

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme

**Lebensaltersschätzung anhand molekularer und morphologischer
Parameter über einen multivariaten Ansatz:**

**Eine „Proof of Concept“-Studie an einem kieferchirurgischen
Probandengut**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tatjana Siahaan

(2022)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. dent. Alfons Hugger

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Siahaan T, Reckert A, Becker J et al., (2021), Molecular and morphological findings in a sample of oral surgery patients: What can we learn for multivariate concepts for age estimation?. *J Forensic Sci.* 66:1524-1532. doi: 10.1111/1556-4029.14704

Zusammenfassung

Die Schätzung des Lebensalters eines Menschen ist ein zentrales Thema in der Rechtsmedizin. Entsprechend ist die Entwicklung möglichst zuverlässiger Methoden zur Lebensaltersschätzung Gegenstand rechtsmedizinischer Forschung.

Bei jungen Probanden liefern dentale und skelettale morphologische Verfahren gute Ergebnisse bei der Altersschätzung. Anders ist es bei älteren Probanden, da mit Abschluss des Wachstums nur noch degenerative, sehr variable Altersveränderungen allenfalls grobe Rückschlüsse auf das Alter geben. Es gibt jedoch bereits einige vielversprechende molekulare Verfahren zur Lebensaltersschätzung, beispielsweise auf Basis der Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp), von Pentosidin (Pen) oder der DNA-Methylierung (DNAm). Die meisten Methoden zur Schätzung des Lebensalters stützen sich auf univariate Modelle, nur wenige nutzen mehrere Parameter in einem multivariaten Ansatz, obwohl anzunehmen ist, dass multivariate Ansätze durch Berücksichtigung mehrerer biologischer Ebenen die Variabilität der Alterungsprozesse besser erfassen und so genauere Altersschätzungen liefern sollten.

Ziel dieser *proof of concept*- Studie war die Klärung der Frage, ob und wann multivariate Modelle tatsächlich besser zur Altersschätzung geeignet sind als univariate.

In einem kieferchirurgischen Patientengut wurden D-Asp und Pen in 66 Zähnen, DNAm (5 Genorte) in 88 Mundschleimhaut-Abstrichen sowie der Mineralisierungsgrads der Weisheitszähne in 69 Orthopantomogrammen bewertet. Mit den erhobenen Daten wurden uni- und multivariate Modelle zur Lebensaltersschätzung erstellt und die Genauigkeit der Altersschätzungen mit den Modellen verglichen.

Die Kombinationen D-Asp / Pen sowie DNAm / Morphologie verbesserten die Resultate bei der Altersschätzung im Vergleich zu den jeweils univariaten Modellen, die Kombination von D-Asp, Pen und DNAm verglichen mit dem bivariaten Modell D-Asp / Pen dagegen nicht.

Demnach können multivariate Modelle genauere Ergebnisse generieren, allerdings ist nicht jede Kombination zielführend.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zähne und Mundschleimhautabstriche von überwiegend jungen Menschen untersucht, es lagen hier deshalb optimale Bedingungen für Altersschätzungen vor. Unter so günstigen Bedingungen entfaltet sich das Potential multivariater Ansätze nur begrenzt. In der realen Fallarbeit liegen häufig sehr komplexe Bedingungen vor (keine Zähne, andere Gewebe als suboptimales Untersuchungsmaterial). Insbesondere in solchen Fällen dürfte es gelingen, über die Verknüpfung verschiedener molekularer (und morphologischer) Parameter relevante diagnostische Lücken zu schließen.

Abstract

Estimating the age of a person is a central issue in forensic medicine. Accordingly, the development of methods for estimating age that are as reliable as possible is the task of forensic medical research.

In young individuals, dental and skeletal morphological methods provide good results for age estimation. In older individuals, estimation based on morphology is no longer useful, since - with the completion of growth - only degenerative, highly variable age changes provide conclusions about age. However, there are already some promising molecular models that, for example, determine the accumulation of D-aspartic acid (D-Asp) or of pentosidine (Pen) or examine the degree of DNA methylation (DNAm). Most studies concerning the estimation of age examine univariate models, only a few describe several parameters in a multivariate approach although it is assumed that multivariate approaches, by considering multiple biological levels, should better capture the variability of aging processes and thus provide more accurate age estimates.

Therefore, the aim of this proof-of-concept study is to clarify whether multivariate models are better suited for age estimation than univariate ones and when which parameters should be combined.

In a sample of oral surgery patients, 66 teeth were used for age estimation using accumulation of D-Asp and Pen, DNAm was examined on five markers from 88 buccal swabs and 69 orthopantomograms of young individuals were reviewed to assess the degree of mineralization of wisdom teeth. Univariate and multivariate models for age estimation were created and compared using the collected data.

The combinations of D-Asp/ Pen as well as DNAm/ morphology improved the results in age estimation compared to the corresponding univariate models, whereas the combination of D-Asp, Pen and DNAm compared to the bivariate model D-Asp/ Pen did not.

Accordingly, multivariate models can generate more accurate results but not every combination is beneficial. In the presented study, teeth and buccal swabs of mostly young people were examined. Therefore, the conditions for age estimation were optimal. Under such ideal conditions, the potential of multivariate approaches is limited. In real case work, very complex conditions are often present (no teeth, other tissues as suboptimal examination material). Especially in such cases it should be possible to close relevant diagnostic gaps by combining different molecular (and morphological) parameters.

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced glycation end product
AGFAD	Arbeitsgemeinschaft für Forensische Altersdiagnostik
C	Kohlenstoff
CH₃	Methylgruppe
CpG	Chemische Verbindung: Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin
D-Asp	D-Asparaginsäure
D-Iso-Asp	D-Iso-Asparaginsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAm	DNA-Methylierung
DNMT	DNA-Methyltransferase
GC	Gas-Chromatograph
H	Wasserstoff
H₂O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatograph
L-Asn	L-Asparagin
L-Asp	L-Asparaginsäure
L-Iso-Asp	L-Iso-Asparaginsäure
MAD	<i>mean absolute deviation</i>
MAE	<i>mean absolute error</i>
NH₃	Ammoniak
O	Sauerstoff
OH	Hydroxid
OPTG	Orthopantomogramm
Pen	Pentosidin
r	Korrelationskoeffizient

SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
sjTRECs	<i>single joint T-cell receptor excision circles</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Forensische Lebensaltersschätzung: Fragestellungen.....	1
1.2	Methoden der Altersschätzung	2
1.3	Konventionelle Lebensaltersschätzung durch morphologische Methoden.....	3
1.4	Methoden zur molekularen Lebensaltersschätzung	4
1.4.1	Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp)	4
1.4.2	Akkumulation von advanced glycation end products (AGEs).....	7
1.4.3	Methylierung der DNA.....	9
1.5	Möglichkeiten und Grenzen des derzeit verfügbaren Methodenrepertoires.....	11
1.6	Ziel der Arbeit	12
2	Publikation <i>Molecular and morphological findings in a sample of oral surgery patients: What can we learn for multivariate concepts for age estimation? Siahaan T, Reckert A, Becker J, Eickhoff SB, Koop B, Gündüz T, Böhme P, Mayer F, Küppers L, Wagner W, Ritz-Timme S, Journal of Forensic Sciences 66:1524-1532 (2021)</i>	13
3	Weitere erhobene Daten	14
3.1	Methode	14
3.2	Ergebnisse.....	14
4	Diskussion	17
4.1	Wozu multivariate Ansätze?.....	17
4.2	Multivariate Modelle auf Basis von Proteinmarkern (D-Asp, Pen), DNAm und morphologischen Altersveränderungen	19
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	21
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	22
6	Danksagung	31

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten grundsätzlich für alle Geschlechter.

1 Einleitung

1.1 Forensische Lebensaltersschätzung: Fragestellungen

Die Schätzung des Lebensalters eines Individuums ist im forensischen Kontext von hoher Relevanz. Beim Fund unbekannter Verstorbener können zunächst medizinische Daten mit denen vermisster Personen verglichen werden, beispielsweise der Zahnstatus oder die Einsetzung von Implantaten. Zuvor muss allerdings der Kreis infrage kommender vermisster Personen durch Erhebung von Daten zu Geschlecht, Körpergröße, Ethnie und Alter eingegrenzt werden [1]. Je genauer diese Daten sind, umso besser lässt sich die Identität der Person ermitteln.

Aber auch bei lebenden Individuen gewinnt die Lebensaltersschätzung zunehmend an Bedeutung. In den vergangenen Jahren hat die Migration nach Deutschland immer weiter zugenommen, wobei in zahlreichen Fällen keine Identifikationspapiere vorgewiesen werden können. Zur Klärung rechtlicher Fragen ist das Alter der Betroffenen jedoch von großer Relevanz [2]. Einige rechtlich relevante Altersgrenzen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Rechtsbereich	Fragestellung	Altersgrenze	Paragraph
Strafrecht	Jugendstrafrecht	14	§ 19 StGB, § 3 JGG
	Anwendung von Jugend- oder Erwachsenenstrafrecht	18/21	§§ 1, 105, 106 JGG
Zuwanderungsrecht	Vormundschaft jugendlicher Asylbewerber	18	§1773 BGB
	Handlungsfähigkeit	18	§ 12 AsylVfG, § 80 AufenthG
Sozialrecht	Rentenanspruch	65/67	§38 SGB VI, §35 SGB VI

Tabelle 1 Altersgrenzen: Rechtsbereiche, Fragestellungen und rechtlich relevante Altersgrenzen (verändert nach Schmeling 2016 [2])

1.2 Methoden der Altersschätzung

Für die Altersschätzung an Verstorbenen, im Rahmen der Identifikation, basieren traditionelle Methoden auf der Beurteilung morphologischer Veränderungen, insbesondere von Knochen- und Zahnentwicklung [3, 4]. In den letzten Jahrzehnten und Jahren wurden immer mehr molekulare Ansätze zur Schätzung des Lebensalters von Verstorbenen vorgeschlagen. Vielversprechende Verfahren sind posttranslationale Proteinmodifikationen wie die Akkumulation von D-Asparaginsäure oder Pentosidin [5-10], sowie die Altersschätzung anhand von DNA-Modifikationen wie der DNA-Methylierung [11-15]. Andere molekulare Ansätze wie die Nutzung der Länge der Telomere, mitochondrialer Mutationen und sogenannter „*single joint T-cell receptor excision circles* (sjTREC)s“ [16, 17] haben sich allerdings nicht durchgesetzt, da die nötige Präzision für die forensische Altersschätzung nicht erreicht werden konnte und andere Verfahren präzisere Ergebnisse liefern [12, 17-19].

Die Möglichkeiten einer Altersschätzung an Lebenden sind unter anderem durch ethische Grundsätze und rechtliche Bestimmungen beschränkt [20]. Hier stützt sich die Altersschätzung derzeit auf die Beurteilung der Entwicklung von Zähnen, des Handskeletts und der Clavicula. So empfiehlt die Arbeitsgemeinschaft für Forensische Altersdiagnostik (AGFAD) zur Altersschätzung bei (lebenden) Jugendlichen und jungen Erwachsenen im Strafverfahren eine körperliche Untersuchung, eine Röntgenuntersuchung der linken Hand, die Erhebung eines Zahnstatus, eine Röntgenaufnahme des Gebisses und - bei abgeschlossener Handskelettentwicklung - eine zusätzliche Untersuchung der Schlüsselbeine mittels Röntgen oder Computertomographie [21]. Dabei ist das *minimum-age concept* anzuwenden, das sicherstellt, dass das Alter der untersuchten Person niemals überschätzt wird, das ermittelte Alter also nicht über dem tatsächlichen chronologischen Lebensalter liegt, damit sich kein rechtlicher Nachteil für die untersuchte Person ergibt [2]. Es wurden weitere Empfehlungen zur Altersschätzung an Lebenden formuliert, so zur Altersschätzung bei jungen Menschen außerhalb des Strafverfahrens und im Rentenverfahren. Bei der Altersschätzung außerhalb des Strafverfahrens ist der Einsatz strahlenbelastender radiologischer Verfahren nur erlaubt, wenn eine rechtliche Legitimierung vorliegt. Liegen bereits Röntgenbilder vor, bei denen Identität der Person und Entstehungsdatum gesichert sind, können diese zur Altersschätzung genutzt werden [2]. Zur Altersschätzung im Rentenverfahren dürfen vorliegende Röntgenbilder aus der Kindheit verwendet werden. Da diese nur selten vorliegen, besteht mit Einverständnis der betreffenden Person die Möglichkeit der Bestimmung des D-Asparaginsäure-Gehalts in Dentin, sofern ein Zahnarzt die medizinische Indikation für die Extraktion des Zahns bestätigen kann [22]. Die nicht-invasive Möglichkeit, über die Untersuchung der DNA-Methylierung aus

Mundschleimhautabstrichen das Lebensalter zu schätzen, eröffnet neue Perspektiven. Neben den morphologischen Verfahren sind bei Lebenden demnach auch einige molekulare Methoden unter Berücksichtigung der ethischen und rechtlichen Vorgaben einsetzbar (s. Kapitel 1.4).

Immer mehr Autoren empfehlen eine Kombination mehrerer Methoden zur Optimierung der Altersschätzung [23-27]. Einige Studien belegen bereits, dass die Ergebnisse mit multivariaten Ansätzen präziser sind als in univariaten Verfahren, allerdings gibt es bisher nur wenige Studien zu diesem Ansatz [23, 25-29]. Deshalb sollten in Zukunft insbesondere multivariate Verfahren untersucht werden.

1.3 Konventionelle Lebensaltersschätzung durch morphologische Methoden

Lange standen zur Lebensaltersschätzung nur morphologische Ansätze zur Verfügung. In jüngerem Alter (bis zum Abschluss der körperlichen Entwicklung) stehen dabei die Nutzung der Knochenentwicklung oder des Entwicklungsgrades des Gebisses im Vordergrund, im Erwachsenenalter wird im Wesentlichen das Ausmaß degenerativer Veränderungen beurteilt. Dabei ist die morphologische Lebensaltersschätzung im Erwachsenenalter wegen der hohen Variabilität degenerativer Prozesse generell schwieriger als die Altersschätzung bei jüngeren Individuen [1].

Bei Leichenfunden können die Röhrenknochen bezüglich der Ausreifung der Epiphysenfuge untersucht werden [3, 4]. Auch die Entwicklung der Schambeinfuge [30, 31], der Handwurzelknochen [32] oder der Verschluss der Schädelsuturen [23, 33] lassen Rückschlüsse auf das Alter zu. Vor allem bei archäologischen Skelettfunden ist die Altersschätzung anhand der Schambeinfuge, beispielsweise durch die Suchey-Brooks-Methode, des Femurs oder der Schädelsuturen sinnvoll, da diese Strukturen lange erhalten sind [30, 31, 33].

Ein weiterer wichtiger Ansatz betrifft die Zahnentwicklung. Die Durchbruchzeiten der Milch- und bleibenden Zähne sind hinlänglich bekannt [34] und auch die Entwicklung der einzelnen Zähne gibt Rückschlüsse auf das Alter [3, 20, 35]. Die von Demirjian 1973 publizierte Methode zur Altersschätzung bezieht sich auf den Entwicklungsgrad der Zähne mit Einstufung in vier Kronen- und vier Wurzelstadien (Gruppen A-H) [36]. Zur Einstufung wurde der Mineralisierungsgrad der Zähne 37-31 in Orthopantomogrammen beurteilt, anschließend in Reifegrade umgewandelt und das geschätzte Lebensalter als Summe dieser Reifegrade ermittelt.

In späteren Studien stellte man bei der Demirjian- Methode fest, dass das geschätzte Alter höher lag als das tatsächliche Alter. 2001 wurde diese Methode von Willems weiterentwickelt [37]. Die Willems-Methode fand in den darauffolgenden Jahren durch mehrere Publikationen Bestätigung, da die Ergebnisse bei der Lebensaltersschätzung präziser waren als bei Demirjian [28, 38, 39]. Allerdings ist davon auszugehen, dass es ethnisch bedingte Unterschiede bei der zeitlichen Entwicklung der Zähne gibt [37, 40-42]. 2003 veröffentlichten Olze et al. eine Arbeit zur Mineralisation der dritten Molaren in einer deutschen Population als Teil einer größeren Studie, in der die Entwicklung der Zähne in verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht wurde. In dieser Arbeit wurden die vier Weisheitszähne in die Demirjian-Stadien eingeteilt und Mittelwert sowie Standardabweichung in Jahren für die Weisheitszähne geschlechterspezifisch ermittelt [43].

Die oben beschriebenen Merkmale zu Knochenwachstum und Zahnentwicklung können auch bei lebenden Individuen zur Altersschätzung genutzt werden, entweder durch visuelle Begutachtung oder durch röntgenologische Verfahren. Allerdings beziehen sich die o.g. Ansätze auf die Wachstumsphase. Ist diese abgeschlossen, wird eine Altersschätzung schwierig. Morphologische Ansätze zur Altersschätzung bei Erwachsenen über die Beurteilung des Ausmaßes von degenerativen Veränderungen an Knochen [23, 30] oder Zähnen [23, 35] geben allenfalls eine grobe Orientierung, da diese Befunde stark von externen Faktoren wie Ernährung, Lebensstil oder Erkrankungen abhängen [35]. Hier stoßen morphologische Verfahren an ihre Grenzen. Neue Möglichkeiten bieten molekulare Ansätze.

1.4 Methoden zur molekularen Lebensaltersschätzung

Auch auf molekularer Ebene lassen sich altersbedingte Veränderungen nachweisen. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Methoden zur molekularen Lebensaltersschätzung entwickelt, teils mit vielversprechenden Resultaten.

1.4.1 Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp)

Aminosäuren sind organische Verbindungen mit einer Amino- und einer Carboxylgruppe sowie einer Seitenkette mit Kohlenstoffatomen. Sie sind, abgesehen von Glycin, chiral aufgebaut, da das α -C-Atom vier verschiedene Substituenten besitzt. Durch die

unterschiedliche räumliche Anordnung der Substituenten gibt es zwei Formen der Asparaginsäure, die sich spiegelbildlich zueinander verhalten. Diese sogenannten Enantiomere werden als D- (dexter= rechtsdrehend) und L- (laevus= linksdrehend) Aminosäure bezeichnet [44].

Asparaginsäure ist eine nicht-essentielle proteinogene Aminosäure, die in fast allen Proteinen des menschlichen Körpers enthalten ist [44]. Bei der Proteinbiosynthese werden nur L-Asparagin (L-Asn) und L-Asparaginsäure (L-Asp) eingebaut. Durch Deamidierung von L-Asn kann ein L-Succinimid entstehen. Dieses L-Succinimid bildet zum Teil durch Aufnahme von Wasser L-Asp oder die Iso-Form L-Iso-Asp, kann aber auch über ein Succinimid-Intermediat zu D-Succinimid racemisieren. D-Succinimid wiederum racemisiert zum Teil zurück zu L-Succinimid oder bildet D-Asp bzw. D-Iso-Asp (s. Abb. 1). Die Reaktion zu D-Asp weist dabei eine höhere Geschwindigkeitskonstante auf als die Reaktion zu L-Asp. Daher erfolgt im Laufe des Lebens eine fortschreitende Akkumulation von D-Asp, während die Konzentration von L-Asp sinkt [46].

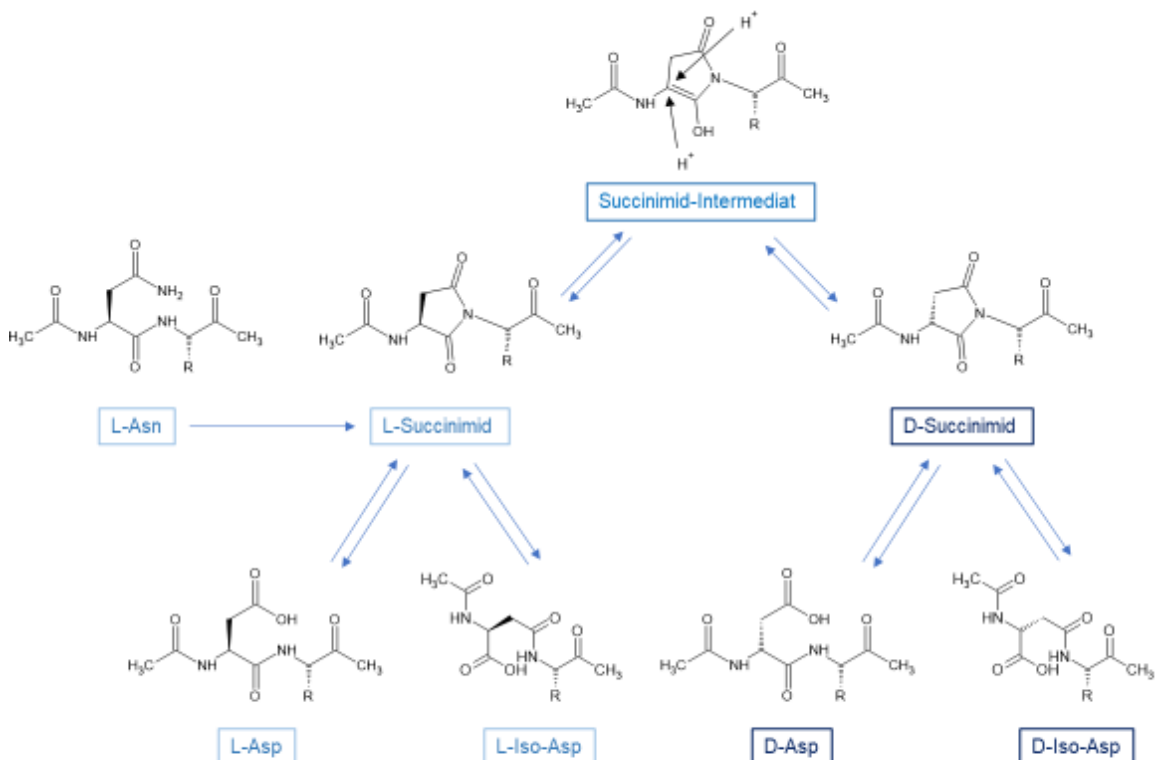


Abb. 1 Entstehung von D-Asp: Reaktionen von L-Asn und L-Asp über L- und D-Succinimid zu D-Asp (und D-Iso-Asp) (verändert nach Geiger und Clarke 1987 (45); Strukturformeln mit ChemSketch erstellt)

Da diese Veränderungen nach der Translation der Proteine stattfinden, spricht man von posttranslationalen Proteinmodifikationen. Die Ermittlung des D-Asp-Gehaltes kann unter Bezugnahme auf den L-Asp-Gehalt zur Altersschätzung bei entsprechend langlebigen und permanenten Proteinen (sehr wenig oder kein Turnover) herangezogen werden [1].

Zur Altersschätzung auf Basis des D-Asp-Gehaltes wird insbesondere das Wurzeldentin eingesetzt. Die Dentinmatrix besteht zu 20% aus organischem Material, wovon 91-92% auf Kollagen und kollagenartige Verbindungen entfallen [47]. Da Dentinproteine keinen wesentlichen Turnover zeigen, finden sich im organischen Teil des Dentins permanente Proteine, die für die Altersschätzung verwendet werden können. Die Akkumulation von D-Asp ist in der nicht-kollagenen Proteinfraction besonders hoch. In früheren Studien wurde gezeigt, dass sowohl in der nicht-kollagenen Fraktion als auch im Gesamtdentin die Razemisierung altersabhängig stattfindet [1].

Auch andere Gewebe wie Knochen [48, 49], Knorpel [50], Aortenwand [51], Sclera [52] und Epiglottis [53] wurden untersucht. Bei Untersuchungen von anderen Geweben als Dentin lag der Korrelationskoeffizient r (D-Asp versus Lebensalter) zwischen 0,84 und 0,97 [48-53]. Für Dentin dagegen ergab sich regelhaft ein noch engerer Zusammenhang zwischen D-Asp und Alter ($r = 0,96 - 0,99$ [5, 54, 55]). Bei vorhandener Zahnschubstanz empfiehlt es sich daher, Dentin zur Altersschätzung zu verwenden.

Die Akkumulation von D-Asp kann jedoch (insbesondere in komplexeren Weichgeweben) auch von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst werden. Diverse Studien zeigen eine zunehmende Streuung der Daten mit steigendem Lebensalter, was möglicherweise auf diese Einflussfaktoren zurückzuführen ist [25, 52, 53]. Um Fehlerquellen bei der Altersschätzung zu vermeiden, muss das verwendete Gewebe kühl gelagert und verarbeitet werden, da Hitzeeinwirkung die Entstehung von D-Asp beschleunigt [1, 5]. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass Erkrankungen, die die Proteinstruktur der zu untersuchenden Gewebe verändern, die Werte verfälschen können [5, 50, 56-58].

Der Ansatz der Altersschätzung auf Basis von D-Asp kann mangels der Verfügbarkeit von Untersuchungsmaterial nur sehr begrenzt an Lebenden eingesetzt werden. In manchen Fällen ist es möglich, Zähne zur Altersschätzung zu nutzen. Voraussetzung ist, dass die verwendeten Zähne aus medizinischer Indikation extrahiert wurden [1]. Extrahierte Zähne mit Karies oder zahnmedizinischen Behandlungen aufgrund von kariösen Läsionen (z.B.

Füllungen oder Wurzelbehandlungen) [47] sollten jedoch nicht verwendet werden [56-58]. Mögliche Extraktionsgründe für kariesfreie, unbehandelte Zähne sind folgende: 1) Teilretinierte Zähne mit *Dentitio difficilis* (insbesondere Weisheitszähne), 2) Extraktion wegen Platzmangels, beispielsweise vor kieferorthopädischer Behandlung, 3) Zähne mit rezidivierenden parodontalen Entzündungen, 4) Elongierte Zähne ohne Antagonisten [59].

1.4.2 Akkumulation von *advanced glycation end products* (AGEs)

Proteine und Lipide reagieren mit Zuckern wie Fruktose, Galaktose oder Glukose zu Molekülen, die teils fluoreszierend sind und eine gelblich braune Farbe aufweisen. Bei Lebensmitteln sind sie für Bräunungsreaktionen von Nahrungsmitteln beim Braten ursächlich [60, 61]. Diese Reaktion findet auch *in vivo* statt und führt in zahlreichen Geweben zu schädlichen Folgen wie veränderten Proteinfunktionen, Gewebsversteifung durch Quervernetzungen der Proteine, Bildung von freien Radikalen und Auslösen von Entzündungsreaktionen [62]. Man spricht von der Maillard-Reaktion, zuerst beschrieben von Maillard und Gautier (1912) [60, 63].

Die Reaktion findet *in vivo* ohne Beteiligung von Enzymen statt. Zunächst reagiert eine Aminosäure mit Zucker zu einer Schiffschschen Base. Es folgen mehrere Amadori-Umlagerungen, Oxidationen und Eliminationen mit Entstehung von Dicarbonyl-Intermediaten. Die Reaktion wird mit der Bildung irreversibler Endprodukte, den *advanced glycation end products* (AGEs), abgeschlossen (s. Abb. 2) [9, 60, 62]. Ähnlich wie bei der Entstehung von D-Asp handelt es sich hierbei um posttranslationale Proteinmodifikationen [9, 24, 65, 66].

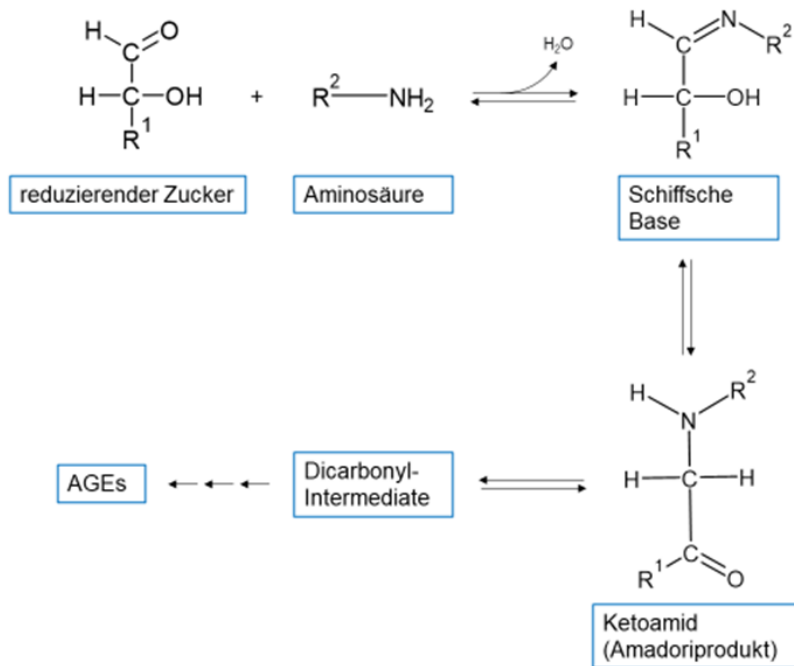


Abb. 2 Entstehung von AGEs über die Maillard-Reaktion: Ein reduzierender Zucker reagiert mit einer Aminosäure unter Abspaltung von Wasser zu einer Schiffschen Base und weiter zu einem Ketoamid. Über Dicarbonyl-Intermediate bilden sich über mehrere Reaktionsschritte AGEs (verändert nach Ahmed 2005 (64), Strukturformeln mit ChemSketch erstellt).

Nur etwa 1% der AGEs sind fluoreszierend. Durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften sind sie leichter zu detektieren und damit gut für Untersuchungen geeignet [60]. Ein bekanntes fluoreszierendes AGE ist Pentosidin (Pen). Es entsteht bei einer Reaktion von Aminosäuren und Ribose und führt zu einer Quervernetzung von Proteinen zwischen Lysin- und Arginin-Resten. Die Konzentration von AGEs wie Pen nimmt in permanenten Proteinen altersabhängig zu und kann daher zur Altersschätzung genutzt werden [10]. Sehr häufig fokussierten sich Studien auf Kollagen in Geweben mit geringem Turnover [8, 60]. Die Akkumulation von AGEs wurde bereits in verschiedenen Geweben analysiert, u.a. in Dentin [9, 24, 67, 68], Knorpel [10], Bandscheibe [8] und Knochen [9]. Im Vergleich zu anderen Geweben waren die Korrelationskoeffizienten bei Dentin am höchsten ($r = 0,94-0,98$ in Dentin, $0,88-0,95$ in anderen Geweben) [8-10, 24].

Erhöhte AGE-Werte werden in der Literatur neben Alterungsprozessen auch häufig mit Diabetes mellitus assoziiert [8, 60-62]. Grund ist die erhöhte Exposition mit Glukose über hohe Glukosekonzentrationen im Blut. Reagiert Glukose mit Hämoglobin, entsteht als

Amadori-Produkt HbA1c. Der HbA1c-Wert wird meist als Prozentsatz zum gesamten Hämoglobin angegeben und liegt bei Gesunden bei 4-6%. Bei nicht medikamentös eingestellten Diabetikern ist er mit Werten über 6,4% deutlich erhöht und damit ein Indikator für Hyperglykämie [69]. Aufgrund der erhöhten Glukosewerte kann eine Altersschätzung anhand von AGEs bei Diabetikern möglicherweise zu falsch hohen Ergebnissen führen [9], wenn die Erkrankung schlecht eingestellt ist. Weitere Einschränkungen sind die Verfügbarkeit des Gewebes und der Einfluss von Hitze, da AGEs bei Hitze schneller akkumulieren [9, 24].

Werden Zähne analysiert, so müssen die verwendeten Zähne kariesfrei sein, da Karies die Dentinkomposition beeinflusst [47]. Frühere Arbeiten zeigen bei der Verwendung von kariösen Zähnen zum Teil eine deutlich höhere Abweichung zwischen geschätztem und tatsächlichem Lebensalter [9, 24, 56, 57].

Bei der Altersschätzung an Lebenden gelten für die AGEs die gleichen Einschränkungen wie bei der Altersschätzung auf Basis von D-Asp.

1.4.3 Methylierung der DNA

Bei der DNA-Methylierung (DNAm) wird mittels DNA-Methyltransferase eine Methylgruppe an eine Nukleobase gebunden. Die DNA-Sequenz bleibt dabei unverändert, es handelt sich bei der Methylierung also lediglich um eine epigenetische Modifikation der DNA [70].

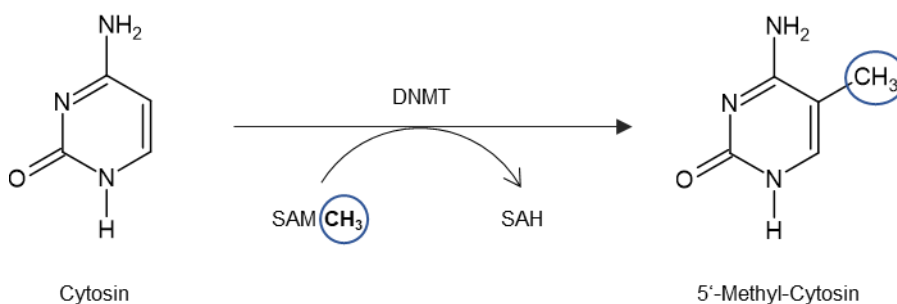


Abb. 3 Methylierung von Cytosin zu 5'-Methyl-Cytosin. DNMT = DNA-Methyltransferase, SAM = S-Adenosyl-L-Methionin, SAH = S-Adenosyl-L-Homocystein (Strukturformeln mit ChemSketch erstellt)

Im menschlichen Organismus wird meist die Nukleobase Cytosin in einem CpG-Dinukleotid (bestehend aus zwei Nukleotiden mit den Basen Cytosin und Guanin) zu 5'-Methyl-Cytosin methyliert (s. Abb. 3) [14, 71]. Mit steigendem Lebensalter sinkt die Methylierungsrate insgesamt und es kommt vermehrt zur Hypomethylierung [19]. Eine Ausnahme bilden sogenannte CpG-Inseln, Abschnitte der DNA mit erhöhter Anzahl von CpG-Dinukleotiden. An CpG-Stellen bestimmter Gene kann die DNAm altersabhängig auch zunehmen [19, 72].

Eine der wegweisendsten Arbeiten zur DNAm wurde von Horvath 2013 verfasst. Er untersuchte 7.844 Proben aus 51 gesunden Geweben und entwickelte mittels 353 CpG-Stellen eine „epigenetische Uhr“. In dieser Studie liegt der Pearson Korrelationskoeffizient für den Zusammenhang zwischen DNAm und dem Lebensalter in allen Geweben bei $r=0,97$ im Trainings-Set bzw. $0,96$ im Test-Set (*mean absolute deviation* (MAD) = 3,6 Jahre). Betrachtet man die einzelnen Gewebe, liegen die besten Korrelationskoeffizienten zwischen $r=0,90$ und $0,99$. Ausnahmen sind beispielsweise Brustgewebe, Mundschleimhaut und Endometrium mit $r=0,55-0,87$ [73].

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Genabschnitte und Gewebe mit dem Ziel untersucht, sich diesen Ansatz für die forensische Altersschätzung nutzbar zu machen. In den meisten Studien wurde Blut analysiert [26, 72, 74-78], aber auch andere Gewebe wie Speichel/ Mundschleimhautabstriche [11, 18, 79-81]. Zudem wurden auch Zähne [72, 82, 83] und Knochen [83, 84] untersucht, da diese Gewebe in der Forensik von großer Bedeutung sind. Die besten Werte für Blut lagen bei MADs (*mean absolute deviation*) zwischen 3,3 und 5,4 Jahren [72, 74, 85, 86], die MADs der anderen Gewebe waren etwas höher.

Es ist bekannt, dass das DNA-Methylierungsmuster in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Naue et al. fanden 2018 beispielsweise sieben CpG-Stellen mit mittlerer bis starker Altersabhängigkeit der DNAm in allen untersuchten Geweben (Muskel, Gehirn, Knochen, MSH und Blut). Weitere fünf CpG-Stellen wiesen dagegen nur in manchen Geweben eine altersabhängige DNAm auf. Es gilt außerdem zu berücksichtigen, wie stark die Veränderung der DNAm ausgeprägt ist. Kommt es im Laufe der Jahre nur zu einem geringen Anstieg/ Abfall, dann werden sehr sensible Methoden benötigt, um eine Altersschätzung durchführen zu können [84].

Die DNAm kann durch biogeographische/ethnische Einflüsse und durch das Geschlecht sowie durch Umwelteinflüsse und Krankheiten beeinflusst werden, als auch durch Stress,

Fettleibigkeit, Gewalterfahrungen und Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Basedow, Krebserkrankungen oder infektiöse Krankheiten [87]. Ebenso können ein erhöhter Alkoholkonsum und Rauchen die DNAm an einigen CpG-Stellen steigern, wodurch sich die Werte bei der Altersschätzung signifikant verändern können [88, 89]. Auch Entzündungsreaktionen im Körper können zu veränderter DNAm führen [90]. Dadurch bedingte Einflüsse auf die Ergebnisse von Altersschätzungen auf Basis der DNAm sind Gegenstand aktueller Forschung [87].

1.5 Möglichkeiten und Grenzen des derzeit verfügbaren Methodenrepertoires

Theoretisch stehen also mittlerweile eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Methoden zur Lebensaltersschätzung zur Verfügung. Daraus ergibt sich die Frage, welche Methode zur Klärung welcher Fragestellungen eingesetzt werden sollte und mit welchen Ergebnissen gerechnet werden kann. Aus zwei „*State-of-the-Art*“-Publikationen (Ritz-Timme et al. 2000, Böhme et al. 2021) [20, 91] ergibt sich Folgendes:

- Morphologische Methoden sind nur im Kindes- und Jugendalter anwendbar, mit steigendem Lebensalter lässt die Genauigkeit aber deutlich nach [20].
- Bei Leichenfunden werden die besten Ergebnisse mit dem D-Asp-Gehalt in Dentin erzielt (*mean absolute error* (MAE): 2,19-2,93 Jahre), etwas schlechter sind die Werte bei Pen in Dentin (MAE: 3,41-6,03 Jahre) und DNAm in Pulpagewebe (MAE: 2,25 Jahre) oder Dentin (MAE: 4,86-5,08 Jahre). Sind keine Zähne vorhanden, fallen die Ergebnisse bei D-Asp und Pen schlechter aus, während die DNAm in Knochen und Blut ähnliche Ergebnisse liefert wie in dentalen Geweben (MAE: 2,56-5,36 Jahre) [91].
- Für archäologische Funde ist einer aktuellen Studie zufolge besonders Pen in Dentin interessant (MAE: 3,92 Jahre), da der Parameter offenbar auch über hunderte und tausende von Jahren konstant bleibt [92].
- Zur Altersschätzung an Lebenden verhält es sich ähnlich wie bei Leichenfunden. Die besten Ergebnisse werden mit D-Asp in Dentin (MAE: 2,93 Jahre) erzielt [1, 27], danach folgen Pen in Dentin (MAE: 3,41 Jahre) [27] und die DNAm in Geweben wie Blut (MAE: 3,16-4,50 Jahre), Speichel (MAE: 3,55 Jahre) oder Mundschleimhaut (MAE: 3,70-4,29 Jahre) [91].
- Liegen zu Analyse nur Spuren wie Blut, Sperma oder Speichel vor, dann ist man auf die DNAm beschränkt. MAEs von 3,2-5,0 Jahren sind beschrieben [91].

1.6 Ziel der Arbeit

Obwohl die Möglichkeiten des Methodenspektrums zur Altersschätzung mittlerweile gut sind, reicht die Genauigkeit auch der besten Verfahren in bestimmten Fällen nicht aus, um die Klärung der zugrundeliegenden Fragestellung zu erreichen. Aktuelle Forschung zielt deshalb auf die Optimierung der Genauigkeit von Methoden zur Altersschätzung. Die Grenzen aller Methoden sind in der hohen Komplexität von Alterungsprozessen begründet. Es wurde vor diesem Hintergrund bereits diskutiert, dieser Problematik durch die Kombination verschiedener Methoden in multivariaten Ansätzen unter Nutzung von *Machine Learning*- Modellen zu begegnen [25, 93].

Dieser Ansatz zur Optimierung wurde in der vorliegenden Arbeit konsequent weiterverfolgt, indem folgende Parameter an einem kieferchirurgischen Probandengut untersucht und in die Entwicklung multivariater Modelle eingebracht wurden:

- Mineralisierungsgrad der Weisheitszähne: Dieser wurde in Orthopantomogrammen beurteilt und, wie von Olze 2003 empfohlen, in die Demirjian-Stadien A-H eingeteilt.
- Akkumulation von D-Asp und Pen: Diese Parameter wurden im Dentin untersucht.
- DNAm: Der Methylierungsgrad der DNA wurde an 5 Markern in Mundschleimhaut-Abstrichen bestimmt.

Die genannten Parameter waren bislang noch nie verknüpft untersucht worden.

Ziel der Arbeit war es, den Mehrwert eines multivariaten Ansatzes auf Basis der aufgeführten Parameter zu untersuchen.

Es lag ein positives Ethikvotum für die durchgeführten Versuche vor (Studennummer 5049).

2 Publikation

Molecular and morphological findings in a sample of oral surgery patients: What can we learn for multivariate concepts for age estimation?

Tatjana Siahaan ¹, Alexandra Reckert ¹, Julia Becker ¹, Simon
B. Eickhoff ^{2,3}, Barbara Koop ¹, Tanju Gündüz ¹, Petra Böhme ¹, Felix Mayer ¹,
Lisa Küppers ¹, Wolfgang Wagner ⁴, Stefanie Ritz-Timme ¹

¹ Institute of Legal Medicine, University Hospital Duesseldorf, Duesseldorf, Germany

² Institute for Systems Neuroscience, University Hospital Duesseldorf, Duesseldorf, Germany

³ Institute of Neuroscience and Medicine | Brain & Behaviour (INM-7), Research Centre
Juelich, Juelich, Germany

⁴ Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering, Stem Cell Biology and Cellular
Engineering, RWTH Aachen University Medical School, Aachen, Germany

Journal of Forensic Sciences 2021 Jul; 66(4): 1524-1532

doi: 10.1111/1556-4029.14704

3 Weitere erhobene Daten

Morphologische Altersschätzung nach Olze [43]

Morphologische Befunde zur Zahnentwicklung flossen in die multivariaten Modelle lediglich als Demirjian-Stadien ein. Eine eigentliche Altersschätzung allein auf Basis der Beurteilung der Zahnentwicklung war nicht engeres Ziel der Arbeit; entsprechend fehlen solche Daten in der Publikation von Siahaan et al. 2021 [27]. Im Folgenden sollen deshalb die Ergebnisse einer morphologischen Altersschätzung über den Mineralisationsgrad von 69 Weisheitszähnen nach Olze [43] zusätzlich dargestellt werden.

3.1 Methode

Es wurden 69 OPTGs von Probanden im Alter von 10,2 bis 27,5 Jahren untersucht und der Entwicklungsgrad der Weisheitszähne über die Demirjian-Stadien [36] beschrieben.

Zur Stadieneinteilung der vier Weisheitszähne 18, 28, 38 und 48 in die Mineralisierungsgrade A-H nach Demirjian [36] bewerteten zwei Wissenschaftler unabhängig voneinander die OPTGs, die Ergebnisse wurden anschließend miteinander verglichen. Bei Abweichungen wurden die Röntgenbilder erneut beurteilt und diskutiert, um zu einer Übereinstimmung zu gelangen [27]. Die ermittelten Stadien der Mineralisation wurden mit den Referenzdaten von Olze et al. (2003) [43] verglichen.

3.2 Ergebnisse

Die erhobenen Mineralisationsstadien lagen innerhalb der doppelten (Frauen) bzw. dreifachen (Männer) Standardabweichung der Referenzdaten von Olze et al. [43] (s. Abb. 4 und 5):

- Stadium A: Für dieses Stadium lagen keine Referenzdaten vor.
- Stadium B: Die ermittelten Stadien liegen bei den männlichen Probanden innerhalb der doppelten Standardabweichung, bei den weiblichen Probanden wurde kein OPTG mit Stadium B bewertet.
- Stadium C: Es wurde kein OPTG mit Stadium C bewertet.

- Stadium D: Die ermittelten Stadien liegen bei den männlichen Probanden innerhalb der doppelten, bei den weiblichen Probanden innerhalb der einfachen Standardabweichung.
- Stadium E: Die ermittelten Stadien liegen bei den männlichen Probanden innerhalb der doppelten, bei den weiblichen Probanden innerhalb der einfachen Standardabweichung.
- Stadium F: Die ermittelten Stadien liegen bei den männlichen und weiblichen Probanden innerhalb der doppelten Standardabweichung.
- Stadium G: Die ermittelten Stadien liegen bei den männlichen Probanden innerhalb der dreifachen, bei den weiblichen Probanden innerhalb der doppelten Standardabweichung.
- Stadium H: Die ermittelten Stadien liegen bei den männlichen Probanden innerhalb der dreifachen, bei den weiblichen Probanden innerhalb der einfachen Standardabweichung.

Die männlichen Probanden (Abb. 4) unter 20 Jahren erreichten in der vorliegenden Studie die jeweiligen Stadien tendenziell früher.

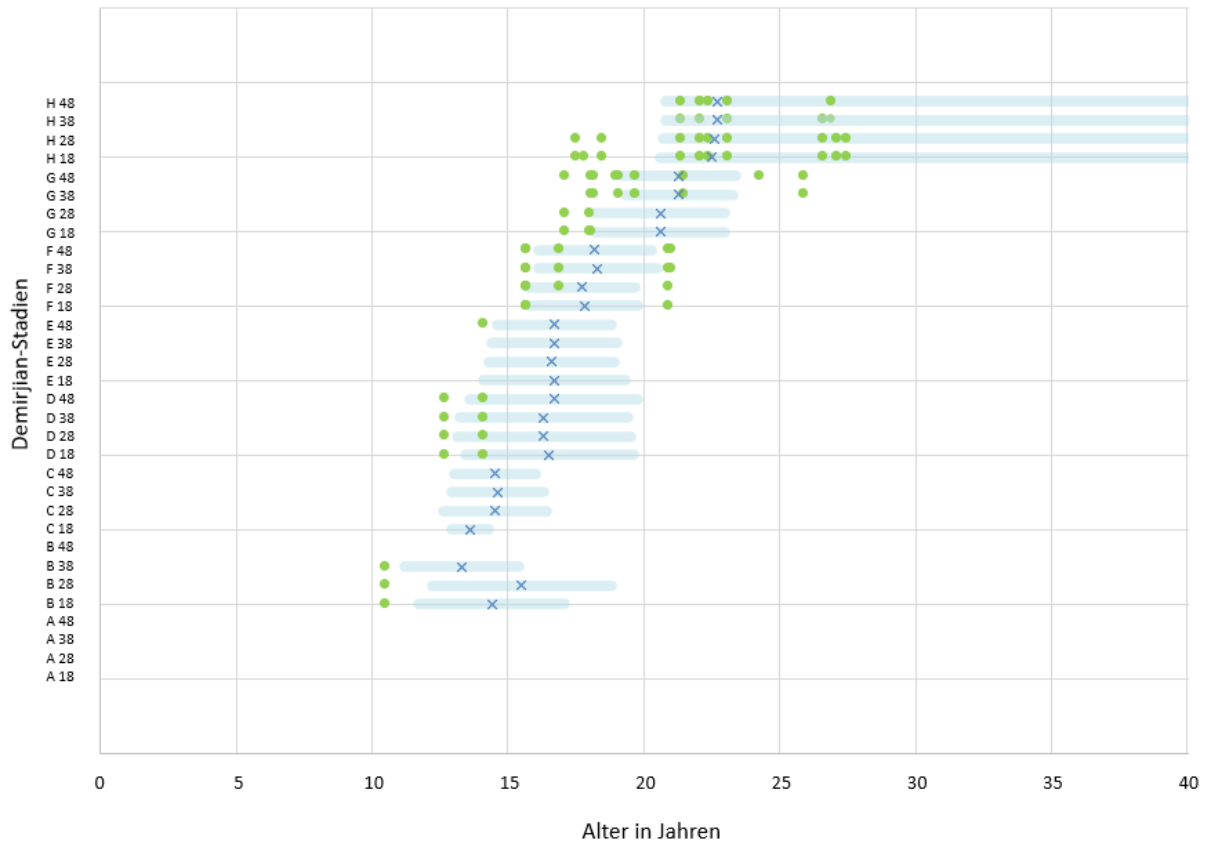


Abb. 4 Erhobene Demirjian- Stadien (männliche Probanden) der Mineralisation von Weisheitszähnen im Vergleich zu den Referenzdaten von Olze (2003): x-Achse = Alter in Jahren, y-Achse = Stadien A-H nach Demirjian der vier Weisheitszähne 18,28,38 und 48, grüne Punkte = Alter der Probanden in der vorliegenden Studie [27], Kreuze = Mittelwert der Alter, in denen dieses Stadium von Olze beobachtet wurde, blaue Balken = einfache Standardabweichung der Alter, in denen dieses Stadium von Olze beobachtet wurde.

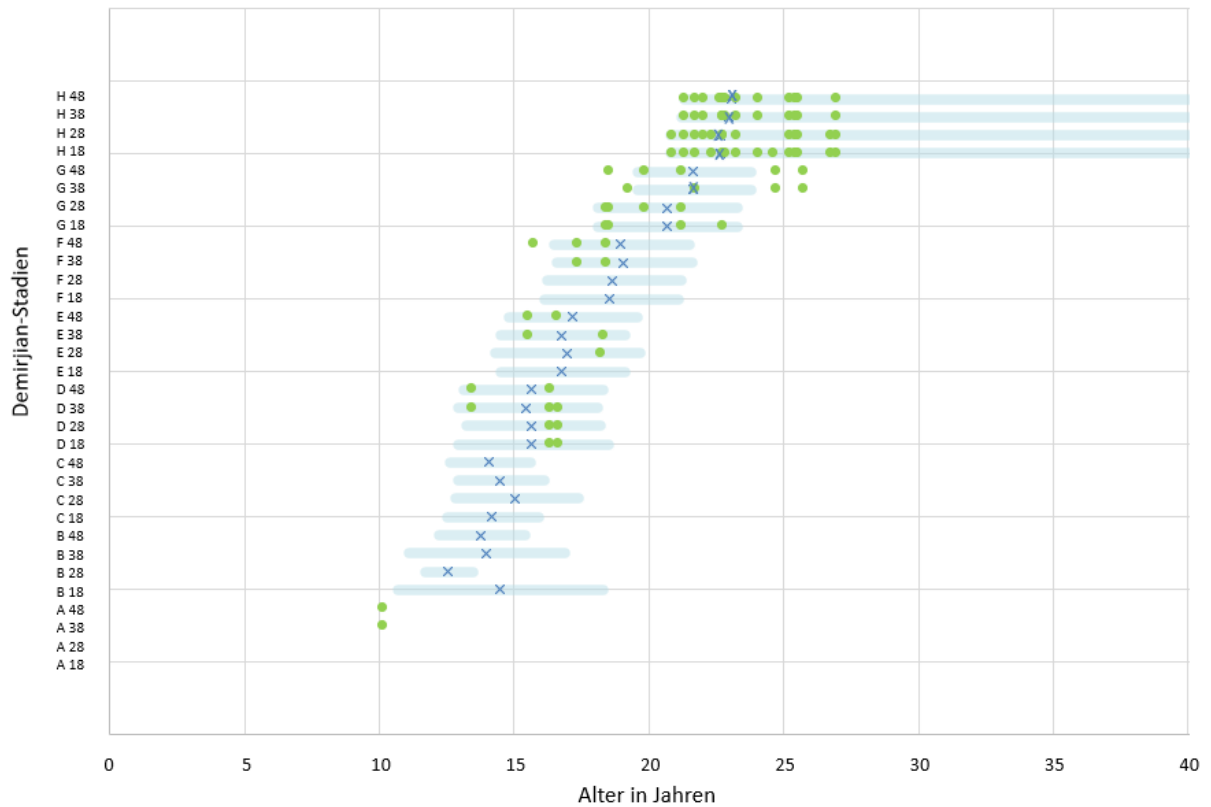


Abb. 5 Erhobene Demirjian- Stadien (weibliche Probanden) der Mineralisation von Weisheitszähnen im Vergleich zu den Referenzdaten von Olze (2003): x-Achse = Alter in Jahren, y-Achse = Stadien A-H nach Demirjian der vier Weisheitszähne 18,28,38 und 48, grüne Punkte = Alter der Probanden in der vorliegenden Studie [27], Kreuze = Mittelwert der Alter, in denen dieses Stadium von Olze beobachtet wurde, blaue Balken = einfache Standardabweichung der Alter, in denen dieses Stadium von Olze beobachtet wurde.

4 Diskussion

4.1 Wozu multivariate Ansätze?

Wie in der Einleitung beschrieben, sind inzwischen zahlreiche Modelle zur Schätzung des Lebensalters bekannt. Die interindividuelle Variabilität von Wachstum, Entwicklung und Alterung führt aber zu Limitationen in der Genauigkeit von Altersschätzungen, insbesondere im Erwachsenenalter.

Dies lässt sich sehr gut an den in Abb. 4 und Abb. 5 präsentierten Daten zu den Mineralisationsstadien von Weisheitszähnen demonstrieren. Obwohl hier der günstige Fall der Beurteilung von Entwicklungsprozessen vorliegt, schöpfen die erhobenen Daten einen Bereich von drei Standardabweichungen des Referenzdatensatzes aus. Die männlichen Probanden unter 20 Jahren erreichten in der vorliegenden Studie die jeweiligen Stadien tendenziell früher, wobei sich dieser Befund in Anbetracht der geringen Probandenzahl nicht verlässlich interpretieren lässt.

Lovejoy und Brooks empfahlen bereits 1985 eine multivariate Analyse mehrerer skelettaler und dentaler Merkmale zur präziseren Altersschätzung. Sie untersuchten die Entwicklung der Schambeinfuge, des Iliums, des proximalen Femurs, der Zahnabnutzung und der Schädelsuturen und kamen zu dem Ergebnis, dass eine Kombination der Merkmale zu besseren Resultaten führt als jedes Merkmal für sich [23]. Kombiniert man mehrere Parameter miteinander, so lassen sich demnach Fehlerquellen einzelner Modelle ausgleichen, sodass genauere Schätzungen möglich werden [27, 94]. Mit Zunahme der diagnostischen Möglichkeiten unter Einbeziehung der molekularen Ebenen bieten sich hier neue Optionen.

In den letzten fünf Jahren wurden verschiedene molekulare und morphologische Parameter in Kombination untersucht:

Becker et al. untersuchten 2020 D-Asp und Pen in zwei verschiedenen Geweben (Bandscheibe und Epiglottis) in uni- und multivariaten Modellen und fanden eine deutliche Verbesserung der Altersschätzung im multivariaten Modell (MAE univariat: 7,5-11,0 Jahre, MAE multivariat: 4,0-6,3 Jahre) [25].

In einer anderen Studie an Kindern konnte die Altersschätzung auf Basis skelettaler und dentaler morphologischer Methoden durch die Kombination mit fünf DNA-Methylierungsmarkern optimiert werden [28]: In der Studie mit 124 Probanden im Alter zwischen 6 und 15 Jahren erzielte die Altersschätzung anhand skelettaler Merkmale als beste Ergebnisse MAEs von 0,69 (Jungen) bzw. 0,74 Jahren (Mädchen). Die dentale Altersschätzung lieferte MAEs von 0,63 (Jungen) bzw. 0,54 Jahren (Mädchen). Durch die multivariate Analyse von skelettalem und dentalem Alter sowie der DNAm konnte der MAE mit 0,47 (Jungen) bzw. 0,33 Jahren (Mädchen) deutlich verbessert werden.

Aber nicht jede Kombination ist zielführend. So haben Márquez-Ruiz et al. 2020 in ihrer Studie mehrere CpG-Stellen in den Genen ELOVL2, ASPA und PDE4C in Zähnen sowie die Telomerlängen der gleichen Probanden untersucht und in einem multivariaten Modell

miteinander verknüpft. ELOVL2 und PDE4C wiesen eine starke Altersabhängigkeit auf, während die Korrelation im Gen ASPA wesentlich schwächer ausgeprägt war. Die Länge der Telomere zeigte eine negative Korrelation zum Alter. Zur Auswertung wurden drei Modelle erstellt. Im ersten Modell wurde die Altersschätzung allein mithilfe mehrerer CpG-Stellen der Gene ELOVL2 und PDE4C ermittelt, der MAE lag hier bei 5,08 Jahren. In einem zweiten Modell wurden nur die Längen der Telomere verwendet (MAE= 6,89 Jahre). Im letzten Modell kombinierte man die Daten der ersten beiden Modelle miteinander und erzielte so einen MAE von 5,04 Jahren. Die Verknüpfung der Telomerlänge mit der DNAm resultierte demnach nur in einer sehr geringen Verbesserung der Altersschätzung [29].

Eine weitere interessante Studie hat die Kombination von DNA-Methylierungsmarkern und sjTREC_s untersucht [26]: Unterschiedliche CpG-Stellen von Probanden zwischen 20 und 74 Jahren wurden analysiert und die CpG-Stellen mit der höchsten Korrelation zum Alter in verschiedenen Modellen kombiniert (bestes Ergebnis mit MAE= 3,29 Jahren). Ein multivariates Modell unter Einbeziehung von mehreren CpG-Stellen und den sjTREC_s ergab einen MAE von 3,31 Jahren. Die Altersschätzung konnte mit dem multivariaten Modell nicht verbessert werden. Betrachtet man jedoch die einzelnen Altersgruppen in den verschiedenen Modellen, so fällt auf, dass die Kombination mit den sjTREC_s eine deutliche Besserung der Altersschätzung in den höheren Altersgruppen (60-74 Jahre) zur Folge hatte.

Weder die Kombination von Proteinmarkern (D-Asp, Pen) mit DNAm noch die Kombination dieser molekularen Marker mit morphologischen Altersveränderungen war bislang untersucht worden; die vorgelegte Arbeit ist hier im Sinne eines „*proof of concept*“ zu sehen.

4.2 Multivariate Modelle auf Basis von Proteinmarkern (D-Asp, Pen), DNAm und morphologischen Altersveränderungen

In der vorliegenden Studie flossen Daten zur DNAm an fünf verschiedenen Genorten (EDARADD, DDO, ELOVL2, RPA2, PDE4C), zu D-Asp und Pen sowie zum Mineralisationsgrad der Weisheitszähne ein. Damit wurden erstmals molekulare Marker auf DNA- und Proteinebene kombiniert und außerdem morphologische Befunde einbezogen. Die Kombination von D-Asp und Pen führte zu den besten Schätzergebnissen (MAE (D-Asp) = 2,93, MAE (Pen) = 3,41 Jahre, MAE (D-Asp + Pen) = 2,68 Jahre). Die Verknüpfung der Proteinmarker D-Asp und Pen mit der DNAm und der Morphologie ergab dagegen keine Verbesserung bei der Altersschätzung

verglichen mit dem bivariaten Modell D-Asp/ Pen. Demnach können multivariate Modelle die Altersschätzung zwar optimieren, aber nicht jede Kombination verbessert die Ergebnisse [27].

Diese Schlussfolgerung ergibt sich auch aus den Daten anderer Autoren (Tabelle 2).

Parameter	Altersbereich	Anzahl der Probanden	Gewebe	MAE (univariat)	MAE (multivariat)	Literatur
D-Asp + Pen	0-98 Jahre	95	Bandscheibe, Epiglottis	7,5-11,0 Jahre	4,0-6,3 Jahre	Becker et al. [25]
Morphologie (skelettal und dental) + DNAm	6-15 Jahre	124	Handwurzelknochen, Zähne, Blut	skelettal 0,69-0,74 Jahre dental 0,54-0,63 Jahre	0,33-0,47 Jahre	Shi et al. [28]
DNAm + Telomerlänge	15-85 Jahre	65	Zähne	DNAm 5,08 Jahre Telomerlänge 6,89 Jahre	5,04 Jahre	Márquez-Ruiz et al. [29]
DNAm + sjTRECs	20-74 Jahre	100	Blut	DNAm 3,29 Jahre sjTRECs 10,33 Jahre	3,31 Jahre	Cho et al. [26]
D-Asp + Pen	13-80 Jahre	52	Zähne	D-Asp 2,93 Jahre Pen 3,41 Jahre	2,68 Jahre	Siahaan et al. [27]
DNAm + Morphologie (dental)	10-28 Jahre	69	Mundschleimhaut, Zähne	DNAm 3,85 Jahre	2,81 Jahre	Siahaan et al. [27]

Tabelle 2 Altersschätzung mit uni- und multivariaten Modellen: Verwendete Parameter, Altersbereiche, Anzahl der Probanden, Gewebe und *mean absolute error* (MAE)

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Da in der vorliegenden Arbeit Zähne und Mundschleimhautabstriche von überwiegend jungen Menschen untersucht wurden, lagen hier optimale Bedingungen zur Altersschätzung vor. Alle Methoden liefern bei jungen Probanden aufgrund der Wachstums- und Entwicklungsphase bessere Ergebnisse als im höheren Lebensalter, in dem sich die Variabilität von Alterungsprozessen mehr und mehr manifestiert [27].

Zudem ist Dentin mit seinem bradytrophen Stoffwechsel und einer relativen Homogenität des Gewebes ein optimales Untersuchungsmaterial für D-Asp und Pen [1]. Die Ergebnisse der Kombination D-Asp und Pen waren in der vorgelegten Studie bereits so gut, dass die Kombination mit anderen Parametern keine weitere relevante Verbesserung erbracht hat.

Unter so günstigen Bedingungen entfaltet sich das Potential multivariater Ansätze nur bedingt. Völlig anders ist dies, wenn molekulare Parameter an komplexeren Geweben erhoben und ältere Probanden untersucht werden. Dies lässt sich durch Tabelle 2 demonstrieren: Bei der Analyse von D-Asp und Pen in Bandscheibe und Epiglottis bei Probanden im Alter von 0 bis 98 Jahren führte der multivariate Ansatz zu einer sehr relevanten Verbesserung der Schätzergebnisse (MAE: 4,0-6,3 Jahre des multivariaten Modells versus 7,5-11,0 Jahre bei den univariaten Modellen) [25].

In der forensischen Praxis sind ungünstige Voraussetzungen leider häufig. Bei der Untersuchung von Skelettfunden und Leichenteilen sind Zähne oft nicht vorhanden, sodass meist nur weniger günstiges Gewebe zur Verfügung steht [93]. Wenn zusätzlich ein höheres Erwachsenenalter vorliegt und eine morphologische Eingrenzung des Alters wegen der Variabilität degenerativer Prozesse kaum möglich ist, bieten multivariate Modelle unter Einbeziehung von Parametern aus unterschiedlichen biologischen Ebenen zum ersten Mal die Möglichkeit genauerer Altersschätzungen [91]. Die Verknüpfung mehrerer Parameter kann die Auswirkungen der Einflussfaktoren verringern, vorausgesetzt dass die Parameter nicht von den gleichen Einflussfaktoren beeinträchtigt werden. Um allen Fallkonstellationen der forensischen Praxis zu begegnen, wären diverse Modelle unter Einbeziehung verschiedener Parameter und Gewebe nötig. Die ersten Schritte zur Etablierung eines solchen Konzeptes wurden bereits von Becker et al. 2021 vorgestellt [93].

Über die Verknüpfung verschiedener molekularer (und morphologischer) Parameter in multivariaten *machine learning*- Modellen dürfte es gelingen, relevante diagnostische Lücken in der forensischen Fallarbeit zu schließen. Dazu ist aber noch weitere Forschungsarbeit zu leisten.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Ritz-Timme S. (1999) Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche. In: Berg S, Brinkmann B, (Hrsg.) Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, Band 23. Schmidt-Römhild, Lübeck;7-13.
2. Schmeling A, Dettmeyer R, Rudolf E, Vieth V, Geserick G. Forensic Age Estimation. (2016) Dtsch Arztebl Int. 113(4):44-50. doi: 10.3238/arztebl.2016.0044.
3. Pfau RO, Sciulli PW. (1994) A method for establishing the age of subadults. J Forensic Sci. 39(1):165-76.
4. Ubelaker DH, Khosrowshahi H. (2019) Estimation of age in forensic anthropology: historical perspective and recent methodological advances. Forensic Sci Res. 4(1):1-9. doi: 10.1080/20961790.2018.1549711.
5. Meissner C, Ritz-Timme S. (2010) Molecular pathology and age estimation. Forensic Sci Int. 203(1-3):34-43. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.010.
6. Ritz-Timme S, Collins MJ. (2002) Racemization of aspartic acid in human proteins. Ageing Res Rev. 1(1):43-59. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00363-3.
7. Yekkala R, Meers C, Van Schepdael A, Hoogmartens J, Lambrechts I, Willems G. (2006) Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age. Forensic Sci Int. 159 Suppl 1:S89-94. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.02.022.
8. Pilin A, Pudil F, Bencko V, Bezdícková D. (2007) Contents of pentosidine in the tissue of the intervertebral disc as an indicator of the human age. Soud Lek. 52(4):60-4.
9. Valenzuela A, Guerra-Hernández E, Rufián-Henares JÁ, Márquez-Ruiz AB, Hougen HP, García-Villanova B. (2018) Differences in non-enzymatic glycation products in human dentine and clavicle: changes with aging. Int J Legal Med. 132(6):1749-1758. doi: 10.1007/s00414-018-1908-3.
10. Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Tekoppele JM. (2000) Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. Biochem J. 350 Pt 2(Pt 2):381-7.
11. Alghanim H, Antunes J, Silva DSBS, Alho CS, Balamurugan K, McCord B. (2017) Detection and evaluation of DNA methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age. Forensic Sci Int Genet. 31:81-88. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.07.011.
12. Daunay A, Baudrin LG, Deleuze JF, How-Kit A. (2019) Evaluation of six blood-based age prediction models using DNA methylation analysis by pyrosequencing. Sci Rep. 9(1):8862. doi: 10.1038/s41598-019-45197-w.

13. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, Di Blasio AM, Gentilini D, Vitale G, Collino S, Rezzi S, Castellani G, Capri M, Salvioli S, Franceschi C. (2012) Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell*. 11(6):1132-4. doi: 10.1111/accel.12005.
14. Goel N, Karir P, Garg VK. (2017) Role of DNA methylation in human age prediction. *Mech Ageing Dev*. 166:33-41. doi: 10.1016/j.mad.2017.08.012.
15. Vidaki A, Kayser M. (2018) Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Sci Int Genet*. 37:180-195. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.08.008.
16. Zapico SC, Ubelaker DH. (2013) Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing research reviews* 12(2), 605-617.
17. Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, Choi Y, van Meurs JBJ, van IJcken WFJ, Uitterlinden AG, Hofman A, Broer L, van Duijn CM, Lewin J, Kayser M. (2016) Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Sci Int Genet*. 24:33-43. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.05.014.
18. Eipel M, Mayer F, Arent T, Ferreira MR, Birkhofer C, Gerstenmaier U, Costa IG, Ritz-Timme S, Wagner W. (2016) Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *Aging (Albany NY)*. 8(5):1034-48. doi: 10.18632/aging.100972.
19. Freire-Aradas A, Phillips C, Lareu MV. (2017) Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. *Forensic Sci Rev*. 29(2):121-144.
20. Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch HJ, Borrman HI. (2000) Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *Int J Legal Med*. 113(3):129-36. doi: 10.1007/s004140050283.
21. Arbeitsgemeinschaft für Forensische Altersdiagnostik der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, AGFAD (https://www.medizin.uni-muenster.de/fileadmin/einrichtung/agfad/empfehlungen/empfehlung_strafverfahren.pdf), Stand 21.08.2121
22. Arbeitsgemeinschaft für Forensische Altersdiagnostik der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, AGFAD (https://www.medizin.uni-muenster.de/fileadmin/einrichtung/agfad/empfehlungen/empfehlung_rentenverfahren.pdf), Stand 21.08.2021
23. Lovejoy CO, Meindl RS, Mensforth RP, Barton TJ. (1985) Multifactorial determination of skeletal age at death: a method and blind tests of its accuracy. *Am J Phys Anthropol*. 68(1):1-14. doi: 10.1002/ajpa.1330680102.

24. Greis F, Reckert A, Fischer K, Ritz-Timme S. (2018) Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation? *Int J Legal Med.* 132(3):799-805. doi: 10.1007/s00414-017-1671-x.
25. Becker J, Mahlke NS, Reckert A, Eickhoff SB, Ritz-Timme S. (2020) Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study. *Int J Legal Med.* 134(2):721-733. doi: 10.1007/s00414-019-02054-9.
26. Cho S, Jung SE, Hong SR, Lee EH, Lee JH, Lee SD, Lee HY. (2017) Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. *Forensic Sci Int Genet.* 29:250-256. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.04.020.
27. Siahaan T, Reckert A, Becker J et al. (2021) Molecular and morphological findings in a sample of oral surgery patients: What can we learn for multivariate concepts for age estimation?. *J Forensic Sci.* 66:1524-1532. doi: 10.1111/1556-4029.14704
28. Shi L, Jiang F, Ouyang F, Zhang J, Wang Z, Shen X. (2018) DNA methylation markers in combination with skeletal and dental ages to improve age estimation in children. *Forensic Sci Int Genet.* 33:1-9. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.11.005.
29. Márquez-Ruiz AB, González-Herrera L, Luna JD, Valenzuela A. (2020) DNA methylation levels and telomere length in human teeth: usefulness for age estimation. *Int J Legal Med.* 134(2):451-459. doi: 10.1007/s00414-019-02242-7.
30. Brooks S, Suchey JM. (1990) Skeletal age determination based on the os pubis: a comparison of the Acsádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Human evolution* 5(3), 227-238.
31. Meindl RS, Lovejoy CO, Mensforth RP, Walker RA. (1985) A revised method of age determination using the os pubis, with a review and tests of accuracy of other current methods of pubic symphyseal aging. *Am J Phys Anthropol.* 68(1):29-45. doi: 10.1002/ajpa.1330680104.
32. Cameriere R, Ferrante L, Ermenc B, Mirtella D, Strus K. (2008) Age estimation using carpals: study of a Slovenian sample to test Cameriere's method. *Forensic Sci Int.* 174(2-3):178-81. doi: 10.1016/j.forsciint.2007.04.212.
33. Meindl RS, Lovejoy CO. (1985) Ectocranial suture closure: a revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *Am J Phys Anthropol.* 68(1):57-66. doi: 10.1002/ajpa.1330680106.
34. Mittelsdorf A. (2010) Kariesprävention mit Fluoriden: eine Fragebogenaktion zur Fluoridverordnung in Berliner Kinderarztpraxen unter besonderer Berücksichtigung der Empfehlungen der DGZMK (Doctoral dissertation).

35. Adserias-Garriga J, Thomas C, Ubelaker DH, C Zapico S. (2018) When forensic odontology met biochemistry: Multidisciplinary approach in forensic human identification. *Arch Oral Biol.* 87:7-14. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.001.
36. Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. (1973) A new system of dental age assessment. *Hum Biol.* 45(2):211-27.
37. Willems G, Van Olmen A, Spiessens B, Carels C. (2001) Dental age estimation in Belgian children: Demirjian's technique revisited. *J Forensic Sci.* 46(4):893-5.
38. Gelbrich B, Carl C, Gelbrich G. (2020) Comparison of three methods to estimate dental age in children. *Clin Oral Investig.* 24(7):2469-2475. doi: 10.1007/s00784-019-03109-2.
39. Cherian JM, Thomas AM, Kapoor S, Kumar R. (2020) Dental age estimation using Willems method: A cross-sectional study on children in a North Indian city. *J Oral Maxillofac Pathol.* 24(2):383-388. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_299_19.
40. Esan TA, Yengopal V, Schepartz LA. (2017) The Demirjian versus the Willems method for dental age estimation in different populations: A meta-analysis of published studies. *PLoS One.* 12(11):e0186682. doi: 10.1371/journal.pone.0186682.
41. Wang J, Bai X, Wang M, Zhou Z, Bian X, Qiu C, Li C, Yang Z, Chen G, Ji F, Tao J. (2018) Applicability and accuracy of Demirjian and Willems methods in a population of Eastern Chinese subadults. *Forensic Sci Int.* 292:90-96. doi: 10.1016/j.forsciint.2018.09.006.
42. Liversidge HM, Chaillet N, Mörnstad H, Nyström M, Rowlings K, Taylor J, Willems G. (2006) Timing of Demirjian's tooth formation stages. *Ann Hum Biol.* 33(4):454-70. doi: 10.1080/03014460600802387.
43. Olze A, Schmeling A, Rieger K, Kalb G, Geserick G. (2003) Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Weisheitszahnmineralisation bei einer deutschen Population. *Rechtsmedizin* 13(1), 5-10.
44. Zeeck A, Frond S, Papastavrou I, Zeeck SC. (2020) *Chemie für Mediziner.* 10. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München; 341-344.
45. Geiger T, Clarke S. (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *Journal of Biological Chemistry* 262(2):785-794. doi: 10.1016/S0021-9258(19)75855-4.
46. Fujii N, Takata T, Fujii N, Aki K, Sakaue H. (2018) D-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 1866(7):840-847. doi: 10.1016/j.bbapap.2018.03.001.
47. Hellwig E, Klimek J, Attin T. (2018) *Einführung in die Zahnerhaltung.* 7. Auflage. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln; 8-41.

48. Ohtani S, Matsushima Y, Kobayashi Y, Kishi K. (1998) Evaluation of aspartic acid racemization ratios in the human femur for age estimation. *J Forensic Sci.* 43(5):949-53.
49. Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A. (1995) Estimation of chronologic age using the aspartic acid racemization method. II. On human cortical bone. *Int J Legal Med.* 108(1):24-6. doi: 10.1007/BF01845612.
50. Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A. (1995) Estimation of chronologic age using the aspartic acid racemization method. I. On human rib cartilage. *Int J Legal Med.* 108(1):19-23. doi: 10.1007/BF01845611.
51. Dobberstein RC, Tung SM, Ritz-Timme S. (2010) Aspartic acid racemisation in purified elastin from arteries as basis for age estimation. *Int J Legal Med.* 124(4):269-75. doi: 10.1007/s00414-009-0392-1.
52. Klumb K, Matzenauer C, Reckert A, Lehmann K, Ritz-Timme S. (2016) Age estimation based on aspartic acid racemization in human sclera. *Int J Legal Med.* 130(1):207-11. doi: 10.1007/s00414-015-1255-6.
53. Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S. (2014) Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in elastic cartilage of the epiglottis. *Int J Legal Med.* 128(6):995-1000. doi: 10.1007/s00414-013-0940-6.
54. Ritz S, Schütz HW, Peper C. (1993) Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: its applicability for root dentin. *Int J Legal Med.* 105(5):289-93. doi: 10.1007/BF01370387.
55. Ohtani S, Yamamoto T. (2011) Comparison of age estimation in Japanese and Scandinavian teeth using amino acid racemization. *J Forensic Sci.* 56(1):244-7. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01545.x.
56. Sirin N, Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S. (2018) Age estimation based on aspartic acid racemization in dentine: what about caries-affected teeth? *Int J Legal Med.* 132(2):623-628. doi: 10.1007/s00414-017-1667-6.
57. Kleter GA, Damen JJ, Buijs MJ, Ten Cate JM. (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. *J Dent Res.* 77(3):488-95. doi: 10.1177/00220345980770030801.
58. Tiemeier H (2002). Razemisierung von Asparaginsäure in Schmelzproteinen: forensische Nutzbarkeit zur biochemischen Lebensaltersschätzung und grundlagenwissenschaftliche Aspekte (Doctoral dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).
59. Reichart PA, Hausamen J-E, Becker J, Neukam FW, Schliephake H, Schmelzeisen R. (2002) *Zahnärztliche Chirurgie Band I.* Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin; 155,156.

60. Ulrich P, Cerami A. (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res.* 56:1-21. doi: 10.1210/rp.56.1.1.
61. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 44(2):129-46. doi: 10.1007/s001250051591. Erratum in: *Diabetologia* 2002 Feb;45(2):293.
62. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel RJ, Börgermann J, Silber RE, Simm A. (2007) Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr.* 40(5):349-56. doi: 10.1007/s00391-007-0484-9.
63. Maillard LC, Gautier MA, Seances CR. (1912) Maillard browning reaction. *Acad Sci, Vol.* 154, 66-68.
64. Ahmed N. (2005) Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 67(1):3-21. doi: 10.1016/j.diabres.2004.09.004.
65. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM. (1992) Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes.* 41(2):153-9. doi: 10.2337/diab.41.2.153.
66. Simm A. (2013) Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *J Proteomics.* 92:248-59. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.012.
67. Miura J, Nishikawa K, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto M, Takeshige F, Araki T. (2014) Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Arch Oral Biol.* 59(2):119-24. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.10.012.
68. Fukushima S, Shimizu M, Miura J, Matsuda Y, Kubo M, Hashimoto M, Aoki T, Takeshige F, Araki T. (2015) Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin. *Biomed Opt Express.* 6(5):1844-56. doi: 10.1364/BOE.6.001844.
69. Weykamp C. (2013) HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Ann Lab Med.* 33(6):393-400. doi: 10.3343/alm.2013.33.6.393.
70. Horn F. (2021) *Biochemie des Menschen.* 8. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart; 372-373.
71. Maulani C, Auerkari EI. (2020) Age estimation using DNA methylation technique in forensics: a systematic review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 10(1):1-15.
72. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. (2015) Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics.* 10(10):922-30. doi: 10.1080/15592294.2015.1080413.
73. Horvath S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14(10):R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115. Erratum in: *Genome Biol.* 2015;16:96.

74. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Ż, Spas A, Parys-Proszek A, Kucharczyk K, Płoski R, Branicki W. (2015) Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* 14:161-7. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.10.002.
75. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K. (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.* 49(2):359-367. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016.
76. Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, Miller TH, Barron LP, Syndercombe Court D. (2017) DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 28:225-236. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.02.009.
77. Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, Girón-Santamaría L, Gómez-Tato A, Casares de Cal M, Álvarez-Dios J, Ansedo-Bermejo J, Torres-Español M, Schneider PM, Pośpiech E, Branicki W, Carracedo Á, Lareu MV. (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. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.06.005.
78. Vidal-Bralo L, Lopez-Golan Y, Gonzalez A. (2016) Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults. *Front Genet.* 7:126. doi: 10.3389/fgene.2016.00126.
79. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. (2011) Epigenetic predictor of age. *PLoS One.* 6(6):e14821. doi: 10.1371/journal.pone.0014821.
80. Hong SR, Jung SE, Lee EH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. (2017) DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers. *Forensic Sci Int Genet.* 29:118-125. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.04.006.
81. Silva DSBS, Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, Alho CS, McCord B. (2016) Developmental validation studies of epigenetic DNA methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples. *Forensic Sci Int Genet.* 23:55-63. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.01.017.
82. Giuliani C, Cilli E, Bacalini MG, Pirazzini C, Sazzini M, Gruppioni G, Franceschi C, Garagnani P, Luiselli D. (2016) Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth. *Am J Phys Anthropol.* 159(4):585-95. doi: 10.1002/ajpa.22921.
83. Correia Dias H, Corte-Real F, Cunha E, Manco L. (2020) DNA methylation age estimation from human bone and teeth. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 1-14.

84. Naue J, Sanger T, Hoefsloot HCJ, Lutz-Bonengel S, Kloosterman AD, Verschure PJ. (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. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.07.007.
85. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jockel KH, Erbel R, Muhleisen TW, Zenke M, Brummendorf TH, Wagner W. (2014) Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 15(2):R24. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r24.
86. Jung SE, Lim SM, Hong SR, Lee EH, Shin KJ, Lee HY. (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. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.09.010.
87. Koop BE, Reckert A, Becker J, Han Y, Wagner W, Ritz-Timme S. (2020) Epigenetic clocks may come out of rhythm-implications for the estimation of chronological age in forensic casework. *Int J Legal Med.* 134(6):2215-2228. doi: 10.1007/s00414-020-02375-0.
88. Rosen AD, Robertson KD, Hlady RA, Muench C, Lee J, Philibert R, Horvath S, Kaminsky ZA, Lohoff FW. (2018) DNA methylation age is accelerated in alcohol dependence. *Transl Psychiatry.* 8(1):182. doi: 10.1038/s41398-018-0233-4.
89. Lee HY, Lee SD, Shin KJ. (2016) Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Rep.* 49(7):359-69. doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.7.070.
90. Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, Axelsson J, Suliman M, Lindholm B, Heimburger O, Barany P, Alvestrand A, Nordfors L, Qureshi AR, Ekstrom TJ, Schalling M. (2007) Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med.* 261(5):488-99. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01777.x.
91. Boehme P, Reckert A, Becker J, Ritz-Timme S. (2021) Molecular methods for age estimation: The current state of the art in relation to specific demands of forensic practice. *Rechtsmedizin* 31:177–182. doi:10.1007/s00194-021-00490-9.
92. Mahlke NS, Renhart S, Talaa D et al. (2021) Molecular clocks in ancient proteins: Do they reflect the age at death even after millennia? *International Journal of Legal Medicine.* doi: 10.1007/s00414-021-02522-1.
93. Becker J, Naue J, Reckert A, Boehme P, Ritz-Timme S. (2021) Nutzung von Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNA-Methylierung zur postmortalen Lebensaltersschatzung: Konzept und Ergebnisse einer Pilotstudie. *Rechtsmedizin* 31:234–242. doi: 10.1007/s00194-021-00489-2.

94. Thevissen PW, Kaur J, Willems G. (2012) Human age estimation combining third molar and skeletal development. *Int J Legal Med.* 126(2):285-92. doi: 10.1007/s00414-011-0639-5.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme für das Bereitstellen des Themas, Ihre Unterstützung und Geduld bedanken. Selbst spät abends oder am Wochenende konnte ich mit helfenden Worten rechnen. Ich bedanke mich für Ihre Motivation während der Datensammlung und beim Erstellen der Publikation und Dissertation.

Auch Frau Dr. Alexandra Reckert gilt mein Dank für die fachliche Beratung und Literaturrecherche. Ihre Tür stand für Fragen immer für mich offen, um mir beim Verfassen der Dissertation zu helfen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Bärbel Seeling für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor bedanken, aber auch für Ihre gut Laune und stete Motivation. Mit Ihrer Hilfe hat mir die Arbeit im Institut für Rechtsmedizin Freude bereitet.

Herrn Prof. Dr. Simon Eickhoff gilt mein Dank für die detaillierte statistische Auswertung meiner Daten.

Allen Mitarbeitern im Institut für Rechtsmedizin danke ich für die gute Stimmung im Team und Ihre Mithilfe im Labor. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Julia Becker, Frau Dr. Barbara Koop, Herrn Tanju Gündüz, Frau Dr. Petra Böhme, Herrn Dr. Felix Mayer, Frau Lisa Küppers und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wagner für die tatkräftige Unterstützung bei meiner Publikation.

Für die Bereitstellung von Zähnen, Mundschleimhaut-Abstrichen und Röntgenbildern danke ich den Kollegen in der Zahnklinik der Uniklinik Düsseldorf, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Michael Schnaidt für sein Verständnis und seine Geduld während meiner Promotionszeit. Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, Frau Gabriele und Herrn Dr. Sarma Siahaan, die mir das Studium ermöglicht und mich bei all meinen Schritten unterstützt haben.