis over het type orgaanweefsel van nut kan zijn in het reconstrueren van de gebeurtenissen rondom het misdrijf. **Hoofdstuk 6** beschrijft de ontwikkeling van een RNA-gebaseerde assay voor het onderscheiden van orgaanweefsels. Na het toepassen van verschillende selectieronden, waarvoor onder andere niet-beoogde (non-target) weefsels geanalyseerd zijn om te onderzoeken of kruisreacties konden optreden in weefseltypen waarvoor de assay niet is ontwikkeld, zijn markers die weefselspecifiek werden geacht gecombineerd in één assay. Met deze assay kan onderscheid gemaakt worden tussen zeven orgaantypen die het meest waarschijnlijk zijn om aan te treffen op geweldsvoorwerpen, namelijk hersen-, long-, lever-, spier-, hart-, nier- en huidweefsel. Deze assay kan bijvoorbeeld worden gebruikt in het geval van een schietpartij, waar het afleiden van het type celmateriaal aanwezig op een kogel kan worden gebruikt voor de reconstructie van een misdrijf. In complexe zaken waarbij meerdere schutters betrokken zijn, kunnen specifieke kogels met een bepaald orgaanweefsel gelinkt worden aan individuele vuurwapens, waarmee kan worden achterhaald met welk vuurwapen het dodelijke schot is afgevuurd.

Voor de toepasbaarheid van de orgaantypering-assay in forensisch zaakwerk is humaan- en weefselspecificiteit van de assay essentieel, omdat de aanwezigheid van dierlijk in plaats van humaan materiaal als alternatief scenario kan worden geopperd (zoals een kogel met celmateriaal van een dier na jagen). In **hoofdstuk 7** is bevestigd dat de Organtyper-assay specifiek is voor mensen (strikt genomen primaten) door RNAs uit orgaanweefsel van verschillende dieren te analyseren. Toen de celtypen die doelwit (target) zijn van de Organtyper getest werden met de Cell-typer-assay en vice versa, bleken enkele individuele markers een respons te geven in non-target celtypen.

Dit benadrukt het belang van het gebruik van meerdere markers per celtype, zodat de zekerheid waarmee conclusies getrokken kunnen worden vergroot wordt.

Algemeen wordt aangenomen dat RNA minder stabiel is dan DNA en daarom wordt RNA vaak beperkt geschikt beschouwd voor forensische analyse. Zonlicht, vocht en tijd worden gezien als factoren die nucleïnezuren destabiliseren maar ook microben of de tafonomische processen (postmortale processen als autolyse en putrefactie) die plaatsvinden na overlijden kunnen een negatieve werking hebben. In **hoofdstuk 8** is de op RNA gebaseerde orgaantypering-assay en een scala aan DNA-profileringsstechnieken toegepast op orgaanweefsel samples verkregen van lichamen variërend in postmortaal interval doordat deze lichamen 4 tot 42 jaar begraven hadden gelegen. Voor een aanzienlijk deel van deze organen konden de nucleïnezuren nog geanalyseerd worden ondanks dat de organen sterk aangetast waren door de tafonomische processen; soms was hierbij DNA- en soms RNA-profilering meer succesvol. Het wordt afgeraden om de mate van DNA- en/of RNA-degradatie te gebruiken om het postmortaal interval af te leiden, omdat er geen relaties zijn gevonden tussen nucleïnezuur resultaten en het postmortaal interval. Waarschijnlijk hebben vele andere factoren zoals het vochtgehalte van de bodem, type kleding en kist waarin overledene begraven is, sekse en doodsoorzaak een rol. Het feit dat met succes een RNA-profiel werd verkregen uit een weefsel dat meer dan 40 jaar begraven was ondersteunt sterk de forensische toepassing van RNA-profilering. Ten slotte kan het inzicht dat hersen- en hartweefsel de beste profileringsresultaten opleveren het bemonsteringsbeleid veranderen in geval van identificatiezaken aan ontbindende lichamen.

In forensisch onderzoek wordt DNA-profilering gebruikt voor de identificatie van de donor van een spoor, terwijl RNA-profilering kan worden gebruikt voor het identificeren van de cellulaire origine, zoals lichaamsvloeistoffen of orgaanweefsels. In **hoofdstuk 9** is een nieuwe toepassing van RNA-typering onderzocht, namelijk voor het onderscheiden van sekse. Terwijl de aanwezigheid van mannelijk celmateriaal kan worden afgeleid op DNA-niveau met behulp van Y-chromosomale markers in kwantificatie of DNA-profilering, bestaan er geen forensische markers die direct de aanwezigheid van vrouwelijk celmateriaal aantonen. De aanwezigheid van vrouwelijk materiaal wordt slechts indirect afgeleid, namelijk door de afwezigheid van de Y-chromosomale marker of een ongebalanceerd resultaat bij de bepaling van het X/Y-chromosomale kenmerk bij een man-vrouw mengsel. Vrouwspecifieke markers zouden echter op RNA-niveau gevonden kunnen worden, gezien bepaalde cellulaire processen specifiek voor de vrouw zijn. Zo komt bijvoorbeeld het proces dat zorgt voor de inactivatie van één van de twee vrouwelijke X-chromosomen ten behoeve van doseringsequivalentie tussen XY-mannen en XX-vrouwen alleen bij vrouwen voor. Omdat bij dit proces specifieke RNA-moleculen betrokken zijn, is onderzocht of deze RNAs als marker voor vrouwelijk celmateriaal gebruikt kunnen worden. Daarnaast zijn RNAs die op het Y-chromosoom tot expressie komen onderzocht voor het aantonen

van mannelijk celmateriaal tijdens RNA-profilering. Na het onderzoeken van de sekse-specificiteit, de gevoeligheid, de geschiktheid voor het identificeren van man-vrouw mengsels en de prestaties van de markers op gedegradeerde samples, zijn de twee sekse-specifieke markers opgenomen in de bestaande RNA-assays. Dit is de eerste forensische assay die het mogelijk maakt om vrouwelijk celmateriaal aan te tonen en de eerste overlappende informatie in DNA- en RNA-profielen.

Hoofdstuk 10, de algemene discussie van dit proefschrift, beschrijft onder andere verschillende algemene aspecten met betrekking tot het onderscheiden van celtypen, zoals het gebruik van alternatieve markers (anders dan mRNA), of het gebruik van mRNA voor alternatieve doeleinden. Een overzicht wordt gegeven van de ontwikkelingen van RNA-assays die gebruikt worden bij het NFI en hun toepassing in zaakwerk. Daarnaast worden verschillende bekommernissen of overtuigingen behandeld die kunnen leven ten aanzien van RNA-profilering in forensische context. Ook worden toekomstige ontwikkelingen met betrekking tot RNA-gebaseerde celtyp onderscheiding besproken.

List of publications

Publications on which this thesis was based

A. Lindenbergh*, **M. van den Berge***, R.J. Oostra, C. Cleypool, A. Bruggink, A. Kloosterman, T. Sijen, Development of a mRNA profiling multiplex for the inference of organ tissues, *Int. J. Legal Med.* 127 (2013) 891–900.

**Both authors contributed equally*

M. van den Berge, A. Carracedo, I. Gomes, E.A.M. Graham, C. Haas, B. Hjort, P. Hoff-Olsen, O. Maronas, B. Mevag and N. Morling, H. Niederstätter, W. Parson, P.M. Schneider, D. Syndercombe Court, A. Vidaki, T. Sijen, A collaborative European exercise on mRNA-based body fluid/skin typing and interpretation of DNA and RNA results, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 10 (2014) 40–48.

M. van den Berge, T. Sijen, Advancing forensic RNA profiling: Preventing noise signals in RNA profiling by adding the multiplex buffer last. *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 5 (2015) e518–e519.

M. van den Berge, G. Ozcanhan, S. Zijlstra, A. Lindenbergh, T. Sijen, Prevalence of human cell material: DNA and RNA profiling of public and private objects and after activity scenarios. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 21 (2016) 81–89.

M. van den Berge, B. Bhoelai, J. Harteveld, A. Matai, T. Sijen, Advancing forensic RNA typing: On non-target secretions, a nasal mucosa marker, a differential co-extraction protocol and the sensitivity of DNA and RNA profiling. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 20 (2016) 119–129.

M. van den Berge, D. Wiskerke, R.R.R. Gerretsen, J. Tabak, T. Sijen, DNA and RNA profiling of excavated human remains with varying postmortem intervals, *Int. J. Legal Med.* 130 (2016) 1471–1480.

M. van den Berge, T. Sijen, A male and female RNA marker to infer sex in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 26 (2017) 70–76.

M. van den Berge, T. Sijen, Extended specificity studies of mRNA assays used to infer human organ tissues and body fluids. *Electrophoresis* (2017) 38, 3155–3160

M. van den Berge, L. van de Merwe, T. Sijen, DNA transfer and cell type inference to assist activity level reporting: Post- activity background samples as a control in dragging scenario. *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 6 (2017) e591–e592.

Publications besides this thesis

S.Verheij, L. Clarisse, **M. van den Berge**, T. Sijen, RapidHIT™ 200, a promising system for rapid DNA analysis, *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 4 (2013) e254–e255

C. Haas, E. Hanson, R. Banemann, A.M. Bento, A. Berti, Á. Carracedo, C. Courts, G. De Cock, K. Drobnič, R. Fleming, C. Franchi, I. Gomes, G. Hadzic, S.A. Harbison, B. Hjort, C. Hollard, P. Hoff-Olsen, C. Keyser, A. Kondili, O. Maroñas, N. McCallum, P. Miniati, N. Morling, H. Niederstätter, F. Noél, W. Parson, M.J. Porto, A.D. Roeder, E. Sauer, P.M. Schneider, G. Shanthan, T. Sijen, D. Syndercombe Court, M. Turanská, **M. van den Berge**, M. Vennemann, A. Vidaki, L. Zatkáliková, J. Ballantyne, RNA/DNA co-analysis from human skin and contact traces—results of a sixth collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 16 (2015) 139–147.

M. Marcińska, E. Pośpiech, J. Dyrberg Andersen, **M. van den Berge**, Á. Carracedo, M. Eduardoff, A. Marczakiewicz-Lustig, N. Morling, T. Sijen, M. Skowron, J. Söchtig, D. Syndercombe-Court, N. Weiler, The EUROFORGEN-NoE Consortium, D. Ballard, C. Børsting, W. Parson, C. Phillips, W. Branicki, Evaluation of DNA variants associated with androgenetic alopecia and their potential to predict male pattern baldness, *PLoS ONE* (2015); 10(5): e0127852.

E. Pośpiech, J. Karłowska-Pik, M. Marcińska, S. Abidi, J.D. Andersen, J. D., **M. van den Berge**, A. Carracedo, M. Eduardoff, A. Freire-Aradas, N. Morling, T. Sijen, M. Skowron, J. Söchtig, D. Syndercombe-Court, N. Weiler, P.M. Schneider, D. Ballard, C. Børsting, W. Parson, C. Phillips, W. Branicki, Evaluation of the predictive capacity of DNA variants associated with straight hair in Europeans. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 19 (2015) 280–288.

E. Carnevali, D. Lacerenza, S. Severini, F. Alessandrini, C. Bini, C. Di Nunzio, M. Fabbri, P. Fattorini, A. Piccinini, E. Ponzano, G. Portera, C. Previderè, A. Renieri, F. Scarnicci, A. Verzeletti, S. Pelotti, **M. van den Berge**, T. Sijen, C. Robino. A GEFI collaborative exercise on DNA/RNA co-analysis and mRNA profiling interpretation. *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 6 (2017) e18–e20.

S. Ingold, G. Dørum, E. Hanson, A. Berti, W. Branicki, P. Brito, P. Elsmore, K.B. Gettings, F. Giangasparo, T.E. Gross, S. Hansen, E.N. Hanssen, M.-L. Kampmann, M. Kayser, F.-X. Laurent, N. Morling, A. Mosquera-Miguel, W. Parson, C. Phillips, M.J. Porto, E. Pośpiech, A.D. Roeder, P.M. Schneider, K. Schulze Johann, C.R. Steffen, D. Syndercombe-Court, M. Trautmann, **M. van den Berge**, K.J. van der Gaag, J. Vannier, V. Verdoliva, A. Vidaki, C. Xavier, J. Ballantyne, C. Haas (2018). Body fluid identification using a targeted mRNA massively parallel sequencing approach—results of a EUROFORGEN/EDNAP collaborative exercise. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 34 (2018) 105–115.

Dankwoord

Het voelt als de dag van gisteren dat ik als “broekie” begon aan mijn avontuur bij het NFI. De tijd is voorbij gevlogen, “het boekje” is af en het einde van mijn promotietijd in zicht. Natuurlijk schrijf je zo’n proefschrift niet alleen maar heb ik het geluk gehad dat ik gesteund ben door een heleboel mensen, waarvan ik er een aantal specifiek wil noemen.

In eerste plaatst uiteraard Titia, zonder wiens vertrouwen, vrijheid en steun ik deze mijlpaal nooit had kunnen halen. Vol passie, enthousiasme en humor kon je sparren over experimenten, resultaten en manuscripten. Ik waardeer enorm de tijd en energie die je door de jaren heen in mij hebt gestoken en waarmee we deze uitdaging tot een succesvol einde zullen brengen.

Geen promotie zonder promotor. Peter, grote waardering heb ik voor het vertrouwen en de kans die je mij hebt gegeven om bij jou te promoveren.

Wim, oud-afdelingshoofd van HBS, met wiens steun ik dit promotietraject kon starten. Alle (ex-)collega’s en (ex-)stagiaires van het R&D-team, waarbij ik er een aantal in het bijzonder wil noemen. Alex, vol enthousiasme was jij mijn stagebegeleider toen ik voor het eerst bij het NFI begon. Ik denk nog vaak terug aan deze gave tijd: het opzetten van de orgaantypering-assay en hoe deze nu toegepast wordt in forensisch zaakonderzoek! Corina, bij wie ik altijd terecht kan voor vragen, input of “gewoon” een luisterend oor. Daarnaast uiteraard de stagiaires die ik heb mogen begeleiden gedurende de jaren, waardoor ikzelf ook ben gegroeid. Mijn (ex-)kamerogenoten die het door de jaren heen met mij hebben volgehouden en zorgden voor gezelligheid, een minder serieuze noot en uiteraard de nodige flauwe grap.

Collega’s binnen het NFI met wie ik de afgelopen jaren heb mogen samenwerken, met name van de divisies BiS, BDE en CFS en in het bijzonder de RNA-deskundigen op het gebied van RNA-zaakonderzoek.

Alle coauteurs van de wetenschappelijke artikelen die uit dit promotietraject zijn voortgekomen. Daarbij horen uiteraard ook de verschillende donoren die bereid waren monsters af te staan voor onderzoek. Daarnaast het EUROFORGEN netwerk, voor de financiële ondersteuning en de kansen die verbonden zijn aan een internationale samenwerking.

Dan kom ik nu bij de twee mensen die naast mij zullen staan tijdens de verdediging. Mijn broer Kees en collega Natalie. Fijn dat jullie mij als paranimf willen ondersteunen.

Last but not least: familie en vrienden. In het bijzonder uiteraard het thuisfront. Mijn ouders Krijn en Sjouk en de rest van het nest: Kees-Micha, Jouke-Sanne, Marjolein-Itay, Kristiaan-Sharon, Jasper-Paul en zeker ook Sam-Job-Max-Ben, Julius-Isabelle-Babette, Seth-Emma. Met zoveel steun, levendigheid en enthousiasme komt het altijd goed.

Curriculum vitae

Margreet van den Berge was born in Willemstad, the Netherlands, on April 19th, 1990. She attended high school at the CSG Willem van Oranje in Oud-Beijerland and graduated HAVO in 2008. The same year, she started the Bachelor degree programme Biology and Applied Medical Laboratory Technology at the Avans University of Applied Sciences in Breda. This Bachelor degree included two internships; one at Flinders University in Adelaide, Australia under the supervision of Prof. A. Linacre; and one at the Research and Development (R&D) group of the department of Human Biological Traces at the Netherlands Forensic Institute (NFI) under the supervision of Dr. P.A. Lindenbergh and Dr. L.M.T. Sijen. After her graduation in 2012, she was offered a research position in the R&D group at the NFI, which led to the start of a PhD under the supervision of Dr. L.M.T. Sijen and Prof.dr. P. de Knijff (Leiden University Medical Centre, LUMC). During her time at the NFI, Margreet developed, validated and challenged RNA profiling tools for the identification of body fluids and organ tissues, aiming to expand and advance forensic RNA profiling. After completing her PhD, she will continue to work in the research group at the NFI as a postdoc.