Rechtsmedizin 2021 · 31:234–242

<https://doi.org/10.1007/s00194-021-00489-2>

Angenommen: 30. März 2021

Online publiziert: 18. Mai 2021

© Der/die Autor(en) 2021

Julia Becker¹ · Jana Naue² · Alexandra Reckert¹ · Petra Böhme¹ · Stefanie Ritz-Timme¹¹ Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland² Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Deutschland

Nutzung von Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNA-Methylierung zur postmortalen Lebensaltersschätzung

Konzept und Ergebnisse einer Pilotstudie

Einleitung

Molekulare Verfahren zur postmortalen Lebensaltersschätzung

Die postmortale Schätzung des Lebensalters einer nichtidentifizierten Leiche kann insbesondere bei der Klärung von Identitäten, Vermisstenfällen sowie Tötungsdelikten eine wichtige und auch herausfordernde Aufgabe sein (eindrucksvolle Darstellung eines authentischen Falls aktuell bei Herzog [1]). Mit der Identifikation und Beschreibung „molekularer Uhren“ (posttranslationale Proteinmodifikationen, DNA-Methylierung [DNAm]) eröffneten sich neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Verfahren zur Lebensaltersschätzung auch im Kontext fortgeschrittener postmortalen Veränderungen oder spezieller postmortalen Situationen (z. B. Leichenteile), die die Anwendbarkeit von Methoden sehr einschränken können. Als „molekulare Uhren“ werden Veränderungen auf molekularer Ebene bezeichnet, die eng mit dem Lebensalter korrelieren. Solche Veränderungen wurden insbesondere für

Proteine und DNA beschrieben (Übersichten z. B. [2–4]); vielversprechend sind insbesondere die Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp) und von Pentosidin (Pen) in permanenten Proteinen sowie die DNAm an Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Positionen im Genom [5–9].

Akkumulation von D-Asparaginsäure

Die Akkumulation von D-Asp mit zunehmendem Lebensalter ist das Ergebnis einer nichtenzymatischen Umwandlung von L-Asparagin- und L-Asparaginsäure-Resten in ihre D-Form [10, 11]. Sie wurde für einige langlebige, permanente Proteine und in zahlreichen Geweben beschrieben (Übersicht bei [5, 8]). Die Korrelation zwischen der Akkumulation von D-Asp im Dentin und dem Lebensalter ist Basis einer der genauesten Methoden zur Lebensaltersschätzung [5, 12–15]; es liegen 95 % aller Altersdiagnosen in einem Intervall von ca. ± 4 Jahren um das wahre Alter (je nach Zahntyp); die mittleren absoluten Fehler betragen (je nach Zahntyp) unter 2 Jahre (nach Rohdaten zu [16]). Jedoch stehen intakte und gesunde Zähne in der forensi-

schen Praxis als Untersuchungsmaterial nicht immer zur Verfügung. Mit anderen, komplexeren sowie proteinumsatzaktiveren Geweben (z. B. Knochen) können ähnlich präzise Ergebnisse erreicht werden, wenn mit hohem, in der forensischen Praxis nichtleistbarem Aufwand permanente Proteine aufgereinigt werden [17–20]. Wird bei solchen Geweben auf eine Proteinaufreinigung verzichtet und stattdessen Gesamtgewebe oder eine grob aufgereinigte Proteinfraction analysiert, ist die Genauigkeit der Methode jeweils deutlich geringer als bei Einsatz von Dentin [21, 22].

Akkumulation von Pentosidin in langlebigen Proteinen

Die Akkumulation von Pen, einem „advanced glycation end product“ (AGE), ist das Ergebnis einer nichtenzymatischen Reaktion freier Aminogruppen von Proteinen mit Glucose oder anderen reduzierenden Zuckern [23–25]. Der Zusammenhang zwischen der Pen-Akkumulation und dem Lebensalter ist in langlebigen Proteinen ebenfalls hoch (z. B. aus Dentin, Bandscheiben oder Epiglottis, [26–28]), der Ansatz liefert allerdings insgesamt schlechtere Ergeb-

Die Autoren J. Becker und J. Naue haben zu gleichen Teilen zum Manuskript beigetragen.

nisse als D-Asp. Dennoch kann er in multivariaten Modellen wesentlich zur Altersschätzung beitragen [29]. Zudem legen eigene kasuistische Beobachtungen nahe, dass Pen postmortal über sehr lange Zeit, möglicherweise über Jahrtausende, stabil ist [30], was eine Einsetzbarkeit des Verfahrens im anthropologischen Kontext ermöglichen würde.

DNA-Methylierung

Die DNAm ist Teil der epigenetischen Regulation; durch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit einer Methylgruppe an Cytosinen im CpG-Sequenz-Kontext kann die Zellfunktion gesteuert werden [31, 32].

Dabei gibt es eine Vielzahl von CpG-Positionen, an denen sich die DNAm altersabhängig verändert und teilweise eher mit dem chronologischen Lebensalter oder mit dem biologischen Alter korreliert [31, 33]. Eine Vielzahl altersabhängiger Methylierungsmarker wurde bereits in Geweben und Körperflüssigkeiten identifiziert, und verschiedene Modelle für die Schätzung des chronologischen Lebensalters wurden vorgeschlagen (z. B. [34–37]). Die Untersuchung von Blut und Mundschleimhautabstrichen eröffnet Möglichkeiten für die Lebensaltersschätzung an lebenden Personen (z. B. [38–40]). Bei der Untersuchung von Spuren (z. B. Blutspuren) bietet der Ansatz die Möglichkeit zur Schätzung des Lebensalters der Spurenlegerin oder des Spurenlegers [41, 42]. Auch zum Einsatz zur postmortalen Altersschätzung wurden bereits erste Studien durchgeführt [43–47]. Für die besten Modelle für Altersschätzungen mithilfe der DNAm sind „mean absolute deviations“ (MAD) von ca. 3 bis 5 Jahren beschrieben [38–40, 48].

Verknüpfung mehrerer molekularer Uhren in Modellen zur Altersschätzung als Ansatz zur Optimierung?

Das Potenzial jeder einzelnen dieser „molekularen Uhren“ zur Lebensaltersschätzung ist unzweifelhaft hoch. Bei ihrer Nutzung zur Altersschätzung ist

jedoch zu berücksichtigen, dass verschiedene Einflussfaktoren im Rahmen komplexer biologischer Alterungsvorgänge oder bei Erkrankungen auf sie wirken können, was die Zuverlässigkeit von Altersdiagnosen beeinträchtigen kann. Diesbezüglich am robustesten ist die Akkumulation von D-Asp, die spontan (nichtenzymatisch) bei einer biologisch eng einregulierten Körpertemperatur um 37°C abläuft. In kariös verändertem Dentin sowie in komplexeren Geweben als Dentin kann es allerdings im Rahmen der (erkrankungs- oder altersbedingten) Gewebsdegeneration zu Einflüssen auf die Akkumulation von D-Asp kommen [16, 49]. Die Akkumulation von Pen ist abhängig von der Kohlenhydratstoffwechsellaage und kann jedenfalls theoretisch bei einem über lange Zeit schlecht eingestellten Diabetes mellitus beschleunigt sein, wobei dies offenbar nur in Fällen mit dauerhafter schlechter medikamentöser Einstellung von praktischer Bedeutung zu sein scheint [23, 24, 26]. Für die DNAm ist bekannt, dass bestimmte Positionen im Genom durch eine Vielzahl äußerer und innerer Parameter beeinflusst werden können, wie beispielsweise durch Erkrankungen, Psychotraumata oder Lebensstilfaktoren (Übersicht bei [50]).

Aufgrund solcher Einflussfaktoren kann eine erhebliche Diskrepanz zwischen dem jeweils geschätzten „Proteinalter“ bzw. einem geschätzten „epigenetischen Alter“ einerseits und dem chronologischen Alter andererseits auftreten und dazu führen, dass die Ergebnisse von Altersschätzungen nicht hinreichend genau sind.

Die Nutzung der Altersinformationen aus mehreren unterschiedlichen molekularen Uhren verspricht eine Reduktion des Einflusses von Störfaktoren, wenn diese nicht alle Uhren gleichermaßen beeinträchtigen.

Dieser Ansatz hat sich in einem anderem Zusammenhang bereits als vielversprechend erwiesen; so wurde gezeigt, dass sowohl die Verknüpfung verschiedener Proteinparameter [29] als auch die Verknüpfung von DNAm mit morphologischen Parametern [51] oder „signal-joint T cell receptor excision circles“

(sjTREC, [52]) zu besseren Ergebnissen von Altersschätzungen führen.

Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen (D-Asp, Pen) und DNAm wurden bislang noch nie in Modellen zur Lebensaltersschätzung verknüpft. Diese Parameter dürften unabhängig voneinander sein, jedenfalls gibt es keine Erkenntnisse zu gemeinsamen Einflussfaktoren. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass die Verknüpfung in multivariaten Modellen genauere Ergebnisse von Altersschätzungen bietet als die Analyse einzelner Parameter. Dies dürfte umso mehr zutreffen, wenn diese Marker in mehreren Geweben untersucht werden können.

Pilotstudie

Ziele

Die Überprüfung der oben genannten Hypothese setzt systematische Untersuchungen geeigneter Parameter an geeigneten Geweben voraus. Für die Planung solcher Untersuchungen ist zunächst die Identifikation geeigneter Gewebe erforderlich. Diese sollten eine Altersabhängigkeit sowohl für D-Asp, Pen und DNAm-Marker zeigen; sie sollten außerdem möglichst fäulnisresistent sein, um auch bei fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen noch verfügbar zu sein.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen einer Pilotstudie

- D-Asp, Pen und mehreren CpG-Stellen in 10 ausgewählten DNAm-Bereichen (*RPA2*, *ZYG11A*, *F5*, *HOXC4*, *NKIRAS2*, *TRIM59*, *ELOVL2*, *DDO*, *KLF14* und *PDE4C*)
- in Proben aus den fäulnisresistenten Geweben Knochen, Bandscheiben, Achillessehne und Epiglottis

von 15 Individuen mit bekanntem Lebensalter untersucht.

Material/Methoden

Proben

Asservierung und Lagerung Im Rahmen von Obduktionen wurden bei 15 Individuen (6 weiblich, 9 männlich; Lebensalter: 8 bis 96 Jahre) folgende Gewebeproben asserviert:

- Gewebe aus der Bandscheibe („intervertebral disc“, IVD) zwischen den Lendenwirbelkörpern 2 und 3 (vorderer Anulus fibrosus),
- Achillessehne,
- Kehlkopfdeckel,
- Schädelkalotte (Os parietale).

Das postmortale Intervall betrug zwischen einem und 12 Tage (bei gekühlter Lagerung), wobei keine der Leichen Fäulnisveränderungen aufwies. Alle Gewebe wurden so intakt wie möglich entnommen, mit Wasser gewaschen und bis zur Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Präparationen Bandscheibe: Gewebe des vorderen äußeren Anulus fibrosus der IVD wurden präpariert (ca. 100 mg).

Achillessehne: Eine Sehngewebsprobe (ca. 100 mg) aus dem mittleren Teil des ansatznahen Stück wurde entnommen.

Epiglottis: Die oberen zwei Drittel des Kehlkopfdeckels wurden präpariert, und der Knorpel durch Entfernen der Schleimhaut und des restlichen Gewebes freigelegt.

Kalotte: Es wurden ca. 2×3 cm große Stücke aus der Kalotte herausgesägt. Nach Entfernung der Knochenhaut wurden die einzelnen Knochenstücke in mindestens 2 ca. 1×1 cm große Fragmente gesägt.

Vorbereitung der Gewebeproben für die Analysen Für die Analyse von D-Asp und Pen wurde immer eines der oben genannten Knochenstücke pro Leichnam pulverisiert, das Pulver nach Ritz-Timme [16] gewaschen und anschließend 24 h gefriertrocknet. Das jeweils andere Stück wurde, wie unten beschrieben, zur DNAm-Analyse vorbereitet.

Zur Bestimmung des Pen-Gehalts wurden jeweils zwischen 70 und 100 mg Gewebe (Bandscheibe, Achillessehne, Epiglottis) in ein säuresauberes Pyrex-Röhrchen (Fa. Pyrex, England) überführt. Für die Analyse des Pen-Gehalts im Gesamtprotein des Knochens wurden ca. 100 mg des vorbereiteten Knochenpulvers in ein Pyrex-Röhrchen überführt.

Zur Analyse des D-Asp in den 3 Geweben (Bandscheibe, Achillessehne, Epiglottis) wurde jeweils ca. 1 mg Gewebe in ein säuresauberes Pyrex-Röhrchen überführt. Im Knochen wur-

Rechtsmedizin 2021 · 31:234–242 <https://doi.org/10.1007/s00194-021-00489-2>
© Der/die Autor(en) 2021

J. Becker · J. Naue · A. Reckert · P. Böhme · S. Ritz-Timme

Nutzung von Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNA-Methylierung zur postmortalen Lebensaltersschätzung. Konzept und Ergebnisse einer Pilotstudie

Zusammenfassung

Mit der Identifikation und Beschreibung „molekularer Uhren“ (posttranslationale Proteinmodifikationen, DNA-Methylierung) eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Verfahren zur postmortalen Lebensaltersschätzung. Bislang werden diese Ansätze aber nur unabhängig voneinander eingesetzt. Ihre Verknüpfung verspricht eine bessere Erfassung hochkomplexer Alterungsprozesse und damit die Möglichkeit zur Entwicklung optimierter Verfahren zur Altersschätzung für verschiedenste Szenarien der forensischen Praxis.

In Vorbereitung umfangreicher Untersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese wurden verschiedene molekulare Uhren (Akkumulation von D-Asparaginsäure, Akkumulation von Pentosidin und DNA-Methylierungsmarker [RPA2, ZYG11A, F5, HOXC4, NKIRAS2, TRIM59, ELOVL2, DDO, KLF14 und PDE4C]) in 4 fäulnisresistenten Geweben (Knochen, Sehne, Bandscheibe, Epiglottis) von 15 Individuen untersucht.

In allen untersuchten Geweben fand sich eine starke Korrelation beider Proteinmarker sowie jeweils mehrerer DNA-Methylierungsmarker mit dem Lebensalter. Dabei zeigten die untersuchten Parameter gewebspezifische Veränderungen mit dem Alter.

Die Ergebnisse der Pilotstudie belegen das Potenzial der Verknüpfung molekularer Verfahren für die postmortale Altersschätzung. Weitere Untersuchungen werden zeigen, wie genau postmortale Altersschätzungen sein können, wenn Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNA-Methylierung aus verschiedenen Geweben in multivariaten Modellen verknüpft werden.

Schlüsselwörter

D-Asparaginsäure · Pentosidin · Massive parallele Sequenzierung · Epigenetik · Multivariate Analyse

Exploiting age information from posttranslational protein modifications and DNA methylation for postmortem age estimation. Concept and results of a pilot study

Abstract

The identification and description of “molecular clocks” (posttranslational protein modifications, DNA methylation) offer new possibilities for the development of methods for postmortem age estimation; however, so far these approaches have only been used independently. Their combination promises a better recording of highly complex aging processes and thus the possibility of developing optimized age estimation procedures for a wide variety of scenarios in forensic practice.

In preparation for large-scale research to test this hypothesis, different molecular clocks (accumulation of D-aspartic acid, accumulation of pentosidine and the DNA methylation markers RPA2, ZYG11A, F5, HOXC4, NKIRAS2, TRIM59, ELOVL2, DDO, KLF14 and PDE4C) were examined in 4 decay-

resistant tissues (bone, tendon, intervertebral disc, epiglottis) from 15 individuals.

In all tissues examined both protein markers as well as several DNA methylation markers showed a strong correlation with age. Thereby, the examined parameters showed tissue-specific changes with age. The results of the pilot study demonstrate the potential of combining molecular methods for postmortem age estimation. Further studies will show how accurate postmortem age estimates might be if age information from posttranslational protein modifications and DNA methylation from different tissues are combined in multivariate models.

Keywords

D-aspartic acid · Pentosidine · Massive parallel sequencing · Epigenetic · Multivariate analysis

de D-Asp sowohl im Gesamtprotein als auch in der nichtkollagenen Proteinfraction untersucht. Für die Analyse des Knochengesamtproteins wurde 1 mg des getrockneten Knochenpulvers in ein Pyrex-Röhrchen überführt. Zur Untersuchung der nichtkollagenen Fraktion wurden etwa 200 mg des getrockneten Knochenpulvers in 50 ml Falcon-Röhrchen eingewogen und eine Extraktion der nichtkollagenen Proteinfraction nach [16] durchgeführt.

Die DNA-Extraktion aus ca. 10 mg Gewebe der Epiglottis, Bandscheibe und Achillessehne erfolgte mit dem NucleoSpin® Tissue Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 100 µl Elutionspuffer eluiert.

Für die DNA-Extraktion aus Knochen wurde ein ca. 1 × 1 cm großes Knochenstück mithilfe von 0,5%iger Bleichelösung, „High-performance-liquid-chromatography“ (HPLC)-Wasser (Fa. International VWR, Darmstadt, Deutschland) und 96%igem Ethanol dekontaminiert. Das Knochenstück wurde mechanisch zerkleinert, und bis zu 150 mg des Knochenpulvers wurden nach dem „Supplementary Protocol: Extraction of DNA from Bone or teeth using the EZ1® DNA Investigator® Kit (June 2016)“ dekalzifiziert und lyisiert. Die DNA-Extraktion wurde nach dem „Large-Volume Protocol“ des EZ1® DNA Investigator® Kits und des EZ1-Advanced-XL-Extraktionsroboters (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die DNA wurde in 100 µl Elutionspuffer eluiert.

Die Quantifizierung wurde mithilfe des QuantiFluor® dsDNA System Kit sowie des Quantus™-Fluorometers (Fa. Promega, Walldorf) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Analysen

Pen

Die vorbereiteten Proben wurden in 1 ml einer 6 N Chlorwasserstoff(HCl)-Lösung für 18 h bei 110 °C hydrolysiert und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Die Messung des Pen erfolgte über HPLC nach der Methode von Odetti et al. [53], modifiziert nach Greis et al. [26]. Die Hydrolysate wurden in

1 ml 0,01 M HFBA-Puffer („heptafluorobutyric acid anhydride“, Fa. Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) in HPLC-grade gereinigtem Wasser (HiPerSolv Chromanorm®: Fa. VWR International, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und gefiltert (Syringe-Filter, Porendurchmesser 0,45 µm, Durchmesser: 25 mm; Fa. VWR International). Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Festphasenextraktion durchgeführt (Strata-X 33 µm Polymeric Reversed Phase; Fa. Phenomenex) und die Proben wieder über Nacht im Exsikkator getrocknet. Die eingetrockneten Proben wurden in 200 µl Pyridoxin-HFBA-Puffer (Pyridoxin 2,068815 µmol/ml, in 0,01 M HFBA) gelöst. Eine Kalibrierungskurve wurde mit Standards (Pentosidin 0,03303 nmol/ml in 0,01 M HFBA; Fa. Cayman Chemical) erstellt. Es wurden 50 µl jeder Probe in das HPLC-System injiziert (1260 Infinity II; Fa. Agilent; Eluent A: 0,1 % HFBA in HPLC-Wasser, Eluent B: Acetonitril „HPLC-grade“ ≥ 99,9 %), Flussrate 1 ml/min, Semi-Präparationssäule [Onyx™ Monolithic, Semi-Prep C18; Fa. Phenomenex], Säulentemperatur: 25 °C Extinktions-/Emissionswellenlänge: 335/385 nm).

D-Asparaginsäure

Die vorbereiteten Proben wurden in 1 ml einer 6 N HCl-Lösung für 6 h bei 100 °C hydrolysiert und über Nacht im Exsikkator getrocknet.

Die Messung des D-Asp erfolgte über HPLC nach der Methode von Kaufman und Manley [54], modifiziert nach Dobberstein et al. [20]. Die Hydrolysate wurden in 1 ml Probenpuffer (0,01 M HCL mit 1,5 mM Natriumacid und 0,03 mM L-Homo-Arginin) gelöst. Die gelöste Probe wurde in das HPLC-System (HPLC 1100 Reihe; Fa. Agilent, CA) injiziert (Eluent A: 23 mM Natriumacetat, 1,5 mM Natriumacid, 1 mM EDTA in HPLC-Wasser, Eluent B: nach Dobberstein et al. [20], Flussrate 0,56 ml/min, C18-Säule [BDS HYPERSIL C18, 250 × 3 mm, Partikelgröße 5 µm; Fa. Thermo Scientific], Säulentemperatur: 25 °C, Extinktions-/Emissionswellenlänge: 230/445 nm). Die Identifizierung der L- sowie D-Form von Asparaginsäure erfolgte anhand

der Retentionszeiten der Standardreinstoffen mithilfe der Analysesoftware „Agilent OpenLAB Control Panel“. Der Razemisierungsgrad wurde nach $\ln([1 + D\text{-Asp} / L\text{-Asp}] / [1 - D\text{-Asp} / L\text{-Asp}])$ [16] berechnet.

DNA-Methylierung

Bisulfitkonvertierung Es wurden 200 ng DNA mithilfe des Methylation EZ Gold Kit (Fa. Zymo Research Europe, Freiburg) konvertiert und in 15 µl H₂O eluiert. In einigen Fällen wurde weniger DNA konvertiert, da die aus der DNA-Extraktion gewonnene Menge geringer war. Die erhaltene einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde mithilfe des ssDNA Quantification Kit und des Qubit (beide Thermo Fisher Scientific [TFS], Waltham, MA, USA) für eine grobe Einschätzung der ssDNA-Menge quantifiziert.

Polymerase-Kettenreaktion und Vorbereitung für die massive parallele Sequenzierung

Ausgewählte DNA-Regionen von *RPA2*, *ZYG11A*, *F5*, *HOXC4*, *NKIRAS2*, *TRIM59*, *ELOVL2*, *DDO*, *KLF14* und *PDE4C* wurden, wenn möglich, mit je 10 ng konvertierter DNA in Einzel-Polymerase-Kettenreaktionen (Einzel-PCR) amplifiziert. Jeder Marker wurde in einem 6,5-µl-Reaktionsvolumen, bestehend aus 2,5 µl PyroMark Master Mix (Fa. Qiagen, Hilden), 2,5 pmol beider Primer, 0,5 µg bovinem Serumalbumin (BSA; Fa. TFS), der DNA und DNA-freiem H₂O amplifiziert. Die Primer-Sequenzen können der Arbeit von Naue et al. [38] entnommen werden. Die Primer für *PDE4C* wurden auf Basis von der Publikation von Weidner et al. [55] modifiziert und für MPS angepasst. Eine „touch-up PCR“ wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 95 °C 10 min; 15 Zyklen: 98 °C 45 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s; 25 Zyklen: 98 °C 45 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s; finale Elongation bei 72 °C für 10 min. Die erfolgreiche Amplifikation wurde mit einem 2%igen Agarosegel überprüft, und die PCR-Produkte pro Individuum wurden zusammengeführt. Die PCR-Produkte wurden unter Nutzung von 1,9-fach magnetischen Partikeln (Fa. GE Healthcare, Little Chalfont, UK; vorbereitet und nach Rohland und Reich

Tab. 1 Spearman-Korrelation (ρ) zwischen dem gemessenen molekularen Marker und dem Alter

Marker	GRCh38 ^a	CpG	ρ	95 %-KI	Adj p	CpG	ρ	95 %-KI	Adj p
		Achillessehne				Bandscheibe			
Protein-analyse	D-Asp	–	–	0,932	[0,8, 0,98]	<0,0001	0,871	[0,65, 0,96]	<0,0001
	Pen	–	–	0,957	[0,87, 0,99]	<0,0001	–	0,871	[0,65, 0,96]
DNA-Methylierung	DDO	chr 6: 110415496-110415579	1	–0,371	[–0,74, 0,17]	0,2041	1	–0,718	[–0,9, –0,33]
	ELOVL2	chr 6: 11044628-11044741	8	0,911	[0,75, 0,97]	<0,0001	1	0,861	[0,62, 0,95]
	F5	chr 1: 169586762-169586862	1	0,307	[–0,24, 0,71]	0,3049	2	–0,800	[–0,93, –0,49]
	HOXC4	chr 12: 54054480-54054538	1	0,354	[–0,19, 0,73]	0,2283	1	0,211	[–0,34, 0,65]
	KLF14	chr 7: 130734348-130734413	2	0,939	[0,82, 0,98]	<0,0001	3	0,821	[0,53, 0,94]
	NKIRAS2	chr 17:42025363-42025471	1	–0,189	[–0,64, 0,36]	0,5511	2	–0,750	[–0,91, –0,39]
	PDE4C	chr 19:18232966-18233106	17	0,918	[0,77, 0,97]	<0,0001	6	0,871	[0,65, 0,96]
	RPA2	chr 1: 27915013-27915089	1	0,914	[0,76, 0,97]	<0,0001	3	0,886	[0,68, 0,96]
	TRIM59	chr 3: 160450168-160450243	8	0,921	[0,77, 0,97]	<0,0001	8	0,918	[0,77, 0,97]
	ZYG11A	chr 1: 52843080-52843210	3	0,900	[0,72, 0,97]	0,0001	19	0,850	[0,6, 0,95]
		Epiglottis				Knochen			
Protein-analyse	D-Asp	–	–	0,979	[0,94, 0,99]	0	–	TP: 0,896/ NCP: 0,896	TP: [0,71, 0,97]/ NCP: [0,71, 0,97]
	Pen	–	–	0,964	[0,89, 0,99]	0	–	0,904	[0,73, 0,97]
DNA-Methylierung	DDO	chr 6: 110415496-110415579	1	–0,661	[–0,88, –0,22]	0,0084	1	–0,729	[–0,9, –0,35]
	ELOVL2	chr 6: 11044628-11044741	1	0,893	[0,7, 0,96]	<0,0001	1	0,964	[0,89, 0,99]
	F5	chr 1: 169586762-169586862	2	–0,625	[–0,86, –0,17]	0,0139	2	–0,496	[–0,8, 0,02]
	HOXC4	chr 12: 54054480-54054538	1	0,846	[0,59, 0,95]	0,0001	1	0,750	[0,39, 0,91]
	KLF14	chr 7: 130734348-130734413	3	0,946	[0,84, 0,98]	<0,0001	3	0,929	[0,79, 0,98]
	NKIRAS2	chr 17:42025363-42025471	3	–0,786	[–0,93, –0,46]	0,0008	2	–0,668	[–0,88, –0,24]
	PDE4C	chr 19:18232966-18233106	17	0,936	[0,81, 0,98]	<0,0001	17	0,936	[0,81, 0,98]
	RPA2	chr 1: 27915013-27915089	2	0,911	[0,75, 0,97]	<0,0001	3	0,979	[0,94, 0,99]
	TRIM59	chr 3: 160450168-160450243	7	0,932	[0,8, 0,98]	<0,0001	3	0,942	[0,83, 0,98]
	ZYG11A	chr 1: 52843080-52843210	18	0,929	[0,79, 0,98]	<0,0001	19	0,896	[0,71, 0,97]45332

Angegeben sind der Marker, der Spearman-Korrelationskoeffizient (ρ), das 95 %-Konfidenzintervall (95 %-KI) und der p-Wert nach Anpassung durch die Benjamini-Hochberg Methode (Adj p)

Kursiv hervorgehobene Werte für ρ , 95 %-KI und Adj p: Spearman-Korrelation über 0,6; hohe Korrelation durch 95 %-KI noch nicht bestätigt; fett hervorgehobene Werte für ρ , 95 %-KI und Adj p: Spearman-Korrelation über 0,6 und hohe Korrelation durch 95 %-KI-Intervall bestätigt

TP totale Phase, NCP nichtkollagene Phase

^aAnalysierter Bereich

Abb. 1 ▲ Altersabhängige Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp) und Pentosidin (Pen) in 4 Geweben von 15 Individuen. Pen-Gehalt (a) sowie D-Asp-Gehalt (b) der 4 verschiedenen Gewebe in Korrelation zum Lebensalter. Zur besseren Visualisierung wurde eine lineare Regressionsgerade eingefügt

[56]) gereinigt. Die zweite PCR zum Anhängen der Adapter/Indizes erfolgte mit 2 µl der vereinten Probe, 6,25 µl des NEBNext Ultra II Q5 Master Mix (Fa. New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), je 5 pmol vom i5- und i7-Indexprimer (NexteraXT) und 2,25 µl DNA-freiem H₂O. Folgende Reaktionsbedingungen wurden genutzt: 98 °C 30 s; 6 Zyklen: 98 °C 10 s, 62 °C 30 s, 65 °C 45 s; finale Elongation bei 65 °C für 5 min. Die PCR-Produkte wurden 2-mal mit 1,6-fach vorbehandelten magnetischen Partikeln gereinigt. Die DNA Quantität jedes Amplikon-Pools wurde mit dem dsDNA High-Sensitivity Qubit Quantification Kit (Fa. TFS) gemessen, und die Amplikons wurden äquimolar vereint. Der finale 10,5 pM Amplikon-Pool aller Proben wurde mit einem MiSeq FGx (Fa. Verogen, San Diego, CA, USA) unter Nutzung von 300 bp v2 Micro und Nano Kits im 2 × 150 bp-Modus sequenziert. Die erhaltenen FastQ-Dateien wurden mithilfe der zuvor beschriebenen Pipeline analysiert [38, 43], wobei die Analyse auf *PDE4C* erweitert wurde. Eine 1000 × Abdeckung wurde angestrebt, wobei aufgrund geringer DNA-Menge im Material in Ausnahmefällen auch Werte mit einer Abdeckung von mindestens 600 × gewertet wurden.

Datenaufbereitung und statistische Analyse

Die Datenauswertung erfolgte mit Jupyterlab 1.2.6 des Anaconda Navigator v1.9.7 unter Nutzung von Python 3.6. Die Auswertung erfolgte mit den Analysepaketen pandas v1.0.1, pingouin v0.3.8 [57] und seaborn v0.10.0. Zur initialen Einschätzung der Korrelation wurde die Spearman-Korrelation berechnet. Um die erhaltenen Ergebnisse besser einzuschätzen, wurde das 95 %-Konfidenzintervall berücksichtigt und bei der DNAm-Analyse aufgrund der parallelen Analyse von 84 CpG-Positionen auch die Benjamini-Hochberg-Methode für das multiple Testen angewendet („false discovery rate“ [FDR] von 5 %).

Ergebnisse

Durchführbarkeit der parallelen Analyse

Es wurden D-Asp, Pen sowie DNAm von 10 ausgewählten Markern in 4 Geweben von 15 Leichen erfolgreich analysiert. Für die Proteinmarker waren die eingesetzten Probenmengen ausreichend; die Qualität der Chromatogramme war sehr gut. Bei der DNAm wurden aufgrund geringerer DNA-Mengen in einzelnen Proben vereinzelt Werte mit einer Molekülbedeckung unter 1000 ×, jedoch über 600 × erhalten. Bei einer 1000 × Abdeckung muss mit einer

maximalen Ungenauigkeit von ± 3,1 % gerechnet werden. Da diese bei 600 × mit ± 4,0 % kaum größer ausfällt, hatte dies keine generelle Auswirkung auf die präsentierten Ergebnisse.

Altersabhängigkeit der Marker in den Geweben

Einen Überblick über die Ergebnisse der statistischen Auswertung der erhobenen Daten gibt **Tab. 1**. Die Korrelation der untersuchten Parameter mit dem Alter wurde anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten ρ beschrieben; zudem wurde das 95 %-Konfidenzintervall berechnet, um den erhaltenen Koeffizienten besser zu bewerten. Während die beiden Proteinmarker Pen und D-Asp in allen untersuchten Geweben eine starke Korrelation mit dem Alter zeigten, gab es bei den DNAm-Markern gewebespezifische Unterschiede.

Die stärksten Korrelationen mit dem Alter fanden sich für die Achillessehne und die Epiglottis (**Tab. 1**). Eine starke Korrelation zwischen dem Alter und der DNAm – auch unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls – wurde in allen 4 Geweben im Fall von *ELOVL2*, *KLF14*, *PDE4C*, *RPA2*, *TRIM59* und *ZYG11A* festgestellt (**Tab. 1**). Zum Teil wiesen unter Nutzung des hier verwendeten Probenkollektivs unterschiedliche CpG-Positionen die höchste Korrelation auf, wobei die Korrelationen der benachbarten CpG-Positionen meist vergleichbar waren. Daher listet **Tab. 1** den jeweiligen Wert für die CpG-Position mit der höchsten Korrelation auf. Für andere Marker, wie z.B. *NKIRAS2*, konnte im Probenkollektiv keine Altersabhängigkeit in der Achillessehne, jedoch in den anderen Geweben festgestellt werden. Die hohe, bereits statistisch signifikante, detektierte Altersabhängigkeit sollte unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls in einigen Markern durch Untersuchung einer höheren Probenzahl bestätigt werden (kursiv hervorgehoben in **Tab. 1**), um eine zufällige Messung auszuschließen.

Abb. 2 ▲ DNA-Methylierung (DNAm)-Analyse aus 4 Geweben von 15 Individuen. Die Abbildungen zeigen die DNAm der 4 Gewebe für eine beispielhaft ausgewählte CpG-Position pro Loci. Zur besseren Visualisierung wurde eine lineare Regressionsgerade eingefügt

Gewebespezifische Unterschiede der Akkumulation altersabhängiger Marker

Aus **Abb. 1** ergibt sich, dass D-Asp sowie Pen in allen untersuchten Geweben mit dem Lebensalter akkumulieren, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß und mit unterschiedlicher Streuung.

Die Akkumulation von Pen ist in der Bandscheibe sowie der Achillessehne am höchsten, gefolgt von der Epiglottis. Die Streuung der Werte nimmt mit zunehmendem Lebensalter zu. Die Akkumulation der Modifikationen im Knochen ist dagegen vergleichsweise gering. D-Asparaginsäure akkumuliert am meisten in der nichtkollagenen Knochenfrakti-

on, der Bandscheibe und der Epiglottis, deutlich weniger in der Achillessehne und im Gesamtprotein des Knochens.

Für die DNAm wurde in **Abb. 2** beispielhaft jeweils eine CpG-Position dargestellt, die bei diesem Probenkontingent im Schnitt die beste Korrelation über alle Gewebe aufzeigte.

Wie bei D-Asp und Pen zeigt sich, dass die Veränderung des DNAm-Niveaus über die Jahre nicht in allen Geweben gleich stark verläuft. Während sich z.B. die DNAm an der CpG-Position *ELOVL2_1* in der Epiglottis und dem Knochen gleich stark verändert, nimmt die DNAm in der Bandscheibe und der Achillessehne weniger stark zu, wobei sich auch hier die Steigungen bei der

Achillessehne und der Bandscheibe ähneln. Dennoch weist die Bandscheibe in diesem Marker ein generell niedrigeres DNAm-Niveau auf. Diese Unterschiede in der Stärke der Veränderung und dem generellen DNAm-Level zwischen den Geweben findet sich auch in den meisten anderen Markern. Zum Beispiel weist die Bandscheibe gegenüber der Epiglottis auch in *KLF14*, *PDE4C*, *RPA2*, *TRIM59* und *ZYG11A* ein generell niedrigeres DNAm-Niveau auf.

Diskussion

Hintergrund der Durchführung dieser Pilotstudie war das übergeordnete Ziel, das Potenzial der untersuchten Prote-

in- und DNAm-Marker für postmortale Lebensaltersschätzungen zu untersuchen, um diese zukünftig optimal nutzen zu können. Dieses Ziel wird von der Hypothese geleitet, dass die kombinierte Nutzung von Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNAm aus verschiedenen Geweben in multivariaten Modellen genauere Ergebnisse von Altersschätzungen eröffnet als die Analyse einzelner Parameter.

Die durchgeführte Pilotstudie lieferte Daten, die für die Planung umfangreicher systematischer Untersuchungen zur Überprüfung der beschriebenen Hypothese und zur Entwicklung neuer Verfahren zur postmortalen Altersschätzung wichtig sind.

Das hier untersuchte Marker-Set wurde zum ersten Mal an identischen Proben analysiert. Für einige der analysierten Parameter gab es zuvor noch keine Daten (z. B. für Pen und D-Asp in der Achillessehne sowie DNAm in Achillessehne, Bandscheibe und Epiglottis). Die jetzt erhobenen Daten belegen eine starke Korrelation der Proteinmarker (D-Asp, Pen) sowie jeweils mehrerer DNAm-Marker mit dem Lebensalter in allen der untersuchten fäulnisresistenten Gewebe. Dabei wiesen die untersuchten Parameter gewebsspezifische Werte auf. Während beispielsweise D-Asp im Achillessehnen-gewebe nur langsam akkumulierte (was auf die übergeordnete räumliche Struktur des Kollagens zurückgeführt werden kann [58]), stellte sich für Pen eine vergleichsweise rasche Akkumulation mit zunehmendem Alter in diesem Gewebe dar.

Die unterschiedlich rasche Akkumulation von D-Asp in Knochengesamtgewebe und der nichtkollagenen Proteinfraktion ist dadurch zu erklären, dass die organische Matrix des Gesamtgewebes zu 90 % aus Kollagenen besteht, in dem D-Asp aufgrund sterischer Hindernisse nur langsam akkumuliert [58].

Bei den Knochenproben war ein Vergleich der DNAm-Daten mit Ergebnissen einer vorherigen Studie möglich; die hier gemessene moderate Korrelation in *F5* bzw. hohen Korrelationen in allen anderen Markern wurde/wurden auch bereits zuvor beobachtet [43]. Ansonsten

zeigten sich hier gewebespezifisch verschieden starke Schwankungen bei den DNAm-Markern.

Insgesamt weisen die erhobenen Daten daraufhin, dass die untersuchten Gewebe über die Analyse der Protein- und DNAm-Marker Altersinformationen liefern, die in einem multivariaten Modell zur Altersschätzung genutzt werden könnten. Natürlich erlauben die erhobenen Daten keine abschließenden Schlussfolgerungen. Dennoch stimmen sie optimistisch, dass auf ihrer Basis eine umfangreiche Studie geplant wird. Die Vision ist ein System aus multivariaten Modellen auf Basis von D-Asp, Pen und DNAm, das möglichst genaue postmortale Altersschätzungen unter den unterschiedlichen Voraussetzungen der forensischen Praxis ermöglicht, indem es die jeweils noch erhebbaren Parameter in optimaler Weise berücksichtigt und so möglichst viele Altersinformationen abrufen. Es wird erwartet, dass über diesen Ansatz deutlich genauere Ergebnisse postmortaler Altersschätzungen erreichbar sind als über konventionelle morphologische Untersuchungen oder die Nutzung nur einzelner molekularer Parameter.

Korrespondenzadresse

Julia Becker

Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf
Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Deutschland
Julia.Becker@med.uni-duesseldorf.de

Jana Naue

Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Deutschland
jana.naue@uniklinik-freiburg.de

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

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. J. Becker, J. Naue, A. Reckert, P. Böhme und S. Ritz-Timme geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Die postmortal asservierten menschlichen Proben und die Analyse molekularer Marker wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der

Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt.

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>.

Literatur

1. Herzog A (2020) SOKO Soien: Das Rätsel der unbekannten Toten, 1. Aufl. hansen, Feldafing
2. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S (2017) Biological age predictors. *EBioMedicine* 21:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.046>
3. Salameh Y, Bejaoui Y, El Hajj N (2020) DNA methylation biomarkers in aging and age-related diseases. *Front Genet* 11:171. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00171>
4. Truscott RJW, Schey KL, Friedrich MG (2016) Old proteins in man: a field in its infancy. *Trends Biochem Sci* 41:654–664. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.06.004>
5. Zapico S, Ubelaker DH (2013) Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Res Rev* 12:605–617. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.02.002>
6. Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ et al (2000) Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *Int J Legal Med* 113:129–136. <https://doi.org/10.1007/s004140050283>
7. Zolotarev AD, Chekalin EV, Bruskin SA (2019) Modern molecular genetic methods for age estimation in forensics. *Russ J Genet* 55:1460–1471. <https://doi.org/10.1134/S1022795419120147>
8. Meissner C, Ritz-Timme S (2010) Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int* 203:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.010>
9. Böhme P, Reckert A, Becker J, Ritz-Timme S (2021) Molecular methods for age estimation. *Rechtsmedizin*. <https://doi.org/10.1007/s00194-021-00490-9>
10. Ritz-Timme S, Collins MJ (2002) Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Res Rev* 1:43–59. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00363-3)
11. Zapico SC (Hrsg) (2017) Mechanisms linking aging, diseases and biological age estimation. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton

12. Chen S, Lv Y, Wang D et al (2016) Aspartic acid racemization in dentin of the third molar for age estimation of the Chaoshan population in South China. *Forensic Sci Int* 266:234–238. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.06.010>
13. Elfawal MA, Alqattan SI, Ghallab NA (2015) Racemization of aspartic acid in root dentin as a tool for age estimation in a Kuwaiti population. *Med Sci Law* 55:22–29. <https://doi.org/10.1177/0025802414524383>
14. Ohtani S, Yamamoto T (2010) Age estimation by amino acid racemization in human teeth. *J Forensic Sci* 55:1630–1633. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01472.x>
15. Yekkala R, Meers C, van Schepdael A et al (2006) Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age. *Forensic Sci Int* 159:S89–S94. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.02.022>
16. Ritz-Timme S (1999) Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche; mit 6 Tabellen. Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, Bd. 23. Schmidt-Römhild, Lübeck
17. Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins MJ (2003) Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br J Dermatol* 149:951–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2003.05618.x>
18. Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins M (2003) Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *Int J Legal Med* 117:96–101. <https://doi.org/10.1007/s00414-002-0355-2>
19. Ritz S, Turzynski A, Schütz HW et al (1996) Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: basis for an accurate age at death determination. *Forensic Sci Int* 77:13–26. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01834-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01834-4)
20. Dobberstein RC, Tung S-M, Ritz-Timme S (2010) Aspartic acid racemization in purified elastin from arteries as basis for age estimation. *Int J Leg Med* 124:269–275. <https://doi.org/10.1007/s00414-009-0392-1>
21. Ritz S, Turzynski A, Schütz HW (1994) Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in noncollagenous bone proteins. *Forensic Sci Int* 69:149–159. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(94\)90251-8](https://doi.org/10.1016/0379-0738(94)90251-8)
22. Ritz S, Schütz H-W (1993) Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to postmortem estimation of age at death. *J Forensic Sci* 38:13449J. <https://doi.org/10.1520/JFS13449J>
23. Ahmed N (2005) Advanced glycation end-products—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67:3–21. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.09.004>
24. Singh R, Barden A, Mori T et al (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44:129–146. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>
25. Suji G, Sivakami S (2004) Glucose, glycation and aging. *Biogerontology* 5:365–373. <https://doi.org/10.1007/s10522-004-3189-0>
26. Greis F, Reckert A, Fischer K et al (2018) Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation? *Int J Leg Med* 132:799–805. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1671-x>
27. Valenzuela A, Guerra-Hernández E, Rufián-Henares JA et al (2018) Differences in non-enzymatic glycation products in human dentine and clavicle: changes with aging. *Int J Leg Med* 132:1749–1758. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1908-3>
28. Pillin A, Pudil F, Bencko V et al (2007) Contents of pentosidine in the tissue of the intervertebral disc as an indicator of the human age. *Soud Lek* 52:60–64
29. Becker J, Mahlke NS, Reckert A et al (2020) Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study. *Int J Leg Med* 134:721–733. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02054-9>
30. Mahlke NS, Renhart S, Talaa D, Reckert A, Ritz-Timme S (2021) Molecular clocks in ancient proteins: Do they reflect the age at death even after millennia? *Int J Legal Med*. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02522-1>
31. Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13:484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
32. Jones PA, Taylor SM (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20:85–93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90237-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90237-8)
33. Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
34. Vidaki A, Kayser M (2018) Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Sci Int Genet* 37:180–195. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.08.008>
35. Parson W (2018) Age estimation with DNA: from forensic DNA fingerprinting to forensic (Epi)Genomics: a mini-review. *Gerontology* 64:326–332. <https://doi.org/10.1159/000486239>
36. Kader F, Ghai M (2015) DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Sci Int* 249:255–265. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.01.037>
37. Freire-Aradas A, Phillips C, Lareu MV (2017) Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. *Forensic Sci Rev* 29:121–144
38. Naue J, Hoefsloot HCJ, Mook ORF et al (2017) Chronological age prediction based on DNA methylation: massive parallel sequencing and random forest regression. *Forensic Sci Int Genet*. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.015>
39. Jung S-E, Lim SM, Hong SR et al (2019) DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. *Forensic Sci Int Genet* 38:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.010>
40. Aliferi A, Ballard D, Gallidabino MD et al (2018) DNA methylation-based age prediction using massively parallel sequencing data and multiple machine learning models. *Forensic Sci Int Genet*. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.003>
41. Naue J, Hoefsloot HCJ, Kloosterman AD et al (2018) Forensic DNA methylation profiling from minimal traces: how low can we go? *Forensic Sci Int Genet* 33:17–23. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.004>
42. 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*. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102189>
43. Naue J, Sängert T, Hoefsloot HCJ et al (2018) Proof of concept study of age-dependent DNA methylation markers across different tissues by massive parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 36:152–159. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.07.007>
44. Correia Dias H, Cordeiro C, Corte Real F et al (2020) Age estimation based on DNA methylation using blood samples from deceased individuals. *J Forensic Sci* 65:465–470. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14185>
45. Hamano Y, Manabe S, Morimoto C et al (2016) Forensic age prediction for dead or living samples by use of methylation-sensitive high resolution melting. *Leg Med*. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.05.001>
46. Koop BE, Mayer F, Gündüz T et al (2020) Postmortem age estimation via DNA methylation analysis in buccal swabs from corpses in different stages of decomposition—a “proof of principle” study. *Int J Legal Med*. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02360-7>
47. Lee HY, Hong SR, Lee JE et al (2020) Epigenetic age signatures in bones. *Forensic Sci Int Genet* 46:102261. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102261>
48. Eipel M, Mayer F, Arent T et al (2016) Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *Aging*. <https://doi.org/10.18632/aging.100972>
49. Sirin N, Matzenauer C, Reckert A et al (2018) Age estimation based on aspartic acid racemization in dentine: what about caries-affected teeth? *Int J Legal Med* 132:623–628. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1667-6>
50. Koop BE, Reckert A, Becker J et al (2020) Epigenetic clocks may come out of rhythm—implications for the estimation of chronological age in forensic casework. *Int J Legal Med* 134:2215–2228. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02375-0>
51. Shi L, Jiang F, Ouyang F et al (2018) DNA methylation markers in combination with skeletal and dental ages to improve age estimation in children. *Forensic Sci Int Genet* 33:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.005>
52. Cho S, Jung S-E, Hong SR et al (2017) Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. *Forensic Sci Int Genet* 29:250–256. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.020>
53. Odetti P, Fogarty J, Sell DR et al (1992) Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diab.41.2.153>
54. Kaufman DS, Manley WF (1998) A new procedure for determining dl amino acid ratios in fossils using reverse phase liquid chromatography. *Quat Sci Rev* 17:987–1000. [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(97\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(97)00086-3)
55. Weidner CI, Lin Q, Koch CM et al (2014) Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
56. Rohland N, Reich D (2012) Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Res*. <https://doi.org/10.1101/gr.128124.111>
57. Vallat R (2018) Pingouin: statistics in Python. *JOSS* 3:1026. <https://doi.org/10.21105/joss.01026>
58. Collins MJ, Waite ER, van Duin AC (1999) Predicting protein decomposition: the case of aspartic-acid racemization kinetics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:51–64. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0359>