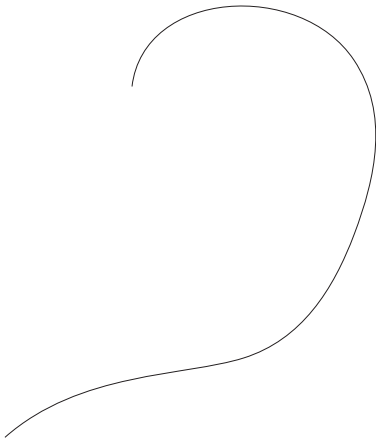


D N A
als gerechtelijk
bewijsmateriaal

DRS. ATE D. KLOOSTERMAN





DNA als gerechtelijk bewijsmateriaal

Drs. Ate D. Kloosterman

Nederlands Forensisch Instituut (NFI)

Volmerlaan 17

2288 GD Rijswijk

Telefoon 070 413 57 47

Fax 070 413 54 56

E-mail a.kloosterman@nfi.minjus.nl

www.DNAsporen.nl

INLEIDING

Bij geweldsmisdrijven en zedendelicten vindt in de regel overdracht van sporen plaats. Bloed, sperma, haren, speeksel en huidschilfers zijn voorbeelden van biologische sporen. Maar ook het wetenschappelijk onderzoek aan andere sporen, zoals vingerafdrukken, vezels, schoensporen, verf kan in veel gevallen wetenschappelijk bewijsmateriaal opleveren en leiden tot de oplossing van een misdrijf. De afdeling biologie van het Nederlands Forensisch Instituut (NFI, voorheen Gerechtelijk Laboratorium) houdt zich bezig met het onderzoek van biologisch bewijsmateriaal. Eerst moeten de biologische sporen worden opgezocht, waarna ze worden veiliggesteld. Dan wordt vastgesteld om welk type spoor het handelt (sperma, bloed, speeksel, epitheelcellen) en het spoor wordt in afwachting van de officiële opdracht van justitie voor het verrichten van een vergelijkend DNA-onderzoek zo goed mogelijk geconserveerd.

GENETISCHE MERKERS, DE BASIS VOOR DE IDENTIFICATIE VAN BIOLOGISCHE SPOREN

Genetische merkers vormen de basis voor de identificatie van biologisch sporenmateriaal bij het forensisch onderzoek. Tot 1988 was het genetisch onderzoek in Nederland beperkt tot de analyse van een aantal polymorfe eiwitten. Bloedgroepantigenen (zoals het ABO- en Rhesus-bloedgroepen-systeem), transplantatieantigenen (HLA-systeem), polymorfe serumeiwitten (haptoglobine, Hp) en polymorfe enzymssystemen (phosphoglucomutase, PGM) zijn voorbeelden van genetische polymorfe eiwitssystemen. De genetische variatie binnen deze eiwitmoleculen is terug te voeren op de individuele variatie die in de genen op het coderende DNA aanwezig is. De genetische variaties van eiwitten worden met serologische en elektroforetische technieken opgespoord. Het aantal polymorfe eiwitssystemen is beperkt. In de praktijk zijn, afhankelijk van de kwaliteit en de hoeveelheid van het monster slechts tien eiwitmerkers geschikt gebleken voor het forensisch onderzoek van bloedsporen. De kans dat een willekeurig onschuldig individu voor alle merkers bij toeval dezelfde typering heeft als het onderzochte bloedspoor bedraagt gemiddeld ongeveer één op duizend. Het aantal genetische eiwitssystemen dat in spermasporen kan worden geanalyseerd, bedraagt in de forensische praktijk slechts twee (hoofdbloedgroep en PGM). De kans dat in een zedenzaak meerdere verdachten voor beide systemen identiek zijn en dus ook de kans dat een onschuldige verdachte in een zedenzaak niet op basis van het klassieke vergelijkende onderzoek kan worden uitgesloten, is groot.

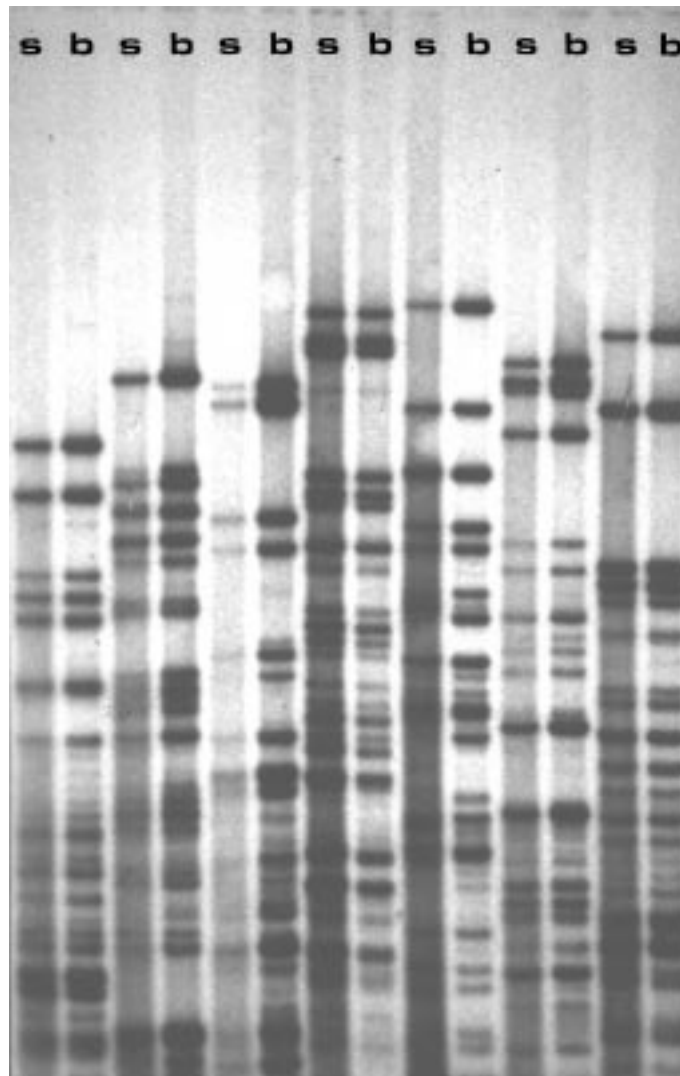
Vooraf de mogelijkheden die het DNA-onderzoek biedt bij het onderzoek aan spermasporen in zedendelicten heeft er voor gezorgd dat het DNA-onderzoek in Nederland een enorme vlucht heeft genomen. Het DNA-onderzoek bezit de potentie om een biologisch spoor te individualiseren met uitsluiting van praktisch elk willekeurig ander individu.

DNA-POLYMORFISME

Dat individuen een verschillende bloedgroep kunnen hebben is terug te voeren op de individuele variatie die er binnen coderende DNA-sequenties bestaat. De genetische informatie die ligt opgeslagen in de celkern is identiek voor elke lichaamscel binnen één individu. Dit is van groot belang omdat bij het vergelijkend DNA-onderzoek bijvoorbeeld een spermaspoor, dat is aangetroffen bij een slachtoffer van verkrachting dient te worden vergeleken met het bloedmonster van een verdachte, dat in opdracht van de rechter-commissaris door een arts is afgenomen. De drijvende kracht achter de genetische variatie in het DNA zijn de spontane mutaties. Indien deze mutaties in de geslachtscellen optreden, worden de veranderingen tijdens de voortplanting op de volgende generaties overgebracht. Hierdoor ontstaan van het desbetreffende stuk DNA twee varianten in de populatie, de oorspronkelijke en de gemuteerde vorm. Een variatie in de volgorde van de bouwstenen noemt men een DNA-polymorfisme. In coderend DNA blijken deze veranderingen veel zeldzamer te zijn dan in niet-coderend DNA. Wanneer het coderend DNA van twee willekeurige individuen wordt vergeleken zien we gemiddeld in slechts één op de drieduizend basenparen een verschil. In niet-coderend DNA is deze variatie tien maal zo groot. Het verschil in mutatiegevoeligheid tussen coderende en niet coderende DNA-sequenties kan worden verklaard doordat een mutatie

in het DNA van structurele genen kan resulteren in de productie van eiwitten met een abnormale structuur en leiden tot een erfelijke aandoening. Mutaties in de niet-coderende gedeelten van het DNA zijn veel minder dramatisch en vormen geen bedreiging voor de levensvatbaarheid of het vermogen tot voortplanting. In de loop van de evolutie ontstaat bij elke nieuwe generatie een grotere verscheidenheid in het DNA. Door de bevolkingsexplosie, de verspreiding van bevolkingsgroepen over de aarde en de vermenging van rassen is een vrijwel eindeloze genetische verscheidenheid ontstaan. De enige individuen met een volledig identieke volgorde van de bouwstenen in hun DNA zijn eeneiige tweelingen. De moderne DNA-technologieën hebben het mogelijk gemaakt de individuele verschillen direct op het niveau van het DNA zichtbaar te maken.

De technologie om de variatie binnen het DNA zichtbaar te maken is voor het eerst beschreven door Sir Alec Jeffreys. In 1985 beschreef hij in Nature een multi locus probe (probe 33.15), waarmee in één keer een groot aantal polymorfe loci konden worden gedetecteerd. Het resultaat was een individu specifiek DNA-profiel, de DNA-fingerprint. De DNA-fingerprint laat zich het best vergelijken met de barcode op een product uit de supermarkt [figuur 1].



figuur 1

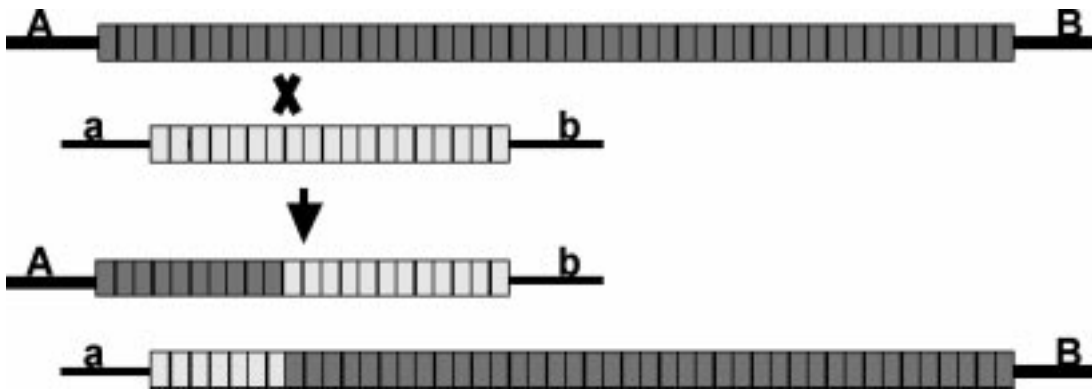
De klassieke DNA-fingerprint

Hier zijn de DNA-profielen van bloed (b)- en spermamonsters (s) van dezelfde mannelijke vrijwilliger met elkaar vergeleken. De verkregen profielen zijn vrijwel individu specifiek.

Een groot nadeel in de forensische praktijk is de relatief grote hoeveelheid DNA (1 microgram) die nodig is voor het vervaardigen van een DNA-fingerprint. Eén microgram DNA kan worden geïsoleerd uit een bloedvlek ter grote van een stuiver.

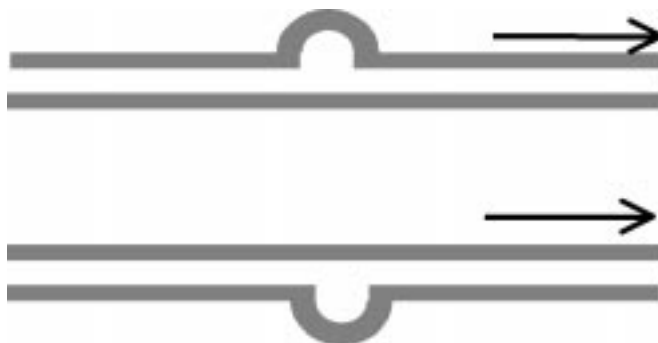
TECHNOLOGISCHE BASIS VAN HET FORENSISCH DNA-ONDERZOEK

Circa veertig procent van het niet-coderend DNA bestaat uit zogenaamd repetitief DNA, dat bestaat uit een aantal kopieën (repeats) van dezelfde basenvolgorde. Repetitief DNA met kopieën van korte stukjes (minimaal tien en maximaal zestig bouwstenen) wordt minisatelliet-DNA genoemd. Als de repeat bestaat uit minimaal twee bouwstenen (CA-repeats) en maximaal 10 spreken we van microsatellieten of Short Tandem Repeats (STR's). Repetitief DNA komt op verschillende plaatsen (loci) voor in het genoom, en een aantal van deze loci zijn buitengewoon gevoelig voor mutaties in het aantal kopieën. Eén van de drijvende krachten achter de mutaties die kunnen leiden tot veranderingen in het aantal repeats is "unequal crossover" tijdens de meiose (figuur 2a). Een ander mechanisme dat leidt tot veranderingen in het aantal repeats is "replication slippage" bij de DNA-synthese (figuur 2b).



figuur 2a

Unequal crossing over tussen de homologe chromosomen leidt tot twee nieuwe repeats (Ab en ab) die elk in lengte verschillen van de oorspronkelijke repeats (AB en ab).



figuur 2b

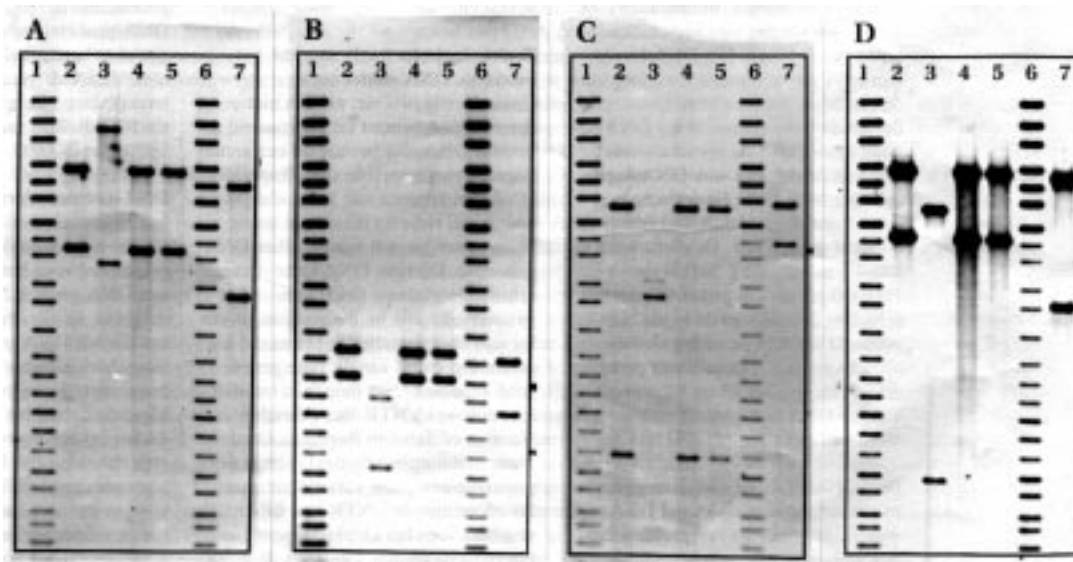
Replication slippage gedurende de DNA-synthese. Slippage gaat meestal gepaard met het verlies (onder) of de winst (boven) van slechts één repeat.

De genetische varianten noemt men ook wel VNTR's (Variable Number of Tandem Repeats). VNTR's erven volgens de wetten van Mendel over; een individu dat voor een bepaald locus op de homologe chromosomen een verschillende DNA-volgorde bezit, noemen we heterozygoot voor het desbetreffende locus. Door hun grote mutatiegevoeligheid is er in de populatie een grote variatie ontstaan. Hierdoor zijn de VNTR-loci bij uitstek

geschikt voor het karakteriseren van biologische sporen. Ondanks de grote mutatiegevoeligheid is de kans op een mutatie per generatie per VNTR-locus gering en bedraagt slechts voor een zeer beperkt aantal VNTR-loci meer dan één procent. Dit maakt dat de VNTR's ook als genetische merker bij het vaststellen van het biologisch onderschap (bijvoorbeeld vaderschapsonderzoek en DNA-identificatie bij rampen) een onmisbaar hulpmiddel zijn geworden.

DE TECHNOLOGIE IN HET PRÉ-PCR TIJDPERK

De technologie om VNTR's te analyseren heeft na de invoering van de Polymerase Chain Reaction (PCR) een radicale verandering doorgemaakt. Tot 1992 werden VNTR's met behulp van de Southern blotting techniek geanalyseerd [figuur 3]. Na autoradiografie of chemoluminescentie werden de restrictiefragmenten zichtbaar die afhankelijk van het onderzochte locus tussen de 1000 en de 10.000 basenparen lang waren. In 1992 deed de PCR zijn intrede in het forensisch DNA-onderzoek en heeft inmiddels de restrictie-enzymen en de nylon membranen volledig verdrongen.

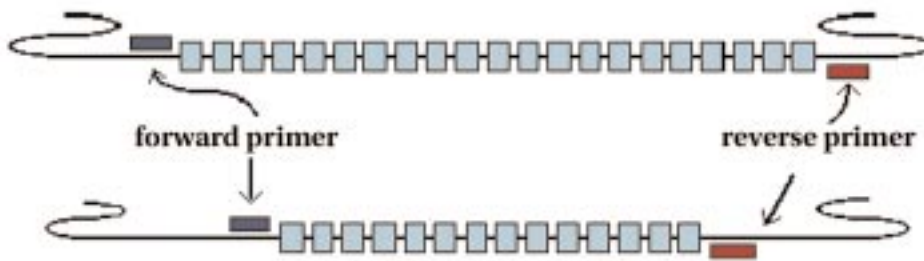


figuur 3

Het klassieke DNA-onderzoek toont vier verschillende DNA-profielen die zijn verkregen bij het DNA-profilingonderzoek na een zedendelict. In laan 1 en 6 zijn de fragmenten van een standaard DNA-fragmentenreeks opgebracht. De lengten van de fragmenten in deze standaardreeks zijn precies bekend. Door de posities van de banden in de DNA-profielen precies op te meten, kunnen door interpolatie eveneens de fragmentlengten van de onderzochte monsters worden bepaald. Laan 2 toont het DNA-profiel van het bloed van de verdachte. Laan 3 toont het profiel van een controle DNA-monster. Dit controle-DNA wordt op elke gel meegenomen en is van belang bij de kwaliteitscontrole. Laan 4 toont het DNA-profiel van het sperma dat is aangetroffen in het schede-uitstrijkje van het slachtoffer. Laan 5 toont het DNA-profiel van het sperma dat is aangetroffen in het slipje van het slachtoffer. In laan 7 is het DNA van het slachtoffer opgebracht. Er werd vastgesteld dat de DNA-profielen van de betwiste spermasporen samenvallen (matchen) met de profielen van de verdachte. In dit geval bedroeg de kans dat een willekeurige Nederlander dezelfde DNA-profielen bezit als die van de onderzochte spermasporen minder dan één op de tien miljoen.

DNA-VERMEERDERINGSTECHNIEK

Voordat DNA-vermeerdering zijn intrede deed in het forensisch onderzoek kon in veel gevallen uit de biologische vlek onvoldoende DNA worden geïsoleerd voor het vervaardigen van een DNA-profiel. Na de inwerkingtreding van de uitvoeringsregelingen van het Besluit DNA-onderzoeken (september 1994) zag het NFI zich bovendien geconfronteerd met de problematiek rond het recht van de verdachte op een tegenonderzoek. De wet stelt dat er bij een DNA-onderzoek niet meer celmateriaal verloren dient te gaan dan strikt noodzakelijk is en dat er voldoende celmateriaal wordt achtergehouden voor een tegenonderzoek. Sporenmateriaal is evenwel uit de aard der zaak schaars en het is in een relatief groot aantal gevallen onmogelijk om voldoende DNA uit het sporenmateriaal te isoleren ten behoeve van twee DNA-onderzoeken. Een bijkomend nadeel van het 'klassieke DNA-onderzoek' is de tijd die het onderzoek vergde (onderzoeksduur circa 4 weken). Het is niet verwonderlijk dat een dergelijk lange onderzoeksperiode regelmatig vragen van de opdrachtgever oplevert. Tegenwoordig wordt bij het forensisch DNA-onderzoek gebruik gemaakt van DNA-vermeerdering met behulp van de Polymerase Chain Reaction (PCR). Sedert 1994 heeft de PCR-technologie grote opgang gemaakt binnen het forensisch DNA-onderzoek. Bij het forensisch DNA-PCR-onderzoek worden STR-loci gebruikt die korte repeterende stukjes hebben (meestal tetranucleotide repeats waar de repeats uit 4 bouwstenen bestaan). Het principe is weergegeven in *figuur 4*. De primers worden zo gekozen dat ze buiten de repeat region binden. De primer binding sites dienen geconserveerde sequenties te zijn, dit wil zeggen dat in de primer binding region de kans op een mutatie klein is. Een mutatie in de primer binding region kan ertoe leiden dat de primer niet kan binden, waardoor het betreffende allel niet vermenigvuldigd kan worden.



figuur 4

Dit individu is heterozygoot voor een bepaald STR-locus. Het locus op het ene chromosoom heeft 21 repeats, het locus op het andere chromosoom bezit 14 repeats. Volgens de algemeen geaccepteerde nomenclatuur is het individu voor dit locus een 14/21. In dit geval bezit de reverse primer een fluorescentie label, zodat de PCR-producten met behulp van een excitatie laser en een geschikte detector real time in een polyacrylamide gel kunnen worden gedetecteerd. Dit maakt het systeem geschikt voor verregaande automatisering

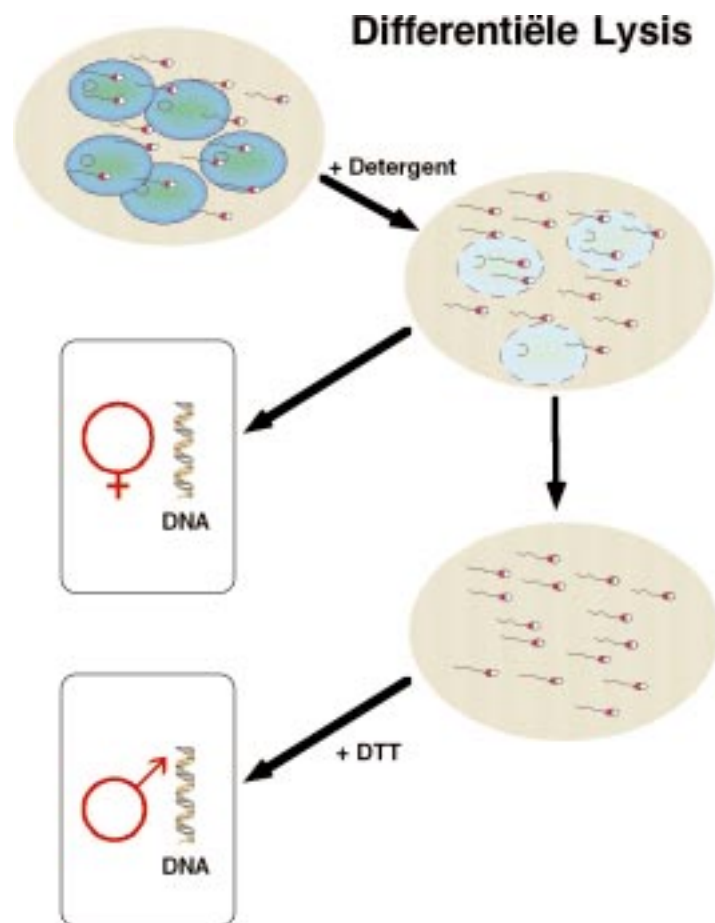
De DNA-vermeerderingstechniek biedt de mogelijkheid om de herkomst van minimale hoeveelheden biologisch materiaal vast te stellen. Met name van zeer kleine bloed- en spermasporen, waarvan met de Southern blotting technologie geen profiel kon worden vervaardigd, kan met de PCR-techniek in veel gevallen de herkomst worden vastgesteld. Maar ook de herkomst van biologische sporen als speeksel op een sigarettenpeuk en wortelmateriaal van één enkele haar kan op deze wijze bepaald worden.

Omdat de te amplificeren DNA-fragmenten nooit langer zijn dan 400 basenparen is de DNA-vermeerderingstechniek ook bijzonder geschikt om profielen te vervaardigen van DNA dat afgebroken is. Afgebroken DNA vindt men in de regel in oude dan wel in deels in staat van ontbinding verkerende biologische monsters.

TECHNISCHE UITVOERING VAN HET DNA PCR-ONDERZOEK

Als voorbeeld dient hier het DNA-onderzoek bij zedenzaken. In een groot aantal van de gevallen wordt bij het laboratoriumonderzoek van zedenzaken sperma aangetroffen. In de regel worden de spermasporen aangetroffen in de kleding (slijpje) van het slachtoffer en in de schede-uitstrijkjes, welke na het delict door de (politie)arts van het slachtoffer zijn genomen. In deze gevallen is het aangetroffen sperma meestal vermengd met celmateriaal (vaginale epitheelcellen) van het slachtoffer zelf.

Bij het DNA-onderzoek is het evenwel mogelijk om het mannelijke DNA, opgesloten in de spermacellen, te scheiden van het vrouwelijke DNA, dat zich in de vaginale epitheelcellen bevindt. Met behulp van een speciale techniek (differentiële lysis, *figuur 5*) wordt het mannelijke DNA gescheiden van het vrouwelijke DNA in de vaginale epitheelcellen. Op deze wijze worden twee verschillende DNA-fracties verkregen: de mannelijke-DNA-fractie uit de spermacellen en de vrouwelijke DNA-fractie. Van de twee verkregen DNA-fracties worden vervolgens afzonderlijke DNA-profielen vervaardigd.

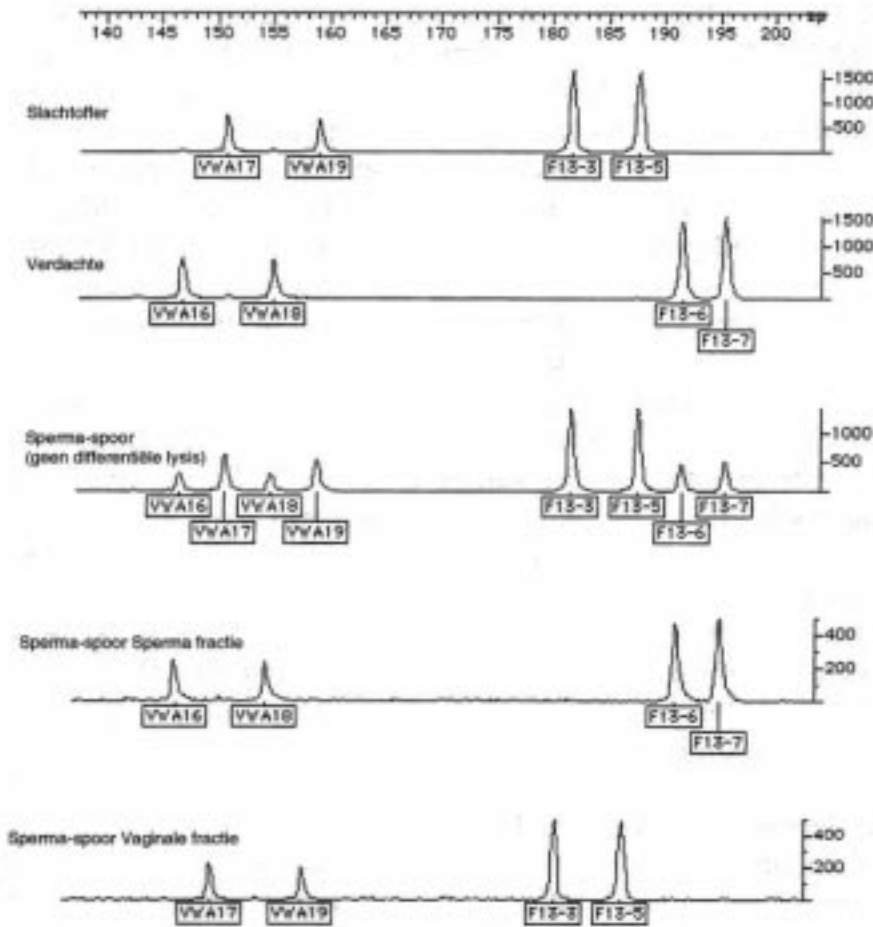


figuur 5

Hier wordt het principe van de differentiële lysistechniek getoond. De cellen in het schede-uitstrijkje spermavlek worden met detergens behandeld, waardoor de vaginale epitheelcellen lyseren en het DNA van de vrouwelijke cellen in oplossing komt. De spermacellen blijven intact en kunnen vervolgens door centrifugeren worden gescheiden van de vrouwelijke DNA-fractie. De spermacellen worden vervolgens met dithiotreitol (DTT) behandeld om het DNA uit de spermacellen vrij te maken. De mannelijke en vrouwelijke DNA-fracties worden afzonderlijk opgewerkt en onderzocht.

Figuur 6 toont een voorbeeld van het DNA-PCR-onderzoek met automatische detectie van de DNA-fragmenten. De hypervariabele, vermeerderde DNA-fragmenten worden op grootte gescheiden en met behulp van een automatische DNA-sequencer 'real-time' gedetecteerd. Na bewerking van de verkregen resultaten met behulp van de bij de apparatuur behorende software worden de DNA-profielen verkregen. Bij het huidige vergelijkend DNA-onderzoek met behulp van DNA-vermeerdering worden tegelijkertijd tien verschillende hypervariabele STR-loci vermeerderd (multiplex PCR) en gedetecteerd. Binnen 24 uur kan nu een volledig DNA-profiel worden verkregen.

Geautomatiseerde detectie van DNA PCR-fragmenten



figuur 6

toont de patronen van twee verschillende STR -loci. Het betreft de profielen welke zijn verkregen na het DNA-vermeerderingsonderzoek in een zedendelict. Van boven naar beneden worden de profielen van de vergelijkingsmonsters van het slachtoffer en de verdachte en de profielen van het spermaspoor getoond. Het DNA-profiel van het sperma-DNA blijkt identiek aan het DNA-profiel van de verdachte. Het DNA -profiel van de vaginale celfractie is identiek aan het profiel van het slachtoffer; hierdoor ontstaat een extra controle op de identiteit van het onderzochte spoor. Indien geen differentiële lysis wordt toegepast, ontstaat er een mengprofiel.

STATISTISCHE ASPECTEN EN DE BEWIJSKRACHT VAN HET DNA-ONDERZOEK

Door de ingeburgerde naam 'DNA-vingerafdruk' wordt de indruk gewekt dat ieder mens een uniek DNA-profiel heeft. Dit is een misvatting. Hoewel gesteld kan worden dat ieder mens een uniek genoom heeft (uitgezonderd identieke tweelingen), maakt een DNA-profiel slechts een gedeelte hiervan zichtbaar. Naarmate een profiel meer

loci zichtbaar maakt is het aantal personen met overeenkomende profielen kleiner.

Wanneer de deskundige constateert dat het DNA-profiel van bijvoorbeeld een spermavlek van een verkrachter en het DNA-profiel van een verdachte overeenkomen, dan zegt deze overeenkomst op zich dus niet zo veel. Waar het om gaat is de vraag hoe zeldzaam de gevonden overeenkomst is. Aangenomen dat een 'onschuldige verdachte' geen verwantschap heeft met de verkrachter, komt deze vraag neer op de vraag welk percentage van de bevolking een DNA-profiel heeft dat overeenkomt met het profiel van de spermavlek. Bij deze vraag zit een addertje onder het gras: wat is 'de bevolking'? Is dat de plaatselijke bevolking, de Nederlandse bevolking, de bevolkingsgroep waartoe de verdachte behoort, enzovoorts? Welnu, uitgaande van een 'onschuldige verdachte' heeft een willekeurig individu uit de populatie van mogelijke verkrachters de spermavlek achtergelaten en de vraag is dus eigenlijk wat de frequentie is van overeenkomende DNA-profielen in deze populatie. Om deze frequentie te kunnen schatten zijn gegevens noodzakelijk van DNA-profielen van de populatie mogelijke verkrachters. Deze gegevens zijn in de praktijk natuurlijk niet voorhanden. Wel zijn er inmiddels van een groot aantal verschillende bevolkingsgroepen over de hele wereld gegevens beschikbaar. Hieruit blijkt dat er verschillen zijn tussen bevolkingsgroepen wat betreft de frequentie waarmee elk profiel voorkomt. Uitgaande van een verkrachter uit bevolkingsgroep A is de geschatte frequentie van de DNA-profielen die overeenkomen met de spermavlek dus anders dan uitgaande van bevolkingsgroep B. Evenwel is uit statistisch onderzoek gebleken dat deze verschillen er in de praktijk weinig toe doen omdat elk DNA-profiel dat bestaat uit meerdere loci zeer zeldzaam is in alle bevolkingsgroepen (WEIR EN EVETT 1993).

Het NFI maakt voor zijn berekeningen gebruik van een databestand waarin de DNA-profielen zijn opgeslagen van blanke Nederlandse medewerkers van het NFI. Aan de hand van dit bestand worden de frequenties van de DNA-profielen geschat voor de blanke Nederlandse bevolking. In rapporten wordt aangegeven hoe vaak het gevonden DNA-profiel voorkomt in deze bevolkingsgroep. Hoewel zoals boven vermeld de gerapporteerde frequentie dus enigszins kan afwijken voor andere bevolkingsgroepen, is op grond van wetenschappelijk onderzoek te verwachten dat een DNA-profiel dat zeldzaam is in de blanke Nederlandse bevolking ook zeldzaam zal zijn in andere bevolkingsgroepen. De medewerkers van het NFI vormen geen aselechte steekproef uit de blanke Nederlandse bevolking. Hierdoor zou in principe de frequentie van DNA-profielen in het bestand sterk kunnen afwijken van de landelijke frequentie. Een vergelijking met het gegevensbestand van het Forensisch Laboratorium voor DNA-onderzoek te Leiden (FLDO, het laboratorium dat is aangewezen voor de contra-analyses), dat op een volledig andere wijze is samengesteld, liet echter geen verschillen zien. Ook buitenlands onderzoek heeft aangetoond dat er geen reden is om te twijfelen aan de representativiteit van de bestanden.

FREQUENTIEBEREKENINGEN

Het gegevensbestand van het NFI bestaat uit de DNA-profielen van circa 250 personen. Toch worden frequenties gerapporteerd van minder dan één op de vele miljoenen of zelfs minder dan één op de miljard. Deze zeer lage schattingen worden verklaard door het vermenigvuldigen van de geschatte frequenties van de afzonderlijke fragmenten waaruit het DNA-profiel bestaat. Als bijvoorbeeld een bepaald DNA-profiel uit vier verschillende STR-loci bestaat die elk voorkomen bij tien procent van de personen in het bestand dan wordt voor het schatten van de frequentie van het DNA-profiel 4 maal vermenigvuldigd met 0.1. Er wordt dus vermenigvuldigd met $0,1^4 = 0.0001$ (één op tienduizend). Bovenstaande vermenigvuldiging is alleen correct onder de aanname dat:

1. de twee fragmenten op één locus onafhankelijk van elkaar zijn (dat wil zeggen dat informatie over de lengte van het ene fragment geen informatie geeft over de lengte van het andere fragment);
2. dat de fragmenten van twee verschillende loci onafhankelijk van elkaar zijn.

Om te onderzoeken of deze aannamen gerechtvaardigd zijn, is het databestand van het NFI met statistische technieken onderzocht op mogelijke afwijkingen. Deze zijn niet gevonden, zodat de vermenigvuldiging verantwoord kan worden toegepast. Ook in buitenlandse onderzoeken wordt slechts hoogst zelden een afwijking geconstateerd en wordt de vermenigvuldiging alom toegepast.

De lage frequenties die aldus gerapporteerd worden hebben echter alleen betekenis als er geen aanwijzingen zijn dat de dader in de familiekring van de verdachte gezocht moet worden. De kans dat bijvoorbeeld een broer van de verdachte ook een DNA-profiel heeft dat overeenkomt met de spermavlek van de dader is weliswaar klein, maar toch vele malen groter dan de kans dat het overeenkomt met het DNA-profiel van een willekeurig individu uit de bevolking. De verklaring hiervoor is dat van de twee fragmenten die een individu op elke locus heeft, er één geërfd is van zijn moeder en één van zijn vader. Voor de VNTR-loci geldt dat de twee fragmenten gelijke kans hebben om te worden doorgegeven aan een kind. Voor twee broers geldt dus dat er een kans van één op twee is dat zij hetzelfde fragment erven van hun moeder. Hetzelfde geldt voor de vader, zodat er een kans van één op vier is dat zij dezelfde twee fragmenten erven van hun ouders (identical by descent). Omgekeerd houdt deze kanttekening echter ook in dat als de DNA-profielen van een verdachte en een sperma-spoor overeenkomen maar de verdachte onschuldig blijkt, de dader mogelijk familie is van de verdachte.

HARMONISATIE BINNEN EUROPA EN DE REST VAN DE WERELD

Vanaf de introductie van het forensisch DNA-onderzoek is binnen Europa veel aandacht besteed aan de harmonisatie en standaardisatie van het forensisch DNA-onderzoek. Alle forensische DNA-wetenschappers onderschreven het grote belang om technisch de mogelijkheden te bieden tot het uitwisselen van DNA-gegevens. Met het opheffen van de grensformaliteiten binnen Europa kan worden verwacht dat ook de criminelen zich over de landsgrenzen zullen bewegen bij hun criminele activiteiten. Het uitwisselen van vingerafdrukken via de Interpol organisatie is één van de antwoorden van de autoriteiten om cross border criminaliteit te bestrijden. Ook de uitwisseling van DNA-profielen is inmiddels technisch mogelijk geworden. Hiertoe moesten twee belangrijke aspecten worden gestandaardiseerd. Ten eerste moest er consensus zijn over de te onderzoeken DNA-merkers. Alleen als iedereen dezelfde set van DNA-merkers (loci) gebruikt is vergelijking mogelijk. Bovendien moest de nomenclatuur worden gestandaardiseerd naar het aantal repeats in het STR-fragment (*figuur 4*). Samen met het DNA-contralaboratorium in Leiden en met veel van onze collega-instituten in Europa zijn meerdere testsystemen geëvalueerd, waar vooral is gekeken naar robuustheid en reproduceerbaarheid. Ook aspecten als kostenbeheersing en mogelijkheid tot automatisering bepalen de uiteindelijke keuze. De Europese labs hebben in 1996 gekozen voor het SGM-systeem (Second Generation Mix). Van 1996 tot eind 1999 heeft het NFI bij het routinematige DNA-onderzoek gebruik gemaakt van deze multiplex PCR techniek, waarmee in één keer 6 merkers op verschillende chromosomen en een sexspecifieke DNA-merker worden vermenigvuldigd en geanalyseerd. Met deze laatste merker kan het geslacht van de DNA-donor worden achterhaald. De kans dat een willekeurig (onschuldig) individu een identiek SGM-profiel bezit als het profiel in de betwiste vlek is minder dan één op de miljoen. Een groot voordeel van de integrale Europese aanpak is dat we nu technisch in staat zijn DNA-profielen uit te wisselen. Een DNA-profiel van een onopgelost misdrijf kan met een verzoek van het Bureau Internationale Rechtshulp worden vergeleken met de DNA-databestanden van de ons omringende landen.

DE LAATSTE ONTWIKKELING OP HET GEBIED VAN FORENSISCH DNA-ONDERZOEK: DE SGM PLUS KIT

In de praktijk is gebleken dat met de set van de 6 SGM merkers (VWA, D8S1179, D21S11, D18S51, THO en FGA) bij de meeste strafzaken voldoende bewijskracht werd verkregen. Toch bestond er regelmatig behoefte om meer genetische merkers te onderzoeken. Vooral als een verdachte door middel van een "hit" met de profielen in het DNA-databestand is geïdentificeerd bestaat de behoefte om de gevonden match te bevestigen door de verdachte en het spoor voor een aantal andere DNA-merkers te typeren. In voorkomende gevallen heeft het NFI hiervoor de beschikking over een aantal monoplex PCR systemen.

Eind 1999 is binnen Europa het SGM Plus multiplex PCR systeem geïntroduceerd. Met dit multiplex systeem worden alle loci van het SGM-systeem geanalyseerd, bovendien zijn vier nieuwe DNA-merkers aan het systeem toegevoegd: D16S539, D2S1338, D3S1358 and D19S433 (*tabel 1*). Voordat een nieuwe DNA-tets in de praktijk wordt gebruikt op biologische sporen van misdrijven, ondergaat het een uitgebreide reeks validatie experimen-

ten. Als deze experimenten volledig en naar tevredenheid zijn afgerond wordt een accreditatie voor het nieuwe systeem aangevraagd bij de Raad van Accreditatie. Pas nadat het certificaat is ontvangen volgt de daadwerkelijke invoering. Hier volgt een overzicht van enkele experimenten die in het SGM Plus validatie traject zijn verricht:

- Robuustheid van het systeem met betrekking tot DNA-input concentratie. De optimale DNA-template concentratie (afhankelijk van de kwaliteit van het DNA-monster) bedraagt tussen de 0,2 en de 1,0 nanogram DNA per reactie. Van alle monsters die op het NFI worden vermeerderd wordt de DNA-concentratie semi-kwantitatief gemeten met een dot-blot en gebruikmakend van een humaan specifieke DNA-probe. Te hoge input (10 nanogram) mag evenwel niet leiden tot een foute typering. Een te lage DNA-concentratie kan ertoe leiden dat de pieken niet meer afleesbaar zijn, maar mag niet leiden tot een mistypering.
- Suboptimale PCR-condities (bijvoorbeeld een tot 1,5 °C afwijkende annealingstemperatuur) mogen niet leiden tot foutieve typeringen.
- Veel aandacht is besteed aan de meetnauwkeurigheid van de DNA-fragment analyse apparatuur. De DNA-fragmenten worden immers getypeerd aan de hand van hun lengte. Gebleken is dat de standaard deviatie (SD) ongeveer 0.2 bp bedraagt. Goed genoeg om opeenvolgende fragmenten, welke 4 basenparen (of in het geval van varianten 1 of 2 basenparen) in lengte van elkaar verschillen te onderscheiden.
- Binnen Europa zijn een aantal onbekende DNA-monsters naar de diverse forensische laboratoria verzonden. De SGM Plus typeringen van alle deelnemers zijn vergeleken. De robuustheid van het nieuwe systeem werd hier duidelijk gedemonstreerd, alle deelnemende laboratoria waren in staat de rondgestuurde monsters correct te typeren.
- Ten behoeve van onze forensische berekeningen is van 230 blanke Nederlandse individuen een SGM Plus profiel gemaakt. In uitgebreide statistische berekeningen zijn geen aanwijzingen gevonden op afwijkingen, zodat de vermenigvuldiging verantwoord kan worden toegepast. Het meest voorkomende SGM Plus profiel heeft een frequentie van minder dan één op de twee miljard!

Met het SGM plus systeem worden vrijwel individu specifieke profielen verkregen. Ook een match tussen de profielen van een spoor van een onopgelost misdrijf en een verdachte in het DNA-databestand wordt met dit nieuwe systeem zeer veelzeggend. De kans op een toevallige match is ook in een zeer goed gevulde database zeer klein.

Tabel 1 geeft de bijzonderheden omtrent de genetische systemen (loci) in het SGM Plus systeem.

Locus	Chromosoom
Amelogenine ¹	X en Y chromosoom
D3S1358*	3
VWA*	12
D16S539	16
D2S1338	2
D8S1179*	8
D21S11*	21
D18S51*	18
D19S433	19
TH01*	11
FGA*	4

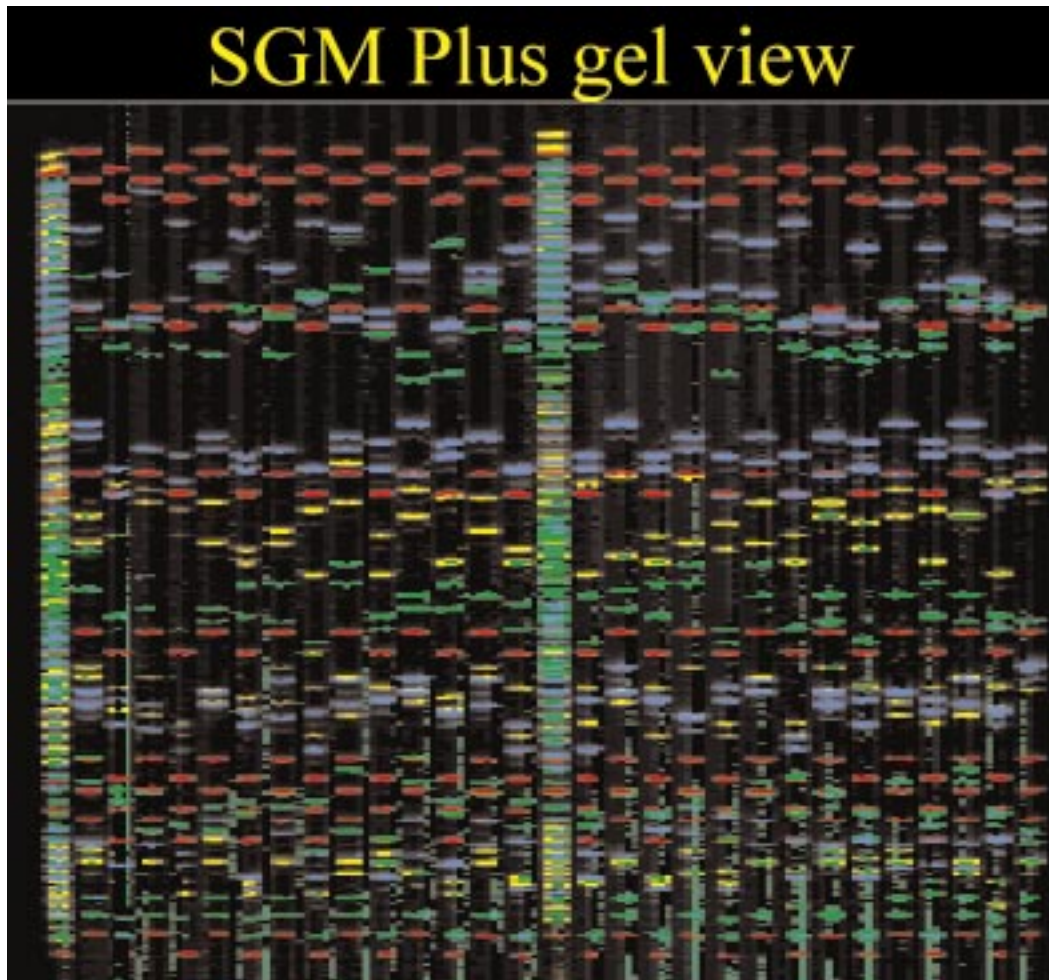
Toelichting tabel

1. het amelogenine locus bevindt zich op de geslachtschromosomen, aan de hand van de typering van dit locus kan worden vastgesteld of de donor van het celmateriaal van het mannelijke (X/Y) dan wel van het vrouwelijke (X/X) geslacht is.
2. *: deze 7 loci gelden als core loci binnen Europa, d.w.z. dat elk forensisch lab deze set van DNA-markers altijd bij het DNA-onderzoek betreft. Deze core loci zijn ook als zodanig door Interpol aangemerkt en worden bovendien in de VS en in Canada standaard getypeerd. Technisch wordt het mogelijk om DNA-profielen van onopgelostemisdrijven wereldwijd te vergelijken.

t a b e l 1

De loci op het DNA welke met de SGM Plus test worden onderzocht

Figuur 7 geeft de "gelview" van het SGM Plus systeem op de automatisch sequencer. Voor de primers van de 11 verschillende systemen zijn drie verschillende fluorescentie labels beschikbaar (blauw, groen en geel). De vierde kleur (rood) is gereserveerd voor de internal lane standaard. Deze sizing standaard met DNA-fragmenten van een bekende lengte loopt met elk te onderzoeken monster op de gel mee. Door interpolatie worden lengtes van de PCR-fragmenten berekend. Uit de verkregen lengte volgt het aantal (tetranucleotide) repeats in het fragment. De primers van de loci die een overlappende fragmentlengte bezitten, dragen een verschillende kleur label, waardoor de PCR-fragmenten ondubbelzinnig voor het betreffende locus worden herkend.

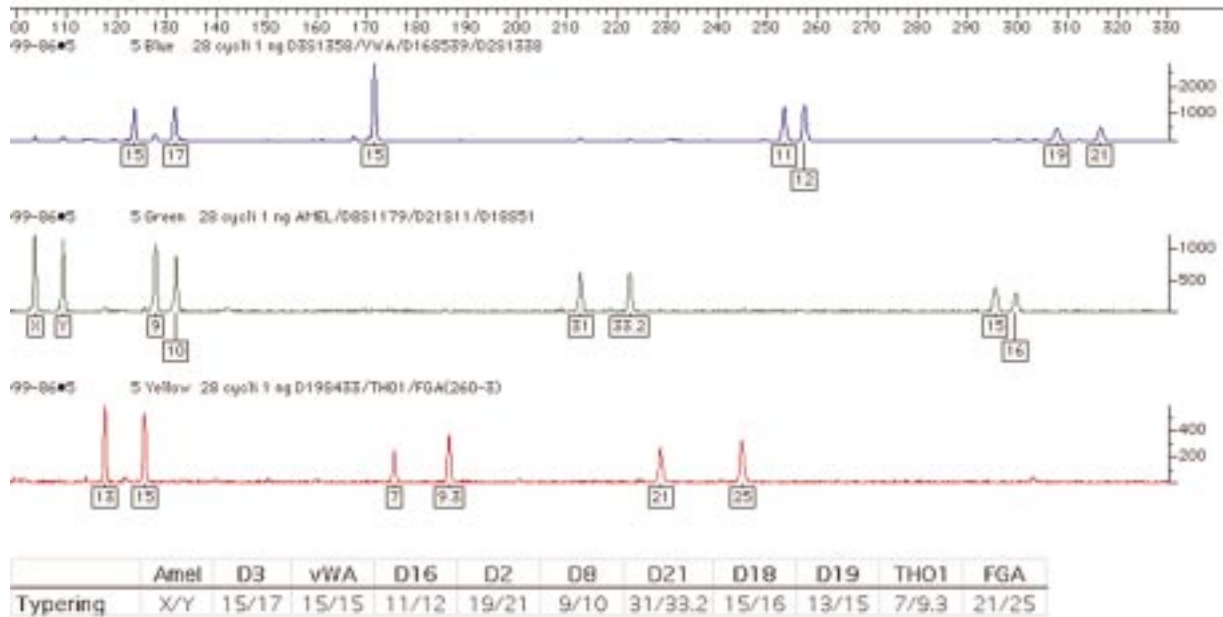


figuur 7 : SGM Plus gelview.

In laan 1 en 16 is de allelische ladder opgebracht. De allelische ladder bevat alle bekende allelen van de 10 verschillende genetische systemen. De overige lanen bevatten het DNA van verschillende individuen ten behoeve van een populatie genetische studie.

Het is duidelijk te zien dat de verschillende loci die elkaar qua fragmentlengte overlappen een verschillend fluorescentie label dragen.

Figuur 8 toont het SGM plus profiel van het DNA uit een wanguitstrijkje van een mannelijke student van het laboratorium. Zijn profiel komt met een frequentie van "één op de 500 duizend miljard" in de Nederlandse populatie voor. Zeer frappant was dat de bezitter van dit zeer bijzondere profiel aangaf een eeneiige tweelingbroer te bezitten!



figuur 8: Het SGM plus profiel van een mannelijk (XY) individu.

Het bovenste piekenpatroon (in blauw) geeft van links naar rechts de PCR producten weer van de loci D3, vWA, D16 en D2 (tabel 1).

Het middelste piekenpatroon (in groen) geeft van links naar rechts de PCR producten weer van het sex-specifieke locus amelogenine en van de loci D8, D21 en D18.

Het onderste piekenpatroon (in rose) geeft van links naar rechts de PCR producten weer van loci D19, TH01 en FGA.

DNA-DATABASES

In 1995 is Groot-Brittannië begonnen om van alle personen, die met justitie in aanraking kwamen een DNA-monster te nemen en het DNA-profiel op te nemen in de DNA-database. Nu, vier jaar later spreken de Engelse autoriteiten over een geweldig succes. Inmiddels (1 december 2000) bevat de Engelse databank de profielen van bijna 1 miljoen individuen en 70.000 sporen van onopgeloste misdrijven. Er worden meer dan 300 hits per week gevonden. De meest tot de verbeelding sprekende hit is die, waar het profiel van een spoor van een onopgelost misdrijf overeenkomt met het profiel van een verdachte in de database. Deze informatie leidt vaak tot een spoedige oplossing van het misdrijf. Maar ook in die gevallen waar blijkt dat het profiel van een spoor in het ene misdrijf overeenkomt met een spoor uit een ander misdrijf kan voor de politie belangrijke informatie zijn. In de tussentijd hebben binnen Europa ook andere landen de beschikking over een nationale DNA-database gekregen, Nederland, Oostenrijk, Finland, Zweden en Duitsland. Door een veel terughoudender wetgeving is in deze landen het aantal profielen in de database veel kleiner. In maart 2000 bevatte de Nederlands DNA-profielenregistratie de profielen van 500 verdachten en 2000 sporen van onopgeloste misdrijven. Toch zijn met dit relatief kleine databestand inmiddels enkele voor justitie interessante hits verkregen.

De DNA-registratie in het Nederlandse strafrecht systeem kent een solide kwaliteitssysteem en een grote zorgvuldigheid. De toegankelijkheid tot de informatie is aan strenge regels gebonden. De profielen zijn anoniem in het bestand opgenomen, dit wil zeggen dat de naam van de verdachte geen deel uitmaakt van de informatie in de database. Een zoekactie in de database kan alleen in opdracht van de bevoegde autoriteit (Rechter Commissaris of Officier van Justitie) en de informatie wordt alleen aan de opdrachtgever teruggerapporteerd. Aan de andere kant moeten de autoriteiten voor de opdracht zorgen dat de DNA-profielen van personen die onterecht in de DNA-database blijken te zijn opgenomen (bijvoorbeeld door vrijspraak) worden verwijderd.

OVERIGE FORENSISCHE DNA-ONDERZOEKEN

In voorkomende gevallen biedt de typering van de autosomale STR-loci geen uitkomst. Dit kan zijn omdat het monster te weinig genomisch DNA bevat, zoals bij de analyse van uitgevallen haren of bij de DNA-identificatie van zeer oude botten. De twee hieronder te noemen DNA-onderzoeksystemen kunnen in een aantal gevallen uitkomst bieden.

1. Y-chromosoom specifieke STR-loci

Een relatief nieuwe ontwikkeling in het forensisch DNA-onderzoek spitst zich toe op de genetische variatie op het Y-chromosoom. Iedere zoon krijgt het Y-chromosoom van zijn vader. Net zoals op de overige chromosomen komen ook op het Y-chromosoom STR-loci voor. Broers hebben een volledig identieke Y-chromosoom sequentie. Hiervan wordt soms dankbaar gebruik bij identificaties van onherkenbare slachtoffers in gevallen waar de ouders of kinderen van het vermoedelijke slachtoffer niet voorhanden zijn. Vergelijking van de variabele Y-specifieke sequenties van het slachtoffer met zijn vermoedelijke broer kan in een dergelijke zaak meehelpen aan een positieve identificatie.

Het NFI gebruikt de Y-STR typering bovendien bij het ontrafelen van mengsels van DNA. Als in (zeden)zaken een grote hoeveelheid vrouwelijk celmateriaal is vermengd met een geringe hoeveelheid mannelijk celmateriaal schieten de autosomale loci tekort om de mannelijke fragmenten zichtbaar te maken. Om in dergelijke zaken toch het profiel van de mannelijke component in het mengsel zichtbaar te maken worden 6 loci op het Y-chromosoom getypeerd. De Y-specifieke fragmenten worden met een multiplex PCR reactie vermeerderd. Een groot nadeel is dat de verkregen Y-profielen verre van individu specifiek zijn. De bewijskracht is relatief gering. Uit vergelijkende bevolkingsonderzoeken is gebleken dat de Y-STR profielen informatie kunnen verstrekken omtrent de bevolkingsgroep waartoe de donor van een biologisch spoor behoort. Omdat het DNA-onderzoek in Nederland onder de huidige wetgeving alleen gericht is op de DNA-vergelijking van sporenmateriaal en referentiemonsters wordt hier in Nederland (nog) geen gebruik van gemaakt.

2. mitochondriaal DNA

Bij de hierboven beschreven autosomale of Y-specifieke DNA-testen worden biologische sporen en referentiemonsters met elkaar te vergeleken op basis van de DNA-profielen van het DNA uit de celkern (het genomisch DNA). Het DNA-profiel dat hieruit wordt verkregen is vrijwel individuspecifiek. Voorwaarde voor het verkrijgen van een genomisch DNA-profiel is de aanwezigheid van kernhoudende cellen (b.v. spermacellen in een schedewitstrijkje). Haren, en in het bijzonder uitgevallen haren, bevatten geen of zeer weinig genomisch DNA. Buiten de haarwortel bevatten haren nauwelijks intacte cellen. Van uitgevallen haren kan met de huidige technologie vrijwel nooit een genomisch DNA-profiel worden verkregen. Het NFI spreekt hier uit eigen ervaring. De deskundige moet zijn toevlucht nemen tot andere mogelijkheden. Het microscopisch vergelijken van de haren, een onderzoek dat altijd voorafgaat aan een DNA-onderzoek, biedt slechts in een aantal gevallen uitkomst. Vaak blijft er na een morfologisch haaronderzoek de behoefte aan een onafhankelijke test die de uitsluiting (haren passen niet in het haarpallet van de verdachte) of de overeenkomst kan bevestigen. Het mitochondriaal DNA (mt-DNA) onderzoek kan hier uitkomst bieden. Binnen de cel met zijn genoom in de celkern is er nog een cellichaampje dat DNA bevat, "de mitochondrium". De mitochondriën zijn verantwoordelijk voor de energiehuishouding in de cel. Het bijzondere is dat mitochondriën hun eigen DNA bevatten. Eén cel bevat vele honderden mitochondriën. Slechts één lichaamscel bezit in principe voldoende kopieën (templates) van het mt-DNA voor het vervaardigen van een mt-DNA profiel. Doordat tijdens de haargroei de afzonderlijke mitochondriën over de volle lengte van een haar migreren kan een uitgevallen haar duizenden mt-DNA-kopieën bezitten.

De grootte van het mt-DNA-molecuul (16 duizend basenparen) is miniem in vergelijking met het genomisch DNA-molecuul (zes miljard bp). Hoewel de mutatiefrequentie van mt-DNA hoger is dan die van genomisch DNA bezit de korte mt-DNA keten kwantitatief gezien veel minder genetische variatie. Bij de analyse van mt-DNA wordt de DNA-sequentie in twee verschillende hypervariabele regio's vastgesteld (HV1 en HV2). Als de HV1 (341 basenparen) en de HV2 (267 basenparen) mt-DNA sequenties van twee willekeurige blanke individuen met elkaar worden vergeleken zien we gemiddeld 8 verschillen.

De bewijskracht die uit het mt-DNA kan worden geput, is in vergelijking met het genomisch DNA-onderzoek beperkt. De kans dat het mt-DNA-profiel van een **onschuldig** individu overeenkomt met het mt-DNA-profiel van bijvoorbeeld een haar uit de bivakmuts die na een roofoverval is aangetroffen, varieert afhankelijk van de gevonden DNA-sequentie, tussen de 3% en de 0,1%. Bruikbaar als aanvullend bewijs, maar nimmer te gebruiken als een sluitend bewijsmiddel. Wel is het zo dat gemiddeld tenminste 97 van de 100 onschuldige verdachten met een mt-DNA-onderzoek kunnen worden uitgesloten. Het gevaar van een mt-DNA-onderzoek is de hoge bewijskracht die bewust of onbewust aan de uitslag van een DNA-onderzoek wordt toegeschreven. Een ander probleem is dat de mt-DNA sequentie binnen hetzelfde individu variaties vertoont. Niet alle hoofdharen vertonen precies dezelfde sequentie evenmin als het mt-DNA van verschillende weefsels, dit fenomeen wordt heteroplasmie genoemd. Eén of twee verschillen in de volgorde van de bouwstenen tussen het referentiemonster van de verdachte en een op de plaats van het misdrijf gevonden haar sluit de verdachte daarom nog niet uit. Indien de deskundige onvoldoende rekening houdt met dit fenomeen, kan een verdachte in een aantal gevallen ten onrechte worden uitgesloten.

Een andere toepassing van het mt-DNA onderzoek is de DNA-identificatie van (zeer) oude skeletresten. In de meeste gevallen is het NFI in staat om van de voor justitie van belang zijnde skeletresten (in de regel niet ouder dan de verjaringstermijn van 18 jaar) het autosomale DNA-profiel te achterhalen dat gebruikt kan worden bij de vergelijking van nog in leven zijnde eerstegraads familieleden. Van historisch belang is de mt-DNA identificatie van de botten van de laatste Russische tsaar door de collegae van het laboratorium van de Forensic Science Service in Engeland geweest.

DE TOEKOMST VAN HET FORENSISCHE DNA-ONDERZOEK

Met het geaccrediteerde SGM Plus systeem kan het NFI meerdere jaren vooruit. Door de DNA-wetgeving van 1994 is het NFI eraan gehouden de onderzochte referentiemonsters van verdachten te vernietigen. Hierdoor is de overschakeling naar een volledig nieuwe DNA-test, met alternatieve loci niet opportuun. Het DNA-database-stand zou vrijwel onmiddellijk obsoleet worden. Van de verdachten resteert immers alleen hun SGM Plus profiel in de database. Vergelijking van dit profiel met nieuwe merkersystemen op een andere positie van het DNA is onmogelijk! Door een nieuwe wetgeving zal in de nabije toekomst de toepassing van het DNA-onderzoek aanmerkelijk worden verruimd. Nu is het DNA-onderzoek alleen een middel bij ernstige delicten (doodslag, verkrachting, gewapende overval, etc.). Met de nieuwe DNA-wet zal DNA ook een middel worden bij minder ernstige misdrijven zoals woninginbraak. De te verwachten toename van het aantal zaken dat op DNA onderzocht zal gaan worden dwingt het NFI ertoe om de DNA-test verregaand te automatiseren. De beschreven STR-systemen lenen zich hiervoor. Dit laat onverlet dat het NFI de nieuwe ontwikkelingen op de voet volgt. Een van de systemen die het NFI bij zijn strategische research gaat betrekken zijn de "DNA-chips". Met deze technologie kunnen zeer efficiënt een groot aantal puntmutaties op het DNA tegelijkertijd worden onderzocht. Deze puntmutaties worden in de literatuur gerefereerd als Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's). Een inherent nadeel van deze methode is, willen we dezelfde zekerheid kunnen bieden als de huidige DNA-test, het grote aantal loci dat eerst in de PCR vermenigvuldigd moet worden voordat de detectie via hybridisatie aan de DNA-chip kan plaatsvinden. Om de huidige STR-systemen via de DNA-chip technologie te analyseren is om technische redenen nog toekomstmuziek.

LITERATUUR EN INTERNET

De ontdekking van de DNA-fingerprint

- A.J. JEFFREYS, V. WILSON EN S.L. THEIN (1985)
Individual-specific "fingerprints" of human DNA
Nature 317: 76-79

Autosomale DNA-merkers en de validatie van multiplex PCR systemen

- GILL P, SPARKES R, WERRETT DJ (2000)
Report of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI); formulation and testing of principles to evaluate STR multiplexes.
Forensic Sci. Int. 108: 1-29
- A.D. KLOOSTERMAN EN M. SJERPS (1995)
DNA-onderzoek "bespreking van een moderne techniek"
MODUS 5:27-30
- JOHN M. BUTLER AND DENNIS J. REEDER (NIST BIOTECHNOLOGY DIVISION),
Short Tandem Repeat DNA Internet Database
<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/>

Forensische berekeningen en statistiek

- ES LANDER EN B. BUDOWLE
DNA-fingerprinting dispute laid to rest
Nature 371: 735-738

Aanbevelingen aan forensische laboratoria (laboratorium inrichting, personeel, statistische berekeningen, QC/QA)

- THE EVALUATION OF DNA-EVIDENCE (1996)
National Research Council
National Academic Press, Washington DC
ISBN 0-309-05395-1

Y-chromosomale merkers

- M.A. JOBLING EN C. TYLER-SMITH (1995)
Fathers and sons: the Y-chromosome and human evolution.
Trends Genet. 11: 449-456
- Y-STR HAPLOTYPE REFERENCE DATABASE
<http://ystr.charite.de/>

Mitochondriaal DNA

- M.M. HOLLAND EN T.J. PARSONS (1999)
Mitochondrial DNA sequence analysis. Validation and use in forensic casework.
Forensic Sci. Rev. 11: 21-50
- P. GILL, P.L. IVANOV, C. KIMPTON, R. PEIRCY, N. BENSON, G. TULLY, I. EVETT, E. HAGELBERG EN K. SULLIVAN (1994)
Identification of the remains of the Romanov family by DNA-analysis.
Nature Genetics 15: 363-368