

## Forensische Genetik

# Pyrosequenzierung zur molekularen Altersschätzung in der DNA-Spurenanalyse

JAN FLECKHAUS, PETER M. SCHNEIDER

INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN, MEDIZINISCHE FAKULTÄT UND UNIVERSITÄTSKLINIKUM KÖLN

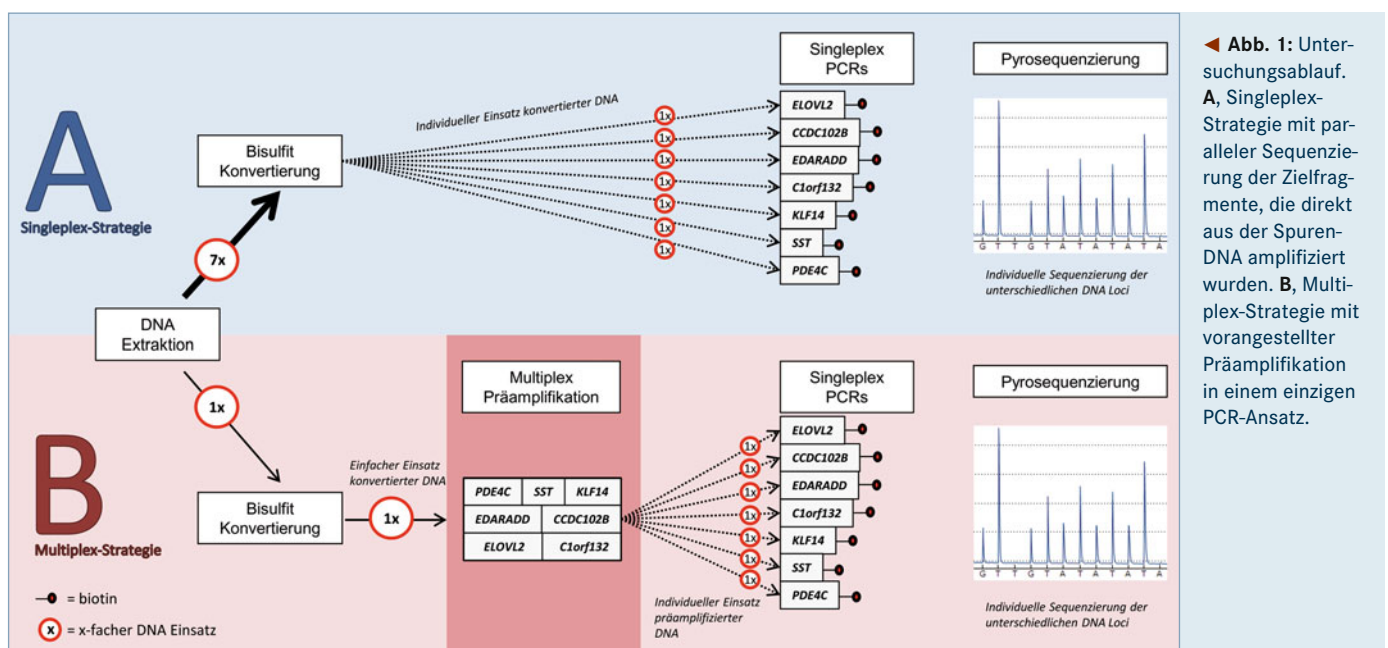
**The estimation of the chronological age based on DNA methylation markers by bisulfite sequencing is a promising new method in forensic molecular genetics. The application of the method to forensic trace samples from crime scenes was recently legalized following a change of the German law. Biological traces display a challenging sample source since they are usually of small amount. To increase sensitivity, we have developed an optimized pyrosequencing protocol for quantitative methylation analysis.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1468-1  
© Die Autoren 2020

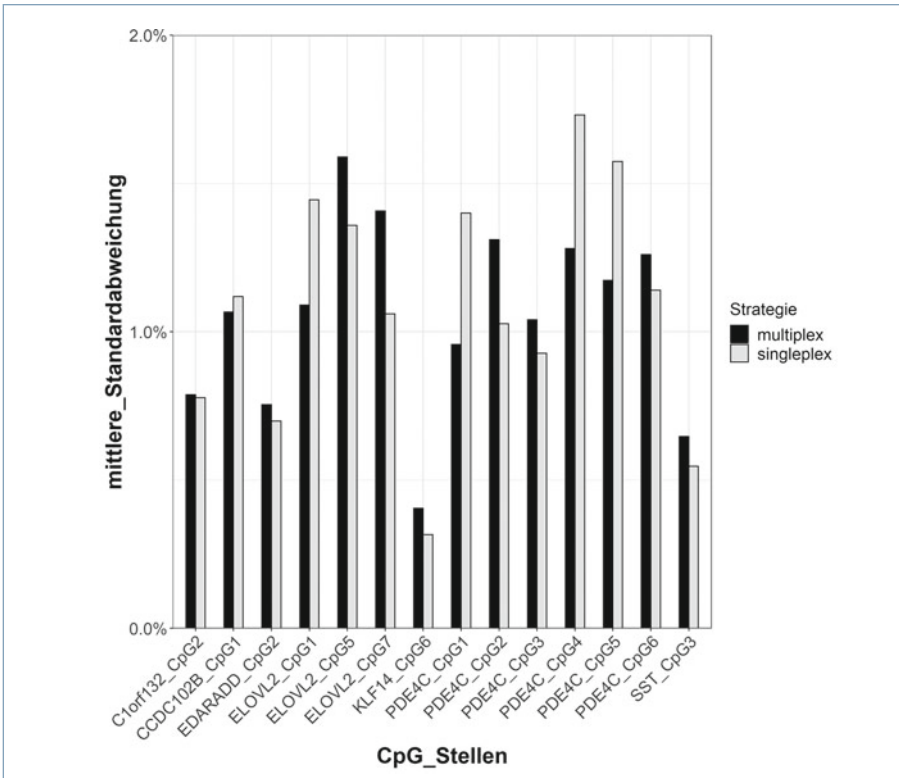
Die molekulare Altersschätzung beruht auf der Analyse altersabhängig methylierter DNA-Abschnitte. Anders als die in der rechtsmedizinischen Praxis etablierten morphologischen und radiologischen Methoden basiert sie auf einer molekulargenetischen Untersuchung, die auch ohne Anwesenheit einer entsprechenden Person, z. B. anhand von biologischem Spurenmaterial, durchgeführt werden kann. Die Schätzung des Alters

eines unbekanntem Spurenlegers kann bei der Ermittlung von Straftaten hilfreich für die polizeiliche Fahndung sein oder bei Personen unklaren Alters im Rahmen der Anwendung des Strafrechts eingesetzt werden [1, 2]. Die Grundlagen dieses Verfahrens beruhen auf der Auswertung von genomweiten Methylierungsarray-Daten [3], ein Ansatz, der aufgrund des hohen DNA-Bedarfs für die forensische Spurenanalyse nicht

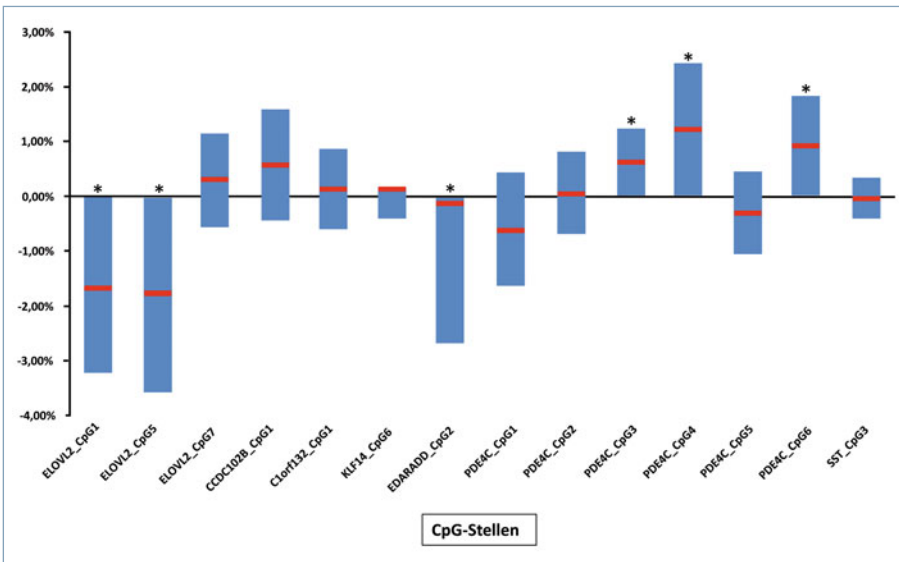
geeignet ist. Hier ist eine schnelle, präzise und vor allem sensitive Bisulfit-Sequenzierungsmethode erforderlich. Die Pyrosequenzierung ist eine solche Methode, hat aber die Einschränkung, dass verschiedene DNA-Loci nur unabhängig voneinander sequenziert werden können. Da bei der Altersschätzung mehrere Abschnitte untersucht werden, sind pro Probe entsprechend viele Sequenzierungsansätze und somit ein mehrfacher DNA-Einsatz nötig, wodurch die Sensitivität der Methode insgesamt sinkt. Zusätzlich benötigt die Methylierungsanalyse mit ca. 20–50 ng DNA ca. 100–1000-mal mehr DNA als die genetische Typisierung der *short tandem repeat*-Marker zur Identifizierung eines Spurenlegers [4]. Um dieses Problem zu umgehen und den DNA-Bedarf zu senken, haben wir das Protokoll der Pyrosequenzierung um eine vorangestellte Multiplex-Präamplifikation erweitert, in der alle relevanten DNA-Loci für die Altersschätzung aus einem Aliquot gemeinsam amplifiziert werden [5]. Das Produkt dieser Präamplifikation liefert genügend Template für die in der Folge notwendigen parallelen PCR- und Sequenzierungsreaktionen der einzelnen



◀ **Abb. 1:** Untersuchungsablauf. **A**, Singleplex-Strategie mit paralleler Sequenzierung der Zielfragmente, die direkt aus der Spuren-DNA amplifiziert wurden. **B**, Multiplex-Strategie mit vorangestellter Präamplifikation in einem einzigen PCR-Ansatz.



▲ **Abb. 2:** Vergleich der Präzision der Methylierungsmessungen bei Einsatz der Multiplex- und der Singleplex-Strategie. Die Präzision ist als Mittelwert der Standardabweichungen innerhalb der Dreifachmessungen der Einzelproben, jeweils für die untersuchten DNA-Loci (CpG-Stellen), dargestellt.



▲ **Abb. 3:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der t-Tests zum Vergleich der Methylierungsmessungen aus Multiplex- und Singleplex-Strategie. Konfidenzintervalle (blaue Balken), mittlere Abweichungen (rote Linien) und CpG-Stellen mit signifikanten Messunterschieden (\*).

Cytosin-Guanin, also an CpG-Stellen (CpGs), vorkommt. Ein Großteil der CpGs ist in CpG-Inseln im Bereich der Gen-Promotoren lokalisiert, wo sie über ihren Methylierungsstatus maßgeblich zur Regulation der Genexpression beitragen. So wie sich die Expression einzelner Gene innerhalb eines Gewebes ändert, ändert sich auch der durchschnittliche Methylierungsgrad jeder einzelnen CpG innerhalb des Gewebes. Für einige CpGs entsteht daraus eine gewebespezifische, mit dem chronologischen Alter korrelierte, kontinuierliche Veränderung des Methylierungsgrads, die es ermöglicht, das Alter vom aktuellen Methylierungszustand abzuleiten. Je stärker diese Korrelation ist, desto genauer kann das chronologische Alter geschätzt werden. Da die DNA-Methylierung über komplexe untereinander vernetzte inter- und intrazelluläre Prozesse reguliert wird, sind trotz hoher Korrelation zwischen Alter und Methylierung zu einem bestimmten Zeitpunkt, z. B. zum Zeitpunkt der Probenentnahme, Abweichungen von der altersabhängigen Methylierung möglich, die zu einem Fehler bei der Altersschätzung führen können. Auch Umwelt- und Lebensstilfaktoren sowie Erkrankungen können zu Veränderungen führen, weshalb sich ein Teil der Forschung mit den potenziellen Einflüssen dieser Faktoren befasst. Bei der Erstellung von Altersschätzungsmodellen werden die robustesten, also die am wenigsten von anderen Faktoren als dem chronologischen Alter beeinflussten CpGs verwendet. Zudem werden zum Schutz vor Messfehlern oder anderen spontanen Abweichungen einzelner CpGs immer mehrere unabhängige CpGs kombiniert. Bei der Analyse biologischer Spuren wird dabei eine Optimierung zwischen Vorhersagegenauigkeit und DNA-Bedarf angestrebt. Das Modell selbst wird dann durch eine multiple Regressionsanalyse zwischen chronologischem Alter und Methylierung der ausgewählten CpGs erstellt. Die Referenzdaten dafür liefern Messwerte aus großen Probenkollektiven mit gleichmäßiger Altersverteilung, welche die gesamte Lebensspanne eines Menschen repräsentativ abbilden. Die Regressionsanalyse modelliert dabei nicht nur die altersabhängige Methylierungsänderung und transformiert diese in eine Berechnungsformel für das chronologische Alter, sondern liefert über die beobachtete Streuung der Methylierungswerte in Form der mittleren absoluten Abweichung (*mean average deviation, MAD*) eine hilfreiche Quantifizierung des Fehlers, mit dem bei der

Loci. In einer Studie haben wir Proben sowohl mit dieser neuen Multiplex- als auch der konventionellen Singleplex-Strategie analysiert und die Ergebnisse aus beiden Strategien direkt miteinander verglichen.

### Prinzip der molekulargenetischen Altersschätzung

Die DNA-Methylierung ist eine reversible epigenetische Modifikation von Cytosinen, die besonders häufig in der Sequenzfolge

Altersschätzung zu rechnen ist. Aktuelle Modelle schätzen das chronologische Alter mit einer Präzision von ca.  $\pm 3$ –4 Jahren MAD [1].

### PCR von Bisulfit-konvertierter DNA

Der Goldstandard für quantitative Methylierungsanalysen ist die Bisulfit-Sequenzierung. Durch die Behandlung der genomischen DNA-Probe mit Natriumbisulfit werden zunächst alle unmethylierten Cytosine (C) in Uracil umgeschrieben, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Uracil wird in der folgenden PCR als Thymin (T) amplifiziert, wodurch der Methylierungsstatus jeder ursprünglichen Cytosinposition über den Sequenzunterschied C oder T erkannt und mit der passenden Sequenzierungsmethode quantitativ bestimmt werden kann. Bei den altersabhängigen CpGs sind die beiden Basen C und T in jeweils unterschiedlichen Anteilen vorhanden. Für das Design spezifischer PCR-Primer stellt Bisulfit-konvertierte DNA eine Herausforderung dar, weil die DNA-Sequenz durch die Konvertierung von C zu T nur noch aus drei statt vier unterschiedlichen Basen aufgebaut ist und somit an Diversität verliert. Zwar kommen Cs nach der Konvertierung noch im CpG-Motiv vor, sind jedoch als variable Positionen (C oder T) ungeeignet für spezifische Primerbindungsstellen. Die reduzierte Sequenzdiversität von DNA und Primern erhöht die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Primerbindungen für die Entstehung von PCR-Artefakten und die Bildung von Primer-Dimeren während einer Multiplex-PCR, wie sie in unserer Studie angedacht ist.

### Multiplex-PCR-Strategie für die Pyrosequenzierung

Um die möglichen Effekte einer Multiplex-PCR empirisch zu untersuchen, haben wir zehn Proben parallel mit der konventionellen Singleplex-Strategie (**Abb. 1A**) und der neuen Multiplex-Strategie (**Abb. 1B**) jeweils in Triplikaten analysiert und die Ergebnisse beider Strategien direkt miteinander verglichen. Untersuchungsgegenstand waren sieben unabhängige DNA-Loci mit 16 altersabhängigen CpGs [6], die bereits für die Bearbeitung mit der Singleplex-Strategie in unserem Labor validiert waren. Dabei ist entscheidend, dass nur die Singleplex-PCRs mit Biotin-markierten Primern durchgeführt werden, da diese für die Immobilisierung der PCR-Produkte während der Pyrosequenzie-

rung benötigt werden. Es werden so ausschließlich die Amplifikate aus den Singleplex-PCRs, jedoch nicht aus der Multiplex-Präamplifikation sequenziert.

### Experimentelle Validierung der Multiplex-Strategie

Für die experimentelle Validierung haben wir als Maß für die Reproduzierbarkeit zunächst für alle untersuchten CpGs die Standardabweichung innerhalb der sequenzierten Triplikate bestimmt (**Abb. 2**). Die mittlere Standardabweichung ist bei der Multiplex-Strategie an den untersuchten CpGs mit Werten zwischen 0,4 und 1,6 Prozent sehr gering. Zudem unterscheidet sich die Präzision der Messungen an keiner der untersuchten CpG-Stellen signifikant von der der Singleplex-Strategie. Es ist somit sichergestellt, dass die mit der Multiplex-Strategie gemessenen Methylierungswerte auf validen Analysen beruhen.

Da die Modelle zur Altersschätzung auf Referenzdaten basieren, die mit einer bestimmten Methode und unter Verwendung

eines bestimmten Gewebetyps (z. B. Blut [7]) gemessen wurden, muss bei der Verwendung des Modells sichergestellt sein, dass die Methylierungsanalysen zur Altersschätzung einer unbekannt Probe mit einer Methodik ermittelt wurden, die äquivalente Ergebnisse zu der Methodik der Modellmessung liefert. Daher haben wir getestet, ob sich die gemessenen Methylierungswerte aus Multiplex- und Singleplex-Strategie unterscheiden und ob die Multiplex-Strategie ggf. als neue abweichende Methodik angesehen werden muss. Für den Strategievergleich haben wir für jede CpG-Position einen einfachen t-Test durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Messungen der gleichen Proben aus Singleplex- und Multiplex-Strategie signifikant unterscheidbar sind. Für acht der 14 untersuchten CpGs konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Somit können die beiden Strategien für die Messung dieser CpGs äquivalent verwendet werden. Im Gegensatz dazu offenbarten sechs CpGs signifikante Unterschiede. Jedoch zeigte sich sowohl über die 95 %-Konfidenzintervalle der

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer

t-Tests als auch über die mittlere Abweichung der zehn untersuchten Proben, dass die Messunterschiede bezogen auf den Abstand in Prozentwerten insgesamt sehr gering waren (**Abb. 3**). Trotzdem würden sie bei der Altersschätzung zu einem kleinen, aber systematischen Fehler führen. Deshalb ist eine Anpassung der Modelle bzw. der Berechnungsformel für das chronologische Alter für diese sechs CpGs zu empfehlen. Für diese Anpassung muss der quantitative Messunterschied jedoch zunächst in einem größeren Probenkollektiv genau untersucht werden, bevor die Berechnungsformel für das Alter auf dieser Basis für die Multiplex-Strategie adaptiert werden kann.

### Fazit

Auch wenn Multiplex- und Singleplex-Strategie nicht für alle CpGs identische Ergebnisse erzielten, konnten wir in unserer Studie zeigen, dass die Abweichungen zwischen den Strategien, sofern diese auftreten, sehr gering sind. Es besteht somit ein großes Potenzial, dass die Multiplex-Strategie-Messungen für die meisten altersabhängigen CpGs über einen Normalisierungsfaktor denen der Singleplex-Strategie angeglichen und somit dieselben Modelle zur Altersschätzung verwendet werden können. Gepaart mit der hohen Präzision der Messungen ist die Multiplex-Strategie eine vielversprechende Methode für die Anwendung bei Spurenfällen und löst so das Problem der begrenzten Verfügbarkeit von Spuren-DNA. ■

### Literatur

- [1] Ritz-Timme S, Schneider PM, Mahlke NS et al. (2018) Altersschätzung auf Basis der DNA-Methylierung. Rechtsmedizin 28:202-207
- [2] Schneider PM, Prainsack B, Kayser M (2019) Erweiterte forensische DNA-Analyse zur Vorhersage von Aussehen und biogeografischer Herkunft. Dtsch Arztebl Int 116:873-880
- [3] Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biol 14:3156
- [4] Naue J, Hoefsloot HCJ, Kloosterman AD, Verschure PJ (2018) Forensic DNA methylation profiling from minimal traces: How low can we go? Forensic Sci Int Genet 33:17-23
- [5] Fleckhaus J, Schneider PM (2020) Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via Pyrosequencing. Forensic Sci Int Genet 44:102189
- [6] Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A et al. (2016) Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. Forensic Sci Int Genet 24:65-74
- [7] Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T et al. (2015) Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. Forensic Sci Int Genet 17:173-179

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Open Access** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse:

Jan Fleckhaus, M.Sc.  
Prof. Dr. Peter M. Schneider  
Institut für Rechtsmedizin  
Universitätsklinikum Köln  
Melatengürtel 60/62  
D-50823 Köln  
Jan.fleckhaus@uk-koeln.de  
rechtsmedizin@uk-koeln.de  
www.rechtsmedizin-koeln.de

### AUTOREN



#### Jan Fleckhaus

2010–2016 Biologiestudium an der Universität Duisburg-Essen. Seit 2017 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Bereich für Forensische Molekulargenetik der Rechtsmedizin Köln. Seit 2018 Promotion am Klinikum der Universität zu Köln.



#### Peter M. Schneider

Biologiestudium an der Universität Bonn. 1984–1986 Visiting Research Fellow am Children's Hospital der Harvard Medical School Boston. 1987 Promotion im Fach Genetik an der Universität Mainz. 1994 Habilitation im Fach Immunologie an der Universität Mainz. 1986–2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Rechtsmedizin der Universität Mainz. Seit 2004 Inhaber des Lehrstuhls für Forensische Molekulargenetik am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Köln.