

Neue Ansätze zur molekularen Lebensalterschätzung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Becker
aus Duisburg

Düsseldorf, Dezember 2024

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

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Stefanie Ritz

2. Prof. Dr. William F. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2025

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- [1] Becker J, Mahlke NS, Reckert A, Eickhoff SB, Ritz-Timme S. *Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study.* Int J Legal Med 134, 721–733 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02054-9>
- [2] Becker J, Naue J, Reckert A, Böhme P, Ritz-Timme S. *Nutzung von Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNA-Methylierung zur postmortalen Lebensaltersschätzung.* Rechtsmedizin 31, 234–242 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00194-021-00489-2>
- [3] Becker J, Bühren V, Schmelzer L, Reckert A, Eickhoff SB, Ritz S & Naue J. *Molecular age prediction using skull bone samples from individuals with and without signs of decomposition: a multivariate approach combining analysis of posttranslational protein modifications and DNA methylation.* International Journal of Legal Medicine, 1-18 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00414-024-03314-z>

Für meine Eltern
Ina & Jörg

Zusammenfassung

Werden Verstorbene erst im Zustand fortgeschrittener postmortalen Veränderungen aufgefunden, kann eine unmittelbare Identifizierung, z.B. durch Abgleiche mit dem Personalausweis, erheblich erschwert oder gar unmöglich sein. Eine möglichst präzise Schätzung des erreichten Lebensalters stellt einen wichtigen Hinweis im Rahmen der Identifizierung dar, da dem Lebensalter unter den verschiedenen individuellen Merkmalen wie Körpergröße, Geschlecht und anderen Charakteristika die höchste Selektivität zukommt. Traditionelle morphologische Methoden zur Lebensaltersschätzung bei Erwachsenen liefern oft unpräzise Schätzungen. Im Gegensatz dazu bieten molekulare Verfahren vielversprechendere Ansätze, dies gilt insbesondere für Methoden auf Basis der Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp) und Pentsidin (Pen) in langlebigen Proteinen sowie der lebensaltersabhängigen Zu- oder Abnahme der DNA-Methylierung (DNAm).

Auch bei diesen vielversprechenden Ansätzen kann die Diskrepanz zwischen dem anhand eines singulären Parameters bestimmten molekularen Alter und dem chronologischen Lebensalter aus verschiedenen Gründen erheblich sein. Beispielsweise beeinflussen verschiedene Erkrankungen, ethnische Unterschiede oder individuelle Lebensumstände die genutzten Parameter. Zudem nimmt die Streuung der Daten mit dem Lebensalter aufgrund der komplexen Interindividualität der Alterungsprozesse zu und kann zu unpräzisen Ergebnissen in höherem Alter führen. Der Einfluss postmortalen Veränderungen wie Fäulnis und die oft eingeschränkte Verfügbarkeit verschiedener Gewebetypen stellen zusätzliche Herausforderungen dar.

Vor diesem Hintergrund widmet sich die vorliegende Dissertation der Optimierung des Methodenrepertoires zur postmortalen Lebensaltersschätzung. Durch die Nutzung der Information aus der Analyse mehrerer molekularer Parameter – D-Asp, Pen und DNAm – in *Machine Learning* Modellen sollte der Einfluss ante- sowie postmortalen Faktoren auf die Genauigkeit der Lebensaltersschätzung minimiert werden. In Publikation 1 wurde das Potenzial *Machine Learning* gestützter Modelle unter Nutzung der Parameter D-Asp und Pen in Bandscheiben- und Epiglottisgewebe zur Lebensaltersschätzung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verknüpfung dieser beiden Parameter die Genauigkeit von Lebensaltersschätzungen, insbesondere im höheren Alter, deutlich verbessern kann. In einer weiteren Studie (Publikation 2) wurden erstmals proteinbasierte Parameter (D-Asp, Pen) sowie zusätzlich die DNAm in vier verschiedenen Geweben (Bandscheiben-, Epiglottis- und Achillessehngewebe sowie Knochenproben) von jeweils einem Spender analysiert; die Ergebnisse belegten Machbarkeit und Potential der gleichzeitigen Analyse aller drei Parameter in komplexen Geweben. In Publikation 3 wurden D-Asp, Pen und DNAm in Knochenproben von Spendern ohne makroskopisch erkennbare postmortale Veränderungen sowie erstmals auch von Spendern mit fortgeschrittenem postmortalem Intervall analysiert. Hierbei erwies sich in Modellen nicht jede Kombination als zielführend; das „reine“ DNAm-Modell erzielte die besten Ergebnisse bei Proben von Spendern ohne makroskopisch erkennbare postmortale Veränderungen, während sich bei Proben von Spendern mit fortgeschrittenem postmortalem Intervall die proteinbasierten Methoden als robuster zeigten. Die Ergebnisse dieser Arbeiten stützen die Hypothese, dass eine Kombination verschiedener molekularer Parameter in *Machine Learning* Modellen dazu beitragen kann, Einflüsse wie die interindividuelle Varianz von Alterungsprozessen bei der Schätzung des chronologischen Alters zu verringern. Dies gilt insbesondere für komplexe Gewebetypen und Proben mit fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen.

Die Zukunft der forensischen Altersschätzung liegt in einer Kombination möglichst vieler und unterschiedlicher Ansätze (auch morphologische, histologischer etc.) in entsprechenden *Machine Learning* Modellen. Dabei setzt eine solche Einführung von künstlicher Intelligenz in die Rechtsmedizin im Vorfeld die Klärung rechtlicher, ethischer und praktischer Fragen voraus.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Herausforderungen bei unbekannter Identität eines/r Verstorbenen/r	1
1.2 Schätzung des Lebensalters zur Einengung des Personenkreises bei unbekannten Verstorbenen: Methoden und Ansätze	2
1.3 Grundlagen der molekularen Lebensaltersschätzung auf Basis posttranslationaler Protein-Modifikationen und der DNA-Methylierung	4
1.3.1 Intravitale Akkumulation von D-Asparaginsäure	4
1.3.2 Akkumulation von <i>Advanced Glycation End Products</i> wie Pentosidin	5
1.3.3 DNA-Methylierung	6
1.4 Möglichkeiten und Grenzen molekularer Verfahren zur postmortalen Lebensaltersschätzung: Status quo	7
1.4.1 Proteinbasierte Verfahren (auf Basis von D-Asp, Pen)	7
1.4.2 Verfahren auf Basis der DNAm	8
1.5 Neue Ansätze zur postmortalen Lebensaltersschätzung: Kombination verschiedener molekularer Parameter in verschiedenen Gewebetypen eines Individuums zur Steigerung der Genauigkeit unter Nutzung von KI basierten Modellen	13
1.5.1 Knochen und andere postmortal stabile Gewebe als Untersuchungsgut	13
1.5.2 <i>Machine Learning</i> basierte Modelle zur postmortalen Lebensaltersschätzung	15
2 Zielsetzung	18
3 Publikationen	19
3.1 Publikation 1	19
3.2 Publikation 2	20
3.3 Publikation 3	21
4 Diskussion	22
4.1 Die Auswahl der optimalen Methode zur Lebensaltersschätzung kann im Einzelfall eine Herausforderung sein	22
4.2 Eignung der als Untersuchungsgut gewählten Gewebe zur postmortalen Lebensaltersschätzung über molekulare Verfahren	23
4.2.1 Proteinbasierte Verfahren (auf Basis von D-Asp, Pen)	23
4.2.2 Verfahren auf Basis der DNAm	25
4.3 Robustheit der untersuchten molekularen Parameter gegenüber postmortalen Einflüssen	26
4.4 Multivariate Analyse von Parametern – Die Lösung für alles?	28
4.4.1 Einsatz von Künstlicher Intelligenz in der Forensik und Begutachtung	30
5 Ausblick	32
6 Literatur- und Quellenverzeichnis	33
7 Abkürzungsverzeichnis	42
8 Abbildungsverzeichnis	43
9 Tabellenverzeichnis	43
10 Eidesstattliche Versicherung	44
11 Danksagung	45

1 Einleitung

1.1 Herausforderungen bei unbekannter Identität eines/r Verstorbenen/r

Bei Unsicherheit über die Identität eines Verstorbenen bei der ärztlichen Leichenschau muss die Polizei informiert werden (§ 9 (6) BestG), die sodann verpflichtet ist, die Staatsanwaltschaft oder das Amtsgericht zu benachrichtigen (§ 159 Abs. 1 StPO). Die Identität soll bestenfalls vor Öffnung des Leichnams ermittelt werden durch Befragung von Personen, die den Verstorbenen kannten und „Maßnahmen erkennungsdienstlicher Art“ (§ 88 Abs. 1 StPO). Zu den oft primär durchgeführten Maßnahmen zählen u.a. die Daktyloskopie [4] sowie die Erhebung individueller Kennzeichen z.B. von Narben nach medizinischen Eingriffen, Tätowierungen oder besonderen anatomischen Merkmalen [5-7]. Sollten diese Maßnahmen nicht zu einer sicheren Identifizierung führen, kann eine Obduktion angeordnet werden.

Laut Angabe des Bundeskriminalamtes betrug im Mai 2024 die Zahl der in Deutschland aufgefundenen unbekannten Toten 1.582¹ [mit Stand 30.04.2024]. Auch Skelett- oder Knochenfunde, die formal nicht mehr als Leichnam gelten, können forensisch relevant sein, wenn sie eine Liegezeit von maximal 50 Jahren nicht überschreiten.

Eine nicht erfolgte oder fehlerhafte Identifizierung kann weitreichende Folgen haben. Zunächst ist die Gewissheit, dass ein vermisster Angehöriger tatsächlich verstorben ist, für die Trauerarbeit wichtig. Weiterhin hat die Identifizierung mit der Feststellung des Todes einer Person direkte Auswirkungen auf die Rechtsstellung der Hinterbliebenen. Dies zieht bedeutende ökonomische und finanzielle Konsequenzen nach sich, insbesondere im Hinblick auf erbrechtliche Fragen und Versicherungsaspekte. Im Bereich des Strafrechts kann eine nicht erfolgte Identifizierung die Ermittlungsarbeit in Tötungsdelikten erheblich behindern sowie verkomplizieren. Die Aufklärung von Verbrechen wird dadurch maßgeblich erschwert [8].

Werden Verstorbene erst nach Einsetzen der Autolyse- und Fäulnisprozesse gefunden, kann eine Identifikation „prima facies“ unmöglich sein. Postmortale Veränderungen schreiten je nach Umgebungsbedingungen unterschiedlich schnell voran.

Die Autolyse ist ein Vorgang, bei dem körpereigene Enzyme organische Strukturen abbauen. Im Gegensatz dazu wird die Fäulnis durch bakterielle, sowohl aerobe als auch anaerobe, Abbauvorgänge bestimmt bei denen Wasserstoff- und Sauerstoffverbindungen frei werden [9]. Die verantwortlichen Bakterien entstammen der Hautoberfläche, den Atemwegen und vor allem dem Magen-Darm-Trakt [9, 10]. Im Folgenden treten die typischen spät postmortalen Veränderungen am Körper auf: die Grünverfärbung der Bauchhaut durch die Bildung von Sulfhämoglobin, die Entwicklung von Fäulnisgasen im Bereich der Haut und der Körperhöhlen mit Gasdunsung des Abdomens und Durchschlagen des oberflächlichen Venennetzes. Haare und Nägel lassen sich leichter entfernen, während Weichgewebe und Organe weich werden und sich zersetzen. Weitere Zeichen sind die erleichterte Ausziehbarkeit der Körperbehaarung sowie der Finger- und Zehennägel. Seltener Phänomene sind die Fettwachsbildung in feuchter, sauerstoffarmer Umgebung sowie eine Mumifizierung in trockener, kalter oder heißer Luft [9, 11].

Weitere Faktoren, die die postmortalen Veränderungen begleiten und die Identifikation von Verstorbenen erschweren können sind die Besiedlung des Leichnams durch Insekten sowie Tierfraßdefekte und Verschleppen einzelner Leichenteile durch Tiere [12]. Auch diese Faktoren hängen maßgeblich von den Umgebungsbedingungen ab und können bereits in der frühen postmortalen Phase einsetzen. Die Geschwindigkeit der postmortalen Veränderungen des

¹ Die Zahlen unterliegen Schwankungen und können täglich variieren, da in der Zwischenzeit Identifizierungen erfolgen können.

menschlichen Körpers verlaufen in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen. Bei einem exponierten Leichnam kann es bei hohen Außentemperaturen während der Sommermonate selbst in Mitteleuropa zur vollständigen Skelettierung innerhalb weniger Wochen kommen [13]. Tritt eine Mumifizierung bei trockenen und heißen Umgebungsbedingungen auf, ist eine Beständigkeit von Weichgewebsresten über Dekaden hinweg möglich, insbesondere bindegewebige Strukturen wie Sehnen, Bänder und Knorpel sind neben Knochen und Zähnen relativ robust. Im Wasser verläuft der Verwesungsprozess langsamer als an der Luft. Die Casper'sche Regel beschreibt, dass der Fäulnisgrad eines Leichnams nach einwöchiger Exposition an der Luft in etwa zwei Wochen im Wasser oder acht Wochen im Erdgrab entsprechen [13].

Bei fehlendem Anfangsverdacht und nicht möglicher Identifizierung durch Maßnahmen „erkennungsdienstlicher Art“ basiert die Identifizierung unbekannter Verstorbener auf einer engen Zusammenarbeit zwischen den Ermittlungsbehörden und der Rechtsmedizin. Die Ermittlungsbehörden verfügen über den Zugang zu umfangreichen Vermisstendatenbanken (in Deutschland „Vermi/Utot“ - Datei für Vermisste, Unbekannte Tote und unbekannte Hilfloose). Die Rechtsmedizin übermittelt die Parameter, die für das Einengen des infrage kommenden Personenkreises bei der Suche infrage kommender Personen benötigt werden.

Zunächst werden Basisinformationen wie Geschlecht, Körperhöhe und geschätztes Lebensalter anhand verschiedener morphologischer Merkmale am Skelett ermittelt wobei ihre Aussagekraft und ihr Beitrag zur Eingrenzung möglicher Identitäten unterschiedlich gewichtet sind: Die Bestimmung des Geschlechts bietet lediglich eine binäre Unterscheidung zwischen männlich und weiblich. Zudem gelingt nicht immer eine eindeutige Zuordnung aufgrund der erheblichen Variationsbreite dieser Merkmale bei Frauen und Männern und gibt nur Aufschluss auf das biologische Geschlecht [14]. Die Körpergröße kann auch bei völliger Skelettierung anhand der Röhrenknochen ermittelt werden. Die Schätzung wird präziser je mehr Knochen vorhanden sind [15, 16]. Das geschätzte Alter eines Verstorbenen besitzt den höchsten diskriminierenden Wert unter diesen drei Parametern. Es ermöglicht eine deutlich feinere Eingrenzung der in Frage kommenden Personen in den Vermisstendatenbanken. Allerdings ist die Schätzung des Lebensalters mit methodischen Herausforderungen verbunden (s. Absatz 1.2 und Absatz 1.4).

Ergibt sich der Verdacht, dass es sich um eine bestimmte Person handeln könnte, erfolgt die endgültige Identifizierung durch Vergleich. Zu diesem Zweck stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, darunter die Analyse von molekulargenetischen Merkmalen (*short tandem repeats*) [17, 18], den Abgleich des Zahnstatus [19], die Auswertung medizinischer Implantate oder Röntgenvergleichsanalysen [20]. Der Erfolg dieser Methoden hängt von der Verfügbarkeit geeigneten Vergleichsmaterials ab, wie DNA-Proben naher Angehöriger, möglichst aktuelle zahnärztliche Unterlagen und/oder alte Röntgenaufnahmen.

1.2 Schätzung des Lebensalters zur Einengung des Personenkreises bei unbekannten Verstorbenen: Methoden und Ansätze

Methoden zur forensischen Lebensaltersschätzung sollten nach strengen Auswahlkriterien ausgewählt und überprüft werden, um eine möglichst präzise Altersschätzung zu ermöglichen. Dazu zählt der Nachweis der Validität einer Methode durch empirisch erhobene und fachwissenschaftlich publizierte Datensätze sowie der Beleg der Reliabilität der Methode durch eine unabhängige Reproduktion der Daten. Weiterhin sollten klare Informationen zur Streubreite der Datensätze wie auch der einer individuellen Schätzung vorgelegt werden und der Einfluss möglicher Störgrößen bekannt sein [8].

Konventionelle morphologische Verfahren basieren im Kindes- und Jugendalter auf der Beurteilung der Knochen- und Gebissentwicklung; sie lassen in dieser Altersgruppe [insbesondere unter 14 Jahren] eine relativ genaue Lebensaltersschätzung zu. Je nach Alter wird eine Genauigkeit von $\pm < 2$ Jahren im 95% Vertrauensintervall angegeben [21-23] (s. Tabelle 1). Im Erwachsenenalter sind das Skelett und Gebiss hingegen voll ausgereift und es können nur noch degenerative Veränderungen zur Beurteilung herangezogen werden; entsprechend resultieren teils große Schwankungsbreiten zwischen dem geschätzten und dem chronologischen Alter (s. Tabelle 1). Bei Beurteilung der Morphologie permanenter Zähne werden 95% Vertrauensintervalle von $\pm 10 - 24$ Jahre angegeben [24].

Tabelle 1: Möglichkeiten der postmortalen Lebensaltersschätzung durch konventionelle morphologische Methoden (modifiziert nach Ritz-Timme et al. [8])

[SE= Standardfehler; PI= Prognoseintervall, MAE= Mittlerer absoluter Fehler, SEE= Standardfehler der Schätzung; MAD= Mittlere absolute Abweichung; n.s. nicht spezifiziert, MVM=Multivariates Modell; R= Korrelationskoeffizient; Lit= Literatur]

Analysierte Parameter / Gewebe		Genauigkeit (Jahren)		R	Lit	Erläuterungen	
Bei Kindern und Jugendlichen:							
Erfassung der Gebissentwicklung (radiologisch)	0 - 14J.	$\pm 0.5-1J.$ $\pm <2 J.$	SEE PI	0.50- 0.88	[23, 25-29]	Mit zunehmendem Alter ungenauer durch Ende von Entwicklung und Beginn degenerativer Veränderungen	
	14 - 21J.	$\pm 1-2.5J.$ $\pm 4-5J.$	SEE PI	0.32- 0.85			
Erfassung der Skelettentwicklung (radiologisch)	0 - 18J.	$\pm 0.5-2J.$	SEE	0.64- 0.88	[28, 30, 31]		
Bei Erwachsenen:							
Beurteilung der Morphologie permanenter Zähne	Erwachsenenalter	$\pm 10-24J.$	PI	---	[24]		
Bewertung morphologischer Merkmale des Skeletts	< 40 J.	Bestenfalls $\pm 2 - 4J.$	SEE	0.85	[32-34]		
Gesamter Altersbereich:							
Bewertung dentaler Morphologie sowie histologischen Merkmalen	Jedes Alter mit permanenten Zähnen	$\pm 5-12J.$	SEE	0.57- 0.91	[23, 35, 36]		
Zahnzement Annullation	Jedes Alter mit permanenten Zähnen	$\pm 4-10J.$	SEE	0.78- 0.93	[37-39]		
MVM (unter Nutzung mehrerer Parameter)	Jedes Alter	Bestenfalls c. $\pm 4.5J.*$	SEE	0.72- 0.90	[40-42]		

*abhängig von einbezogenen (verschiedenen) Merkmalen; mit zunehmendem Alter sinkt die Genauigkeit.

Vor diesem Hintergrund wurden die herkömmlichen morphologischen Verfahren insbesondere im letzten Jahrzehnt um zahlreiche neue Ansätze, die auf der Nutzung altersabhängiger molekularer Veränderungen (insbesondere an Proteinen und DNA [43-48]) basieren, erweitert. Aus der Sicht der Grundlagen- und Altersforschung ergeben sich daraus interessante Fragen zur genauen Bedeutung dieser molekularen Modifikationen für Alterungsprozesse und zu ihrem Beitrag zum Altern und zum biologischen Alter eines Individuums. Aus Perspektive der forensischen Wissenschaften ist bemerkenswert, dass einige dieser auch als „molekularer

Uhren“ oder „*biomarkers of aging*“ [43-45, 47, 48] bezeichneten Modifikationen einen so engen Zusammenhang mit dem chronologischen Lebensalter zeigen, dass sie dafür genutzt werden können, das Alter einer (z. B. unbekannten) Person zu schätzen. Diese Ansätze sind vor allem interessant, da sie - zumindest im Erwachsenenalter - wesentlich genauere Ergebnisse einer Lebensaltersschätzung liefern. Als derzeit relevanteste Ansätze sind die posttranslationalen Proteinmodifikationen der Akkumulation von D-Asparaginsäure und Pentosidin sowie die DNA-Methylierung zu nennen.

1.3 Grundlagen der molekularen Lebensaltersschätzung auf Basis posttranslationaler Protein-Modifikationen und der DNA-Methylierung

1.3.1 Intravitale Akkumulation von D-Asparaginsäure

Die Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp) in langlebigen Proteinen mit zunehmendem Lebensalter ist das Ergebnis der spontanen Umwandlung von L-Asparagin- (Asn) und L-Asparaginsäureresten (Asp) in ihre D-Form [43].

Durch die Deamidierung von L-Asn zu einem metastabilen zyklischen L-Succinimid wird der Prozess zur Umwandlung initiiert. Aus dem L-Succinimid können sich durch Isomerisierung L-Asn und L-Iso-Asn bilden. Weiterhin kann durch Umlagerung über das Intermediat die D-Form = D-Succinimid entstehen. Aus diesem können D-Asp und D-Iso-Asp entstehen [43, 49] (s. Abbildung 1).

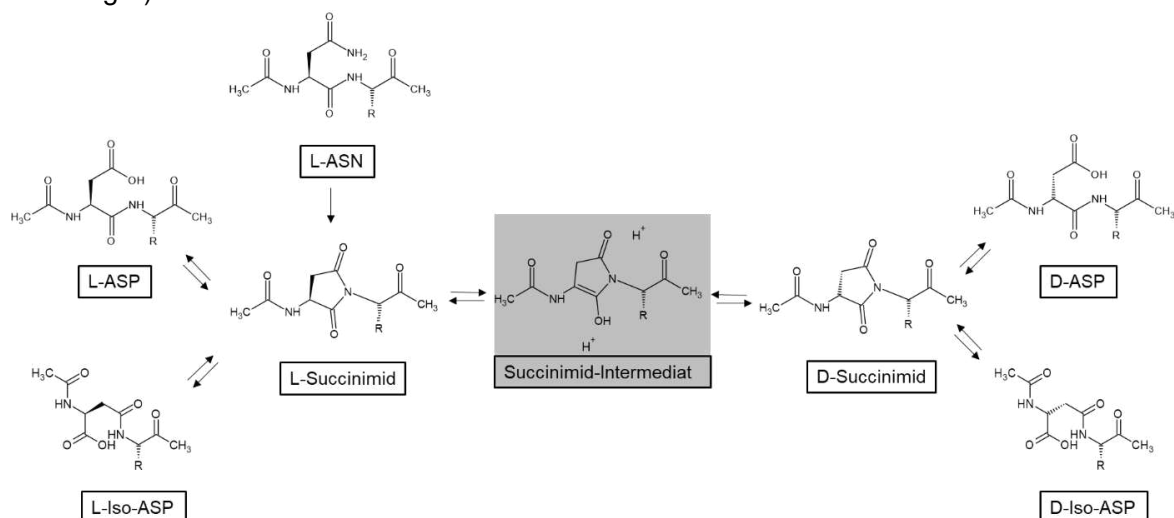


Abbildung 1: Intravitale Umwandlung von L-Asparaginsäure in ihre D-Form (modifiziert nach Geiger und Clark [49]; Strukturformeln erstellt mit ChemSketch [50]). Deamidierung von L-Asn zu einem metastabilen zyklischen L-Succinimid. Durch Isomerisierung können sich aus dem L-Succinimid L-Asp und L-Iso-Asp bilden. Durch Umlagerung über ein Intermediat (grau hinterlegt) kann jedoch auch das D-Succinimid entstehen und folgend D-Asp und D-Iso-Asp.

Die Akkumulation der D-Asp in (langlebigen) Proteinen hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen sind die physikochemische Umgebung sowie die Umsatzrate des „Ausgangsproteins“ maßgeblich, wobei die physikochemischen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur usw.) im Körper weitgehend konstant sein müssen, um mit dem Leben – also während der Akkumulation von D-Asp – vereinbar zu sein. Weist das Protein eine mittlere bis hohe Umsatzrate auf, so unterliegt es entweder ständigem Austausch gegen neu synthetisiertes Protein oder es erfährt eine rasche Degradation [46, 51, 52], sodass es zu keiner altersabhängigen Akkumulation von D-Asp kommt. Damit D-Asp altersabhängig akkumuliert und dies messbar ist muss die Umsatzrate des Proteins sehr gering sein [51]. Weiterhin üben die Sekundär- sowie Tertiärstruktur des Proteins einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Razemisierung, also der

Umwandlung der L- in die D-Form, aus. Je größer bzw. räumlich komplexer das Protein vorliegt, desto langsamer akkumuliert D-Asp in der Regel [46, 51].

1.3.2 Akkumulation von *Advanced Glycation End Products* wie Pentosidin

Pentosidin gehört zu der Gruppe der *Advanced Glycation End Products* (AGEs). AGEs sind heterogene Makromoleküle, die durch spontane Glykierung von Aminosäureresten in Proteinen entstehen und im Rahmen der Proteinalterung eine Rolle spielen [46, 53]. Sie weisen eine Vielfalt an Strukturen auf, die quervernetzende Eigenschaften oder die Fähigkeit zur autonomen Fluoreszenzemission (wie auch Pen) besitzen [54, 55].

Der Entstehung von AGEs liegt die Maillard- Reaktion, die auch als sogenannte Bräunungsreaktion bekannt ist [56], zugrunde. Sie verläuft als nicht-enzymatischer, mehrstufiger Prozess, der in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist. In einem ersten, noch reversiblen Schritt verbinden sich die freie Carbonylgruppe reduzierter Kohlenhydrate mit der freien Aminogruppe eines Proteins. Unter Abspaltung von Wasser bildet sich eine Schiff'sche Base. Infolge ihrer metastabilen Struktur lagert sich diese in mehreren Schritten zu einem weitaus stabileren Ketoamin, auch Amadori-Produkt genannt, um. Durch weitere chemische Transformationen und Intermediate entsteht die heterogene Gruppe der AGEs, die über Umlagerung und Polymerisation letztendlich inter- sowie intramolekulare Quervernetzungen ausbilden können [55] (vgl. Abbildung 2).

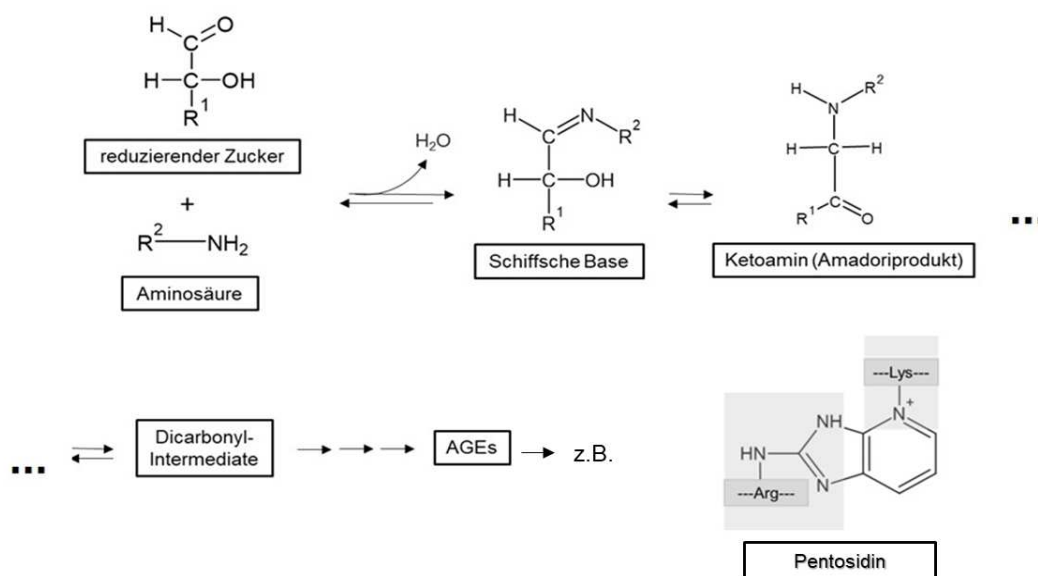


Abbildung 2: Bildung von AGEs durch Maillard Reaktion (modifiziert nach Ahmed [57] und Lackner & Peetz [58], Strukturformeln erstellt mit ChemSketch [50]). Die freie Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers reagiert mit der freien Aminogruppe eines Proteins unter Abspaltung von Wasser zu einer Schiff'schen Base. Aufgrund ihrer metastabilen Struktur lagert sich diese in mehreren Schritten zum stabileren Ketoamin=Amadori-Produkt um. Anschließend entstehen durch weitere chemische Transformationen Dicarboxyl-Intermediate und letztendlich AGEs wie z.B. Pentosidin.

Die Reaktion, die zur Ausbildung der kovalenten Quervernetzungen führt, geht mit der Zunahme von oxidativem Stress einher und potenziert dadurch Entzündungen [55]. AGEs sind assoziiert mit der Genese verschiedener Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz sowie Gefäß- und Herz- Kreislauferkrankungen [59-61]. Die mit der Zeit in langlebigen Proteinen akkumulierenden AGEs verursachen die für die Maillard-Reaktion charakteristische gelbliche bis braune Verfärbung des betroffenen Gewebes, die bereits im Blick auf eine Eignung für die forensische Altersschätzung untersucht wurde [62]. Auch hier gilt, dass Pen (und

vermutlich auch andere AGEs) nur akkumulieren, wenn die Umsatzrate des „Ausgangsproteins“ gering ist, da das Protein sonst einem ständigen Austausch gegen neu synthetisiertes Protein unterliegt oder eine rasche Degradation erfährt [46, 52, 63, 64].

1.3.3 DNA-Methylierung

Die Methylierung von DNA zählt zu den epigenetischen Markierungen des Genoms, die zum einen mit verschiedenen Entwicklungsprozessen und zum anderen mit der Regulierung sowie Expression von Genen in Eukaryonten assoziiert sind.

Diese reversible Modifikation der DNA entsteht durch Anlagerung einer Methyl-Gruppe an das 5'-Kohlenstoffatom des Pyrimidinrings eines Cytosins über eine kovalente Bindung und bildet so ein 5-Methylcytosin. Bei Säugetieren läuft diese Reaktion hauptsächlich an Stellen der DNA-Sequenz mit Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG) ab [65] und wird durch die DNA-Methyltransferasen DNMT1, 3A und 3B (DNMTs) katalysiert [66, 67]. Als Methylgruppen-Donator fungiert S-Adenosylmethionin (SAM), der durch die Katalyse zu S-Adenosinhomocystein (SAH) wird [67-69] (s. Abbildung 3).

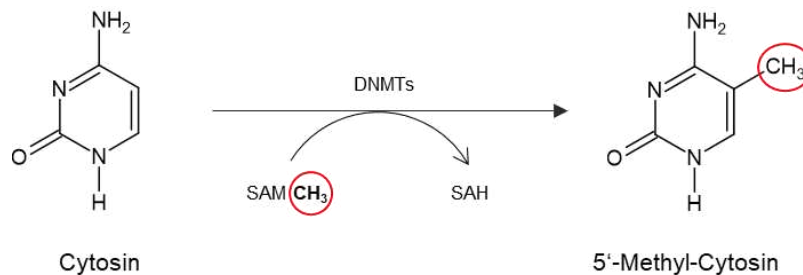


Abbildung 3: Methylierung von Cytosin (modifiziert nach Gibney et al. [70], Strukturformeln erstellt mit ChemSketch [50]). Durch die Anlagerung einer Methyl-Gruppe an das 5'-Kohlenstoffatom des Pyrimidinrings eines Cytosins über eine kovalente Bindung und bildet sich ein 5-Methylcytosin. Diese Reaktion wird durch die DNA-Methyltransferasen DNMT1, 3A und 3B (DNMTs) katalysiert. S-Adenosylmethionin (SAM) agiert als Methylgruppen-Donator der danach zu S-Adenosinhomocystein (SAH) wird.

CpG-Stellen sind im Genom von Säugetieren unterrepräsentiert, weisen dafür jedoch in bestimmten Regionen nahe Genpromotern eine hohe Dichte auf. Diese Bereiche, an denen eine atypisch hohe CpG Häufigkeit vorliegt, werden als „CpG-Inseln“ bezeichnet. Diese machen nur etwa 1 bis 2 % des gesamten Genoms aus. Die meisten Inseln sind kurz, besitzen jedoch einen CpG-Gehalt von 60-70 %. Mehr als 95 % der Inseln sind weniger als 1.800 bp und mehr als 75 % sind weniger als 850 bp lang [71-73].

Das Methylierungsprofil im Gesamt-Genom verändert sich im Laufe des Lebens kontinuierlich. Bei Neugeborenen ist die DNA-Methylierung im Blut niedrig, steigt jedoch im ersten Lebensjahr global an, insbesondere an den Rändern der Inseln und in intergenischen Regionen [74]. Danach bleiben die globalen Methylierungsniveaus stabil, unterliegen jedoch im Erwachsenenalter Schwankungen aufgrund der zunehmenden individuellen Variabilität [75]. Im höheren Alter nimmt die DNA-Methylierung global ab, verzeichnet jedoch eine Zunahme an CpG-Inseln und deren Rändern [76, 77]. Die Änderungsrate der Methylierungen sind im frühen Leben deutlich höher als im späteren Leben [78, 79]. Diese Muster wurden zwar hauptsächlich im Blut beobachtet, sind jedoch auch in anderen Geweben vorhanden. Im Allgemeinen zeigen die meisten Gewebe einen Anstieg der durchschnittlichen DNA-Methylierung in den ersten Lebensjahren und eine allmähliche Abnahme im späteren Leben [48, 80].

Zusätzlich zu den altersbedingten Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster zeigen sich an spezifischen Stellen des Genoms enge Korrelationen zwischen dem biologischen Alter und dem Methylierungsgrad, die nicht-stochastischer Natur sind und sowohl gewebespezifisch als

auch gewebeübergreifend existieren [48, 81]. Die Korrelation ist teilweise so eng, dass die DNA-Methylierungsmuster zur Schätzung des Lebensalters genutzt werden können. Auf dieser Basis wurden bereits diverse Altersschätzungsmodelle entwickelt (Übersicht bei [82]; s. Abschnitt 1.4.2).

1.4 Möglichkeiten und Grenzen molekularer Verfahren zur postmortalen Lebensalterschätzung: Status quo

Eine Übersicht der derzeitigen Möglichkeiten zur postmortalen Altersschätzung bietet Tabelle 2. Zu beachten ist, dass in der Literatur verschiedene Maße zur Beurteilung der Genauigkeit der verschiedenen Methoden und Modelle angewendet wurden und somit kein einheitlicher Vergleich der Methoden möglich ist [83].

1.4.1 Proteinbasierte Verfahren (auf Basis von D-Asp, Pen)

Eine altersabhängige Akkumulation von D-Asp und Pen setzt voraus, dass das „Ausgangsprotein“ früh im Leben angelegt und dann nicht mehr in relevantem Umfang ausgetauscht wird. Der Austausch von Proteinen umfasst sowohl die Synthese neuer Proteine als auch den Abbau von bestehenden Proteinen und wird als Protein-Turnover Rate (Prozentsatz des Proteinbestands, der pro Zeiteinheit erneuert wird) beschrieben [84]. Der kontinuierliche Zyklus von Proteinabbau und -neusynthese ist essentiell für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen und die Anpassungsfähigkeit des Organismus. Weiterhin beschreibt die Halbwertszeit eines Proteins die Zeit, die benötigt wird, um die Hälfte der vorhandenen Menge eines bestimmten Proteins abzubauen. Beide Konzepte sind wichtig für das Verständnis der Proteindynamik in Zellen [84]. Die Turnover Rate variiert erheblich zwischen verschiedenen Proteinen und Gewebetypen, wobei einige Proteine innerhalb von Minuten abgebaut werden, während andere, insbesondere in bradytrophen Geweben, über Monate oder Jahre hinweg stabil bleiben können. Regulatorische Proteine haben oft kurze Halbwertszeiten, um schnelle Anpassungen zu ermöglichen; Strukturproteine weisen in der Regel längere Halbwertszeiten auf [84]. Kollagen als Strukturprotein beispielsweise ist ein langlebiges Protein [46, 85]. Seine Halbwertszeit variiert je nach anatomischer Lokalisation und Kollagentyp, wurde jedoch auf 117 Jahre im Gelenkknorpel [63] und zwischen 95-215 Jahre in Bandscheiben [86] geschätzt.

Für Lebensalterschätzungen mittels der proteinbasierten Parameter Pen und D-Asp gilt deshalb, dass bradytrophe Gewebe mit niedriger Stoffwechselaktivität tendenziell besser geeignet sind. Werden nicht aufgereinigte Proteine untersucht, sondern Proteingemische (z.B. Gesamtgewebeproben), spielt die spezifische Zusammensetzung der Proteingemische eine wesentliche Rolle, da jedes Protein seine eigene Kinetik der Akkumulation von D-Asp und Pen aufgrund verschiedener Proteinstrukturen, verschiedener Turnover-Raten und Halbwertszeiten hat. Vorgänge, die die Proteinkomposition ändern können (z.B. intravitale oder postmortale Degradation oder eine intravitale Gewebsregeneration mit Bildung „neuer“ Proteine) können die Eignung eines Gewebes für Altersschätzungen negativ beeinflussen.

Eines der zurzeit präzisesten Verfahren zur Lebensalterschätzung basiert auf der Akkumulation von D-Asp in Dentin; dieses Verfahren ist zunehmend in der forensischen Praxis etabliert (z.B. [87-91] und lässt Lebensalterschätzungen mit einer Genauigkeit von um ± 4 Jahre im 95% Vertrauensintervall bzw. ein MAE² von 2.19 Jahren zu (je nach untersuchtem Zahntyp) zu [92]. Dentin besteht zu etwa 70% aus anorganischem Material (hauptsächlich

² Berechnet nach internen Daten.

Hydroxylapatit), zu 20% aus organischem Material (hauptsächlich Kollagen, der Rest besteht aus Lipiden und nicht-kollagenen Matrixproteinen) und zu 10% aus Wasser [93]. Weiterhin ist Dentin ein nahezu statisches Hartgewebe mit minimalem Umsatz nach der initialen Bildung während der Zahnentwicklung. Dies führt zu einer konstanten Proteinzusammensetzung über die gesamte Lebensdauer hinweg, was präzise Altersschätzungen basierend auf der Analyse von D-Asp und Pen im Gesamtgewebe ermöglicht [91, 92, 94, 95]. Die für diese Methode benötigten gesunden Zähne stehen allerdings in vielen Fällen der forensischen Praxis als Untersuchungsmaterial nicht zur Verfügung (prä- und/oder postmortaler Zahnverlust [94, 96], Leichen- oder Skeletteile ohne Zähne).

Mit anderen, komplexeren Geweben, die im Verhältnis zu anderen Organen robuster gegenüber postmortalen Veränderungen sind wie Knochen, Ligamente und Arterien, können ähnlich genaue Ergebnisse wie für Dentin nur erreicht werden, wenn mit hohem (in der forensischen Praxis i. d. R. nicht leistbarem) Aufwand langlebige Proteine wie Elastin oder Osteocalcin [97-100] aufgereinigt werden. Dennoch sind auch solche Gewebe für Altersschätzungen nutzbar, teilweise unter Einsatz von Gesamtgewebe oder nach Präparation grober Proteinfractionen, wobei die Genauigkeit der Methode dann jeweils deutlich geringer als bei Aufreinigung geeigneter Proteine oder dem Einsatz von Dentin ist (z.B. [101, 102]; s. Tabelle 2).

Die Studienlage zur Einsetzbarkeit der Akkumulation von Pen zur Schätzung des Lebensalters im forensischen Kontext ist derzeit sehr gering (s. Tabelle 2). Lebensaltersschätzungen auf Basis der Akkumulation von Pen in Dentin sind nach derzeitigem Stand wesentlich ungenauer (± 9.4 Jahre im 95% Vertrauensintervall [94] bzw. MAE² 6.03 Jahre) als die Schätzung auf Basis der Akkumulation von D-Asp. Neuere Arbeiten geben Hinweise auf die potenzielle Eignung von Pen zur Lebensaltersschätzung in komplexen Geweben wie Bandscheiben ([103]; R=0.92) und Knochen ([104]; $\rho = 0.90-0.95$). Bei Nutzung der Akkumulation von Pen zur Lebensaltersschätzung ist die theoretische Beeinflussbarkeit durch innere Erkrankungen zu beachten, insbesondere bei Vorliegen eines über lange Zeit schlecht eingestellten Diabetes mellitus oder einer Niereninsuffizienz [55, 59].

Dennoch ist die Akkumulation von Pen für Lebensaltersschätzungen insbesondere in Hinblick auf eine Kombination mit anderen Ansätzen interessant: Pen scheint über sehr lange postmortale Intervalle bis zu Tausenden von Jahren stabil zu sein [105], was einen Anwendungsbeereich auch im anthropologisch-archäologischen Kontext eröffnet. D-Asp hingegen erliegt über diese Zeiträume einer degradationsbedingten Nachrazemisierung und kann aufgrund dessen falsch hohe Schätzungen des Lebensalters liefern ([106]; s. Tabelle 2).

In der forensischen Praxis stellen Karies und Hitzebeeinträchtigungen (bei verbrannten Leichen) weitere zu beachtende Störfaktoren für die Lebensaltersschätzung mittels proteinbasierter Verfahren (D-Asp, Pen) dar. Die Untersuchungen von Greis et al. (2018) zeigen, dass die Schätzung des Lebensalters anhand von Pen in Fällen von kariösen oder erhitzten Zähnen keine genaueren Ergebnisse liefert als D-Asp. Sowohl Karies als auch Hitzebeeinträchtigung können beide Verfahren stören [94].

1.4.2 Verfahren auf Basis der DNAm

Für die besten Modelle unter Nutzung von DNAm Daten sind MAEs von ca. 3 bis 5 Jahren beschrieben (Übersicht bei [82, 107]), wobei die Abweichung zwischen geschätztem und tatsächlichem Alter im Einzelfall deutlich höher sein kann und sich die meisten bisherigen Modelle auf die Untersuchung von Proben Lebender beziehen. Die DNA-Methylierung ist individuellen stochastischen Veränderungen unterworfen und wird durch viele endogene wie

auch exogene Faktoren beeinflusst [82, 108]. Zu den Einflussfaktoren zählen insbesondere das Geschlecht, die Ethnizität, der Gesundheitsstatus, der sozialökonomische Status sowie zahlreiche Krankheiten wie maligne Erkrankungen und HIV, außerdem Expositionen mit verschiedenen Giftstoffen wie Alkohol, Rauchen, Luftverschmutzung ([109-112], Übersicht bei [113]).

Für den Einsatz von DNAm Modellen an der (durch Fäulnis veränderten) Leiche oder Leichenteilen liegen bislang vergleichsweise wenig Daten vor. Dabei hängt die Qualität der Ergebnisse postmortaler Altersschätzungen von der Verfügbarkeit geeigneter Gewebe und dem Degradationszustand der DNA bzw. dem Vorhandensein ausreichend intakter DNA ab [114, 115]. Es wurden bereits für verschiedene robuste Gewebe wie Knochen und Zähne [116-121] als auch für Knorpel [122, 123] und Finger-/Fußnägel [124] altersabhängige Marker beschrieben (s. Tabelle 2).

Für eine präzise Analyse der DNA-Methylierung ist eine hohe Mindestmenge von 200 bis 500 ng DNA erforderlich [125] um das Methylierungsmuster während der Bisulfitkonvertierung – dem derzeitigen Goldstandard – zu bewahren (Übersicht des Verfahrens bei [82]). In der forensischen Praxis kann dies Probleme bereiten, da gerade nach langen postmortalen Liegezeiten oft nur sehr geringe DNA-Mengen (0.001 ng bis 1 ng) zur Verfügung stehen.

Unterschreitet die DNA-Menge die empfohlene Schwelle, birgt dies folgende Problematik: Im Gegensatz zu der Analyse des genetischen Profils zeigt das DNAm-Niveau eine erhebliche Variabilität zwischen verschiedenen Zelltypen und selbst zwischen einzelnen Zellen desselben Typs. Auf der Ebene einzelner Zellen stellt die DNAm an einer bestimmten CpG-Stelle ein binäres Ereignis dar – die CpG-Stelle ist methyliert oder nicht. Wenn das DNAm-Niveau jedoch aus einem DNA-Extrakt bestimmt wird, repräsentiert das Ergebnis den Durchschnitt der Methylierungsgrade aller CpG-Stellen in dieser Probe [115]. Die Ergebnisse von Naue et al. zeigen auf, dass stochastische Variationen zu signifikanten Schwankungen bei der Analyse von DNAm-Niveaus, insbesondere bei geringen DNA-Mengen, führen können [115]. In der Folge können die Zuverlässigkeit sowie Reproduzierbarkeit der DNAm Analysen erheblich beeinträchtigt sein und zu ungenauen oder fehlerhaften Ergebnissen führen. Zudem wird die Qualität der DNAm-Analyse auch durch technisch bedingte Faktoren beeinflusst, die je nach verwendeten Markern, Modellen und dem untersuchten Altersbereich von unterschiedlich großer Bedeutung sein können. Mehrere Studien haben die Sensibilitätsschwelle ihrer Assays und Marker untersucht, wobei die Ergebnisse je nach Studie zwischen 1 und 20 ng schwanken [116, 126-130] (Details zum Vergleich der Studien in [82]).

Die Definition eines „Markers“ variiert zwischen den Publikationen und bezieht sich oft auf die genetischen Loci oder Sequenzregionen und im endgültigen Modell auf die spezifischen analysierten CpG-Positionen [82]. Es ist bekannt, dass die DNAm durch zahlreiche extrinsische (Umwelteinflüsse wie Verschmutzung, Toxine etc.) und intrinsische Faktoren (Erkrankungen, Stress, posttraumatische Belastungen) beeinflusst werden kann [113, 131]. Nicht für jeden Marker sind solche Einflüsse untersucht und ausschließbar. Vor diesem Hintergrund basieren Lebensaltersschätzungen über die DNAm in aller Regel auf Kombinationen mehrerer Marker in Modellen. Dabei gibt es verschiedene Ansätze zur Nutzung und Kombination der Marker in Modellen: die Marker können spezifisch für jedes Gewebe identifiziert werden oder ein Modell mit einem festen Markersatz für verschiedene Gewebe entwickelt und an die Gewebe angepasst werden. Hier können sowohl gewebe-spezifische Modelle (z.B. [116]; dasselbe Markersatz jedoch die gewebespezifisch am besten korrelierenden CpG-Stellen werden berücksichtigt und verwendet) oder gewebeübergreifende Modelle (z.B. [132]; dieselben Marker und CpG-

Stellen werden in einem gewebespezifischen Modell auf verschiedene Gewebe und Zelltypen angewendet) entwickelt werden.

Die Eignung von Geweben zur Lebensaltersschätzung auf Basis der DNAm hängt somit zunächst von der Erhaltung der Qualität sowie Quantität der DNA in einem Gewebe ab. Ist ausreichend DNA vorhanden, wird die Genauigkeit der Altersdiagnosen dann von der Auswahl und Kombination der geeigneten DNAm-Marker bestimmt. Hier besteht sicherlich noch Forschungsbedarf zu der Frage nicht-altersassoziierter Einflüsse auf die DNAm an den Loci, die als „Marker“ zum Einsatz kommen (sollen).

Tabelle 2: Möglichkeiten der Altersschätzung durch molekulare Methoden (modifiziert nach Böhme et al. [83]). [SE= Standardfehler; PI= Prognoseintervall, MAE= Mittlerer absoluter Fehler, SEE= Standardfehler der Schätzung; MAD= Mittlere absolute Abweichung; RMSE= Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers; n.s. nicht spezifiziert, MVM= Multivariates Modell, R= Korrelationskoeffizient, Lit= Literatur]

Analysierte Parameter / Gewebe		Genauigkeit (Jahren)		R	Lit	Anwendung
Wenn Zähne vorhanden:						
D-Asp	Dentin	± 4	95% PI	0.93-0.99	[51, 88, 91, 95, 133]	Forensische Praxis: Fund von Leichen / Leichenteile / knöcherne Überreste
		2.19± 1.53	MAE± SD			
Pen	Dentin	± 9.4	95% PI	0.94	[94, 95]	
		7.57	SEE			
		6.03	MAE			
DNAm	Zahnmark (13 CpGs)	2.25	MAD	0.76-0.85	[120, 121, 134]	
	Dentin (7-9 CpGs)	4.86	MAD			
MVM	Relative Telomerlänge + DNAm (9 CpGs in Dentin)	5.04	MAE	0.77	[120]	
	D-Asp (Dentin) + Pen (Dentin) + DNAm (5CpGs in MSH)	2.68- 3.59	MAE	0.92-0.96	[95]	
Pen*	Dentin	3.92	MAE	0.94	[105]	Historische/ archäologische Überreste
* Pen scheint über sehr lange postmortale Intervalle stabil zu sein.						
Wenn keine Zähne vorhanden:						
D-Asp	Knochen (Osteocalcin)	± 6 2.8	95% PI SEE	0.99	[99]	Forensische Praxis: Fund von Leichen / Leichenteile / knöcherne Überreste
	Verschiedene Knochentypen (Kalotte, Rippe, Clavicula)	n.s.	---	0.84-0.85	[104]	
	Verschiedene Weichgewebe (z.B. Ligamente, Haut, Knorpel)	n.s	---	0.92-0.97	[63, 97, 98, 100, 135, 136]	
Pen	Verschiedene Weichgewebe (Bandscheibengewebe,Knorpel)	n.s.	---	0.92-0.93	[63, 64, 103]	
	Verschiedene Knochentypen (Kalotte, Rippe, Clavicula)	n.s.	---	0.90-0.95	[104, 137]	
DNAm	Knochen	2.56 3.4	MAD MAE	0.96 n.s.	[116]	
	Blut	5.36	MAD	0.89	[138]	
	MSH	n.s.	---	0.95	[114]	
	Fuß-/Fingernägel	5.48- 9.36	MAD	---	[124]	
	Rippenknorpel	4.26- 4.97	MAE	0.88	[122, 123]	
		5.39- 6.43	RMSE			

Fortsetzung Tabelle 2: Möglichkeiten der Altersschätzung durch molekulare Methoden (modifiziert nach Böhme et al. [83]).

Analysierte Parameter / Gewebe		Genauigkeit (Jahren)		R	Lit	Anwendung
Wenn keine Zähne vorhanden:						
	D-Asp + Pen in Bandscheiben und Epiglottis	4.0-6.3	MAE	0.94	[1]	Forensische Praxis: Fund von Leichen / Leichenteile / Skeletten
MVM	D-Asp + Pen + DNAm (6 CpGs); Schädelknochen					
	-Proben ohne Fäulnis	5.11-7.16	MAE	0.90-0.96	[3]	
		6.34-9.16	RMSE			
	-Proben mit Fäulnis	6.0-10.18	MAE	0.74-0.89		
		9.08-14.08	RMSE			
Weitere Bemerkungen: In Fällen mit fortgeschrittener Fäulnis: -D-Asp und Pen: Analyse des Dentins oder Verwendung von multivariaten Modellen werden empfohlen. -DNAm: bisher nur wenige Daten; offensichtlich anwendbar, solange eine ausreichende Menge an DNA verfügbar ist [114]. Bei verbrannten Überresten: D-Asp und Pen Werte können falsch hoch sein, wenn die analysierten Gewebe durch die Hitze beeinflusst wurden.						

1.5 Neue Ansätze zur postmortalen Lebensaltersschätzung: Kombination verschiedener molekularer Parameter in verschiedenen Gewebetypen eines Individuums zur Steigerung der Genauigkeit unter Nutzung von KI basierten Modellen

Das Potential der oben dargestellten Ansätze zur molekularen Altersschätzung ist grundsätzlich hoch. Allerdings liegen große Herausforderungen in der hohen Komplexität von Alterungsprozessen sowie der limitierten Nutzbarkeit von einzelnen morphologischen oder auch molekularen Parametern in Fällen, in denen z.B. nur Körperteile oder Knochenfragmente vorliegen oder starke postmortale Veränderungen vorliegen, sodass nur bestimmte Gewebetypen zur Altersschätzung vorhanden sind.

Nachdem bisherige Studien bei der Verknüpfung von Parametern in einem Gewebe unter Nutzung von *Machine Learning* Modellen eine höhere Genauigkeit der Lebensaltersschätzung gezeigt haben [95, 120], liegt als nächster Schritt die Kombination der verschiedenen Parameter in verschiedenen Geweben nahe.

1.5.1 Knochen und andere postmortal stabile Gewebe als Untersuchungsgut

Knochen ist ein häufig in der forensischen Praxis verwendetes Material, da es aufgrund seines hohen Anteils an anorganischer Substanz verhältnismäßig lange vor der postmortalen Degradation geschützt und somit lange vorhanden ist:

Knochengewebe ist in kalzifizierten Lamellen angeordnet, in die die Zellen (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten) der Knochenmatrix eingebettet sind. Die Knochenmatrix besteht aus etwa 35 % organischen und 65 % anorganischen Bestandteilen. Der organische Anteil besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I (ca. 90%) und 10 % nicht-kollagenen Proteinen, wie Osteonectin, Osteocalcin, Sialoprotein, Glykoproteinen, Proteoglykanen und weiteren [139]. Hydroxylapatitkristalle, Karbonat, sowie Mineralstoffe wie Kalium, Chlor, Eisen, Magnesium bilden den anorganischen Anteil der Matrix [139].

Im Knochen sind verschiedene Zelltypen für Erhaltung, Funktion und Reparatur notwendig. Osteoblasten bilden die organische Matrix, die als Grundlage für die Mineralisierung dient und spielen eine zentrale Rolle für Knochenwachstum und -reparatur. Osteozyten, die häufigsten Knochenzellen, entstehen aus Osteoblasten und befinden sich in Lakunen innerhalb der mineralisierten Matrix. Sie sind durch kleine Kanäle, den sogenannten Canaliculi, verbunden, überwachen den Knochenumbau und reagieren auf mechanische Belastungen [140]. Osteoklasten sind in Resorptionslakunen lokalisiert und bauen altes oder beschädigtes Knochengewebe ab [141].

Da D-Asp und Pen altersabhängig nur in langlebigen Proteinen akkumulieren, sind bradytrophe Gewebe für Lebensaltersschätzungen mittels der proteinbasierten Parameter optimal. Knochen ist zwar kein bradytrophes Gewebe, da es sehr umsatzstark ist. Die Konzentration langlebiger Proteine ist jedoch so hoch, dass auch bei der Analyse des Gesamtproteins – wie in Publikation [3] durchgeführt – eine Altersabhängigkeit festgestellt werden kann. Die Zellen sind in die mineralisierte extrazelluläre Matrix eingebettet, die als physische Barriere gegen äußere Einflüsse dient. Aufgrund dessen bleibt die DNA verhältnismäßig lange intakt und macht Knochen zu einem wichtigen Material für die Untersuchung der DNAm.

Auch andere, ebenso postmortal stabile Gewebe wie Achillessehne, Bandscheibengewebe und Epiglottisgewebe können unter günstigen Bedingungen mehrere Wochen bis Monate

nach dem Tod noch weitgehend intakt bleiben. Durch ihre dicht gepackten Kollagenfasern weisen sie eine hohe Resistenz gegen Autolyse und Fäulnis auf; ihr geringer Anteil an Zellen sowie die relativ geringe Durchblutung der Gewebe verlangsamt den Abbau durch körpereigene Enzyme und Fäulnis [142]. Durch ihre bradytrophischen Eigenschaften und ihren hohen Anteil an langlebigen Proteinen wie Kollagen, Elastin und Proteoglykane in verschiedenen Anteilen liefern sie eine gute Basis für Lebensaltersschätzungen unter Nutzung der proteinbasierten Parameter D-Asp und Pen. Zudem bieten ihre Knorpel- und/oder Faserstrukturen gute Bedingungen zum langen Erhalt intakter Zellen und damit von DNA auf.

Die Achillessehne besteht aus dichtem, faserigem Bindegewebe (überwiegend Kollagenfasern). Tenozyten, eine Unterart der Fibroblasten, sind länglich und spindelförmig und liegen zwischen den parallelen Kollagenfaserbündeln. Die Tenozyten sind in Längsrichtung der Sehne ausgerichtet und relativ gleichmäßig verteilt, allerdings in geringerer Dichte als in weichen Geweben. Ihre Hauptfunktion besteht darin, die Kollagenfasern zu produzieren und zu erhalten, die die Zugfestigkeit der Sehne gewährleisten [143]. Die Achillessehne besteht zu etwa 90-95 % aus Kollagen, was ihr eine hohe Festigkeit verleiht [144]. Die extrazelluläre Matrix der Achillessehne enthält etwa 1-5 % Proteoglykane (Anteil in Trockenmasse) [145].

Bandscheiben bestehen aus zwei Hauptkomponenten; dem äußeren Faserring (Annulus fibrosus) und dem inneren Gallertkern (Nucleus pulposus). Der Annulus fibrosus enthält etwa 60-70 % Kollagen, hauptsächlich Typ I, was ebenfalls zu einer robusten Struktur führt [146], jedoch insgesamt relativ wenige Zellen, hauptsächlich Fibroblasten und Fibrochondrozyten. Diese Zellen sind zwischen den Kollagenfasern verteilt und sorgen für die Stabilität und Festigkeit des Faserrings. Der Annulus fibrosus enthält einen Anteil von etwa 10-20 % Proteoglykanen [146]. Im Nucleus pulposus hingegen befinden sich chondrozyten-ähnliche Zellen, die in einer gallertartigen Matrix eingebettet sind. Die Zellverteilung ist hier etwas dichter als im Annulus fibrosus, wobei die Zellen in einer viskosen Substanz verteilt sind, die hauptsächlich aus Proteoglykanen besteht [147].

Die Epiglottis (Kehledeckel) ist eine schleimhautüberzogene elastische Struktur aus elastischem Knorpel und Bindegewebe mit einem Anteil von etwa 30-50 % an Kollagen Typ II [148]. Chondrozyten sind in einer dichten Matrix aus elastischen Fasern eingebettet. Die Zellen sind relativ gleichmäßig verteilt und befinden sich in kleinen Hohlräumen, den sogenannten Lakunen. Die Elastizität des Gewebes wird durch die elastischen Fasern und die Matrix gewährleistet, in der die Chondrozyten eingebettet sind [149]. Die Epiglottis enthält einen noch höheren Anteil an Proteoglykanen, die etwa 20-30 % der Trockenmasse ausmachen [150].

1.5.2 *Machine Learning* basierte Modelle zur postmortalen Lebensaltersschätzung

Machine Learning basierte Modelle als Ansatz zur multivariaten Analyse sind ein vielversprechender neuer Ansatz zur Altersschätzung, da erhobene (oder aus Datenbanken extrahierte) molekulare und morphologische Parameter verknüpft werden können sowie auch andere Faktoren wie Hinweise auf eine bestimmte Altersgruppe oder Krankheiten mit in den Algorithmus einbezogen werden können. Zudem kann der Beitrag und die Nützlichkeit eines jeden Parameters für das jeweilige Modell ermittelt werden und zuletzt die optimale Kombination entwickelt werden [95]. Durch die kombinierte Analyse der Parameter unter Einbeziehung anderer Faktoren werden unterschiedliche biologische Ebenen berücksichtigt und die Auswirkungen verschiedener Einflussfaktoren auf die Genauigkeit der Altersschätzung, insbesondere im Erwachsenenalter, können besser ausgeglichen werden [8, 83].

Machine Learning wird als Teilgebiet der künstlichen Intelligenz verstanden. Algorithmen, also logisch und sequenziell festgelegte Anweisungen, werden auf Basis großer Datenmengen „trainiert“ und „lernen“ selbstständig. Im Folgenden sind sie dann auf gleichartige unbekannte Datensätze anwendbar. Es existieren je nach Problemstellung verschiedene Herangehensweisen und Modelltypen mit jeweils eigenen Vor- und Nachteilen. Die Modelltypen gliedern sich in das *supervised* sowie *unsupervised* und *Reinforcement Learning* [151]. Beim *supervised Learning* wird das Modell auf Basis einer bekannten Zielgröße trainiert mit dem Ziel, eine Vorhersage zu treffen. Modelle des *unsupervised Learning* hingegen werden genutzt, um unbekannte komplexe Zusammenhänge der Daten mithilfe von Clustern zu erkennen und zu erforschen. Beim *Reinforcement Learning* werden keine Datensätze analysiert, sondern ein sogenannter Agent entwickelt, der auf Basis von Belohnungen selbst Strategien zur Lösung von Problemen erlernt (Beispiel: Schachcomputer AlphaGo [152]).

Zur Schätzung des Lebensalters können verschiedene *supervised learning* Modelle angewandt werden, wobei sich der *Workflow* in folgende Schritte gliedert (Zusammenfassung s. Abbildung 4):

Zu Beginn steht die Datenerhebung, wobei die Daten selbst erhoben werden können oder auf bestehende Datenbanken (z.B. GSE database [153]) zurückgegriffen werden kann.

Die Quantität sowie die Qualität der Daten bestimmen die spätere Genauigkeit des Modells. In der Regel verbessern mehr hochwertige Daten die Leistung und Generalisierungsfähigkeit eines Modells, d.h. wie gut ein Modell Muster und Zusammenhänge aus den Trainingsdaten auf neue, unbekannte Daten übertragen kann. Allerdings können große Datenmengen indirekt zu *Overfitting* (Verschlechterung des Modells) führen, wenn sie nicht richtig gehandhabt werden. Beispielsweise können längere Trainingszeiten das Risiko erhöhen, dass ein Modell zu stark auf die Trainingsdaten optimiert wird oder große Datensätze, die unentdeckte Verzerrungen enthalten, als fälschlicherweise relevant interpretiert werden. Demzufolge müssen die Daten aufbereitet werden, indem fehlende Werte (wenn möglich) ergänzt und Dopplungen entfernt werden, gefolgt von einer Normalisierung sowie Randomisierung der Daten [151].

Anschließend werden ein Trainings- sowie Testdatensatz erzeugt, wobei die Daten bestenfalls bereits separat gesammelt und behandelt wurden. Das Verhältnis sollte sich zwischen 70-80% Trainingsdaten und 20-30% Testdaten bewegen.

Bei Erstellung des Modells müssen zwei Aspekte unterschieden werden: 1) die Auswahl der optimalen Modellarchitektur, die wegweisend für das Erlernen des Zusammenhangs zwischen gemessenen Parametern und dem Lebensalter einer Person des Modells ist und 2) das Trainieren des Modells.

Zur Auswahl der optimalen Modellarchitektur werden initial Algorithmen aufgesetzt, die auswählen, welche Bestandteile des Daten-Vektors X z.B. die höchste Korrelation mit der

Zielgröße Y haben, um die Grundgesamtheit abzubilden. Zu diesem Zweck gibt es eine Palette an Möglichkeiten wie Wrapper, Kolmogorov-Test, *Principle Compound analysis*, Genetischer Algorithmus, wobei die optimalen Auswahlmechanismen durch *Trial and Error* ermittelt werden. Darauf basierend werden folgend verschiedene mögliche Modelltypen aufgesetzt und getestet [151], wie z.B.

- Klassifikatoren wie *Support Vector Machines*, *k-nearest neighbours*, künstliche neuronale Netzwerke, *Random Forest* etc.
- Regressionsmodelle wie lineare/nichtlineare Regression, LASSO, *Ridge Regression* etc.

Um das Potenzial der zahlreichen möglichen Modelle für die Vorhersage des Alters zu untersuchen, wird eine *k-fold* Kreuzvalidierung durchgeführt. Die vorhandenen Trainingsdaten werden in gleich große Gruppen (typischerweise in $k = 5$ bis 10 Gruppen mit gleicher Gruppengröße) unterteilt. Nacheinander wird eine dieser 10 Gruppen als Validierungsset zurückgehalten und das entsprechende Modell an den restlichen 90% der Daten trainiert. Das zurückgehaltene Validierungsset wird dann genutzt um das (bekannte, vom Modell jedoch nicht gesehene) Alter der im Validierungsset zurückgehaltenen Fälle zu schätzen. Nachdem jede der unterteilten Gruppen einmal als Validierungsset gezogen wurde erhält man ein geschätztes Alter für jeden Probanden basierend auf unabhängigen Trainingsdaten. Um Einflüsse der ursprünglichen Einteilung in 10 Gruppen auf das Ergebnis zu vermeiden, wird dieser Prozess 100 Mal mit zufälligen Unterteilungen wiederholt und die Ergebnisse gemittelt [151]. Durch Berechnen des mittleren absoluten Fehlers oder der Korrelation zwischen wahrem (chronologischem) und geschätztem Alter kann so die *Performance*fähigkeit des jeweiligen Algorithmus ermittelt werden.

Nach Evaluation des besten Modelles wird eine Sättigungsanalyse durchgeführt um zu überprüfen, ob die im Trainingsdatensatz enthaltenen Daten bereits zu einem stabilen trainierten Modell führen [154]. Dazu wird eine weitere Kreuzvalidierung des finalen Modelles im Trainingsdatensatz durchgeführt. Schrittweise werden wieder beispielsweise 5 zufällig gezogene Fälle aus dem Datensatz entfernt und der Prozess wiederholt. Die dabei erhaltenen Maße der Vorhersagegenauigkeit werden gespeichert, und der gesamte Vorgang 1000 Mal mit unterschiedlichen zufälligen Ziehungen bei jeder Reduktion um 5 Fälle wiederholt. Letztendlich erhält man eine Kurve, die die Genauigkeit der Vorhersage in Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen Fälle widerspiegelt. Sollte diese sich gegen Ende deutlich abflachen und asymptotisch einer maximal möglichen Genauigkeit annähern, kann davon ausgegangen werden, dass eine weitere Vergrößerung des Trainingsdatensatzes keinen Vorteil mehr bringen würde. Abschließend wird das Modell durch die separat behandelten Testdaten zum ersten Mal mit unbekannten Daten getestet. Da das Modell bisher nicht mit den Testdaten in Berührung kam gibt dieser Schritt einen guten Eindruck über die realistische Performance des Modells in der Praxis [151].

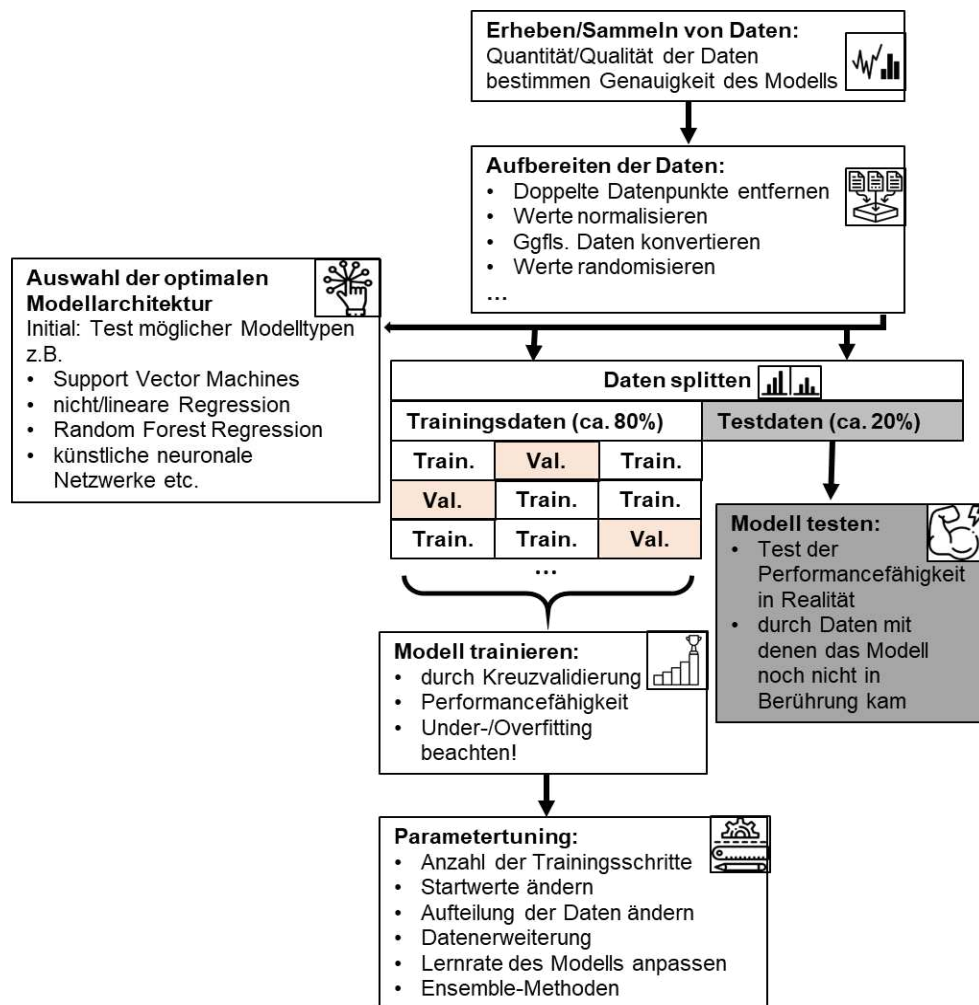


Abbildung 4: Grundlegender Workflow zur Erstellung eines Machine Learning Modells. Im ersten Schritt werden Daten erhoben oder gesammelt. Im Folgenden aufgearbeitet. Anschließend wird basierend auf den vorliegenden Daten und der Anwendung eine Auswahl an möglichen Modellarchitekturen getroffen und getestet. Unabhängig vom gewählten Ansatz wird der erstellte Datensatz in einen Trainingsdatensatz und einen Testdatensatz aufgetrennt, wobei die Testdaten zunächst unangetastet bleiben. Das Trainieren des Modells geschieht per Kreuzvalidierung basierend auf den Trainingsdaten, wobei die Performancefähigkeit des Modells anhand der Validierungsgruppen ermittelt wird. Folgend kann durch Parametertuning die Feineinstellung des Modells erfolgen. Das so erstellte Modell wird zuletzt durch die unabhängigen Testdaten getestet. Dieser Workflow ist für alle Modelle in etwa gleich, jedoch nie geradlinig. Teilweise muss ein oder mehrere Schritte zurückgegangen werden, um ein optimales Modell zu erstellen. Dieser Prozess ist für jedes Modell und jede Anwendung individuell.

2 Zielsetzung

Die der Dissertation³ zugrundeliegenden Arbeiten sollen das Methodenrepertoire zur postmortalen Lebensaltersschätzung erweitern. Die zugrundeliegende Hypothese lautet, dass sowohl antemortalen Einflüssen (u.a. Erkrankungen, hohe Komplexität von Alterungsprozessen) als auch postmortal bedingte Faktoren (limitierte Nutzbarkeit von einzelnen Parametern durch postmortale Veränderungen oder Gewebeverfügbarkeiten) mit einem System aus multivariaten Modellen auf Basis verschiedener Parameter, die in unterschiedlichen postmortal langen stabilen Geweben desselben Individuums erhoben werden, begegnet werden kann.

Die aus der genannten Hypothese abgeleitete Vision ist die Etablierung eines „Werkzeugkastens“ aus optimierten multivariaten Modellen, die je nach Verfügbarkeit von Geweben zur Altersschätzung eingesetzt werden können.

Alle drei zuvor beschriebenen molekularen Parameter (D-Asp, Pen, DNAm) wurden in verschiedenen, postmortal widerstandsfähigen, aber unterschiedlich komplexen Geweben (s. Abschnitt 1.5.1) derselben Individuen analysiert. Auf Basis der erhobenen Daten wurden sowohl gewebespezifische als auch gewebeübergreifende *Machine Learning*-Modelle erstellt und die Auswirkung auf die Genauigkeit der Lebensaltersschätzung geprüft. Zudem wurde das Potential der Verknüpfung der Parameter (D-Asp, Pen, DNAm) zur postmortalen Altersschätzung bei fortgeschritten postmortalen Veränderungen untersucht.

Zukünftig soll das entwickelte System die intelligente Nutzung und Verknüpfung aller drei Ansätze (D-Asp, Pen, DNAm) erlauben, aus dem – je nach postmortalem Zustand des Leichnams und verfügbarem Gewebe – der jeweils optimale Ansatz gewählt werden kann.

Die durchgeführten Studien dienten der Prüfung der Plausibilität der oben dargestellten Hypothese sowie der Vorbereitung der finalen Erarbeitung eines methodischen „Werkzeugkastens“ zur postmortalen Lebensaltersschätzung.

Die **Publikation 1** zugrundeliegende Arbeit untersuchte die Kombination von zwei molekularen Parametern (D-Asp und Pen) in zwei Geweben (Epiglottis und Bandscheiben). Die Ergebnisse bestätigen die Annahme der gesteigerten Genauigkeit von Lebensaltersschätzungen durch Kombination der Parameter in zwei verschiedenen Geweben in einem *Machine Learning* Modell.

Publikation 2 stellt die die Ergebnisse einer Arbeit dar, die den Ansatz durch die Einführung eines dritten molekularen Parameters (DNAm) erweiterte und die parallele Analyse der drei Parameter D-Asp, Pen und DNAm in vier verschiedenen Geweben (Epiglottis, Bandscheiben, Achillessehnen, Schädelknochen) untersuchte. Die Pilotstudie belegt, dass die Parameter in verschiedenen komplexen Geweben analysiert und potenziell zur Entwicklung eines umfassenden Systems an multivariaten Modellen genutzt werden können, um den vielfältigen Situationen der forensischen Praxis gerecht zu werden.

Publikation 3 präsentiert die Daten einer erstmaligen Anwendung aller drei molekularer Parameter (D-Asp, Pen, DNAm) an Knochenproben. Es ist die erste Studie, die ein multivariates *Machine Learning* Modell unter Berücksichtigung postmortaler Einflüsse entwickelt und stellt einen wichtigen Schritt zur praktischen Anwendbarkeit und Anpassungsfähigkeit multivariater Modelle in der forensischen Praxis dar.

³Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen eines DFG-Kooperationsprojekts (NA 1578/2-1 | RI 704/8-1) erhoben.

3 Publikationen

3.1 Publikation 1

J. Becker* & N. S. Mahlke*, A. Reckert, S. B. Eickhoff, S. Ritz-Timme (2020)

Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study

International Journal of Legal Medicine (2020) 134:721-733. [https://doi.org/ 10.1007/s00414-019-02054-9](https://doi.org/10.1007/s00414-019-02054-9)

**J. Becker and N.S. Mahlke contributed equally to this work and share first authorship.*

Beitrag der Autoren: Idee und erste Konzeption stammen von S. Ritz-Timme, die die Arbeit auch supervidierte. **J. Becker** und N.S. Mahlke haben gleichermaßen zur Konzeption der Versuche, der Erhebung, der Analyse und der Interpretation der Daten (**J. Becker** zum Datensatz Bandscheiben; N.S. Malke zum Datensatz Epiglottis) sowie der Erstellung des Manuskripts beigetragen. A. Reckert hat die Laborarbeit betreut. S.B. Eickhoff war für die bioinformatische Erstellung der Modelle zuständig. **Alle Autoren** haben gleichermaßen zur Überarbeitung des Artikels und kritischen Überprüfung von wichtigen intellektuellen Inhalten beigetragen und haben die endgültige Version vor der Einreichung genehmigt.



Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study

Julia Becker¹ · Nina Sophia Mahlke¹ · A. Reckert¹ · S. B. Eickhoff^{2,3} · S. Ritz-Timme¹

Received: 28 January 2019 / Accepted: 25 March 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Several molecular modifications accumulate in the human organism with increasing age. Some of these “molecular clocks” in DNA and in proteins open up promising approaches for the development of methods for forensic age estimation. A natural limitation of these methods arises from the fact that the chronological age is determined only indirectly by analyzing defined molecular changes that occur during aging. These changes are not linked exclusively to the expired life span but may be influenced significantly by intrinsic and extrinsic factors in the complex process of individual aging. We tested the hypothesis that a combined use of different molecular clocks in different tissues results in more precise age estimates because this approach addresses the complex aging processes in a more comprehensive way. Two molecular clocks (accumulation of D-aspartic acid (D-Asp), accumulation of pentosidine (PEN)) in two different tissues (annulus fibrosus of intervertebral discs and elastic cartilage of the epiglottis) were analyzed in 95 cases, and uni- and multivariate models for age estimation were generated. The more parameters were included in the models for age estimation, the smaller the mean absolute errors (MAE) became. While the MAEs were 7.5–11.0 years in univariate models, a multivariate model based on the two protein clocks in the two tissues resulted in a MAE of 4.0 years. These results support our hypothesis. The tested approach of a combined analysis of different molecular clocks analyzed in different tissues opens up new possibilities in postmortem age estimation. In a next step, we will add the epigenetic clock (DNA methylation) to our protein clocks (PEN, D-Asp) and expand our set of tissues.

Keywords Age estimation · Pentosidine · D-Aspartic acid · Machine learning · Age prediction model · Molecular clocks

Introduction

In times of migration and flight, age estimation is becoming an increasingly important issue in Forensic Medicine. This applies not only for age estimation in living young migrants without valid documents but also for age estimation in the context of the identification of unknown deceased.

Postmortem age estimation may be a methodological challenge due to putrefaction and decomposition of a body; in such cases, the applicability of a method may depend on the extent of postmortem changes and the availability of tissues.

Generally, methods of age estimation need to be accurate enough to fulfill the demands in forensic practice [1]. Therefore, the core objective in the development of new methods or the optimization of already established methods for age estimation must be to achieve the highest possible accuracy.

In the last decade, molecular methods of age estimation have attracted much attention. So-called molecular clocks like the racemization of aspartic acid or the accumulation of pentosidine in proteins (see [2–5]) and, most recently, the methylation of DNA (see [2–4, 6–12]) have been identified and their usability for age estimation has been explored.

DNA methylation (mDNA) is used as basis for epigenetic age estimation. Age-dependent methylation markers have been identified in samples from different tissues and body fluids, and various models for mDNA-based age estimation

Julia Becker and Nina Mahlke contributed equally to this work and share first authorship.

✉ Nina Sophia Mahlke
nina.mahlke@hhu.de

¹ Institute of Legal Medicine, University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

² Institute for Systems Neuroscience, University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

³ Institute of Neuroscience and Medicine, Brain & Behaviour (INM-7), Research Centre Jülich, 52428 Jülich, Germany

have already been proposed ([13], for review see [6, 8, 10–12, 14]). However, it is well known that epigenetic changes in DNA are influenced by intrinsic factors (e.g., genetic factors, ancestry, diseases) and extrinsic factors (e.g., environmental conditions, lifestyle) [15, 16]. The implications of such influences on the ultimately achievable accuracy of mDNA-based approaches for age estimation are not finally clear and are subject of current research [10, 11, 16–18].

The accumulation of D-aspartic acid (D-Asp) is the result of a non-enzymatic conversion of L-asparagine residues and L-aspartic acid residues into their D-forms (for details see [3, 19, 20]). It has been described in multiple proteins and tissues (for review see [2], data regarding further proteins/tissues in [21–23]). Age estimation based on the D-Asp content in dental protein is one of the most accurate methods for age estimation in adults. The application of this approach in forensic scenarios has been proposed decades ago (e.g., [24–26]). In the meantime, it has been increasingly established in forensic practice (e.g., [27–30]). This protein clock is very robust as long as the integrity of the corresponding tissue is guaranteed [25]. So far, there is no indication of genetic influences on this clock, and ancestry seems to have no impact [31]. Open research questions concern in particular the applicability of the method to more complex tissues than dentine.

Pentosidine (PEN) is an advanced glycation end product. This group of posttranslational protein modifications is the result of glycation of proteins which is a non-enzymatic reaction of free amino groups (mainly of arginine and lysine) of proteins with glucose or with other reducing carbohydrates [32–35]. It has already been shown that PEN accumulates in permanent and long-living proteins during lifetime in several tissues [36–43]. Theoretically, elevated blood sugar levels in patients with diabetes mellitus may result in an increased formation of PEN [32, 35, 44, 45], which may limit the applicability of this approach to forensic age estimation. However, up to now, there are only a few systematic studies regarding this protein clock.

Even promising molecular methods such as methods based on mDNA still have a considerable error range, which currently limits their practical use [7]. In light of the complexity of the biological aging process, this is not surprising.

The best models for age prediction based on mDNA described so far use combinations of up to hundreds of markers and are associated with mean absolute errors (MAE) of 3–5 years at best (for review see [6–8, 10, 11]). It has to be taken into account, however, that the deviation between estimated and real age may be considerably higher (theoretically a multiple of the MAE) in single cases [7]. Methods based on the accumulation of PEN have an even larger error range [36, 41]. Age estimation based on the accumulation of D-Asp shows quite accurate results when applied to dentine [5, 24–27, 29]. In contrast, the application of this approach to other, more complex tissues reveal considerably less accurate results; this

is especially evident, if tissue samples are analyzed without a preceding protein purification [21–23, 46–52].

If age estimation has to be performed postmortem, it is—dependent on the state of decomposition of a body—possible to analyze several molecular clocks in several tissues. Different molecular clocks in different tissues underlie different influences since they are part of different biological subsystems. A combination of different and at best independent molecular clocks for age estimation may better record complex aging processes and balance the effects of different influence factors on the accuracy of age estimation.

We tested this hypothesis for the indication “postmortem age estimation”:

- by analyzing two molecular clocks in proteins (accumulation of D-Asp, accumulation of PEN) in two different tissues (annulus fibrosus of intervertebral discs (IVD) and elastic cartilage of epiglottis (EPI)) from 95 individuals and
- by generating uni- and multivariate models for age estimation based on the collected data.

The two tissues (IVD and EPI) were chosen since they are relatively robust against putrefaction and can be prepared easily.

Material and methods

Samples of IVD and EPI were drawn from 95 individuals (47 females, 48 males, age range 0.06–98 years) during autopsy. All available documents (especially autopsy protocols and circumstances of each case) were checked for relevant information regarding the case history; particular attention was paid to evidence of diabetes mellitus. The postmortem intervals of these 95 cases were between 1 and 12 days.

In addition, some cases with special postmortem conditions were examined: nine cases with advanced putrefaction (postmortem intervals a few days to about 3 weeks; in one of these cases EPI was not available anymore), three burned bodies (one incompletely, and two totally charred), and three exhumed bodies (postmortem intervals 54, 59, and 68 days, respectively, with advanced putrefaction).

The following parameters were determined in the IVD and EPI samples:

- IVD: D-Asp in an enzymatically purified collagen fraction
- IVD: PEN in an enzymatically purified collagen fraction
- EPI: D-Asp in total tissue
- EPI: PEN in an enzymatically purified collagen/elastin fraction

The relationship between each of the four parameters and age was tested, and uni- and multivariate models for age estimation based on these parameters were developed.

Preparation of the IVD samples

The intervertebral disc L2/3 was removed as intact as possible, washed with water and stored at -80°C until further preparation.

Degenerative changes of the discs were documented and classified into the two groups “no or slightly” and “highly” according to the morphology of the anterior annulus fibrosus. Highly degenerative discs exhibited findings that indicate severe alterations (e.g., radial fissures or scar tissue) with a destruction of the typical morphological structure. Forty-one samples (from individuals with ages between 46 and 98 years) exhibited such highly degenerative changes.

For further preparation, the IVD samples were thawed. Approximately 0.5–0.8 cm of the outer layers of the anterior annulus fibrosus were cut off to remove adjacent tissue, and small samples (1×1 cm) were prepared. These samples were coarsely crushed, dipped in liquid nitrogen, crushed again, and pulverized. The pulverized material was stored at -20°C until further processing (purification of collagen).

Preparation of the EPI samples

The upper two thirds of the epiglottis were taken during autopsy and stored at -80°C until further preparation.

For further preparation, the samples were thawed. After removal of the mucosa and surrounding tissue, the cartilage was cut into small pieces. A small piece (about 2 mm in diameter) was put into a sample tube for analysis of D-Asp and stored at -20°C until analysis. Another piece of tissue (about 8 mm in diameter) was wrapped in aluminum foil, frozen in liquid nitrogen and crushed. The pulverized material was stored at -20°C until further processing (purification of collagen/elastin).

Enzymatic purification of collagen (IVD) and collagen/elastin (EPI)

IVD and EPI samples were enzymatically treated according to the protocol of Sivan et al. [53], based on the method of Schmidt et al. [54]. In short, a proteolytic enzymatic treatment is applied to remove all non-collagen proteins such as proteoglycans with Chondroitinase ABC (0.125 U/ml in 0.05 M Tris-Base/0.06 M sodium acetate buffer (pH 8); for 24 h at 37°C), Streptomyces hyaluronidase (1 U/ml in 0.05 M Tris-Base/0.15 M NaCl buffer (pH 6); for 24 h at 37°C), and trypsin (1 mg/ml in 0.05 M Na_2HPO_4 /0.15 M NaCl buffer (pH 7.2); for 16 h at 37°C). Purified samples were dried by freeze drying and kept at -80°C until further use.

The quality of the purification was evaluated by amino acid analysis performed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method of Dobberstein et al. [21]. An aliquot of each purified sample was transferred in a Pyrex tube and hydrolyzed in 1 ml of a 6-N HCl for 24 h at 110°C . Liquid in excess was removed overnight under vacuum.

The dried hydrolysates were then dissolved in 400 μl 0.01 N HCl. Human collagen type I (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and bovine elastin (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Germany) served as external standards for the adjustment of the amino acid distribution.

Analyses were performed by HPLC (HPLC 1100 Series, Agilent, CA). OPA (o-phthalaldehyde) reagent was used for precolumn derivatization of the primary amino acids; secondary amino acids were derivatized using FMOc (9-fluorenylmethylchloroformate). Separation was accomplished with a C18 column (Hypersil BDS, C18 250×3 mm, particle size 5 μm ; Thermo Electron GmbH, Dreieich, Germany), and a mobile phase consisted of eluents A (40 mM NaH_2PO_4 , 1.5 mM sodium azide) and B (45% methanol, 45% acetonitrile, 10% H_2O) according to Heems et al. [55]. After an initial equilibration step of about 5 min, the amino acid derivatives were detected over a period of 50 min using a binary gradient. The flow rate was constant at 1.2 ml/min and the column temperature at 40°C . The OPA derivatives were measured at an excitation wavelength of $\lambda = 335$ nm and a detection wavelength of $\lambda = 440$ nm. Analysis of the FMOc derivatives was performed after a switching point at 30 min, an excitation wavelength of $\lambda = 260$ nm, and a detection wavelength of $\lambda = 305$ nm were used. Signal identification and quantification were carried out by a calibrated external standard.

D-Asp analysis

The extent of aspartic acid racemization was determined by HPLC according to the method of Kaufman and Manley [56], modified by Dobberstein et al. [21]. An aliquot of each sample (IVD or EPI) was hydrolyzed in 1 ml 6 N hydrochloric acid for 6 h at 100°C in Pyrex tubes. The excess liquid was removed overnight under vacuum. Samples were dissolved in 1 ml sample buffer (0.01 M HCl with 1.5 mM sodium azide and 0.03 mM L-homo-arginine). For HPLC analysis, a C18 column from Thermo Scientific (Hypersil BDS C18, 250×3 mm, particle size 5 μm) served as the stationary phase. The mobile phase consisted of the eluents A (23 mM sodium acetate, 1.5 mM sodium azide, 1 mM EDTA) and B (92.3% methanol, 7.7% acetonitrile). The amino acid enantiomers were detected by a binary gradient over a period of 115 min at a constant flow rate of 0.56 ml/min. Amino acids were detected at an excitation wavelength of $\lambda = 230$ nm and a detection wavelength of $\lambda = 445$ nm. L- and D-Aspartic acid residues were identified using the retention times of the amino

acids in a standard solution. The accumulation of D-Asp was described by the term $\ln((1 + D/L)/(1 - D/L))$ (see [20]).

PEN analysis

PEN concentrations were determined by HPLC as described by Greis et al. [36]. Aliquots of IVD or EPI samples (3.8–10.7 mg and 0.7–10.8 mg, respectively) were hydrolyzed in 1 ml 6 N HCl for 18 h at 110 °C. The samples were dried overnight in a desiccator, then dissolved in 1 ml 0.01 M heptafluorobutyric acid (HFBA, Thermo Scientific, Rockford, IL, in HPLC-water, HiPerSolv Chromanorm, VWR International), filtrated (syringe filters, pore diameter: 0.45 µm, diameter: 25 mm, VWR International), and dried again overnight in a desiccator. For HPLC analysis, the dried residues were dissolved in 200 µl pyridoxine-HFBA (pyridoxine 2.068815 µmol/ml in 0.01 M HFBA) for IVD and 250 µl for EPI, respectively. Calibration curve was established with standard PEN samples (pentosidine 0.03303 nmol/ml in 0.01 M HFBA, Cayman Chemical). Fifty microliters of each sample were injected into the HPLC system (HPLC 1100 Series, Agilent, CA). A semipreparative column (Onyx™ Monolithic Semi-PREP C18, LC Column 100 × 10 mm, Phenomenex, CA) was used as stationary phase. Mobile phase consists of 0.1% HFBA (eluent A) and acetonitrile (eluent B, LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt); a linear gradient program of 10–85% acetonitrile from 0 to 32 min with 0.1% HFBA was used. The flow rate was 1 ml/min, and the column temperature was set to 25 °C. Detection was done at wavelength 335/385 nm. Data were analyzed using “HPChemStation.” PEN was identified by its retention time; its quantification was carried out by determination of the peak area and use of a calibration curve.

Statistics

Classic descriptive statistics

The relationship between chronological age and the accumulation of D-Asp and PEN was tested by rank correlation, and the corresponding correlation coefficients (Spearman) were determined.

Development of multivariate age predicting models by a machine learning approach

Multivariate prediction of individual age was performed using an ensemble of Gaussian process regression (GPR) predictors. The key idea behind an ensemble predictor is to repeatedly fit a model for mapping between the input data (features) and the target variable (chronological age) based on only subsets of the training observations, i.e., subjects [57]. That is, we repeatedly draw subsamples of subjects from the training set and

then fit the GPR model on this lower number of subjects. This procedure yields a “weak learner” (as it is not based on the entire training sample) that is applied the test-data in order to yield one age prediction. These are then combined into a final prediction allowing to obtain better performance than obtainable from any of the constituent predictors by itself. In practice, we repeatedly sampled (with replacement) 95% of the training cases but retained only one instance of each individual case, which brings the additional advantage of variance in the size of the training set (cf. the number of unique observations contributing to a bootstrap).

For each run, we trained a GPR model [58] to identify the best transformation (for this particular subsample of the subjects in the training set) between the input features and the target, i.e., to predict age based on the respective molecular markers as well as information on the available clinical data. As noted above, training was repeatedly performed on a subset of the training cases, yielding “weak learners” that were later combined to achieve the final prediction. For training each of the weak learners, we used the GPR algorithm implemented in the MATLAB “statistics and machine learning toolbox” (*fitrgp* function) using a squared exponential kernel with a separate length scale per predictor. Gender and degeneration level entered the model as categorical predictors; the remaining continuous features were standardized, i.e., centered and scaled by column mean and standard deviation, respectively. For both fit and prediction, the “exact” Gaussian process regression method was used. Each of these models based on a subset of the training subjects was then applied to predict the age of a held-out, “new” subject, i.e., a case that was not part of the training set. This prediction is recorded, and the procedure repeated 5000 times with new, independent sampling from the training data, each yielding a new prediction of the test case. These individual predictions are then averaged, a process termed “bagging”, to yield the final prediction for the test case. Cycling over all possible test cases then yields an out-of-sample prediction of the age for each subject in the current sample. That is, when predicting the age of an individual subject, we do not use any information about that particular person when training the model.

As a measure of prediction accuracy, we computed the mean absolute deviation (MAE). Importantly, MAE was calculated for “out-of-bag” predictions, i.e., assessing the age predicted for each individual subject when it was not part of the training set. More precisely, as noted above, we averaged the predictions of individual age based on the different weak learners fitted on subsamples of the training data (bagging). This yielded an age prediction for each case based on an ensemble that had no information on this particular subject, as it has not been part on the training set. We then computed the mean (averaged across subjects) absolute differences between the predicted (based on models trained on different cases) and the true chronological age for each subject.

Here, our primary interest is related to the prediction of individual age based on all data available for this particular subject, i.e., using both molecular clocks from both tissues and the information about sex and IVD degeneration. However, given the scenario of only having either epiglottis or IVD tissue available, we also fitted reduced models based on only one tissue and the information about sex and IVD degeneration.

We developed multivariate models for the following scenarios:

Model1 (only IVD available):

PEN/IVD and D-Asp/IVD and sex and disc degeneration

Model 2 (only EPI available):

PEN/EPI and D-Asp/EPI and sex and disc degeneration

Model 3 (IVD and EPI available):

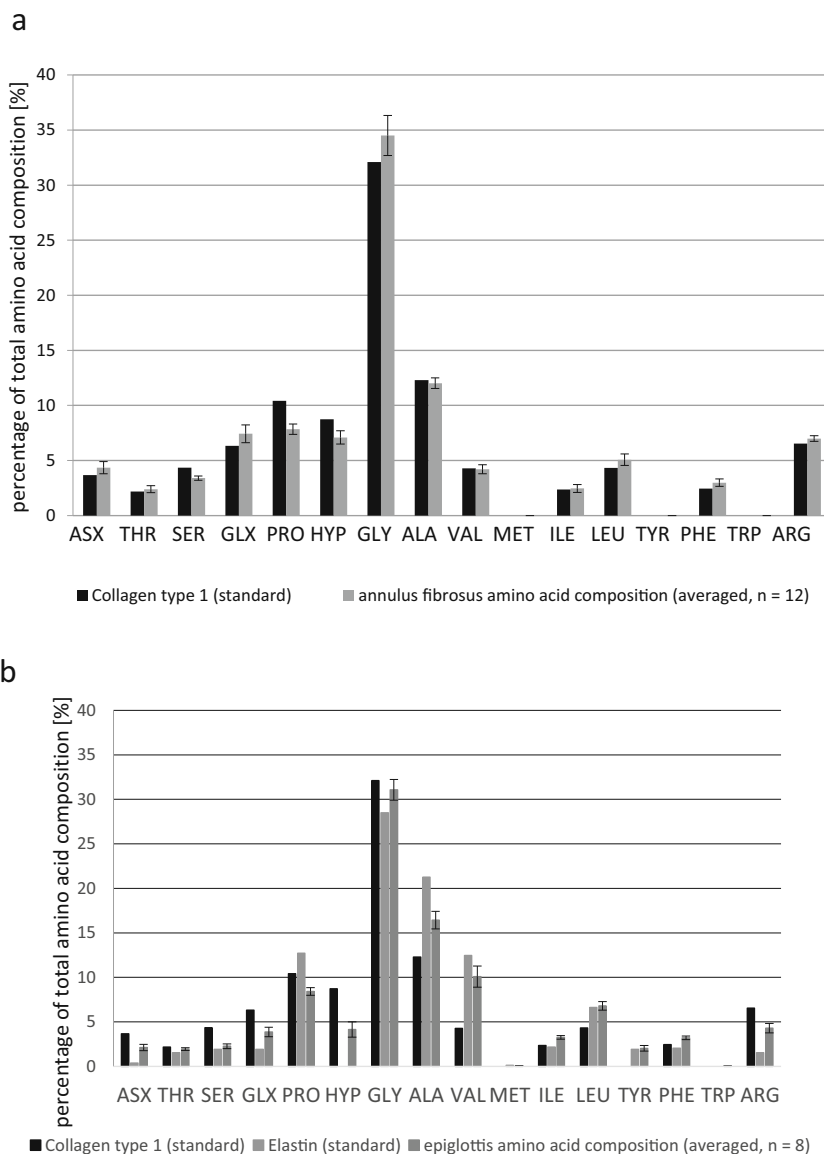
PEN/IVD and D-Asp/IVD and PEN/EPI and D-Asp/EPI and sex and disc degeneration

Results

Sample characteristics

The enzymatic purification of the samples according to Sivan et al. [53] destroyed most proteins but collagen and elastin. As a consequence, after the purification step, the IVD samples consisted mainly of collagen and the EPI samples mainly of

Fig. 1 Amino acid composition of the purified samples of intervertebral disc (IVD) (a) and the epiglottis (EPI) samples (b), as compared to the amino acid composition of standard samples (human collagen type 1, bovine elastin). ASX asparagine and aspartic acid, THR threonine, SER serine, GLX glutamine and glutamic acid, PRO proline, HYP hydroxyproline, GLY glycine, ALA alanine, VAL valine, MET methionine, ILE isoleucine, LEU leucine, TYR tyrosine, PHE phenylalanine, TRP tryptophan, ARG arginine



elastin (and collagen), as demonstrated by the results of amino acid analysis (Fig. 1a, b).

PEN and D-Asp in IVD

Both PEN and D-Asp accumulate with increasing age in the IVD samples ($r = 0.84$ and $r = 0.73$, respectively; Fig. 2a, b). However, scattering of the values for both parameters increases substantially with age.

By marking of the samples with highly degenerative changes ($n = 41$) in Fig. 2a, b, it becomes obvious that these samples contribute substantially to the increased scattering of data in higher ages. On the other hand, the relationship between PEN and D-Asp and age seems to remain close even in old age as long as the integrity of the tissue is preserved (no degeneration); due to the low number of these cases (no degeneration in old ages), a further statistical analysis was not performed.

As far as assessable, a diabetic metabolic disorder had been diagnosed in nine cases (there was no information regarding

the quality of therapy); these cases are indicated in Fig. 3. Only one of these cases exhibited strikingly high PEN values. At the same time, however, there were highly degenerative changes in the tissue of this case.

PEN and D-Asp seem to be robust regarding postmortem influencing factors. In Fig. 4, the results for cases of advanced postmortem putrefaction ($n = 9$), burned bodies ($n = 3$), and exhumation ($n = 3$) are presented; the corresponding values do not deviate noticeably from the other values.

PEN and D-Asp in EPI

The results for the EPI samples were very similar to those for the IVD samples: PEN and D-Asp do also accumulate in EPI with increasing age ($r = 0.86$ and $r = 0.81$, respectively; Fig. 5a, b), and scattering of PEN and D-Asp-values increased with age.

Again, there was no clear indication for higher PEN values in diabetic cases ($n = 9$; Fig. 6), and PEN and D-Asp seem to be robust regarding postmortem influencing factors (Fig. 7a, b).

Multivariate models enable more precise age estimates

Table 1 presents the MAEs of age estimation based on univariate predictions (based on either IVD/PEN, either IVD/D-Asp, either EPI/PEN or EPI/D-Asp) and on multivariate predictions, including either two parameters of one tissue (model 1 (IVD) and model 2 (EPI)) or four parameters of both tissues (model 3). Age estimation based on the univariate models resulted in MAEs between 7.5 and 11.0 years, age estimation using the multivariate models resulted in MAEs of 6.3 years

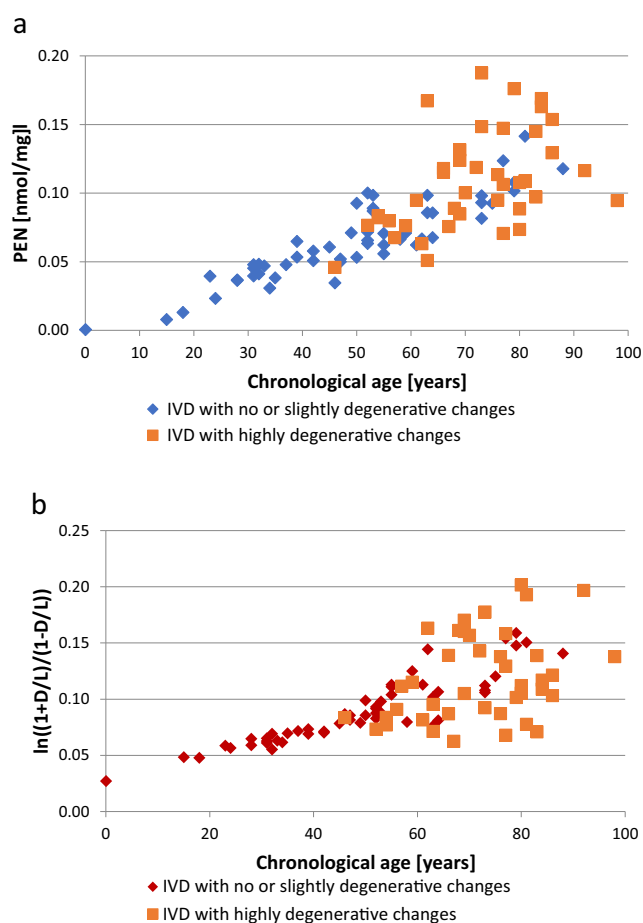


Fig. 2 Intervertebral disc (IVD) samples ($n = 95$): Accumulation of pentosidine (PEN) (a) and D-aspartic acid (D-Asp, as $\ln((1 + D/L)/(1 - D/L))$) (b) in relation to age (PEN $r = 0.84$; D-Asp $r = 0.73$); samples with highly degenerative changes are marked ($n = 41$). D D-aspartic acid, L L-aspartic acid

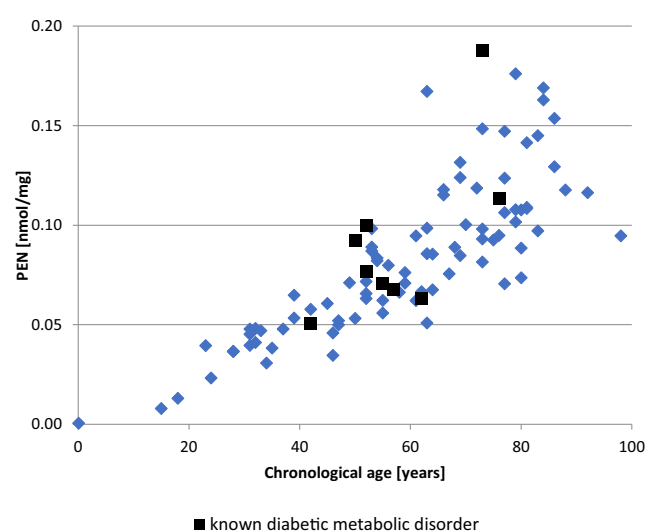
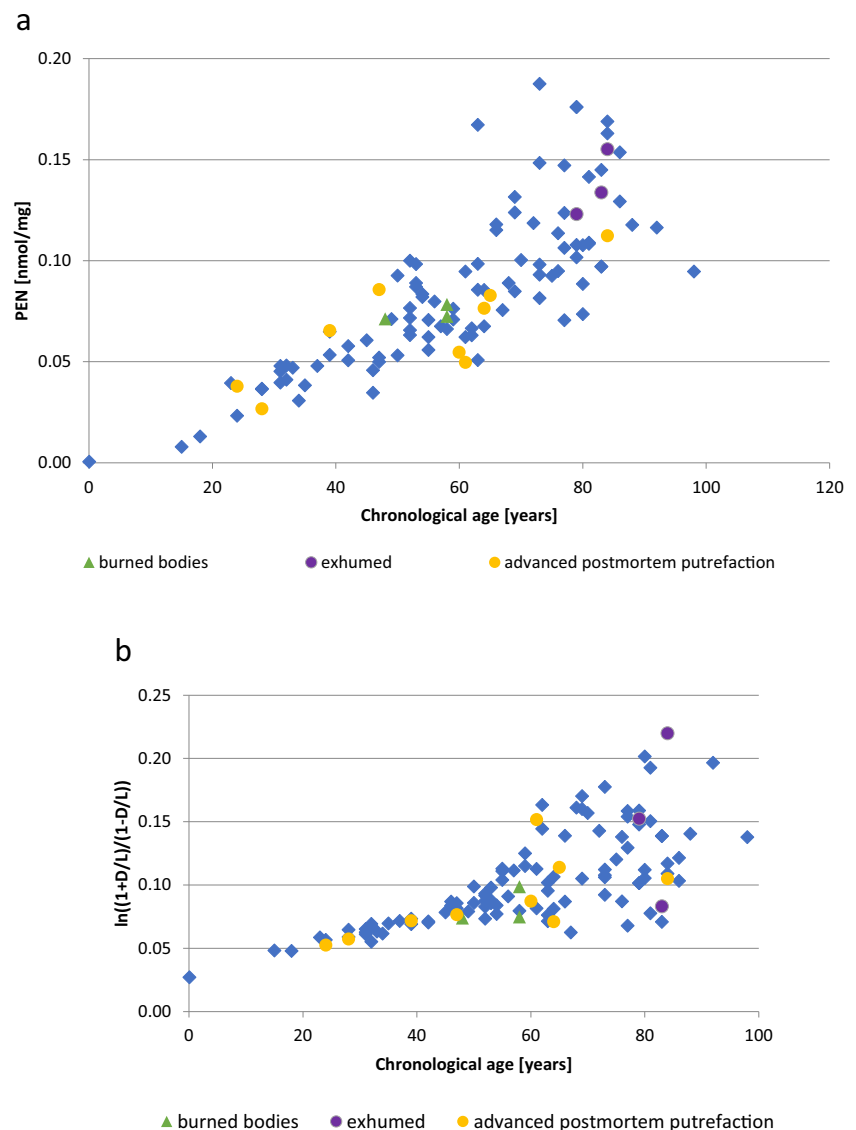


Fig. 3 Intervertebral disc (IVD) samples: Same pentosidine (PEN) data as in Fig. 2a ($n = 95$, $r = 0.84$), here with indication of samples from individuals with diabetic metabolic disorder ($n = 9$)

Fig. 4 Intervertebral disc (IVD) samples: Same data as in Fig. 2a, b (**a** data for PEN, **b** data for D-Asp (as $\ln((1 + D/L)/(1 - D/L))$); data for samples from cases with advanced postmortem putrefaction ($n = 9$) of burned bodies ($n = 3$) and of cases with exhumation ($n = 3$) are added and indicated. D D-aspartic acid, L L-aspartic acid



(model 1, IVD), 5.5 years (model 2, EPI), and 4.0 years (model 3, IVD and EPI). Model 3 showed the strongest correlation between chronological age and estimated age ($r = 0.95$; Fig. 8). All models achieved considerably better results in cases with an age younger than 62 years than in cases older than 62 (age under 62 years: MAEs of 4.7, 5.0, and 3.1 years in models 1, 2, and 3, respectively; age above 62 years: MAEs of 8.0, 6.0, and 4.9 years, respectively).

Discussion

During the last decades, it became evident that several molecular modifications accumulate in the human organism with increasing age. Some of these molecular clocks in DNA and in proteins open up promising approaches for

the development of methods for forensic age estimation ([2, 4, 10–12]). Above all, the published data for approaches based on methylation of DNA (mDNA) and accumulation of D-aspartic acid (D-Asp) indicate a high potential of these methods (for review see [2, 6, 8, 12, 14]). However, one should not overlook the fact that even these approaches determine the chronological age only indirectly, namely by an epigenetic clock or a protein clock. The influence of diverse extrinsic and intrinsic factors on the individual aging process and thus also on these clocks should not be underestimated. Accordingly, one of the main problems of all molecular methods of age estimation is an increasing scattering of data with increasing age. It has already been proposed that a combined use of different biomarkers of aging may address this problem and result in a higher accuracy of age estimation especially

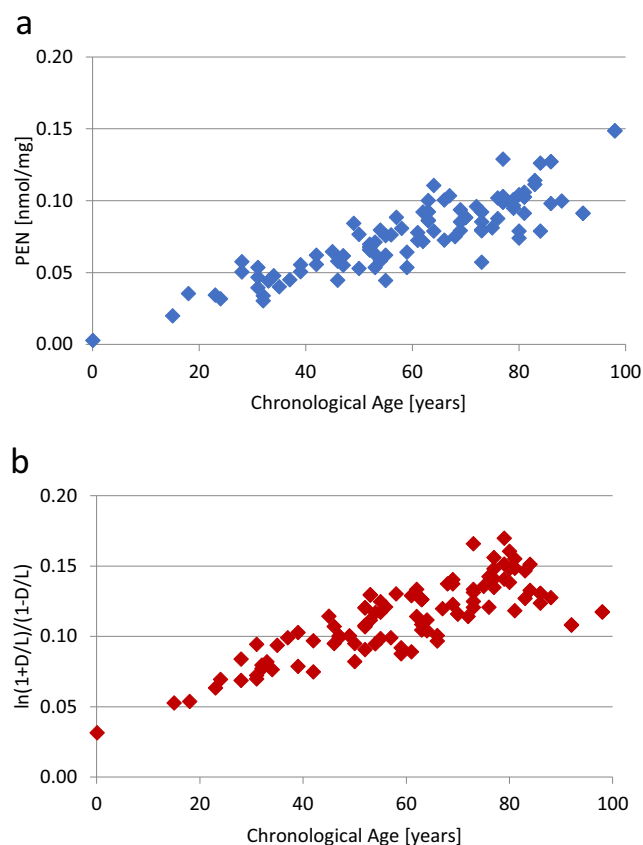


Fig. 5 Epiglottis (EPI) samples ($n=95$): Accumulation of pentosidine (PEN; $r=0.86$) (a) and D-aspartic acid (D-Asp, as $\ln((1+D/L)/(1-D/L))$; $r=0.81$) (b) in relation to age. D D-aspartic acid, L L-aspartic acid

in older ages [59] via a better addressing of the complex processes of aging.

We tested this hypothesis by analysis of two molecular clocks (accumulation of D-Asp, accumulation of pentosidine (PEN)) in two different tissues (annulus fibrosus of intervertebral discs (IVD) and elastic cartilage of epiglottis (EPI)) and the development of multivariate models for age estimation based on the collected data.

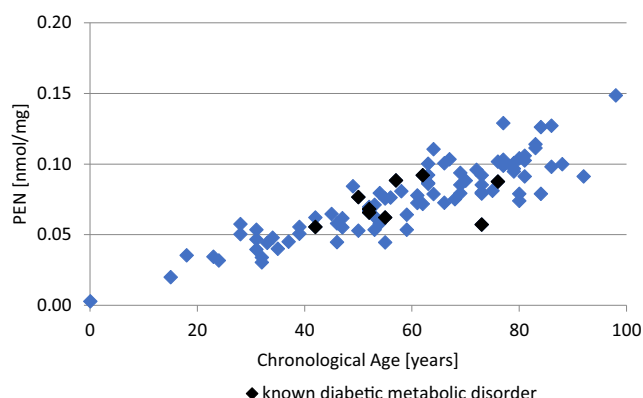


Fig. 6 Epiglottis (EPI) samples: Same pentosidine (PEN) data as in Fig. 5a ($n=95$, $r=0.86$), here with marking of samples from individuals with diabetic metabolic disorder ($n=9$)

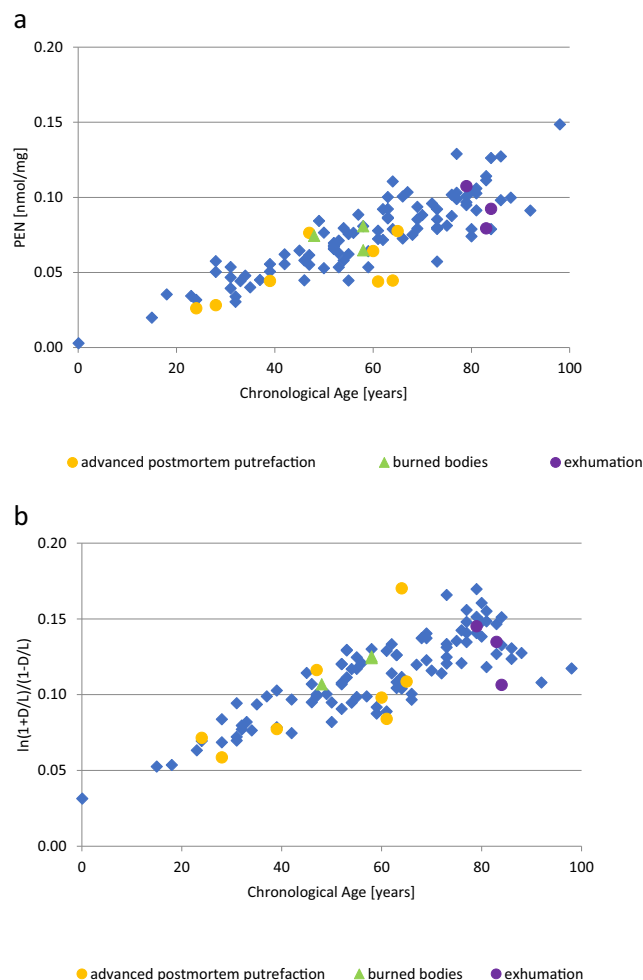


Fig. 7 Epiglottis (EPI) samples: Same data as in Fig. 5a, b (a data for PEN, b data for D-Asp (as $\ln((1+D/L)/(1-D/L))$); data for samples from cases with advanced postmortem putrefaction ($n=8$) of burned bodies ($n=3$) and of cases with exhumation ($n=3$) are added and indicated. D D-aspartic acid, L L-aspartic acid

PEN and D-Asp in collagen from the annulus fibrosus of IVD

An age-dependent accumulation of D-Asp and PEN in IVD has already been described [41, 53, 60]. For the first time, we analyzed the two parameters in combination. Furthermore, we analyzed relatively well defined protein fractions after purification of collagen (Fig. 1a) instead of total protein [41, 60].

Basically, the PEN and D-Asp data confirm that collagen in the annulus fibrosus of IVD is a permanent protein that accumulates modifications during aging. The increasing scattering of data with age mirrors the individuality of the aging process in this tissue, just as the different extents of morphological degenerative changes do. Degeneration can result in tissue remodeling with breakdown of molecules as well as with a synthesis of new collagen which means an introduction of “young” protein into “old” tissue. Therefore, it is not surprising that even after purification of collagen, a relevant increase

Table 1 Quality of age estimation by univariate and multivariate predictions

	<i>r</i>	MAE (years)
Prediction univariate: IVD/D-Asp	0.73	11.0
Prediction univariate: IVD/PEN	0.84	9.5
Prediction univariate: EPI/D-Asp	0.81	8.6
Prediction univariate: EPI/PEN	0.86	7.5
Prediction multivariate—Model 1 (IVD/D-Asp, PEN)	0.86	6.3 (ages < 62 4.7) (ages > 62 8.0)
Prediction multivariate—Model 2 (EPI/D-Asp, PEN)	0.91	5.5 (ages < 62 5.0) (ages > 62 6.0)
Prediction multivariate—Model 3 IVD/D-Asp, PEN EPI/D-Asp, PEN	0.95	4.0 (ages < 62 3.1) (ages > 62 4.9)

IVD samples from intervertebral discs, EPI samples from epiglottis, PEN accumulation of pentosidine, D-Asp accumulation of D-aspartic acid, *r* coefficient of correlation (Spearman), MAE mean absolute error

in the scattering of data in older ages and in cases with degenerative changes was observed (Fig. 2a, b).

Theoretically, the accumulation of PEN may be influenced by a diabetic metabolic disorder due the exposition of proteins to higher concentrations of glucose [32, 33, 45, 61]. There was no clear indication for a relevant deviation of the PEN values in diabetic individuals in the collective examined (Fig. 3). However, we analyzed only a small number of samples from individuals with diabetes mellitus. Since the formation of PEN is a very slow process [33, 44, 62, 63], it can be assumed that a relevant influence of diabetes mellitus on the overall amount of PEN will only be observed, if metabolic conditions with high levels of glucose persist for a long time. This assumption has to be tested by analysis of a sufficiently large set of cases with known medical history.

Fortunately, PEN and D-Asp seem to be relatively robust against special postmortem conditions (Fig. 4a, b). However, also, this preliminary finding has to be checked by analysis of a large set of samples comprising cases with different postmortem conditions.

The MAEs of 9.5 years (IVD/PEN) and 11.0 years (IVD/D-Asp) for age estimation via univariate predictions (Table 1) are quite high. Theoretically, much better results could be achieved, if samples with degenerative changes are excluded, as proposed by Ritz and Schütz [60] and Pilin et al. [41]. However, this would limit the applicability of the method considerably, since advanced degeneration is a very common finding in older ages.

PEN and D-Asp in elastin/collagen from the EPI

Since an age-dependent accumulation of D-Asp in the elastic cartilage from the epiglottis has already been described [23], it could be anticipated that this tissue contains permanent proteins that might also accumulate PEN. Indeed, the collagen/elastin protein fraction (Fig. 1b) of the tissue exhibited an age-dependent accumulation of PEN (Fig. 5a), and the accumulation of D-Asp in EPI was confirmed (Fig. 5b). Overall, the results for the EPI samples were very similar to those for the IVD samples and can be interpreted in the same way.

Age estimation based on only one EPI parameter was quite inaccurate as indicated by MAEs of 7.5 years (EPI/PEN) and of 8.6 years (EPI/D-Asp) (Table 1).

Age estimation based on a multivariate approach using D-Asp and PEN in IVD and EPI

The relatively high MAEs for age estimates based on single parameters reflect the complexity of the aging process in the different biological subsystems.

The inclusion of more than one parameter in the models for age estimation led to considerably lower MAEs (Table 1). While MAEs were 7.5–11.0 years in the univariate models, the multivariate model that included all parameters resulted in the lowest MAE of 4.0 years. This is a very promising result—especially with regard to the underlying single data sets for PEN and D-Asp in IVD and EPI with a quite huge scattering of data at least in higher ages (Figs. 2 and 5).

The question arises, if this “pure protein approach” promises better results in postmortem age estimation than methods based on DNA methylation. This question is difficult to answer for several reasons. Many authors used MAEs and correlation coefficients as measures for the accuracy of age estimation. MAE and correlation coefficient for our multivariate protein model (4 years and 0.95, respectively) are very close to those of the best models for age estimation based on DNA methylation (ca. 3–5 years, [14, 64–66], for review see [7, 10, 11]). However, neither MAEs nor correlation coefficients do permit any exact statements regarding the accuracy in individual cases [7]. Apart from that, situations in the context of the identification of an unknown deceased are highly variable (e.g., highly decomposed bodies, skeletons, body parts). The answer to the question, which approach is the best for a single case depends (1) on the tissues available for the analysis and (2) on the applicability of a method under the conditions of advanced putrefaction. The data presented here prove the applicability of the multivariate protein approach to two tissues that are usually well preserved for a relatively long time during postmortem decomposition; moreover, PEN and D-Asp seem to be robust under diverse postmortem conditions. Up to now, there are only a few studies on the applicability of the DNA methylation approach to postmortem degraded tissues [67,

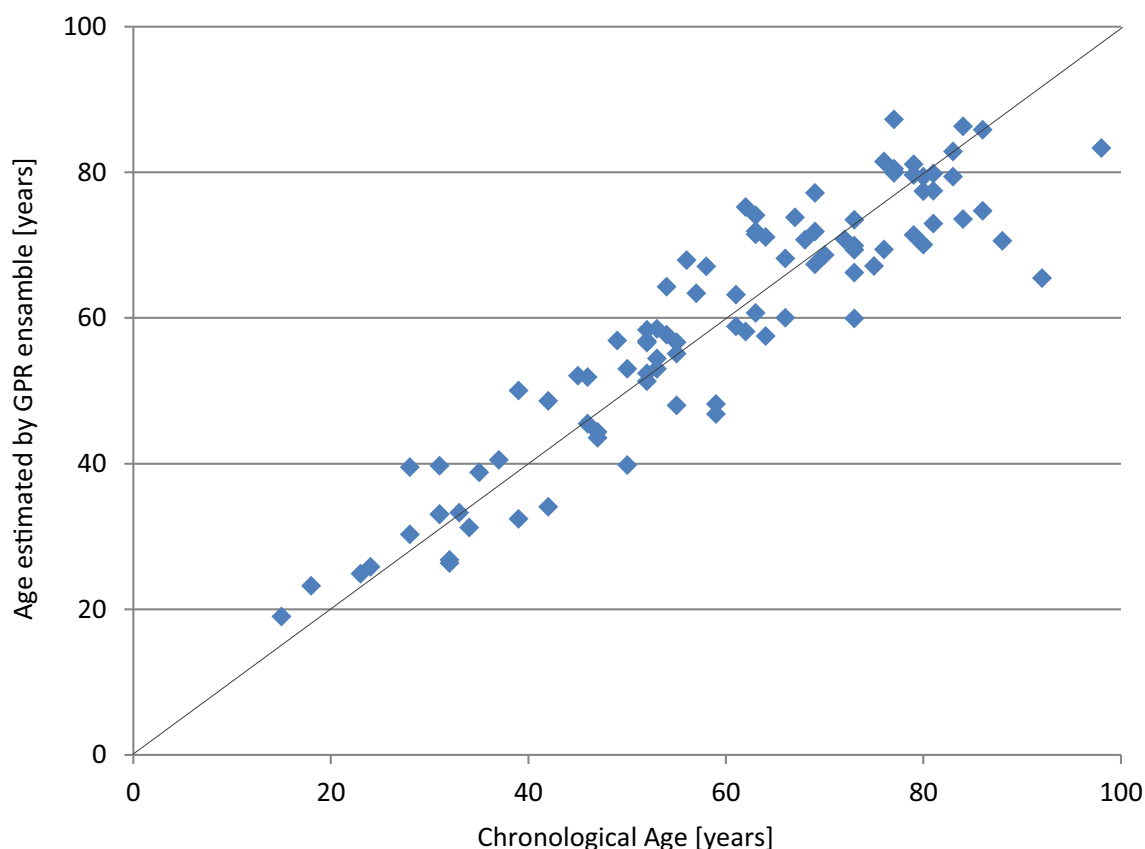


Fig. 8 Multivariate model 3: age estimates in relationship to the corresponding chronological ages ($n = 95$; mean absolute error = 4.0 (3.1 years for ages under 62 years, 4.9 years for ages above 62 years); $r = 0.95$). GPR Gaussian process regression

68]. It is the task of future research to further examine the repertoire of methods in terms of their applicability and accuracy under the diverse case scenarios of forensic practice.

Conclusion and vision

The presented results confirm the conclusion that multivariate models, using appropriate parameters, can be used to develop new age estimation methods that are more accurate and broader in scope than univariate methods. Some groups have already introduced multivariate models into the development of methods for mtDNA-based age estimation [59, 64, 66, 69]. These models include the data for different mtDNA markers but remain in one biological level. Moreover, there are already a few promising multivariate approaches that combine parameters concerning different biological levels, e.g., mtDNA and morphology [70] or mtDNA and signal-joint T cell receptor excision circles (sjTRECs) [59]. Though the approach of Cho [59] is not applicable to highly decomposed bodies (since it is based on the analysis of blood), it is very interesting, as it shows that the combination of an mtDNA model with another biomarker of aging (sjTRECs) may address a major problem

of all methods of age estimation, namely the higher scattering of data with increasing age.

In conclusion, the combined analysis of different molecular clocks in different tissues is a very useful approach for several reasons. It may improve predication accuracy especially in older ages [59], it offers new possibilities for age estimation in cases with advanced postmortem putrefaction and decomposition, and—from the perspective of basic sciences—it may contribute to a better understanding of complex aging processes.

Our vision is the development of a system of multivariate models for age estimation that can be used in the multiple scenarios of forensic practice (e.g., advanced putrefaction, skeletons, body parts). In a next step, we will add the epigenetic clock (mtDNA) to our protein clocks (PEN, D-Asp) and expand our set of tissues.

Compliance with ethical standards

Ethical approval All procedures performed in studies involving human tissue were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards (approved by Ethics Committee at the Medical Faculty of Heinrich-Heine

University: 6191R, 3667). This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch HJ, Borrmann HI (2000) Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practice. *Int J Legal Med* 113(3):129–136
- Meissner C, Ritz-Timme S (2010) Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int* 203(1–3):34–43. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.010>
- Ritz-Timme S, Collins MJ (2002) Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Res Rev* 1(1):43–59
- Zapico SC, Ubelaker DH (2013) Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Res Rev* 12(2):605–617. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.02.002>
- Ritz-Timme S (1999) Lebensaltersbestimmung aufgrund des Racemisierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche ; mit 6 Tabellen. *Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik*, Bd 23. Schmidt-Römhild, Lübeck
- 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
- Ritz-Timme S, Schneider PM, Mahlke NS, Koop BE, Eickhoff SB (2018) Altersschätzung auf Basis der DNA-Methylierung. *Rechtsmedizin* 28(3):202–207. <https://doi.org/10.1007/s00194-018-0249-3>
- Lee HY, Lee SD, Shin K-J (2016) Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Rep* 49(7):359–369
- Goel N, Karir P, Garg VK (2017) Role of DNA methylation in human age prediction. *Mech Ageing Dev* 166:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.012>
- 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>
- Parson W (2018) Age estimation with DNA: from forensic DNA fingerprinting to forensic (epi)genomics: a mini-review. *Gerontology* 64(4):326–332. <https://doi.org/10.1159/000486239>
- Zapico SC (2017) Mechanisms linking aging, diseases and biological age estimation. 23-Epigenetics. CRC Press, Portland
- Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14(10):R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Jung S-E, Shin K-J, Lee HY (2017) DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB Rep* 50(11):546–553
- Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS (2015) DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 14(6):924–932. <https://doi.org/10.1111/acel.12349>
- Spólnicka M, Pośpiech E, Adamczyk JG, Freire-Aradas A, Peplowska B, Zbieć-Piekarska R, Makowska Ż, Pięta A, Lareu MV, Phillips C, Płoski R, Żekanowski C, Branicki W (2018) Modified aging of elite athletes revealed by analysis of epigenetic age markers. *Aging* 10(2):241–252. <https://doi.org/10.18632/aging.101385>
- Gao X, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H (2016) Relationship of tobacco smoking and smoking-related DNA methylation with epigenetic age acceleration. *Oncotarget* 7(30):46878–46889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9795>
- Kandi V, Vadakedath S (2015) Effect of DNA methylation in various diseases and the probable protective role of nutrition: a mini-review. *Cureus* 7(8):e309. <https://doi.org/10.7759/cureus.309>
- Stephenson RC, Clarke S (1989) Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *J Biol Chem* 264(11):6164–6170
- Geiger T, Clarke S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J Biol Chem* 262(2):785–794
- Dobberstein RC, Tung S-M, Ritz-Timme S (2010) Aspartic acid racemization in purified elastin from arteries as basis for age estimation. *Int J Legal Med* 124(4):269–275. <https://doi.org/10.1007/s00414-009-0392-1>
- 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):207–211. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1255-6>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0940-6>
- Ohtani S, Yamamoto K (1991) Age estimation using the racemization of amino acid in human dentin. *J Forensic Sci* 36(3):792–800
- Ritz S, Schütz HW, Schwarzer B (1990) The extent of aspartic acid racemization in dentin: a possible method for a more accurate determination of age at death? *Zeitschrift für Rechtsmedizin. J Legal Med* 103(6):457–462
- 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):289–293
- Ohtani S, Yamamoto T (2010) Age estimation by amino acid racemization in human teeth. *J Forensic Sci* 55(6):1630–1633. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01472.x>
- Chen S, Lv Y, Wang D, Yu X (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>
- 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(1):22–29. <https://doi.org/10.1177/0025802414524383>
- Wochna K, Bonikowski R, Śmigielski J, Berent J (2018) Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a Polish population sample. *Forensic Sci Med Pathol* 14(3):285–294. <https://doi.org/10.1007/s12024-018-9984-8>
- Ritz-Timme S, Rochholz G, Stammert R, Ritz H-J (2002) Biochemische Altersschätzung Zur Frage genetischer und soziokultureller (ethnischer) Einflüsse auf die Racemisierung von Asparaginsäure in Dentin. *Rechtsmedizin* 12(4):203–206. <https://doi.org/10.1007/s00194-002-0152-8>
- Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 56:1–21
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44(2):129–146. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>
- Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H (2004) Advanced glycoxidation end products in

- commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 104(8):1287–1291. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.05.214>
35. 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):349–356. <https://doi.org/10.1007/s00391-007-0484-9>
 36. 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. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1671-x>
 37. Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Cirmigliaro M, Federici M, Federici A (2005) Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann N Y Acad Sci* 1043:710–717. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.082>
 38. Pokharna HK, Phillips FM (1998) Collagen crosslinks in human lumbar intervertebral disc aging. *Spine* 23(15):1645–1648
 39. 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):381–387
 40. Ramalho JS, Marques C, Pereira PC, Mota MC (1996) Role of glycation in human lens protein structure change. *Eur J Ophthalmol* 6(2):155–161
 41. Pillin A, Pudil F, Bencko V, Bezďicková D (2007) Contents of pentosidine in the tissue of the intervertebral disc as an indicator of the human age. *Soud Lek* 52(4):60–64
 42. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 91(6):2463–2469. <https://doi.org/10.1172/JCI116481>
 43. Valenzuela A, Guerra-Hernández E, Rufián-Henares JÁ, Márquez-Ruiz AB, Hougén 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. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1908-3>
 44. Li H, Yu S-J (2018) Review of pentosidine and pyrraline in food and chemical models: formation, potential risks and determination. *J Sci Food Agric* 98(9):3225–3233. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8853>
 45. Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME (2002) Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs* 11(9):1205–1223. <https://doi.org/10.1517/13543784.11.9.1205>
 46. 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(2):149–159
 47. Ritz S, Turzynski A, Schütz HW, Hollmann A, Rochholz G (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(1–2):13–26
 48. 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(2):96–101. <https://doi.org/10.1007/s00414-002-0355-2>
 49. Monum T, Jaikang C, Sinthubua A, Prasitwattanaseree S, Mahakkanukrauh P (2017) Age estimation using aspartic amino acid racemization from a femur. *Aust J Forensic Sci* 116:1–9. <https://doi.org/10.1080/00450618.2017.1391330>
 50. 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):949–953
 51. Ohtani S, Yamamoto T, Abe I, Kinoshita Y (2007) Age-dependent changes in the racemization ratio of aspartic acid in human alveolar bone. *Arch Oral Biol* 52(3):233–236. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.08.011>
 52. Tiplamaz S, Gören MZ, Yurtsever NT (2018) Estimation of chronological age from postmortem tissues based on amino acid racemization. *J Forensic Sci* 63(5):1533–1538. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13737>
 53. Sivan SS, Tsitron E, Wachtel E, Roughley P, Sakkee N, van der Ham F, Degroot J, Maroudas A (2006) Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs. *Biochem J* 399(1):29–35. <https://doi.org/10.1042/BJ20060579>
 54. Schmidt MB, Mow VC, Chun LE, Eyre DR (1990) Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J Orthop Res* 8(3):353–363. <https://doi.org/10.1002/jor.1100080307>
 55. Heems D, Luck G, Fraudeau C, Vérette E (1998) Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in food, beverages and feedstuff. *J Chromatogr A* 798(1–2):9–17. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01007-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01007-8)
 56. 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(11):987–1000. [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(97\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(97)00086-3)
 57. Rokach L (2010) Ensemble-based classifiers. *Artif Intell Rev* 33(1–2):1–39. <https://doi.org/10.1007/s10462-009-9124-7>
 58. Rasmussen CE, Williams CKI (2006) Gaussian processes for machine learning. Adaptive computation and machine learning. MIT Press, Cambridge
 59. Cho S, Jung S-E, 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.020>
 60. Ritz S, Schütz HW (1993) Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to postmortem estimation of age at death. *J Forensic Sci* 38(3):633–640
 61. Sell DR, Nagaraj RH, Grandhee SK, Odetti P, Lapolla A, Fogarty J, Monnier VM (1991) Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes Metab Rev* 7(4):239–251
 62. Brownlee M (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46:223–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.46.1.223>
 63. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L (2010) Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65A(9):963–975. <https://doi.org/10.1093/gerona/gfq074>
 64. Aliferi A, Ballard D, Gallidabino MD, Thurtle H, Barron L, Syndercombe Court D (2018) DNA methylation-based age prediction using massively parallel sequencing data and multiple machine learning models. *Forensic Sci Int Genet* 37:215–226. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.003>
 65. Jung S-E, Lim SM, Hong SR, Lee EH, Shin K-J, 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.010>
 66. Naue J, Hoefsloot HCJ, Mook ORF, Rijlaarsdam-Hoekstra L, van der Zwalm MCH, Henneman P, Kloosterman AD, Verschure PJ (2017) Chronological age prediction based on DNA methylation: massive parallel sequencing and random forest regression. *Forensic Sci Int Genet* 31:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.015>
 67. Rhein M, Hagemeyer L, Klintschar M, Muschler M, Bleich S, Frieling H (2015) DNA methylation results depend on DNA integrity—role of post mortem interval. *Front Genet* 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00182>
 68. Jarmasz JS, Stirton H, Davie JR, Del Bigio MR (2019) DNA methylation and histone post-translational modification stability in post-

- mortem brain tissue. *Clin Epigenetics* 11(1):5. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0596-7>
69. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.009>
70. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.005>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.2 Publikation 2

J. Becker* & J. Naue*, A. Reckert, P. Böhme, S. Ritz-Timme (2021)

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

Rechtsmedizin (2021) 31:234–242. <https://doi.org/10.1007/s00194-021-00489-2>

**J. Becker and J. Naue contributed equally to this work and share first authorship.*

Beitrag der Autoren: **J. Becker** und J. Naue haben gleichermaßen zur Konzeption der Versuche, der Erhebung, der Analyse und der Auswertung sowie Interpretation der Daten (**J. Becker** für die Parameter Proteinmodifikationen; J. Naue für den Parameter DNA-Methylierung) sowie der Erstellung des Manuskripts beigetragen. **J. Becker** war sowohl für die Präparation aller Proben zur weiteren Analyse der Proteinmodifikationen als auch der Extraktion der DNA aus den Proben zur weiteren Analyse der DNA-Methylierung (durchgeführt von J. Naue) zuständig. J. Naue war für die statistische Auswertung der Daten zuständig. A. Reckert hat die Laborarbeit betreut. P. Böhme hat bei der Erstellung des Manuskripts geholfen. S. Ritz-Timme konzipierte die Gesamtidee, unterstützte bei der Entwicklung der Versuche, der Interpretation der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskripts. **Alle Autoren** haben gleichermaßen zur Überarbeitung des Artikels und der kritischen Überprüfung von wichtigen intellektuellen Inhalten beigetragen und haben die endgültige Version vor der Einreichung genehmigt.

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-Timme¹

¹ Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland

² 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 postmortaler Veränderungen oder spezieller postmortaler 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

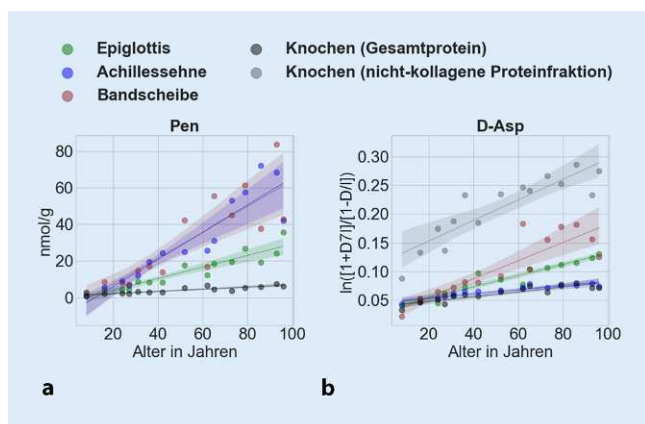


Abb. 1 ▲ Altersabhängige Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp) und Pentosidin (Pen) in 4 Geweben von 15 Individuen. Pen-Gehalt (a) sowie D-Asp-Gehalt (b) der 4 verschiedenen Gewebe in Korrelation zum Lebensalter. Zur besseren Visualisierung wurde eine lineare Regressionsgerade eingefügt

[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 $\pm 3,1\%$ gerechnet werden. Da diese bei 600 × mit $\pm 4,0\%$ 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.

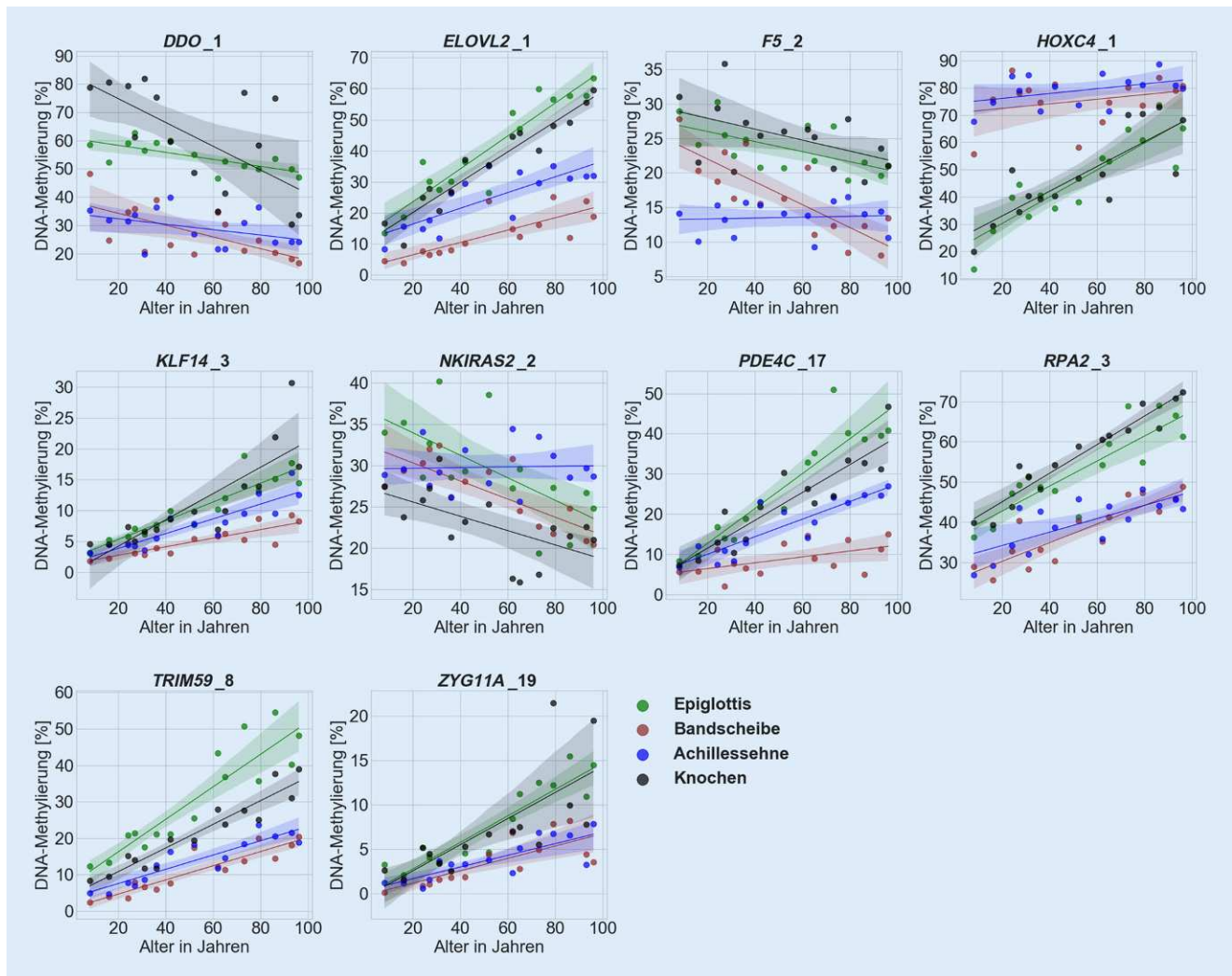


Abb. 2 ▲ DNA-Methylierung (DNAm)-Analyse aus 4 Geweben von 15 Individuen. Die Abbildungen zeigen die DNAm der 4 Gewebe für eine beispielhaft ausgewählte CpG-Position pro Loci. Zur besseren Visualisierung wurde eine lineare Regressionsgerade eingefügt

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 Lebensalterschätzungen 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 Proteinfraction 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 erheblichen 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>

3.3 Publikation 3

J. Becker, V. Bühren, L. Schmelzer, A. Reckert, S. B. Eickhoff, S. Ritz*, J. Naue* (2024)

Molecular age prediction using skull bone samples from individuals with and without signs of decomposition: A multivariate approach combining analysis of posttranslational protein modifications and DNA methylation

International Journal of Legal Medicine (2024) 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00414-024-03314-z>

**These authors contributed equally to this work.*

Beitrag der Autoren: Die Konzeption der Versuche, die Erhebung Daten oblag **J. Becker** und V. Bühren (für die Parameter Proteinmodifikationen) sowie J. Naue und L. Schmelzer (für den Parameter DNA-Methylierung). **J. Becker** und J. Naue haben die Analyse und Interpretation der Daten sowie die Erstellung und Finalisierung des Manuskripts durchgeführt. J. Naue und S. B. Eickhoff waren für die bioinformatische Erstellung der Modelle zuständig. A. Reckert hat die Laborarbeit (für die Parameter Proteinmodifikationen) betreut. S. Ritz konzipierte die Gesamtidee. S. Ritz sowie J. Naue haben zu gleichen Teilen zum Studiendesign und der Supervision der Studie beigetragen. **Alle Autoren** haben gleichermaßen zur Überarbeitung des Artikels und der kritischen Überprüfung von wichtigen Inhalten beigetragen und haben die endgültige Version vor der Einreichung genehmigt.



Molecular age prediction using skull bone samples from individuals with and without signs of decomposition: a multivariate approach combining analysis of posttranslational protein modifications and DNA methylation

J. Becker¹ · V. Bühren¹ · L. Schmelzer² · A. Reckert¹ · S. B. Eickhoff^{3,4} · S. Ritz¹ · J. Naue²

Received: 30 May 2024 / Accepted: 13 August 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

The prediction of the chronological age of a deceased individual at time of death can provide important information in case of unidentified bodies. The methodological possibilities in these cases depend on the availability of tissues, whereby bones are preserved for a long time due to their mineralization under normal environmental conditions. Age-dependent changes in DNA methylation (DNAm) as well as the accumulation of pentosidine (Pen) and D-aspartic acid (D-Asp) could be useful molecular markers for age prediction. A combination of such molecular clocks into one age prediction model seems favorable to minimize inter- and intra-individual variation. We therefore developed (I) age prediction models based on the three molecular clocks, (II) examined the improvement of age prediction by combination, and (III) investigated if samples with signs of decomposition can also be examined using these three molecular clocks. Skull bone from deceased individuals was collected to obtain a training dataset ($n=86$), and two independent test sets (without signs of decomposition: $n=44$, with signs of decomposition: $n=48$). DNAm of 6 CpG sites in *ELOVL2*, *KLF14*, *PDE4C*, *RPA2*, *TRIM59* and *ZYG11A* was analyzed using massive parallel sequencing (MPS). The D-Asp and Pen contents were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Age prediction models based on ridge regression were developed resulting in mean absolute errors (MAEs)/root mean square errors (RMSE) of 5.5years/6.6 years (DNAm), 7.7 years/9.3 years (Pen) and 11.7 years/14.6 years (D-Asp) in the test set. Unsurprisingly, a general lower accuracy for the DNAm, D-Asp, and Pen models was observed in samples from decomposed bodies (MAE: 7.4–11.8 years, RMSE: 10.4–15.4 years). This reduced accuracy could be caused by multiple factors with different impact on each molecular clock. To acknowledge general changes due to decomposition, a pilot model for a possible age prediction based on the decomposed samples as training set improved the accuracy evaluated by leave-one-out-cross validation (MAE: 6.6–12 years, RMSE: 8.1–15.9 years). The combination of all three molecular age clocks did reveal comparable MAE and RMSE results to the pure analysis of the DNA methylation for the test set without signs of decomposition. However, an improvement by the combination of all three clocks was possible for the decomposed samples, reducing especially the deviation in case of outliers in samples with very high decomposition and low DNA content. The results demonstrate the general potential in a combined analysis of different molecular clocks in specific cases.

Keywords Chronological age prediction · D-aspartic acid · Pentosidine · DNA methylation · Bone · Multivariate models

S. Ritz and J. Naue contributed equally to this work.

✉ S. Ritz
stefanie.ritz@med.uni-duesseldorf.de

✉ J. Naue
jana.naue@uniklinik-freiburg.de

¹ Institute of Legal Medicine, University Hospital Duesseldorf, 40225 Duesseldorf, Germany

² Institute of Forensic Medicine, Medical Center - University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

³ Institute for Systems Neuroscience, University Hospital Duesseldorf, 40225 Duesseldorf, Germany

⁴ Institute of Neuroscience and Medicine, Brain & Behaviour (INM-7), Research Centre Juelich, 52428 Juelich, Germany

Introduction

Postmortem chronological age prediction of an individual can be crucial in determining the identity of a deceased. Methodological options for age prediction depend on the extent of postmortem changes and the availability of tissues; the initial situation can range from the presence of a complete corpse to the presence of only some pieces of bone. Teeth and bones are the most resistant human tissues that can withstand harsh conditions such as degradation and putrefaction due to their high content of inorganic substance [1]. Therefore, they are the most relevant sample types for forensic practice in these cases.

Conventional methods for chronological age prediction are based on the examination of physiological and degenerative changes (especially in dental and skeletal structures) during life [2]. However, in adulthood the accuracy of these methods may be low and cannot be used when morphological information is limited, e.g., in cases with only body parts or fragments of bones [2]. In the last decade, numerous new approaches based on the use of known age-dependent molecular changes have expanded the repertoire of age prediction methods [3]. Among the most interesting approaches for forensic age prediction are DNA methylation (DNAm) and post-translational protein modifications, such as accumulation of D-aspartic acid (D-Asp), and pentosidine (Pen) in long-living proteins.

Skull bones, like other bones in the body, are composed of both inorganic and organic tissue. The bone matrix consists of around 35% organic and 65% inorganic constituents. The inorganic components mainly include hydroxyapatite crystals, but also potassium, chlorine, iron, magnesium and carbonate [4, 5]. These crystals provide rigidity and hardness to bone tissue, contributing to its compressive strength [5]. The organic matrix of bone consists mainly of collagen fibers (approx. 90%), which provide tensile strength and flexibility to bone tissue. The remaining components are non-collagenous proteins, such as osteonectin, osteocalcin, sialoprotein, phosphoproteins, glycoproteins, proteoglycans, albumin and others [4]. Different processes of bone protein modifications can result from enzymatic or non-enzymatic processes [5, 6]. The enzymatic process involves the activation of lysyl oxidase, leading to the formation of immature and mature crosslinks that stabilize the collagen fibrils. Two types of non-enzymatic processes result in an accumulation of advanced glycation end products and D-aspartic acid in bone proteins. These bone protein modifications are age-related and can affect the mechanical properties of bone [5].

The accumulation of D-Asp with age is the result of spontaneous nonenzymatic conversion of L-asparagine and L-aspartic acid into its D-forms (for details, see [7]). Age

prediction based on the D-Asp content in dentine, a very stable and bradytrophic tissue, revealed accurate estimates of 2.19–2.93 years mean absolute errors (MAE) [8–13]. This approach also works for more complex and heterogeneous tissues with higher turnover, such as bone. However, for other tissues than dentine, the accuracy of the method is significantly lower, as long as suitable proteins are not purified and protein mixtures are analyzed (for details see [3]). Pen is an advanced glycation end product that accumulates as a fluorescent crosslink between arginine and lysine in different proteins like collagen [14]. Pathological metabolic conditions, such as long-lasting hyperglycemic states or renal failure, may result in elevated Pen levels [14]. Nevertheless, the analysis of Pen can be used for age estimation in cases in which confounding factors can be excluded or as an additional parameter, e.g. in combination with D-Asp [15].

Various cell types within the bone matrix are present to maintain bone structure, function, and repair. Osteoblasts are responsible for producing the organic matrix that serves as the foundation for mineral deposition and therefore are vital for growth and repair, ensuring the integrity and resilience of bone tissue. Derived from osteoblasts, osteocytes nestled within the bone matrix, monitor remodeling processes, and respond to mechanical stresses, playing a crucial role in maintaining bone metabolism [16]. In contrast, osteoclasts are involved in bone resorption by breaking down old or damaged bone tissue, releasing vital calcium and phosphate ions into the circulation to maintain mineral balance [17]. To allow these specific functions, epigenetic mechanisms such as DNAm play a role in the regulation of developmental processes, differentiation, and function in bone cells, too [18–20]. In addition to these primary cells, mesenchymal stem cells in the bone marrow serve tissue regeneration purposes, and endothelial cells form the intricate network of blood vessels within bones and assist in remodeling and repair processes [16]. Blood cells can also be seen as part of the overall cell type composition of bones. Studies revealed age-related DNAm alterations in all cells and tissues including bones [21, 22]. These modifications can influence gene expression patterns and contribute to genomic instability and the onset and progression of numerous diseases [23–27].

Various age-related DNAm markers, with increased or decreased methylation at specific cytosine-guanine (CpG) sites, have already been identified [21]. Based on these findings, several mathematical models for chronological age prediction in forensic settings have been proposed for various tissues and body fluids, including teeth and bone, obtaining MAE of 3–5 years (for details see reviews [28–30]).

Each of these parameters suggested for molecular age prediction exhibits limitations due to its specific biological context, including tissue-specific differences, individual

(stochastic) changes, and many endogenous and exogenous factors, which could influence the degree of DNAm and accumulation of D-Asp and Pen, respectively [14, 30–32]. The combined analysis of all three molecular clocks addresses different biological levels and, therefore may compensate for the effects of various influencing factors on the accuracy of age estimation, especially in adulthood. Approaches combining multiple biological molecular clocks have already been tested and partially improved age prediction accuracy [33–36]. Data from a pilot study performing a parallel analysis of D-Asp, Pen, and DNAm revealed age-dependent changes in bone tissue (skull) and thereby indicated a potential for age prediction [37]. Within that study, the regions *ELOVL2*, *KLF14*, *PDE4C*, *RPA2*, *TRIM59*, and *ZYG11A*, showed a high correlation with age in bone (p 0.9–0.98). The age dependency of these markers was also seen in bone samples examined in other studies, e.g. [38, 39].

Within this study, we analyzed D-Asp and Pen as well as DNAm at multiple CpG sites in the six selected regions, in skull samples from deceased individuals without and with signs of decomposition. We developed and evaluated ridge regression models for age prediction and investigated the impact of postmortem changes on age prediction accuracy in samples ranging from early to advanced stages of decomposition.

Materials and methods

Actions taken to avoid contamination

The samples were treated with appropriate measures from collection to analysis (contamination protection through appropriate rooms, gloves, masks, gowns and clean preparation equipment, ‘human DNA-free’ tubes, pipette tips and reagents). The surfaces of the bones were cleaned with Biocidal and appropriate negative controls were carried out from the DNA extraction onwards as well as for the HPLC to ensure that no contamination had occurred as a result of the washing protocol.

Bone sample collection and preparation

Samples of skull bone (Os parietale) were collected from 190 individuals during autopsy (0 to 96 years, 55 females and 135 males), sampling a piece from the left parietal bone, close to the usual saw cut for skull opening. In order to avoid heat exposure and because of the extremely small thickness of the calotte in the sampling area, the cancellous bone between the tabula externa and interna was not removed, so that the samples covered the entire bone cross-section.

Sample information can be found in Suppl. Table S1A. The state of decomposition (d-score) was defined during autopsy by forensic pathologists based on morphological characteristics. The decomposition scores of head, trunk and extremities were evaluated (details in Suppl. Table S1B) and total body decomposition scores were calculated by summarizing the scores of those regions leading to a minimum score of 3 for corpses without any signs of decomposition and to a maximum score of 22 in highly decomposed bodies as described by Megyesi et al. [40]. Dataset 1 ($n=98$) and dataset 2 ($n=44$) contain only samples from individuals without signs of decomposition. Dataset 3 ($n=48$) consists of all samples with early to advanced signs of decomposition. In all datasets, collection of samples from individuals over the whole age range was anticipated. However that was limited especially for individuals below 18 and for decomposed bodies. The processing of all three datasets was done independently to allow the use of split datasets for model training and independent testing (see below). Soft tissue was mechanically removed with a sterile scalpel and bone samples were sliced into approx. $1 \times 1 \times 0.5$ cm large fragments. The samples were pulverized with a tube mill at 17.000 rpm (Ika Tube Mill Control, Staufen, Germany). The resulting powder was washed in distilled water, 15% sodium chloride, 2% sodium dodecyl sulfate, and ethanol/ether (vol. 3:1), respectively, lyophilized by a freeze-drying system (Christ, Osterode am Harz, Germany) and stored at -80 °C until further analysis.

Determination of the D-Asp content by analysis of D- and L-aspartic acid

From each sample, 1 mg of bone powder was hydrolyzed for 6 h with 1 mL of 6 N HCl at 100 °C. D-aspartic acid and L-aspartic acid were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; 1100 Series and 1260 Infinity II, Agilent, CA, USA) as described by Becker et al. [33] with minor modification (shortened gradient: 47 min). Samples were dissolved in 1 mL sample buffer (0.01 M HCl with 1.5 mM sodium azide and 0.03 mM L-homo-arginine). For HPLC analysis, a C18 column (Hypersil BDS C18, 250 × 3 mm, particle size 5 μ m, Thermo Fisher Scientific (TFS), Waltham, MA, USA) was used as stationary phase. The mobile phase included eluents A (23 mM sodium acetate, 1.5 mM sodium azide, and 1 mM EDTA) and B (92.3% methanol, 7.7% acetonitrile). The amino acid enantiomers were detected by a gradient over a period of 49 min at a constant flow rate of 0.56 mL/min. Amino acids were detected at an excitation wavelength of $\lambda=230$ nm and a detection wavelength of $\lambda=445$ nm. D- aspartic acid (D) and L-aspartic acid (L) were identified by their retention times. The total content of D-Asp was expressed as $\ln((1 + D/L)/(1 - D/L))$.

Determination of pentosidine content

20 mg of bone powder per sample were hydrolyzed with 1 mL of 6 N HCl at 110 °C for 18 h. After drying, 1 mL of 0.01 M heptafluorobutyric acid (HFBA) was added. The solution was filtered through syringe filters (Ø 25 mm and 0.45 µm pore diameter). The dried samples were dissolved in 200 µL of 0.01 M HFBA. Analyzes were performed by HPLC (1100 Series). The stationary phase was a semi-preparative column (Onyx™ Monolithic SemiPrep C18, 100×4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of eluents A (40 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM sodium azide, 0.1% HFBA, pH=2.70) and B (45% methanol, 45% acetonitrile, 10% H₂O) based on Heems et al. [41]. A total of 10 µL of each sample was injected into the HPLC system. Samples were detected over a period of 28 min using a linear gradient followed by a washing plateau (100% eluent B) of 6 min. The flow rate was constant at 1 mL/min and the column temperature at 40 °C. Pentosidine (Pen) was measured at an excitation wavelength of $\lambda=335$ nm and a detection wavelength of $\lambda=385$ nm. The signal of Pen was identified by its retention time. The Pen content was expressed as (area of Pen [-])/(bone powder [mg])

Analysis of DNA methylation

DNA extraction and bisulfite conversion

Per sample up to 150 mg of bone powder were decalcified and lysed according to the Supplementary Protocol from Qiagen: Extraction of DNA from bone or teeth using the EZ1 DNA Investigator Kit (June 2016; Qiagen, Hilden, Germany). DNA extraction was performed according to the “Large-Volume Protocol” of the EZ1 DNA Investigator Kit and the EZ1 Advanced XL extraction robot (Qiagen). DNA was eluted in 100 µL elution buffer. DNA was quantified using the PowerQuant System (Promega, Madison, WI, USA). The quantity of DNA for further analysis was assessed on the longer 294 bp fragment, and DNA quality by evaluation of degradation (84 bp short fragment/ 294 bp long fragment). 200 ng of DNA (when possible) were bisulfite converted using single column and 96well plate-based EZ DNA Methylation Gold Kits (Zymo Research Europe, Freiburg, Germany). DNA was eluted in 15 µL DNA-free water and roughly quantified using the ssDNA Quantification Kit and Qubit 2.0 and Flex (both TFS).

Marker amplification and massive parallel sequencing

Parts of the genomic regions *ELOVL2*, *KLF14*, *PDE4C*, *RPA2*, *TRIM59* and *ZYG11A* were amplified in a multiplex

approach and information on genomic position, primer sequences, and concentrations can be found in the Suppl. Table S2. PCR was performed using 7.5 µL PyroMark Master Mix (Qiagen), 1.5 µL Coral Load (Qiagen), 0.5 µg BSA (TFS), 1.5 µL of the multiplex primer mix, 4µL of bisulfite converted DNA, and water ad 15 µL. Cycling was carried under the following conditions: 10 min at 95 °C; 15 cycles: 45 s at 98 °C, 30 s at 54 °C, 30 s at 72 °C; 25 cycles: 45 s at 98 °C, 30 s at 62 °C, 30 s at 72 °C; final elongation for 10 min at 72 °C on the MJ Research PTC-200 (BioRad, Hercules, CA, USA). PCR products were cleaned using 1.9x magnetic beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), which were prepared according to [42]. PCR for adapter addition was carried out in a 12 µL-volume using 1 µL of PCR product, 6 µL NEBNext Ultra II Q5 Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 5 pmol of Nextera XT i5- and i7 index primer each and 2.25 µL of DNA-free water under the following conditions: 30 s at 98 °C; 6 cycles: 10 s at 98 °C, 30 s at 62 °C, 45 s at 65 °C; final elongation for 5 min at 65 °C. PCR products were cleaned twice using 1.6x of the prepared magnetic beads and then quantified using the dsDNA high-sensitivity Qubit Quantification Kit (TFS). PCR products were equimolar pooled and the final 11pM library 2×150 bp sequenced on a MiSeq FGx (Verogen, San Diego, CA, USA) using the micro, nano, and ‘normal size’ 300 bp v2 kits (Illumina, San Diego, CA, USA).

The FastQ files were quality checked and 5' and 3' trimmed (TrimGalore v0.4.3 [43] (including the FastQC package)). The paired-end reads were merged (PEAR v0.9.10 [44]) and aligned to the human reference hg19 (samtools implemented in the biscuit v0.2.2 package [45]). CpG as well as non-CpG (i.e. CHH and CHG) DNA methylation (DNAm) values were extracted to obtain the DNAm values at the age-dependent positions as well as to check the bisulfite conversion efficiency (MethylDackel v0.2.1 [46]). The anticipated minimal coverage (merged reads) of 1000 was obtained for all samples, except one sample of a decomposed bone with a coverage of 600 merged reads for all markers.

Data analysis and statistical evaluation

Data analysis and visualization was performed using JupyterLab 3.4.4 (Anaconda Navigator v2.3.1) with Python 3.9 and the analysis packages pandas v1.4.4, pingouin v0.5.2, seaborn v0.11.2. The relationship between chronological age and the accumulation of D-Asp, Pen and DNAm was tested by rank correlation, and the corresponding Spearman correlation coefficients (ρ) were determined. For outlier detection, the Mahalanobis distance was determined to detect outliers for the different CpG positions, Pen, as

well as D-Asp outside the expected χ^2 distribution (cutoff: 0.95).

Development of age prediction models

Development and evaluation of the age prediction models was done using julearn 0.3.1 with pandas 2.1.4, sklearn 1.3.2, numpy 1.24.4 and scipy 1.9.1 was used for development and evaluation of the age prediction models.

Development and evaluation of the age prediction models

Age prediction ridge regression models that included the different molecular markers individually (DNAm, D-Asp, Pen) as well as combinations (D-Asp + Pen, D-Asp + DNAm, Pen + DNAm, and D-Asp + Pen + DNAm) were built on a training set with individuals of dataset 1 equal to or above 18 years ($n=86$, 18 to 96 years) and z-score pre-processing. In the first step, the best alpha value (L2 penalty) was determined using hyperparameter tuning (5-fold cross-validation (CV)). The final value of $\alpha=5$ was chosen for all feature combinations. 10-times 10-fold CV was used for development and first evaluation of model performance. The final model for the 86 training samples was evaluated in an independent test set ($n=44$, 19 to 96 years). An additional evaluation was performed using samples with signs of decomposition ($n=48$, 20 to 90 years). Model creation using julearn is based on the implementation of the sklearn function `run_cross_validation` and directly includes the CV approach. The mean absolute errors (MAE), root mean square errors (RMSE), and R value were determined for a model evaluation.

Development and evaluation of a pilot age prediction model specific for decomposed samples

To obtain first insights, if the development of an age prediction model using decomposed samples for training, and therefore including the heterogeneity of post-mortem effects, could be beneficial, a pilot ridge regression model was developed and evaluated with leave-one-out CV (LOOCV) using dataset 3 (decomposed samples, $n=48$).

Results

Correlation of D-Asp, Pen and DNAm markers with age in skull bone samples

The samples from dataset 1 ($n=98$, without signs of decomposition) were analyzed for total D-Asp (described as

$\text{LN}((1 + \text{D/L})/(1 - \text{D/L}))$), Pen (nmol/mg) and the DNAm (%) from the regions *ELOVL2*, *KLF14*, *PDE4C*, *RPA2*, *TRIM59*, and *ZYG11A* (Fig. 1).

As expected from the pilot study, an accumulation of Pen and D-Asp with increasing age was observed in bone samples, resulting in Spearman's ρ -D-Asp = 0.86, 95% CI: 0.79–0.9, and ρ Pen = 0.92, 95% CI: 0.79–0.9 in dataset 1. In the case of eight samples of very young individuals, Pen determination was not possible as the Pen accumulation did not reach the analytical threshold. The Spearman's ρ was also calculated for the CpG positions analyzed, leading to the selection of the final CpG positions within the amplicon for further analysis: *ELOVL2_8* ($\rho=0.93$, 95% CI: 0.79–0.9), *KLF14_3* ($\rho=0.87$, 95% CI: 0.81–0.91) *PDE4C_17* ($\rho=0.9$, 95% CI: 0.85–0.93), *RPA2_3* ($\rho=0.91$, 95% CI: 0.87–0.94), *TRIM59_7* ($\rho=0.9$, 95% CI: 0.86–0.93), and *ZYG11A_18* ($\rho=0.87$, 95% CI: 0.82–0.91). Also, other CpG positions in the same amplicons showed p -values above 0.8 and could also be useful for age prediction (data not shown). Applying the Mahalanobis distance at a χ^2 level of 0.95, revealed data points with a higher divergence from the center point (Suppl. Fig. S1). All deviating samples (in 17 individuals), except one (4 years, *RPA2_3*) were over 60 years old with four individuals having deviating samples at least at three markers. Most of the samples with greater divergence were detected in *PDE4C_17* ($n=7$). However, the occurrence of single outliers can increase in case of markers with a very high age correlation, as lower inter-individual differences can lead to more values identified as outlier.

Independent datasets with samples from individuals without and with signs of decomposition

In addition to bone samples from individuals without signs of decomposition on which an age prediction model will be build (see section below), two additional datasets were collected for further evaluation. An independent dataset 2 ($n=44$) with samples from individuals without signs of decomposition was collected to verify the observed age-dependent changes (Fig. 2). Additionally, 48 samples from individuals with low to strong decomposition (cf. staging in Material and Methods) were included in the study to determine whether and how age-dependent changes are also reflected in these challenging samples (dataset 3). The observed accumulation of Pen and DAsp was detectable in the test dataset (dataset 2) as in decomposed samples (dataset 3); however, with differences in the degree of correlation (test dataset: $\rho=0.90$ (Pen), $\rho=0.70$ (DAsp); decomposed dataset: $\rho=0.68$ (Pen), $\rho=0.59$ (D-Asp)) (Fig. 2). The lower p values are due to a higher scattering of the values

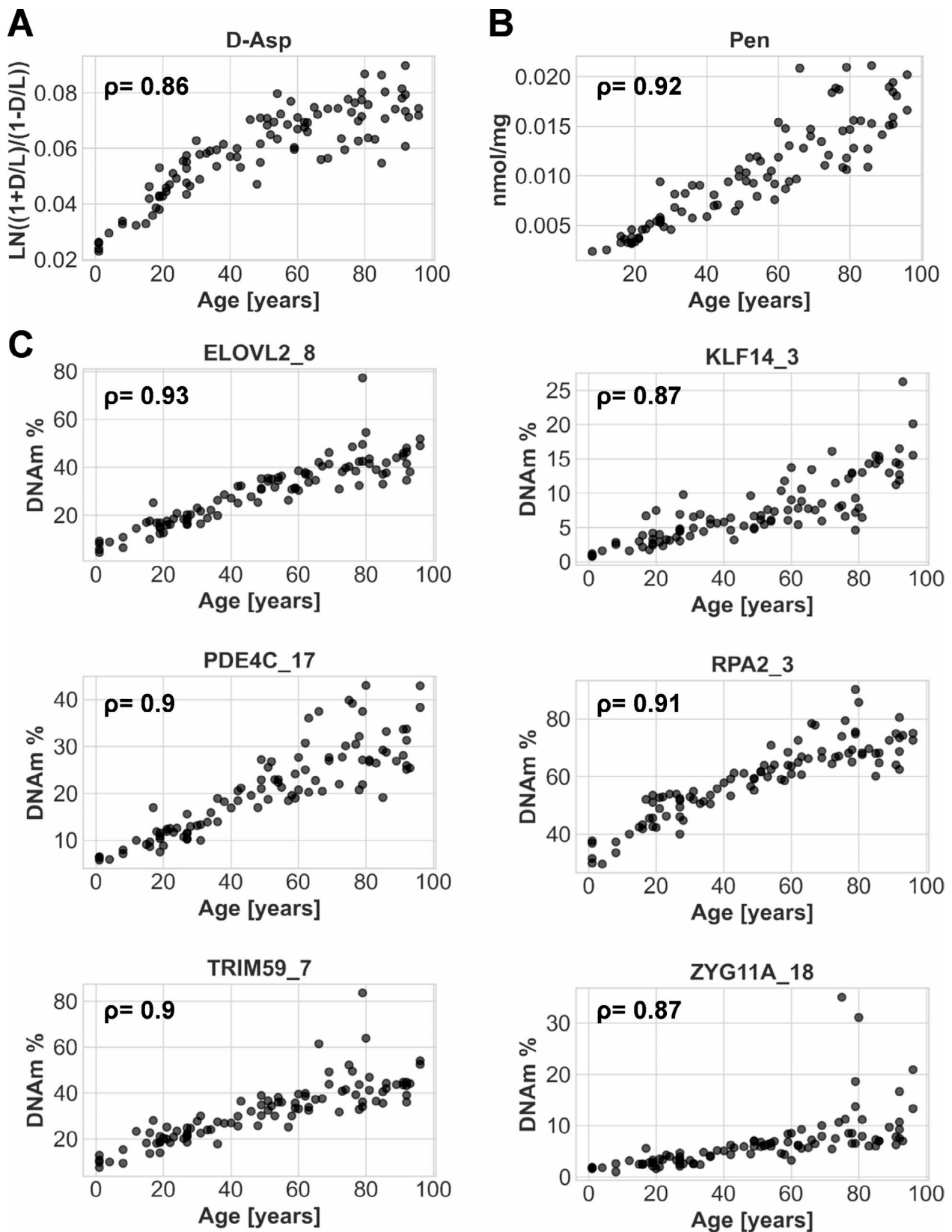


Fig. 1 Results of the selected age-dependent protein and DNA methylation markers in training data ($n=98$; cf. Suppl. Table S1A). Accumulation of D-Asp (A) and Pen (B). In case of Pen, values are missing

due to detection limits for most of the under 15 years old. (C) DNA methylation levels for the final selected CpG sites from six amplicon regions. ρ : Spearman's rho. D: D-Asp, L: L-Asp

for both parameters increasing substantially with age with a downward trend for some samples. In the case of DNAm, the same trends were observed. The age dependence was verified for all six markers with the test data ($p=0.79\text{--}0.89$) and the decomposed samples ($p=0.4\text{--}0.73$). Here, higher variability was observed for the older individuals and the decomposed samples, too. The downward trend was less distinct, but also visible except for KLF14.

Age prediction models based on training data and cross validation

Composition of training data set and hyperparameter optimization for model development

As Pen evaluation was difficult for samples under 18 years (no results in eight cases) and to avoid bias in the development of machine models buildings due to the restricted sample numbers for individuals below age, only individuals equal or above 18 years from dataset 1 were included in the training data set. Therefore, 86 samples were finally included for model(s) development. Ridge regression (RR), a type of linear regression, was chosen as underlying algorithm for the age prediction model, as it is a suitable model in case of a possible multicollinearity (correlation between the independent used markers) and avoiding overfitting by inclusion of a regularization term (penalty term α -L2). In the first step, hyperparameter optimization was conducted to determine the best L2 (α) value for each model by CV analysis. As the value did not show a strong impact and was always close to five, the final $\alpha=5$ was chosen for all RR models.

Single-molecular clock models

RR models (10times 10-fold CV) for D-Asp, Pen, and DNAm were built and evaluated (based on the CV) on the 86 training data samples. The resulting mean MAEs and RMSEs can be found in Table 1. The best age prediction results were obtained for the DNAm marker set (MAE: 4.95 years, RMSE: 6.89 years). Protein marker-based RR models revealed MAEs/ RMSEs of 9.66 years/ 11.52 years (Pen) and 11.91 years/14.47 years (D-Asp). As expected due to observed values and known accumulating inter-individual differences with increasing age, the MAE and RMSE show different accuracies considering only prediction results within specific age groups (Suppl. Table S3).

Combined molecular clocks

In addition, four combinations of the three molecular clocks were used for the construction and evaluation of the RR

models (Table 1). Especially, the combination of the Pen and D-Asp markers in one RR model showed an improvement on the overall MAE (8.55 years) and RMSE (10.18 years), while the combination of the protein markers with the DNAm markers did not reveal a general advantage (MAE/RMSE 4.86 years/ 6.81 years (D-Asp + DNAm), 4.91 years/ 6.72 years (Pen + DNAm), 4.93 years/ 6.63 years (DAsp + Pen + DNAm) within the CV-evaluated data. However, it has to be considered that the DNAm analysis includes six markers that enter into the RR model as individual independent markers and therefore have an overall higher impact on the model. As for the single molecular clock RR models, higher MAEs and RMSEs were obtained with increasing age (Suppl. Table S3).

Age prediction of independent samples from individuals with and without signs of decomposition

The individual and combined RR models were tested on the independent datasets using, as in the training dataset, individuals ≥ 18 years (dataset 2: $n=44$, individuals without signs of decomposition and dataset 3: $n=48$, individuals with signs of decomposition). The MAE and RMSE results obtained of dataset 2 are comparable to the CV evaluation (Table 1; Fig. 3), with even slightly better results for Pen and D-Asp. This could be explained by small differences in the composition of the datasets and single outlier samples. The age prediction of dataset 3 samples revealed an overall lower prediction accuracy, except for D-Asp. Accuracy was especially decreased by the strong underestimation of age in a subset of samples. (Fig. 3).

Deeper investigation of samples from individuals with signs of decomposition

The state of decomposition of the individual from which the bone sample originates could influence the age accuracy achieved via a prediction model. Suppl. Fig. S2A shows all prediction results of the single molecular clocks and of the overall combined RR model in dependence on the d-score. No systematic directional shift to under- or over-prediction dependent on the decomposition was observed (Suppl. Fig. S2B). Also, no statistically significant correlation was found between the absolute prediction error and the dscore for the RR models based on DNAm ($p=0.2$, $p=0.30$), Pen ($p=0.005$, $p=0.97$), D-Asp ($p=-0.2$, $p=0.30$), and the combined RR model DNAm + Pen + D-Asp ($p=0.16$, $p=0.38$) (Suppl. Fig. S2C).

A comparison of the results of each single-molecular age prediction RR model (DNAm, Pen, and D-Asp), and the DNAm + DAsp + Pen combined RR model was performed for the total body dscore (Suppl. Fig. S3A, C, E) and

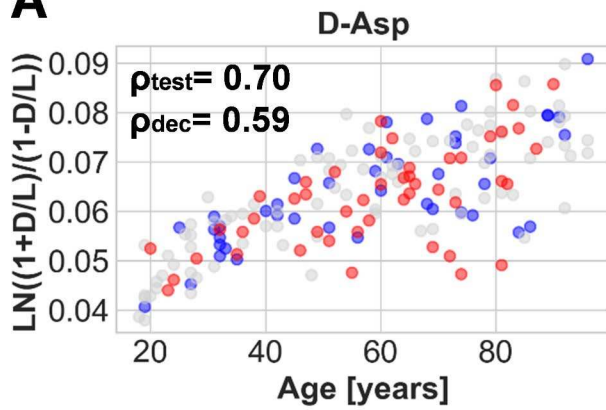
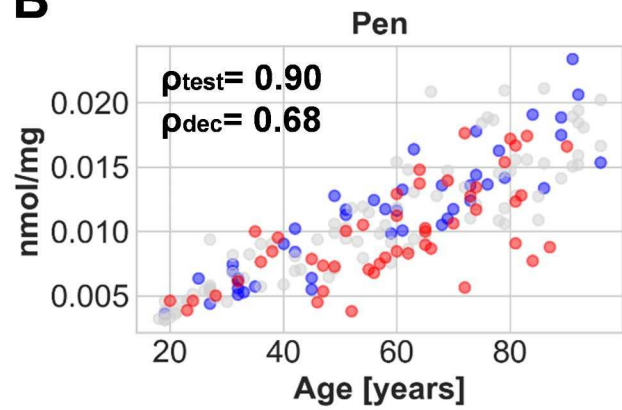
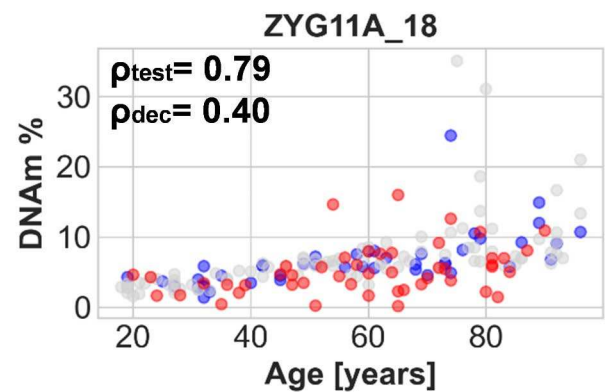
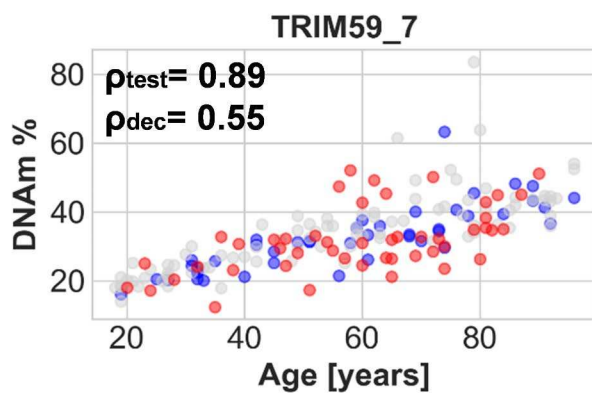
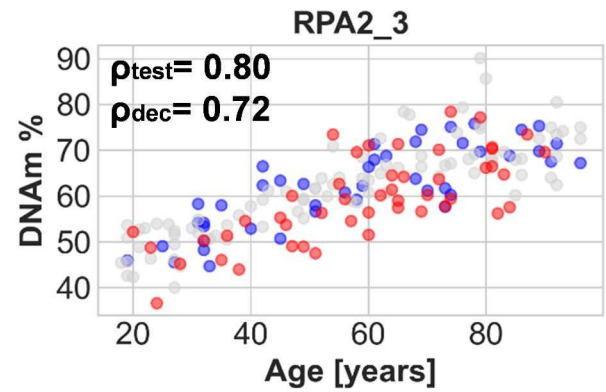
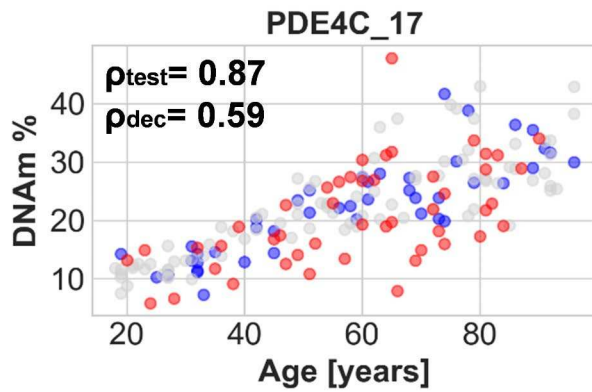
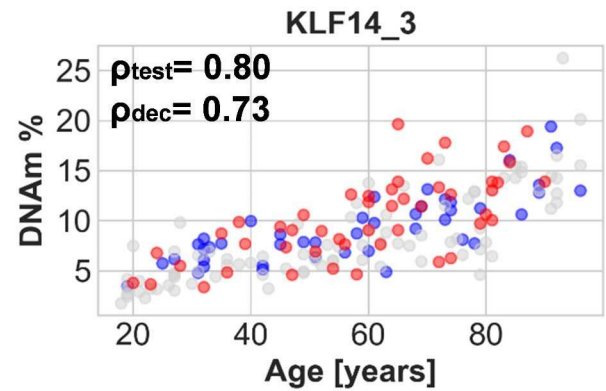
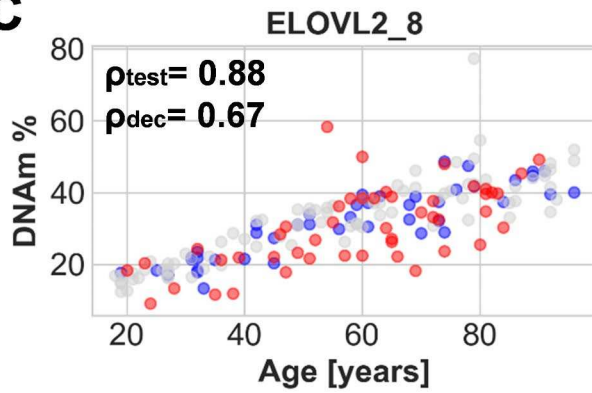
A**B****C**

Fig. 2 Results of the selected age-dependent protein and DNA methylation markers. The training data (Dataset 1 with age ≥ 18 (grey, $n=86$)), independent data (dataset 2, samples without signs of decomposition (blue, $n=44$) and dataset 3, samples with signs of decomposition (red, $n=48$)). Accumulation of D-Asp (**A**) and Pen (**B**). DNA methylation levels for the final selected CpG sites from six amplicon regions (**C**). ptest: Spearman's rho dataset 2 (no signs of decomposition), pdec: Spearman's rho dataset 3 (decomposed samples). D: D-Asp, L: L-Asp, DNAm: DNA methylation

head-specific d-score (Suppl. Fig. S3B, D, F). The calculation of the difference of the absolute prediction error for each sample between the single RR models (DNAm, Pen, DAsp, respectively) and the combined model for total body d-score as well as head-specific d-score revealed that the combination was partially able to improve the age prediction.

As for individuals without signs of decomposition, the highest improvement in prediction accuracy for individuals with signs of decomposition was obtained in the combined model compared to individual D-Asp and Pen RR models (Suppl. Fig. S3A-D). In case of DNAm, in which the sole DNAm RR model revealed a similar overall accuracy to the combined model, a deeper analysis was performed to investigate if the combination could improve prediction in single cases. In 13 of 48 samples, an improvement on the age prediction accuracy (at least 2 years better prediction) was observed by the marker combination. However, the use of the combined model also reduced the accuracy in case of 8 samples (Suppl. Fig. S3E, F). Due to the lower values of D-Asp and Pen in a subset of samples in 6 of 8 samples, the decrease in accuracy and a stronger underestimation of the age than in the case of the DNAm-based age prediction model are explicable. Yet, the combination with the proteins generally does not lead to a stronger underestimation compared to the DNAm RR model. In 7 of the 13 cases with improved prediction, inclusion of the protein parameters increased the calculated age, leading to a lower absolute error. For the two protein clocks, an improvement was obtained by the combination of all molecular clocks for 34 (Pen) and 30 (D-Asp) samples out of 48 samples, and a decrease in accuracy was obtained in 9 (Pen) and 11 (D-Asp) samples (Suppl. Fig. S3A-D). Overall, the amount (years) of improvement was higher compared to the amount of decrease.

However, investigating the results in dependence on the d-score on a single case basis rather than a systematic improvement or bias, especially in the case of samples with an overall high total body d-score greater than 15 or head-specific d-score greater than 6, an improvement was visible for the combined RR model compared to the DNAm RR model. Within this study, no limit for a minimal amount of DNA was set for further processing to allow better research on the variation observed in challenging samples. Unsurprisingly, a higher variation in the deviations between

chronological and predicted age can be attributed to the lower DNA content. In these cases, the combination (or sole) analysis of the protein markers was beneficial (Suppl. Fig. S4A-C).

For the proteins, improvement and decrease were not associated with specific d-score ranges. Considering the d-score, and the comparison of the D-Asp RR model and combined RR model, a slight tendency to less improvement was seen by combination of the molecular clocks for very strongly decomposed individuals (Suppl. Fig. S3A, B). Considering that the DNAm + Pen + D-Asp RR model improved age prediction for samples with very low DNA content compared to the DNAm RR model, it could be assumed that the Pen RR model or D-Asp RR model could even be more advantageous without additional inclusion of DNA in these cases. However, as can be seen in Suppl. Figures S4A, B, no clear conclusion can be drawn from the samples within this study, as the addition of the DNAm analysis was still advantageous in roughly half of the cases with very low DNA content compared to a pure D-Asp RR model or Pen RR model.

We further investigated, if an RR model developed with samples from individuals with signs of decomposition as training data might optimize the overserved decreased accuracy by inclusion of the variation due to decomposition. As the number of decomposed samples was restricted in this study, a leave-one-out CV (LOOCV) approach was chosen for evaluation (Fig. 4; Table 2, Suppl. Table S3) and should be considered as a pilot model with need of further research. The developed RR model specifically trained with samples of individuals with signs of decomposition led to an improvement in overall accuracy compared to the predictions based on the model trained on samples from individuals without signs of decomposition (cf. Figure 3; Table 1).

Discussion

The methodological possibilities for chronological age prediction of a deceased person depend on the availability of the biological material. Skull bone is among the most commonly found bone type and age-dependent accumulation of molecular markers like Pen and D-Asp as well as changes in the DNAm level could therefore be useful for age prediction [37]. As interindividual variations are known for all chronological age markers [47, 48], a combined analysis could be beneficial. For this purpose, we investigated age-dependent changes in these three molecular clocks, developed age prediction RR models, investigated the improvement of age prediction by combination, and examined whether samples from individuals with signs of decomposition can also be analyzed. To achieve this, parietal bones from deceased individuals without and with signs of decomposition were

Table 1 MAEs and RMSEs for training data (age ≥ 18 of dataset 1), test data (dataset 2) and individuals with signs of decomposition (dataset 3). The results are based on 10times 10-fold CV ridge regression model development and evaluation for D-Asp, Pen and DNAm, as well as combinations. CV=cross validation, MAE=Mean absolute error, RMSE=root mean square error, CI=confidence interval, D-Asp=accumulation of D-aspartic acid, Pen=accumulation of pentosidine, DNAm=DNA methylation

Marker combination	10-times 10xCV Training data (dataset 1, $n=86$)		Individuals without signs of decomposition Test data (dataset 2, $n=44$)		Individuals with signs of decomposition (dataset 3, $n=48$)	
	Mean MAE CV ($\pm 95\%$ CI)	Mean RMSE CV ($\pm 95\%$ CI)	MAE [years]	RMSE [years]	MAE [years]	RMSE [years]
	[years]	[years]				
D-Asp	11.91 (11.3–12.5)	14.57 (13.9–15.3)	11.72	14.57	11.68	15.42
Pen	9.66 (9.3–10.0)	11.52 (11.1–12.0)	7.72	9.26	11.77	15.07
DNAm	4.95 (4.6–5.3)	6.89 (6.4–7.4)	5.48	6.56	7.38	10.39
D-Asp + Pen	8.55 (8.2–8.9)	10.18 (9.7–10.6)	7.16	9.16	10.81	14.08
D-Asp + DNAm	4.86 (4.5–5.2)	6.81 (6.3–7.3)	5.39	6.5	7.07	9.81
Pen + DNAm	4.91 (4.6–5.2)	6.72 (6.2–7.2)	5.1	6.36	7.02	9.39
D-Asp + Pen + DNAm	4.93 (4.6–5.2)	6.63 (6.1–7.1)	5.11	6.34	6.8	9.08

collected and the DNAm of 6 CpG sites in *ELOVL2*, *KLF14*, *PDE4C*, *RP22*, *TRIM59*, and *ZYG11A* was analyzed using MPS, and the amount of D-Asp and Pen was determined by HPLC. To the best of our knowledge, this is the first study to examine age prediction using DNAm, D-Asp and Pen for samples in different stages of decomposition in bone.

Age-dependent changes in D-Asp, Pen and DNA methylation

The samples included in dataset 1 ($n=98$) were used to characterize the age-dependent molecular clocks D-Asp, Pen and DNAm (i.e., included CpG sites) in bone (cf. Figure 1). One limitation was that the Pen accumulation during life was below the detectable threshold for some individuals under the age of 18 years.

Age-dependence was verified in bone with $\rho > 0.8$ in all markers, however, with a lower age-dependent correlation for D-Asp ($\rho=0.86$) compared to previous studies using highly bradytrophic and homogeneous tissues, such as dentine (Pearson $r=0.96$ – 0.99 [9, 12, 13, 49]). The age-dependent correlation for Pen was comparable to results for dentine (Pearson $r=0.94$ [12, 15]).

Differences in the results for the protein parameters in total dentine and total bone can be explained by very different turnover rates in these tissues. Although dentine and bone share structural and functional similarities like the collagen matrix and the mineral content, after initial formation during tooth development, mature dentine is a very bradytrophic tissue with (almost) no turnover through which its protein composition stays largely unchanged [50] resulting in a close relation between D-Asp and Pen levels to age [12] even by analyzing total tissue.

Bone tissue on the other hand undergoes constant remodeling through a balanced process of old bone resorption and new bone replacement described as bone turnover rate (%)

rebuilt bone per year) and is influenced by e.g., diseases, stress, overall fitness, and hormonal influences [51]. It depends on bone type and is highest at sites where trabecular bone predominates and lowest at sites with a lot of cortical bone [4, 5]. In our study, we investigated skull bone samples having a higher density of cortical bone material and therefore a lower turnover rate [5]. However, with increasing age, the bone structure and metabolism change, resulting in loss of bone mass, decreasing thickness and osteoporosis [16, 18, 26]. It can therefore be assumed that the composition of the organic bone protein matrix varies, especially in old age, with each protein having its own kinetics for the accumulation of D-Asp and Pen, depending on its structure and metabolism. Consequently, variation in the protein composition through changes in bone metabolism as well as degradation of a total bone protein sample strongly impacts the D-Asp and Pen content of a total protein mixture. The only solution is the purification of individual long-living proteins. The analysis of D-Asp in purified osteocalcin from skull bones proves this theory with a very high correlation between D-Asp content in purified osteocalcin and age (Pearson $r=0.99$ [52]). So far, only osteocalcin has been identified as a suitable bone protein; however, its purification is very challenging. The identification of further suitable proteins and the establishment of practicable methods for protein purification is an important research goal. We confirmed the results from our pilot study (D-Asp $\rho=0.9$; Pen $\rho=0.9$) investigating bone samples from 15 individuals [37]. It has to be mentioned that a comparison between studies is limited as sample ranges, age composition within the dataset, and the used correlation parameter can be discrepant between studies.

Also the observed Spearman's correlation values for the DNAm markers ($\rho=0.87$ – 0.93) were within the ranges of the pilot study ($\rho=0.9$ – 0.93 [37]), although, the final 'best' CpG site was not the same in all cases. It would also be

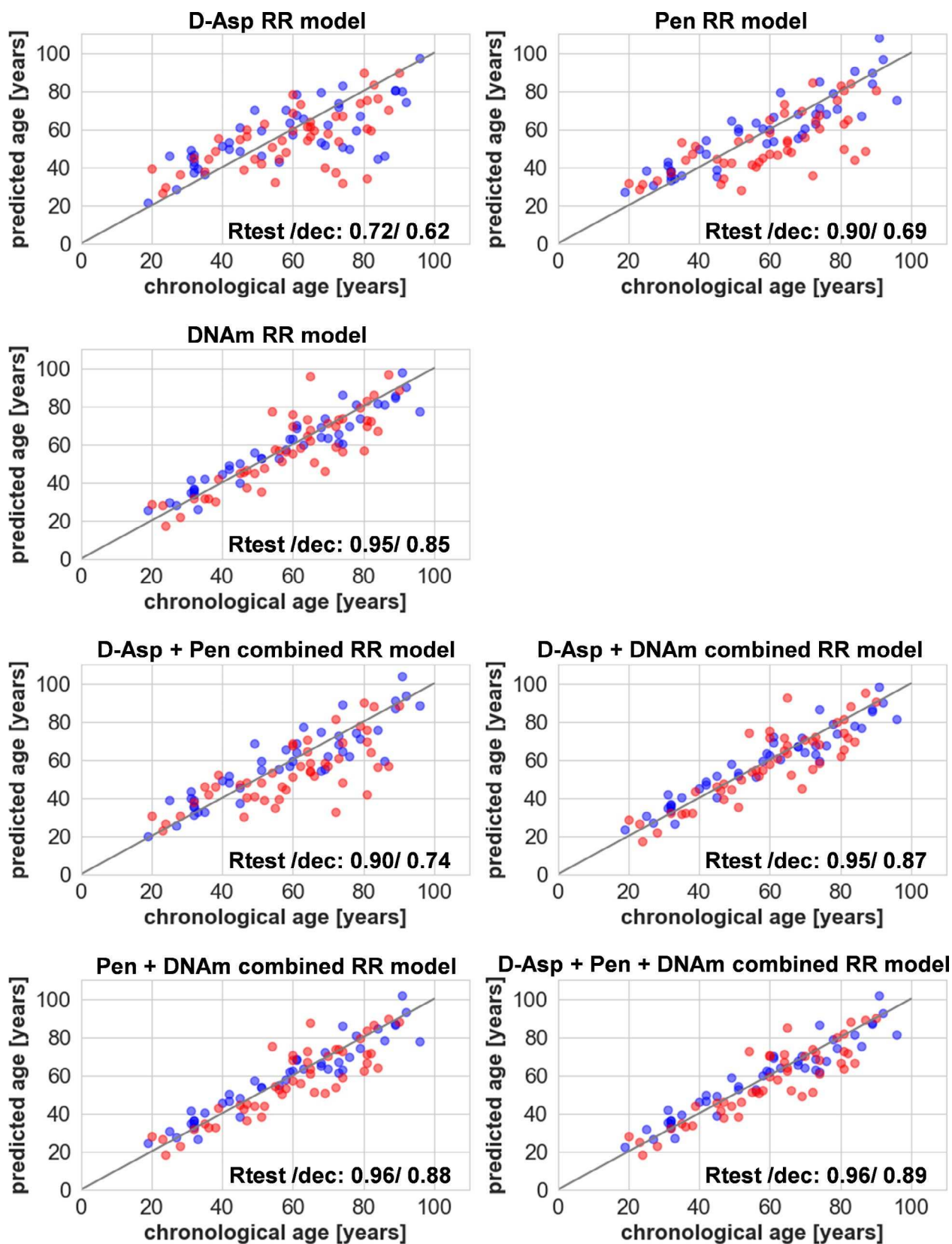


Fig. 3 Age predictions results for individuals of dataset 2 (individuals without signs of decomposition (blue)), and dataset 3 (individuals with signs of decomposition (red)). The RR models were developed

with the training set. cf. Table 1. Rtest: dataset 2 (no signs of decomposition), dec: dataset 3 (with signs of decomposition); RR=ridge regression

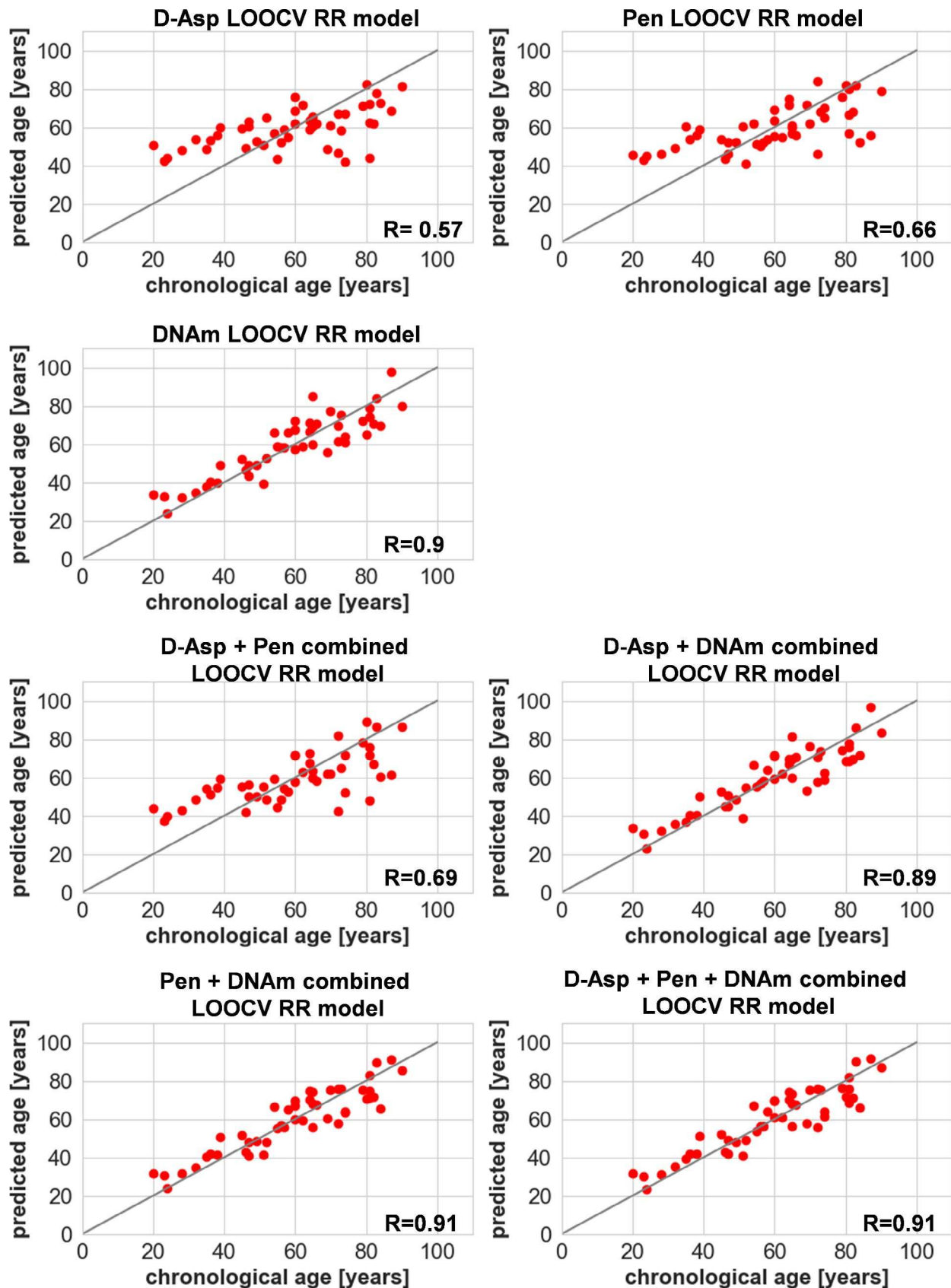


Fig. 4 LOOCV ridge regression model for dataset 3 (decomposed samples). Results of LOOCV age predictions for the different marker combinations used for model building, $n = 48$, cf. Table 2; LOOCV = leave-one-out cross validation, RR = ridge regression

Table 2 MAE and RMSE results of the leave-one-out-CV model trained with samples of individuals with signs of decomposition. LOOCV=leave-one-out-cross validation, MAE=Mean absolute error, RMSE=Root Mean Square Error, D-Asp=accumulation of D-aspartic acid, Pen=accumulation of pentosidine, DNAm=DNA methylation

Marker combination	Individuals with signs of decomposition LOOCV (<i>n</i> = 48)	
	MAE [years]	RMSE [years]
D-Asp	11.94	14.88
Pen	10.88	13.67
DNAm	6.56	8.09
D-Asp + Pen	10.4	13.07
D-Asp + DNAm	6.44	8.1
Pen + DNAm	6.11	7.39
D-Asp + Pen + DNAm	6.19	7.61

possible, to use neighboring CpG sites as an alternative, as these often had similar correlation values. Slight fluctuations can be caused by sample size and age composition under study. Other studies have also analyzed DNAm in bone samples and revealed age-dependent changes [22, 38, 39, 53, 54]. Furthermore, the six genomic regions show age-dependent correlation in a wide range of other tissues and are (with different intensity) implemented in multiple age predictions models [30]. Although DNAm was a more accurate marker for age prediction, inter-individual variation increased with age, and outliers occurred. The observed age dependence may (partly) also be explained by changes in metabolism and turnover with increasing age caused by possible shifts in cell-type composition and cell function in dependence on the above-mentioned factors.

Age prediction based on three biological age estimators

For the development of the RR models, only samples of the collected individuals equal to and above 18 years were used as the training dataset (*n* = 86). Furthermore, two independent test datasets (individuals without signs of decomposition: *n* = 44, individuals with signs of decomposition: *n* = 48) were used to test the RR models. The RR models based on Pen and D-Asp in total protein samples resulted for the training data using CV in a mean MAE/ mean RMSE of 9.66 years/ 11.52 years (Pen), and 11.91 years/ 14.57 years (D-Asp). The results for D-Asp and Pen do not measure up compared to the data for dentine and purified osteocalcin from skull bone [12, 15, 52]. However, the known methodological approaches for purifying osteocalcin are very complex and can currently hardly be used in forensic practice. Given this context, total protein samples were analyzed here. The DNAm approach led to a lower mean MAE mean RMSE of 4.95 years/ 6.89 years and was therefore

more accurate compared to the protein-based parameters (Δ MAE of 5 years and 7 years). These results were confirmed by the independent test set (cf. Table 1). In a previous study based on dentine, age prediction models were developed that led to MAEs of 2.93 years for D-Asp and 3.41 years for Pen [12]. First, DNAm age prediction models were developed, having e.g., in the study of Woźniak et al. (2021), an MAE of 3.3 years and 3.4 years in the training and test dataset by analysis of occipital and femoral bone material [38]. Differences in the MAEs compared to previous studies may be partly due to increased ages included in our study. The studies mentioned before included samples from individuals under 80 years (with the exception of one training sample in the study of Woźniak et al. (2021)) [22, 38, 39, 53, 54]. In our study, all predictions models led to an increased MAE and RMSE in the older age groups, with a particularly strong decreased accuracy in the 80+ year's age category (cf. Suppl. Table S3). As in case of other age prediction models based on molecular markers, the higher uncertainty in case of older individuals should be considered. For better interpretation of the obtained results, reporting of age group-dependent model evaluations parameters as presented in Suppl. Table S3 can be therefore helpful. In addition, information as the percentage of the correct predictions within a case-dependent useful interval (e.g. 61.4% $\pm$ 5 years) could be added.

Advantage of using combined models

The combination of Pen and D-Asp for development of a RR model increased the overall accuracy (training set CV: MAE 8.55 years, RMSE 10.18 years, test set: MAE 7.16 years, RMSE 9.16 years). The usefulness of this approach has already been demonstrated by combining the D-Asp and Pen content for age prediction in dentine obtaining a decrease in MAEs from 2.93 (D-Asp) and 3.41 years (Pen) to 2.68 years (combined) [12], observing the same effect for more complex tissues such as intervertebral discs and epiglottis [33]. Considering the single-molecular clock models, the accuracy (evaluated as MAE/RMSE) of the DNAm-based model was superior to that of the protein-based age prediction in total protein samples. Combining the DNAm with either D-Asp, Pen, or D-Asp and Pen did not show an improvement in overall accuracy considering individuals without signs of decomposition. Nevertheless, this does not exclude an improvement in single cases as the MAE and RMSE evaluate the model performance based on all test data results. Therefore, the conclusion that isolated DNAm would always be sufficient in specific individual cases could be too short-sighted. The inclusion of the protein levels (as well as the inclusion of DNAm in protein models) might be useful in order to outbalance influences like lifestyle, health

status, and numerous diseases [14, 31, 32]. Further research is needed to investigate the not yet well understood impact of these different factors on chronological age prediction models to define guidelines for in which cases a combination might be (dis) advantageous.

Impact of post-mortem changes on age prediction

In a next step, we examined samples with early to severe signs of decomposition and the effect on the prediction accuracies. In our study, all three molecular clocks were successfully analyzed. However, with even longer postmortem intervals, reliable and accurate DNAm may be difficult. Bone proteins may be quite well preserved for a long time [55–57]. Nevertheless, postmortem degradation of proteins that change the overall composition of total bone samples may be a problem, if total bone samples (and not defined, purified proteins) are analyzed. In dentine, Pen could be stable over very long PMIs up to thousands of years (at least in dentine), which would enable a wide application range of age estimation based on this parameter also in the anthropological-archaeological context [58]. It remains to be clarified whether this also applies to bones.

For all parameters, a moderate correlation with age was observed ($\rho(\text{Pen})=0.68$, $\rho(\text{D-Asp})=0.59$, $\rho(\text{DNAm}(6\text{CpGs}))=0.4\text{--}0.73$), which was lower compared to the samples from individuals without signs of decomposition (cf. Figures 1 and 3). The biggest differences were observed for the markers with the highest correlation value (ρ) in individuals without signs of decomposition: Pen ($\Delta\rho$ 0.22), ELOVL2 ($\Delta\rho$ 0.21), PDE4C ($\Delta\rho$ 0.28), TRIM59 ($\Delta\rho$ 0.34), and KLF14 ($\Delta\rho$ 0.39). The results can mainly be attributed to increased variation of single samples. This variation is also visible for the other markers, but has less impact on the correlation value (ρ) due to an already higher variation in individuals without signs of decomposition. More research is needed to explicitly determine the underlying biological and technical causes (of which some are discussed below). An overall lower accuracy with MAEs of 11.77 years (RMSE 15.07 years) for Pen and 11.68 years (RMSE 15.42 years) for D-Asp was obtained. The DNAm model still performed better with an MAE of 7.38 years (RMSE 10.39 years) compared to the protein-based parameters but less accurate than testing bones without signs of decomposition. A slight improvement was obtained for the RMSE (10.39 years (DNAm) vs. 9.08 years (combined)) by the combination of the three molecular clocks (cf. Table 1). The slightly greater drop of the RMSE compared to the MAE (7.38 years (DNAm) vs. 6.8 years (combined)) may give an indication that especially outliers in the age prediction were reduced, which was the case in samples with very

low DNA content (cf. Suppl. Figure 4C). An analysis of more samples is needed to support this indication.

The overall reduced accuracy in the age prediction based on the molecular clock models in decomposed individuals could be caused by postmortem changes like deterioration of the mineral phase and microbiological invasion which results in chemical and biological degradation of the organic bone matrix. In the absence of functional enzymatic repair mechanisms cellular components and DNA degrade due to their limited chemical stability [59, 60]. This leads to a change of the cell type composition and the amount and quality of DNA available for DNAm analysis.

Although bone proteins may be quite well preserved for a long time [55–57], postmortem degradation of proteins may significantly change the overall composition of total bone samples to a mixture of preserved proteins and fragments of broken proteins. This has direct implications on the overall contents of D-Asp and Pen, since they are analyzed as “summary values” in total protein samples. The even higher scattering of the data for older individuals could be related to a pre-existing intravital, age-related degradation of the organic bone matrix, which could result in a higher vulnerability against postmortem influences.

Additionally, the overall impaired tissue and cell structure in decomposed samples might have an impact. Especially for DNAm, a difference in the obtained DNAm values between individuals with and without signs of decomposition might occur due to the analysis process. As decalcification and multiple washing steps are part of the analysis, therefore a destroyed or altered cell structure could lead to a specific ‘wash away’ effect changing the cell type composition analyzed in the final eluate. Moving forward, extensive research is needed in the future to investigate the impact of the discussed degradation processes potentially interfering with accurate age prediction.

To get first research insight, if it could be beneficial to include the very heterogeneous biological as well technical variation caused by decomposition in the training data of a model, pilot RR models were built for age prediction of individuals with signs of decomposition. Within this model, the d-score was not yet included, as not enough samples covered all d-scores in sufficient amount. The overall visible state of decomposition of the body (total body d-score) and head (head d-score (cf. Suppl. Table S1B)) do not necessarily align with the decomposition state of specific tissues such as the bone material itself. As observed before, no correlation was seen between the d-score and the age prediction deviation (Suppl. Fig. S2). Overall, the pilot LOOCV RR models improved the prediction accuracy and outbalanced the previously observed downward trend (cf. Figure 4), but should be considered with caution as more research and

samples are needed for a better understanding of all influences and to build a reliable model.

Considerations and limitations of the developed models

The developed models are based on the results of the analyzed samples and might be influenced by that. Next to the biological facts impacting the results, the used technical procedures can lead to variation, limits, and to study-specific results which are presented below.

Sample collection and preparation

Although the samples in this study were taken from strictly standardized areas (*Os Parietale*) at the same anatomical location, there could be differences and some heterogeneity between the cancellous and cortical portions within a bone fragment analyzed [61]. An additional factor causing variations in the proportion of cortical and cancellous bone is aging itself as described above [16]. This raises the question of whether different bone pieces from the same general location show intra-individual differences. Furthermore, variation between measurements even from the same fragment can occur because of stochastic effects (molecules analyzed) and technical fluctuations, which should be part of future research. Furthermore, our results cannot be automatically transferred to other bone types analyzed (e.g. femur, an often-occurring sample type in forensic casework). A study by König et al. (2023) observed differences in the age-dependent accumulation of D-Asp and Pen between three bone types (skull, rib, clavicle), which could be due to differences in the structure and metabolism of the various bone types from different anatomical regions, leading to different protein compositions and thus to variations in D-Asp and Pen levels of the samples [62]. The resulting impact on age prediction models has to be further investigated and will also depend on the strategy of the model development (e.g. choice of mathematical model, inclusion of sampling location).

As the analysis of all molecular markers depends on sample preparation, the use of another sample preparation before analysis could lead to differences. As described above, e.g. longer incubation steps for bone decalcification or increased wash steps prior to DNAm analysis might lead to ‘wash-away’ effects and change cell type composition. Furthermore, blood cells in small capillaries and the remaining bone marrow cannot be excluded as trabecular bone was not removed.

Technical challenges

The data used for model development are based on D-Asp, Pen and DNAm analysis and technical variation has to be considered. Within this study, standardized methods were used for all samples to harmonize analysis over all three datasets. Technical variation was reduced to a minimum by using enough material e.g. to allow a DNA input of at least 10 ng in the PCR, reducing stochastic variation. Nevertheless, as shown especially for the decomposed individuals, that was not always possible. Furthermore, the harsh process of bisulfite conversion increases DNA degradation with a higher impact on DNAm analysis in case of already pre-degraded samples. These effects remain a challenge in case of DNAm analysis from degraded and low DNA amounts increasing stochastic variation during DNAm analysis.

In case of protein analysis, technical variation can also arise by a too low powder amount (optimal amount in our study was identified with 20 mg) for a sufficient signal quantity for evaluation. Furthermore, the technical threshold for detection of the protein accumulation resulted e.g. in detection challenges for the Pen accumulation in minors. More sensitive methods might help in the future to overcome that problem.

Model development and evaluation

The presented models and results are based on the choice of six CpG sites, two protein markers and ridge regression as underlying mathematical model. The included CpG sites showed age-dependency, and the mathematical model showed suitability, however the use or addition of other sites and optimization of the mathematical model might be able to improve the model.

The models developed during this study are based on samples from deceased individuals and therefore limited in material available, leading to a model excluding individuals under 18 years of age. This decision was made to exclude a bias due to imbalance of number of individuals per age category and in addition due to the fact, that the interpretational threshold did not allow a reliable quantification of the Pen amount for all individuals under the age of 18 years. Within the study, sex balance between females and males as well as equal balance over the whole age group could not be completely achieved. A potential impact of the sex needs further consideration and deeper analysis with more samples. Furthermore, the composition of dataset 3 including individuals with signs of decomposition is biased toward a higher age due to the circumstance that younger individuals are less often found in a (highly) decomposed state. Further collection of samples of specific ages and decomposition state could help to improve model building in the future.

Conclusion

In summary, molecular age prediction on skull bone is possible across all parameters examined. The DNAm-only model (6 CpGs) provided the best results. The protein-based parameters D-Asp and Pen yield (in the here analyzed total protein samples) weaker results than DNAm using univariate models; however, it should be noted that the “single” DNAm molecular clock model is based on 6 CpGs. An approach to more reliable results based on protein parameters could be the implementation of protein purification; the development of viable methods for protein purification could enable significantly more precise age diagnoses. By combining the parameters in postmortem age prediction in which decomposition results in an additional layer of variability biological material, age prediction models including multiple molecular clocks could provide improved accuracy due to the inclusion of independent parameters. Further research is needed to investigate in depth if the combination can compensate internal and external factors that influence single molecular clocks.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00414-024-03314-z>.

Acknowledgements We are grateful to Bärbel Seeling (Duesseldorf) and Tanja Wangler (Freiburg) for excellent technical assistance. We thank the Baden-Württemberg Stiftung for funding L.S. in the research grant Eliteprogramm für Postdoktorand*innen of J.N.

Author contributions Study design and supervision: J. Naue, S. Ritz; experiments: J. Becker, J. Naue, L. Schmelzer, V. Bühler; data analysis: J. Becker, J. Naue, A. Reckert, S. Ritz; model development: J. Naue, S. (B) Eickhoff; manuscript draft and finalization: J. Becker, J. Naue; manuscript revision: J. Becker, J. Naue, V. Bühler, L. Schmelzer, A. Reckert, S. B. Eickhoff, S. Ritz; sample resources: J. Becker, S. Ritz.

Funding This work was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG RI 704/8–1 | NA 1578/2–1). Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Declarations

Ethics approval All procedures performed in studies involving human tissue were in concordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards (approved by Ethics Committee at the Medical Faculty of Heinrich-Heine University Dusseldorf: 6191R). This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Conflict of interest There are no conflicts of interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the

source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Villagran XS, Huisman DJ, Mentzer SM, Miller CE, Jans MM (2017) Bone and Other Skeletal Tissues. *Archaeological Soil and Sediment Micromorphology*. pp. 9–38. <https://doi.org/10.1002/9781118941065.ch1>
- Schmelting A, Dettmeyer R, Rudolf E, Vieth V, Geserick G (2016) Forensic age estimation. *Deutsches Arzteblatt Int* 113:44–50. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0044>
- 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>
- Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A (2020) The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. *Front Pharmacol* 11:757. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
- Niu Y, Du T, Liu Y (2023) Biomechanical characteristics and analysis approaches of bone and bone substitute materials. *J Funct Biomaterials* 14:212. <https://doi.org/10.3390/jfb14040212>
- Niyibizi C, Eyre DR (1994) Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem* 224:943–950. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00943.x>
- Geiger T, Clarke S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J Biol Chem* 262:785–794
- Chen S, Lv Y, Wang D, Yu X (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>
- 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>
- Ritz-Timme S (1999) Lebensaltersbestimmung Aufgrund Des Razemisierungsgrades Von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche. Schmidt-Römhild
- Pilin A, Čabala R, Pudil F, Bencko V (2001) The Use of the D-, L- aspartic ratio in decalcified collagen from human dentin as an estimator of human age. *J Forensic Sci* 46:1228–1231. <https://doi.org/10.1520/jfs15126j>
- 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*. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14704>
- 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>
- Li H, Yu SJ (2018) Review of pentosidine and pyrroline in food and chemical models: formation, potential risks and determination. *J Sci Food Agric* 98:3225–3233. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8853>

15. 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* 132:799–805. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1671-x>
16. Corrado A, Cici D, Rotondo C, Maruotti N, Cantatore FP (2020) Molecular basis of bone aging. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21103679>
17. Park-Min KH (2019) Metabolic reprogramming in osteoclasts. *Semin Immunopathol* 41:565–572. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00757-0>
18. Reppe S, Datta H, Gautvik KM (2015) The influence of DNA methylation on bone cells. *Curr Genom* 16:384–392. <https://doi.org/10.2174/1389202916666150817202913>
19. 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>
20. Gómez R, Barter MJ, Alonso-Pérez A et al (2023) DNA methylation analysis identifies key transcription factors involved in mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biol Res* 56:9. <https://doi.org/10.1186/s40659-023-00417-6>
21. Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14:R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
22. 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>
23. Jintaridh P, Tungtrongchitr R, Preutthipan S, Mutirangura A (2013) Hypomethylation of Alu elements in post-menopausal women with osteoporosis. *PLoS ONE* 8:e70386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070386>
24. Delgado-Calle J, Fernández AF, Sainz J et al (2013) Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 65:197–205. <https://doi.org/10.1002/art.37753>
25. Garcia-Gomez A, Li T, de la Calle-Fabregat C et al (2021) Targeting aberrant DNA methylation in mesenchymal stromal cells as a treatment for myeloma bone disease. *Nat Commun* 12:421. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20715-x>
26. Fang H, Deng Z, Liu J, Chen S, Deng Z, Li W (2022) The mechanism of bone remodeling after bone aging. *Clin Interv Aging* 17:405–415. <https://doi.org/10.2147/cia.S349604>
27. Ciccarone F, Tagliatesta S, Caiafa P, Zampieri M (2018) DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms? *Mech Ageing Dev* 174:3–17. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.12.002>
28. Refn MR, Kampmann ML, Morling N, Tfelt-Hansen J, Børsting C, Pereira V (2023) Prediction of chronological age and its applications in forensic casework: methods, current practices, and future perspectives. *Forensic Sci Res* 8:85–97. <https://doi.org/10.1093/fsr/owad021>
29. 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>
30. Naue J (2023) Getting the chronological age out of DNA: using insights of age-dependent DNA methylation for forensic DNA applications. *Genes Genomics* 45:1239–1261. <https://doi.org/10.1007/s13258-023-01392-8>
31. 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>
32. 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* 134:2215–2228. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02375-0>
33. 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* 134:721–733. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02054-9>
34. 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 International: Genet* 33:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.005>
35. Cho S, Jung SE, 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>
36. Marquez-Ruiz AB, Gonzalez-Herrera L, Luna JD, Valenzuela A (2020) DNA methylation levels and telomere length in human teeth: usefulness for age estimation. *Int J Legal Med* 134:451–459. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02242-7>
37. Becker J, Naue J, Reckert A, Böhme P, Ritz-Timme S (2021) Nutzung Von Altersinformationen Aus Posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNA-Methylierung zur Postmortalen Lebensaltersschätzung. *Rechtsmedizin* 31:234–242. <https://doi.org/10.1007/s00194-021-00489-2>
38. Wozniak A, Heidegger A, Piniewska-Rog D et al (2021) Development of the VISAGE enhanced tool and statistical models for epigenetic age estimation in blood, buccal cells and bones. *Aging* 13:6459–6484. <https://doi.org/10.18632/aging.20278339>
39. Naue J, Sanger 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.07.00740>
40. Megyesi MS, Nawrocki SP, Haskell NH (2005) Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. *J Forensic Sci* 50:618–626
41. Heems D, Luck G, Fraudeau C, Vérette E (1998) Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in food, beverages and feedstuff. *J Chromatogr A* 798:9–17. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01007-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01007-8)
42. Rohland N, Reich D (2012) Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Res* 22:939–946. <https://doi.org/10.1101/gr.128124.111>
43. Krueger F, Trim Galore! https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
44. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A (2013) PEAR: a fast and accurate Illumina paired-end reAd mergeR. *Bioinformatics* 30:614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
45. W.Z. (2017) - Bioinformatics, biscuit: BISulfite-seq CUI Toolkit. <https://github.com/zwdzwd/biscuit>
46. Ryan D (2017) MethylDackel: A (mostly) universal methylation extractor for BS-seq experiments. <https://github.com/dpryan79/MethylDackel>
47. Khan SS, Singer BD, Vaughan DE (2017) Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell* 16:624–633. <https://doi.org/10.1111/acer.12601>
48. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S (2017) Biological age predictors. *EBioMedicine* 21:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.046>
49. Ritz S, Schütz H, 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* 105:289–293. <https://doi.org/10.1007/BF01370387>
50. MacDougall MJ, Javed A (2010) Dentin and Bone: Similar Collagenous Mineralized Tissues, in Bone and Development, F. Bronner, M.C. Farach-Carson, and H.I. Roach,

- Editors. Springer London: London. pp. 183–200. https://doi.org/10.1007/978-1-84882-822-3_11
51. Pignolo RJ, Law SF, Chandra A (2021) Bone aging, Cellular Senescence, and osteoporosis. *JBMR Plus* 5. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10488>
 52. Ritz S, Turzynski A, Schütz H, Hollmann A, Rochholz G (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(1–2):13–26. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01834-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01834-4)
 53. Correia Dias H, Corte-Real F, Cunha E, Manco L (2020) DNA methylation age estimation from human bone and teeth. *Australian J Forensic Sci* 1–14. <https://doi.org/10.1080/00450618.2020.1805011>
 54. Gopalan S, Gaige J, Henn BM (2019) DNA methylation-based forensic age estimation in human bone. <https://doi.org/10.1101/801647>
 55. Collins MJ, Penkman KEH, Rohland N et al (2009) Is amino acid racemization a useful tool for screening for ancient DNA in bone? *P Roy Soc B-Biol Sci* 276:2971–2977. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0563>
 56. Dobberstein RC, Collins MJ, Craig OE, Taylor G, Penkman KEH, Ritz-Timme S (2009) Archaeological collagen: why worry about collagen diagenesis? *Archaeol Anthropol Sci* 1:31–42. <https://doi.org/10.1007/s12520-009-0002-7>
 57. Dobberstein RC, Huppertz J, von Wurmb-Schwark N, Ritz-Timme S (2008) Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Sci Int* 179:181–191. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.05.017>
 58. Mahlke N, 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* 135:1–9. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02522-1>
 59. Turner-Walker G (2008) *The Chemical and Microbial Degradation of Bones and Teeth*
 60. Pérez-Martínez C, Pérez-Cárceles MD, Legaz I, Prieto-Bonete G, Luna A (2017) Quantification of nitrogenous bases, DNA and collagen type I for the estimation of the postmortem interval in bone remains. *Forensic Sci Int* 281:106–112. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.10.039>
 61. Currey JD (2002) *Bones: structure and mechanics*. Princeton University Press
 62. König L, Becker J, Reckert A, Ritz-Timme S (2023) Molecular age estimation based on posttranslational protein modifications in bone: why the type of bone matters. *Int J Legal Med* 137:437–443. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-02948-9>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4 Diskussion

4.1 Die Auswahl der optimalen Methode zur Lebensaltersschätzung kann im Einzelfall eine Herausforderung sein

Ritz-Timme et al. (2000) definierten in der Publikation „*Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practice*“ [8] wegbereitend spezifische Anforderungen an Methoden zur forensischen Altersschätzung und identifizierten die Methoden, die diese Anforderungen zum damaligen Zeitpunkt erfüllen konnten. Neben definierten Kriterien wie einer nachgewiesenen Validität sowie Reliabilität der publizierten Datensätze, forderten Ritz-Timme et al. klare Informationen bezüglich der Streubreite der Datensätze und der Genauigkeit der individuellen Schätzung sowie die Erforschung des Einflusses möglicher Störgrößen [8].

Methoden der forensischen Lebensaltersschätzung haben sich in den letzten Jahrzehnten signifikant weiterentwickelt und diversifiziert. Bis Ende des 20. Jahrhunderts wurden überwiegend morphologische Methoden zur forensischen Lebensaltersschätzung genutzt; zu jener Zeit war die Altersschätzung anhand des D-Asparaginsäuregehalts im Dentin die einzige molekulare Methode, die den strengen forensischen Auswahlkriterien zur benötigten möglichst präzisen Schätzung des Lebensalters standhalten konnte [155].

Seitdem hat sich das wissenschaftliche Feld rasant erweitert, insbesondere durch die Entdeckung der DNA-Methylierung als zuverlässigen Biomarker für Alter und Alterung [82]. Unter Berücksichtigung der genannten, von Ritz-Timme et al. (2000) formulierten Anforderungen geben Böhme et al. (2021) in ihrem Artikel „*Molecular methods for age estimation: The current state of the art in relation to specific demands of forensic practice*“ [83] eine Orientierung über den aktuellen Stand der molekularen Altersschätzung.

Trotz dieser wichtigen Übersichtsarbeiten ist es für forensische Praktiker/-innen heute eine Herausforderung, den Überblick über geeignete Methoden zu behalten und die optimale Methode für einen spezifischen Fall mit seinen besonderen Fragestellungen, Bedingungen und Anforderungen zu finden. Die Genauigkeit von Verfahren zur Lebensaltersschätzung nimmt – unabhängig von den genutzten Parametern - aufgrund der komplexen Alterungsprozesse und der Anhäufung störender Einflussfaktoren mit zunehmendem Alter ab. Die Erforschung externer sowie interner Einflussfaktoren ist lange noch nicht abgeschlossen.

Zudem werden verschiedene Maße für Schätzfehler wie den Mittleren Absoluten Fehler (MAE), die Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers (RMSE), den Standardfehler der Schätzung (SEE) usw. in der Literatur verwendet, was keinen einheitlichen Vergleich der Methoden ermöglicht und meist wenig bis keinen Rückschluss auf die Fehlerbreite im Einzelfall zulässt [83, 156].

Der spezifische Einzelfall zielt auf das Szenario der „unbekannten Leiche“ ab – und in solchen Fällen ist es meist kaum abschätzbar, ob es intravitale (oder auch postmortale) Faktoren gibt, die die Qualität einer Altersschätzung beeinträchtigen könnten. Vor diesem Hintergrund ist es naheliegend, für Altersschätzungen nicht nur einen Parameter zu verwenden, sondern mehrere Parameter, die möglichst unabhängig voneinander sind und verschiedenen biologischen Ebenen zugeordnet werden können.

Bei der Auswahl des Verfahrens zur Altersschätzung und der zu erhebenden Parameter spielen in der forensischen Praxis insbesondere auch die Folgen postmortaler Vorgänge eine wichtige Rolle. Entscheidende Fragen sind dabei, ob geeignete Gewebe (noch) verfügbar sind und ob die untersuchten Parameter robust gegenüber postmortalen Einflüssen sind.

4.2 Eignung der als Untersuchungsgut gewählten Gewebe zur postmortalen Lebensaltersschätzung über molekulare Verfahren

Eine breite Anwendbarkeit von Ansätzen zur postmortalen Altersschätzung setzt voraus, dass auch in Fällen eine möglichst präzise Lebensaltersschätzung möglich ist, in denen nur (noch) bestimmte Gewebe zur Verfügung stehen. Publikationen 1-3 belegen das grundsätzliche Potential der vier verschiedenen untersuchten postmortal verhältnismäßig stabilen Gewebe (Epiglottis, Achillessehne, Bandscheibengewebe sowie Schädelknochen) zur molekularen Altersschätzung auf Basis der drei Parameter Pen, D-Asp und DNAm [1-3]. Wie gut sich die jeweiligen Gewebe zur Schätzung des Lebensalters über Pen, D-Asp und DNAm eignen, hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab.

4.2.1 Proteinbasierte Verfahren (auf Basis von D-Asp, Pen)

Die in Publikation 3 [3] altersabhängige Korrelation des D-Asp-Gehalts ($p=0.86$) sowie der Pen Konzentration ($p=0.92$) der Proben von Spendern ohne makroskopische Autolyse- sowie Fäulnisveränderungen ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus Schädelknochen der Studie von König et al. (p D-Asp=0.84, p Pen=0.95; [104]). In beiden Studien zeigt sich eine mit zunehmendem Lebensalter steigende Streuung des D-Asp-Gehalt als auch der Pen Konzentration bei Analyse von Gesamtprotein des Knochens. Die Problematik einer hohen Streuung der proteinbasierten Parameter in höherem Alter im Knochen ist auf Veränderungen der organischen Knochenmatrix und entsprechend der Proteinkomposition zurückzuführen [3].

Knochen ist dynamisch und wird kontinuierlich durch Knochenaufbau (Osteoblasten) und -abbau (Osteoklasten) erneuert (beschrieben als Knochenumsatzrate in % wiederaufgebauter Knochen pro Jahr) [157]. Die Knochenumsatzrate variiert je nach Alter, Geschlecht, Aktivität und Gesundheitszustand. Bei Kindern und Jugendlichen ist sie etwa dreimal höher als bei Erwachsenen [158]. Gesunde Erwachsene (über 30 Jahre) haben eine Rate von 5-10% pro Jahr, die mit dem Alter abnimmt. Bei älteren Menschen, besonders postmenopausalen Frauen, kann sie unter 5% fallen [159]. Der Knochenumsatz wird zudem durch Faktoren wie Ernährung, Hormone, körperliche Aktivität und Gesundheitszustand beeinflusst [159]. Erkrankungen, die zu einem Abbau des Knochens führen können, umfassen u.a. Störungen der Schilddrüse, hormonelle Störungen, Osteoporose, entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und ein Mangel an Vitamin-D [160-163]. Mit zunehmendem Alter verändern sich Knochenstruktur und -stoffwechsel, was zu Knochenmasseverlust durch Abnahme der Trabekeldicke und -anzahl sowie Schwund des kortikalen Knochens führt [164].

Weiter variiert die Umsatzrate je nach Knochentyp und ist an Stellen mit überwiegend trabekulärem Knochen am höchsten, während sie an Stellen mit viel kortikalem Knochen am niedrigsten ist [157]. Diese Beobachtung machten König et al. (2023) in ihrer Studie in der sie Unterschiede in der altersabhängigen Akkumulation von D-Asp und Pen zwischen drei Knochentypen (Schädel, Rippe, Schlüsselbein) feststellten. Diese Unterschiede könnten auf die Struktur und den Stoffwechsel der verschiedenen Knochentypen aus unterschiedlichen anatomischen Regionen zurückzuführen sein, was zu unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen und damit zu Schwankungen der D-Asp- und Pen-Konzentrationen in den Proben führt [104].

Die Dynamik des kontinuierlichen Knochenumbaus und die sich ändernde Proteinzusammensetzung erschweren präzise Altersschätzungen v.a. basierend auf den einzelnen Parametern D-Asp und Pen, jedoch auch bei Nutzung der DNAm im höheren Lebensalter [3].

Nach derzeitigem Kenntnisstand stellt die Analyse aufgereinigter Proteine eine Lösung dar. Bisher ist nur ein stabiles Protein im Knochen bekannt, dass vergleichsweise präzise Lebensaltersschätzungen auf Basis von D-Asp auch in höherem Lebensalter liefern kann. Ritz et al. (1996) konnten bei Analyse von D-Asp in aufgereinigtem Osteocalcin aus Knochenproben eine enge Korrelation zwischen dem D-Asp-Gehalt und dem Alter (Pearson $r = 0.99$ [99]) feststellen.

Osteocalcin ist ein nicht-kollagenes Protein, das von Osteoblasten produziert wird und kann posttranslational zwei verschiedene Strukturen zeigen. Das Peptid kann posttranslational vollständig (alle drei Glutamyreste) oder nur teilweise (0 bis 2 Glutamyreste) carboxyliert werden [165, 166]. Die vollständig carboxylierte Form des Osteocalcins wird in die extrazelluläre Knochenmatrix zusammen mit Calcium eingelagert und ist für die parallele Ausrichtung des Hydroxylapatit zu den längs des Knochens gelegenen Kollagenfibrillen verantwortlich. Dies gewährleistet die optimale Festigkeit des Knochens und mechanische Stabilität [167].

Das nur teilweise oder untercarboxylierte Osteocalcin wird aufgrund seiner unstrukturierten, zufälligen Konformation nicht in die extrazelluläre Knochenmatrix eingelagert, sondern in den Blutkreislauf freigesetzt und ist eine im Knochen nur temporär vorhandene Form [168, 169]. Die genaue Funktion des untercarboxylierten Osteocalcins ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es werden hormonartige Funktionen zur Regulierung des Energiestoffwechsels, der männlichen Fertilität sowie der Gehirnfunktion und der Entwicklung beschrieben [166].

Die fest im Knochen gebundene, vollständig carboxylierte Form scheint, trotz Schwankungen des Osteocalcingehalts im Knochengewebe je nach Geschlecht und Alter [170, 171], permanent zu sein und ist daher nach Aufreinigung für eine Lebensaltersschätzung auf Basis von D-Asp nutzbar [99].

Die spezifische Aufreinigung von Proteinen und im speziellen von Osteocalcin ist jedoch bis heute sehr zeitaufwändig und komplex, sodass diese allenfalls einzelnen spezialisierten Laboren vorbehalten bleibt. Zukünftig sollte in die Optimierung einer Methode zur einfachen Osteocalcin-Aufreinigung investiert werden, da Knochen das häufigste Untersuchungsmaterial für die Identifikation unbekannter Verstorbener darstellen.

Auch die Lebensaltersschätzung durch D-Asp und Pen in Weichgeweben wie dem Anulus fibrosus von Bandscheiben sowie der Epiglottis bietet grundsätzlich Potential für die forensischen Praxis [1]. Allerdings unterliegt die Gewebekomposition in diesen Geweben im Laufe des Lebens komplexen Veränderungsprozessen, die die Genauigkeit solcher Schätzungen beeinflussen können.

In der Jugend und im frühen Erwachsenenalter sind die Gewebe hoch regenerationsfähig und elastisch, da aktive Fibroblasten reichlich z.B. Kollagen und Elastin produzieren [172]. Im mittleren Erwachsenenalter nimmt die Zellaktivität ab, die Kollagen- und Elastinproduktion wird reduziert und die extrazelluläre Matrix erfährt strukturelle Veränderungen. Im höheren Alter sind degenerative Veränderungen ausgeprägter: Die Fibroblastenaktivität und die Kollagen- und Elastinproduktion nehmen stark ab, was zu einem Verlust an Elastizität und Festigkeit führt [172]. Lebensstil, Umwelt- und genetische Faktoren beeinflussen diese Prozesse zusätzlich [173]. Diese resultierenden Unterschiede in der Gewebekomposition zwischen jungen und alten Proben führen zu unterschiedlichen Proteinkompositionen, die bei der Lebensaltersschätzung über D-Asp und Pen zu großen Streubreiten im höheren Alter führen können: Die in Publikation [1] dargestellten Daten für Bandscheiben zeigen das Problem (altersbedingter) Degeneration im Gewebe für molekulare Marker wie D-Asp und Pen, obwohl Kollagen aufgereinigt wurde. Proben von Verstorbenen bis zu einem Lebensalter von etwa 40/50 Jahren zeigen eine lineare Korrelation zwischen D-Asp bzw. Pen mit dem Alter. In höheren

Lebensaltern streuen die Daten enorm - bedingt durch die Analyse eines Gemisches aus „gealterten“ sowie zwischenzeitlich neu synthetisierten Proteinen (durch Reparaturmechanismen) und den daraus - je nach Zustand des Gewebes - resultierenden variierenden D-Asp- sowie Pen Konzentrationen. Theoretisch könnten wesentlich präzisere Ergebnisse erzielt werden, wenn Proben mit degenerativen Veränderungen ausgeschlossen würden, wie von Ritz und Schütz [102] und Pilin et al. [103] vorgeschlagen. Dies würde jedoch die Anwendbarkeit der Methode erheblich einschränken, da eine fortgeschrittene Degeneration im höheren Alter naturgemäß häufig ist.

Auch die dargestellten Daten für Epiglottis aus Publikation 1 [1] bestätigen das Problem degenerationsbedingter Veränderungen des Gewebes im Laufe des Lebens. Auch hier ist eine Zunahme der Streuung der Daten sowohl bei D-Asp als auch bei Pen in höherem Lebensalter zu sehen, die zu einer geringeren Präzision bei Lebensaltersschätzungen führt. Die Epiglottisproben wurden hier nicht makroskopisch nach Degenerationsgrad klassifiziert, doch bestätigen andere Studien die histologische und mikroskopisch messbare Sichtbarkeit degenerationsbedingter Veränderungen in höherem Lebensalter: Serikawa et al. (2023) untersuchten nach Hämatoxylin-Eosin-, Elastica-van-Gieson- und immunhistochemischen Färbeverfahren Chondrozyten, Bindegewebe und Drüsengewebe unter dem Epiglottisepithel. Sie beobachteten eine erhöhte Menge an Kollagenfasern im Sinne einer Fibrose. Gleichzeitig konnten sie Anzeichen einer Atrophie der Speicheldrüsen feststellen, während das Fettgewebe im Bereich der Epiglottis zunahm [174]. Kano et al. (2005) untersuchten altersbedingte Veränderungen der Epiglottis anhand makroskopischer und mikroskopischer Messungen. Mit zunehmendem Lebensalter beobachteten sie signifikante Zunahmen von Kalziumablagerungen im Epiglottisknorpel, insbesondere bei Männern über 80 Jahren. Zudem nahm die Dicke des Knorpels zu, während die Zelldichte abnahm und ein Rückgang der elastischen Fasern zu sehen war, was auf degenerative Prozesse hinweist. Zudem wiesen Männer oft ausgeprägtere altersbedingte Veränderungen auf als Frauen [175].

Zusammenfassend hängt die Eignung von Geweben zur proteinbasierten Lebensaltersschätzung stark von deren Komplexität, Stoffwechselaktivität und Proteinzusammensetzung ab. Die Analyse homogenerer und extrem bradytropher Gewebe wie Dentin ermöglicht präzisere Ergebnisse (s. Abschnitt 1.4.1), während komplexere und dynamischere Gewebe wie Knochen, Epiglottis-, Achillessehnen- und Bandscheibengewebe eine größere Herausforderung darstellen. Ziel der weiteren Entwicklung proteinbasierter Methoden muss die Aufreinigung geeigneter Proteine aus solchen komplexeren Geweben sein, um Analysen an Proben mit definierter Proteinkomposition über die gesamte Lebensspanne zu ermöglichen. Erst über die Aufreinigung geeigneter Proteine kann das volle Potenzial (einzeln genutzter) proteinbasierter molekularer Verfahren zur forensischen Lebensaltersschätzung umfänglich genutzt werden.

Derzeit sollten vorherige histologische Untersuchungen durchgeführt werden, um den degenerativen Zustand des Gewebes und somit das Risiko der Beeinflussung des Ergebnisses einer Altersschätzung durch Gewebsveränderungen bzw. die Nutzbarkeit des Gewebes zur Schätzung des Lebensalters beurteilen zu können.

4.2.2 Verfahren auf Basis der DNAm

Die Eignung von robusten Geweben zur postmortalen Lebensaltersschätzung auf Basis der DNA-Methylierung ist eng mit der postmortalen Erhaltung der Qualität und Quantität der DNA in einem Gewebe verknüpft. Voraussetzung für den Einsatz eines Gewebes für die Altersschätzung auf Basis der DNAm ist das Vorhandensein ausreichend intakter DNA.

Die Eignung verschiedener Knochentypen zur Lebensaltersschätzung auf Basis der DNAm konnte neben der hier durchgeführten Studie an Schädelknochen (Os parietale) [3] bereits gezeigt werden: es wurden Femur [117], Femurschaft und Schädelknochen (Os occipitale) [116] sowie Rippenknochen [118, 176] untersucht.

Wenn Knochen (und auch Zähne) aus stark belasteten Proben oder Proben mit einem langen postmortalen Intervall (z.B. archäologische Funde, forensische Fälle mit fortgeschrittenen Fäulnisveränderungen und/oder ungünstigen Umgebungsbedingungen) stammen, liefern sie häufig DNA von geringerer Qualität [177]. Solche Proben können fragmentierte oder degradierte DNA enthalten, was die Analyse der DNA-Methylierung erschwert. Hier müssen teilweise optimierte Methoden der bereits komplexeren Verfahren zur Extraktion der DNA aus mineralisierten Geweben verwendet werden, um genügend intakte DNA für eine zuverlässige Methylierungsanalyse zu gewinnen [177].

Auch Bandscheiben-, Epiglottis- und Achillessehngewebe weisen durch ihre bradytrophen Eigenschaften und ihrem hohen Anteil an Knorpel- und/oder Faserstrukturen gute Bedingungen zum langen Erhalt intakter Zellen auf. Die potentielle Eignung von Knorpel zur postmortalen Altersschätzung wurde außer in unserer Pilotstudie [2] bisher nur für (hyalinen) Rippenknorpel untersucht [122, 123]; für Epiglottis-, Bandscheiben- und Sehngewebe legte bislang nur unsere Arbeitsgruppe Daten vor [2]: Für den Annulus Fibrosus sowie die Achillessehne konnte bereits eine postmortale Stabilität der DNA belegt werden; auch bei fortgeschrittenem postmortalem Zustand konnte noch eine ausreichende Menge an intakter DNA zur weiteren DNAm Analyse nachgewiesen werden [178, 179].

Um das volle Potenzial der DNAm-basierten Lebensaltersschätzung in der forensischen Praxis auszuschöpfen, sollten zukünftig möglichst robuste Marker identifiziert werden, die möglichst unabhängig von nicht-altersbedingten Einflüssen sind. Gleichzeitig sollten Methoden zur Verbesserung der DNA-Extraktion und -Aufbereitung aus verschiedenen Gewebetypen weiterentwickelt werden, um auch bei stark belasteten Probenmaterialien zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.

4.3 Robustheit der untersuchten molekularen Parameter gegenüber postmortalen Einflüssen

Für den Einsatz molekularer Verfahren zur Altersschätzung an fortgeschritten postmortal veränderten Verstorbenen gibt es vergleichsweise wenige Daten. Publikation 3 ist die erste Studie, in der die Altersvorhersage anhand von DNAm, D-Asp und Pen für Knochenproben von Verstorbenen in verschiedenen Stadien der Fäulnis untersucht wurde. Alle drei molekularen Parameter (DNAm, D-Asp, Pen) wurden erfolgreich analysiert [3]. Bei noch längeren postmortalen Intervallen (als den beschriebenen) könnte v.a. die Degradation der DNA zum Problem für eine zuverlässige DNAm-Analyse werden, da postmortale Intervalle bis 50 Jahre forensische Relevanz besitzen (s. Abschnitt 1.1).

Von dieser Problematik berichteten bereits Koop et al. (2020), die die Anwendbarkeit des Ansatzes von Mundschleimhautabstrichen als DNA-Quelle bei 73 Verstorbenen in verschiedenen Stadien der Fäulnis sowie einer Kontrollgruppe von 142 Wangenabstrichen lebender Probanden testeten. Die Methylierungswerte wiesen sowohl bei Proben von lebenden Individuen ($r^2 = 0.85-0.87$) als auch bei Proben verstorbener Personen eine enge Korrelation mit dem Alter auf ($r^2 = 0.90$), unabhängig vom Stadium der Fäulnis. Nur in Fällen fortgeschrittener

Fäulnis mit extrem geringen DNA-Mengen war eine Lebensaltersschätzung auf Basis der DNAm nicht möglich [114].

Ein ähnliches Bild zeigte sich anhand der in Publikation 3 erhobenen Daten: Bei der Analyse von Proben von Leichen in verschiedenen Stadien der Fäulnis reduzierten sich die Fehler bei Einsatz des kombinierten Modells (D-Asp + Pen + DNAm) im Vergleich zur Nutzung des reinen DNAm Modells; dabei zeigte sich eine stärkere Reduktion des RMSE im Vergleich zum MAE [3]. Im Gegensatz zum MAE berücksichtigt der RMSE verstärkt Ausreißer. Aufgrund dessen kann dies als Hinweis gewertet werden, dass insbesondere Ausreißer in der Altersvorhersage durch die proteinbasierten Parameter D-Asp und Pen reduziert wurden: dieser Befund war bei Proben mit sehr geringem DNA-Gehalt evident. Um diese Annahme zu bestätigen, bedarf es jedoch einer höheren Fallzahl [3].

Im Vergleich zur DNA bleiben die Strukturproteine des Knochens länger erhalten, sodass auf posttranslationalen Proteinmodifikationen basierende Methoden wie die Akkumulation von Pen und die Akkumulation von D-Asp auch länger möglich sein können.

Dobberstein et al. (2008) untersuchten die Degradation von Biomolekülen, u.a. von Kollagen, in künstlich und natürlich gealterten Zähnen und deren Auswirkungen auf Methoden zur Altersschätzung mittels D-Asp sowie auf genetische Analysen. Das Kollagen in Zähnen zeigte eine bemerkenswerte Stabilität, selbst unter harschen künstlichen Bedingungen (Erhitzen bei 90 °C). Während der durchgeführten Degradations-Experimente nahm der Kollagengehalt ab, die Aminosäurezusammensetzung blieb jedoch über lange Zeiträume konsistent. Auch in natürlich gealterten Zähnen blieb die Aminosäurezusammensetzung lange stabil und die typischen Kollagenmuster blieben lange erhalten. D-Asp in Dentin kann demnach für forensisch relevante Zeiträume (s. Abschnitt 1.1) unter „normalen“ postmortalen Bedingungen als zuverlässiger Parameter für die Altersschätzung angesehen werden.

Bei längerem postmortalem Intervall müssen die Ergebnisse von Lebensaltersschätzungen basierend auf D-Asp besonders kritisch hinterfragt werden, da es nach langer Zeit durch postmortale Proteinabbauprozesse zu einer beschleunigten Razemisierung von Asp kommen kann [106].

Diese Ergebnisse wurden in einer Studie von Mahlke et al. (2021) bestätigt: Sie untersuchten die molekularen Parameter D-Asp sowie Pen in modernen sowie archäologischen Zähnen mit der Frage, ob das Lebensalter zum Todeszeitpunkt auch nach Jahrtausenden noch aufgrund dieser Parameter geschätzt werden kann. Während die Schätzung des Lebensalters auf Basis von D-Asp bei den sehr alten Proben (1400 bis 8800 Jahren Liegezeit) zu falsch hohen Schätzungen führte, wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass Pen in Dentin über sehr lange postmortale Intervalle bis zu Tausenden von Jahren stabil sein könnte. Die Ergebnisse der Altersschätzungen auf Basis von Pen aus Dentin lagen nicht nur in einem realistischen Bereich, sondern waren in den untersuchten Fällen nahezu deckungsgleich mit dem jeweils morphologisch geschätzten Lebensalter [105]. Beispielsweise wurde Probe 1 durch D-Asp auf 74.26 Jahre geschätzt, während die Schätzung über Pen ein Alter von 13.97 Jahren ergab, was zu den Ergebnissen morphologischer Methoden (Schätzung auf ca. 15 bis 18 Jahre) passte.

Möglicherweise eröffnet die beschriebene Stabilität von Pen einen weiteren Anwendungsbe- reich des Parameters zur Altersschätzung auch im anthropologisch-archäologischen Kontext.

Die molekulare Lebensaltersabschätzung bei fortgeschritten postmortal veränderten Verstorbenen ist ein herausforderndes Feld, da bisher wenig über die Einflüsse postmortaler Veränderungen und anderer einwirkender Umweltfaktoren (s. Abschnitt 1.4) auf die molekularen

Parameter bekannt ist. Zudem sind Einflüsse wie Liegezeitbedingungen oder Erkrankungen in der forensischen Praxis beim Fund unbekannter Verstorbener oft nicht bekannt.

Während die Möglichkeiten der Altersschätzung auf Basis von DNAm bei fortgeschrittener Fäulnis durch Degradation und Verlust von DNA eingeschränkt sein kann, bieten die proteinbasierten Parameter durch längere Stabilität zumindest in Dentin und unter „normalen“ Liegebedingungen offenbar eine vielversprechende Grundlage für zuverlässigere Altersschätzungen selbst über größere bis sehr große postmortale Intervalle hinweg. Weitere Forschung ist erforderlich, um dies auch in anderen Geweben zu untersuchen und die Frage zu klären, ob die Kombination verschiedener molekularer Parameter dazu beitragen kann, negative Effekte postmortaler Einflussfaktoren zu detektieren und auszugleichen.

4.4 Multivariate Analyse von Parametern – Die Lösung für alles?

Die vorliegende Arbeit fußt auf der Hypothese, dass durch eine *Machine Learning* basierte Kombination von Parametern altersunabhängige (z.B. durch antemortale Erkrankungen oder postmortale Einflüsse bedingte) Einflüsse auf die Lebensaltersschätzung über molekulare Methoden ausgeglichen werden können. Diese Hypothese wurde für die Verknüpfung der Parameter D-Asp, Pen und DNAm an verschiedenen Geweben derselben Spender untersucht. Dabei wurde die Verknüpfung von proteinbasierten Verfahren wie D-Asp und Pen sowie der DNAm zum ersten Mal zur Entwicklung multivariater Modelle basierend auf *Machine Learning* Algorithmen zur Lebensaltersschätzung in verschiedenen Geweben eingesetzt.

Die in Publikation 1 präsentierten Daten zeigen, dass durch Kombination von zwei molekularen Methoden (D-Asp, Pen) in zwei komplexen Geweben (Bandscheibe, Epiglottis) von 95 Individuen bereits eine signifikante Steigerung der Genauigkeit einer postmortalen Altersschätzung (v.a. in höherem Alter) durch *Machine Learning* basierte Modelle erzielt werden kann. Als zusätzliche Variablen wurden der makroskopisch erkennbare Degenerationsgrad der Bandscheibe sowie das Vorliegen eines Diabetes mellitus (wenn bekannt) mit in die Modellberechnung einbezogen. Die mittleren absoluten Fehler (MAE) der univariaten Modelle lagen zwischen 7.5 und 11.0 Jahren; dagegen lagen die MAE multivariater Modelle unter Kombination verschiedener Parameter zwischen 4.0 bis 6.3 Jahren [1].

Für Publikation 3 wurden zum ersten Mal D-Asp, Pen sowie DNAm (6 CpG-Stellen in *ELOVL2*, *KLF14*, *PDE4C*, *RPA2*, *TRIM59* und *ZYG11A*) in Proben des Schädelknochens von Spendern mit unterschiedlich langem postmortalem Intervall analysiert. Eine so umfassende Analyse postmortaler Einflüsse auf die untersuchten Parameter war bislang noch nicht verfügbar. Anhand von Proben von Spendern ohne makroskopisch erkennbare postmortale Veränderungen wurden sowohl uni- als auch multivariate Altersvorhersagemodelle mithilfe eines *Machine Learning* Algorithmus entwickelt. Die MAE der univariaten Modelle lagen zwischen 5.48 Jahren (DNAm), 7.72 Jahren (Pen) sowie 11.72 Jahren (D-Asp). Die Kombination der Pen- und D-Asp-Marker in einem Modell zeigte eine Verbesserung des Gesamt-MAE (7.16 Jahre) v.a. im Vergleich zum univariaten Modell von D-Asp und dem univariaten Modell von Pen. Die Kombination der Proteinmarker mit den DNAm-Markern ergab keinen Vorteil im Vergleich mit „reinen“ DNAm-Modellen (verschiedene Kombinationen von D-Asp, Pen und DNAm: MAE 5.1 – 5.39 Jahre, „reines“ DNAm-Modell: 5.48) [3].

Für die Proben von Spendern mit fortgeschrittenem postmortalem Intervall ergaben sich Hinweise, dass durch die Kombination der proteinbasierten Parameter mit der DNAm insbesondere Ausreißer in der Altersvorhersage reduziert werden konnten (bei Proben mit sehr

geringem DNA-Gehalt). In Anbetracht der Tatsache, dass das DNAm + Pen + D-Asp Modell die Altersvorhersage für Proben mit sehr geringem DNA-Gehalt im Vergleich zum „reinen“ DNAm-Modell verbessert hat, könnte man annehmen, dass das univariate Pen Modell oder das D-Asp Modell in diesen Fällen ohne zusätzliche Einbeziehung von DNA sogar vorteilhafter sein könnte. Dies muss an einer größeren Fallzahl überprüft werden [3].

Die Ergebnisse von Publikationen 1 und 3 bestätigen die Hypothese, dass eine Kombination verschiedener Parameter aus unterschiedlichen Geweben desselben Spenders durch *Machine Learning* basierte Modelle dazu beitragen kann, altersunabhängige ante- und postmortale Einflüsse auf die Lebensaltersschätzung zu kompensieren. Die Studiendaten zeigen, dass die Kombination der Methoden von Proteinmarkern wie D-Asp und Pen mit DNAm-Markern in multivariaten Modellen die Genauigkeit der Altersvorhersage erheblich verbessern kann, insbesondere in komplexen Geweben und bei Proben mit postmortalen Veränderungen. Diese Ergebnisse können den Grundstein für weitere Untersuchungen und Optimierungen legen, insbesondere in Bezug auf die Analyse von Proben mit geringem DNA-Gehalt [1, 3].

Auch andere Studien der letzten Jahre bestätigen den Ansatz der Nutzung multivariater Modelle unter Berücksichtigung verschiedener molekularer und morphologischer Parameter zur Lebensaltersschätzung:

Shi et al. (2018) kombinierten skelettale und dentale morphologische Parameter mit fünf DNA-Methylierungsmarkern in Blut an einem Kollektiv von 124 Kindern im Alter zwischen 6 und 15 Jahren und erzielten eine deutliche Verbesserung zwischen den jeweils uni- und multivariaten Modellen. Hier konnte die Genauigkeit der Schätzung univariater Modelle anhand skelettaler bzw. dentaler Merkmale durch die multivariate Analyse der morphologischen Parameter sowie der DNA-Methylierungsmarker (5 bzw. 4 CpGs) bei Jungen um bis zu 0.22 Jahren und bei Mädchen um bis zu 0.41 Jahren (MAE) gesteigert werden [180].

Cho et al. (2017) konnten mit der Kombination von DNA-Methylierungsmarkern und sjTREC_s in Blut an einem Kollektiv von 100 Individuen im Alter zwischen 20 und 74 Jahren zwar die Altersschätzung insgesamt nicht verbessern (MAE 3.29 Jahre nur DNAm (5 CpGs); MAE 3.31 Jahre bei Kombination von DNAm und sjTREC_s); jedoch zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Altersschätzung in den höheren Altersgruppen (60 - 74 Jahre) [181].

Dennoch ist nicht jede Kombination sinnvoll, und es ist notwendig, sich optimal ergänzende Marker zu identifizieren. Darauf weisen Siahaan et al. (2021) zurecht hin. In ihrer „*proof of concept*“-Studie wurden an einem Kollektiv oralchirurgischer Patienten molekulare und morphologische Parameter (D-Asp, Pen in Dentin; DNAm-Marker (5 CpGs) in Mundschleimhautabstrichen sowie der Zahnmineralisierungsstatus) erhoben, um zu erforschen, welche der untersuchten Parameter zu multivariaten Altersmodellen beitragen können und welche Kombinationen einen Mehrwert bieten. Die Studie ergab, dass die zusätzliche Analyse der altersbedingten DNAm-Veränderungen (zu D-Asp und Pen) die Genauigkeit der Schätzungen nicht verbesserte. Während sich für die untersuchten proteinbasierten Parameter ein MAE von 2.68 Jahre (D-Asp + Pen) ergab, brachte die zusätzliche Analyse der DNAm in Mundschleimhautabstrichen hier keine wirkliche Verbesserung (MAE 3.53 Jahre, D-Asp + Pen + DNAm) [95] - das Potenzial multivariater Ansätze entfaltete sich hier nur bedingt. Dies war dadurch zu erklären, dass das Untersuchungsmaterial vorwiegend von jungen Patienten stammte und

Dentin als bradytrophes und homogenes Gewebe ein optimales Untersuchungsmaterial für D-Asp und Pen darstellt.

Auch die Daten einer weiteren Studie belegen, dass nicht jede Kombination von Parametern in multivariaten Modellen sinnvoll ist: Márquez-Ruiz et al. (2020) kombinierten in ihrer Studie an Zähnen⁴ DNAm-Daten zu mehreren CpG-Stellen der Gene *ELOVL2*, *ASPA* und *PDE4C* mit den Telomerlängen derselben Individuen. Für das DNAm-Modell wurden nur die der Gene *ELOVL2* und *PDE4C* verwendet, da die Korrelation der DNAm-Daten im Gen *ASPA* mit dem Lebensalter nicht eng genug war. Der MAE bei Einsatz des „reinen“ DNAm-Modells ohne Einbeziehung des Geschlechts lag bei 5.08 Jahren. Der MAE der Altersschätzungen basierend auf dem „reinen“ Modell der Telomerlängen ohne Einbeziehung des Geschlechts lag bei 6.89 Jahren. Die Kombination beider Parameter (DNAm / Telomerenlänge; ohne Einbeziehung des Geschlechts) erzielte allerdings nur einen MAE von 5.04 Jahren und brachte somit kaum eine Steigerung der Präzision [120].

Die Studien bestätigen, dass eine *Machine Learning* basierte Kombination verschiedener Parameter in unterschiedlichen Gewebetypen die Genauigkeit der Lebensaltersschätzung deutlich verbessern kann. Multivariate Ansätze weisen ein erhebliches Potenzial zur Optimierung für den individuellen Einzelfall der forensischen Praxis auf, da die zuvor erstellten Modelle flexibel anhand vieler Faktoren trainiert werden können: so können Erkrankungen, der (altersbedingte) Zustand der Gewebe, das Geschlecht usw. berücksichtigt werden. Der Einzelfall in der forensischen Praxis ist immer individuell und hängt von genau diesen Bedingungen ab. Durch Erhebung möglichst vieler Parameter zur Lebensaltersschätzung aus verschiedenen Geweben können sämtliche Möglichkeiten zur Lösung des Einzelfalls ausgeschöpft werden. Die sorgfältige Auswahl und Kombination der Parameter sind dabei entscheidend, um das volle Potenzial dieser Technologien auszuschöpfen.

4.4.1 Einsatz von Künstlicher Intelligenz in der Forensik und Begutachtung

Der Einsatz Künstlicher Intelligenz (KI) in der forensischen Praxis eröffnet eine neue Ära, die sowohl Chancen als auch Herausforderungen mit sich bringt. Trotz der rasanten technologischen Entwicklung hat sich bislang keine KI-basierte Methode als Standardverfahren in der forensischen Praxis etabliert [182, 183].

Während KI-Systeme enorme Potenziale bieten - wie die Analyse komplexer Datenmengen, die Erkennung subtiler Muster und die Unterstützung bei Ermittlungen - müssen gleichzeitig fundamentale ethische und rechtliche Aspekte bei ihrer Nutzung berücksichtigt werden [184, 185].

Während im allgemeinen Gesundheitswesen bereits intensive Diskussionen über ethische und rechtliche Herausforderungen bei Einsatz von KI geführt werden, fehlt bisher ein Übertrag für die spezifischen Ansprüche in der Rechtsmedizin.

Tynan [184] gibt eine erste Übersicht über die spezifischen Herausforderungen der forensischen Praxis: Zentrale Herausforderungen umfassen die Entwicklung unvoreingenommener Algorithmen, robuste Datenschutzrichtlinien und die Gewährleistung von Transparenz. Erklärbare KI (*Explainable AI*; Übersicht bei [186]) kann Fachexperten ermöglichen, die zugrunde liegenden Entscheidungsmechanismen besser nachzuvollziehen und zu rechtfertigen. KI soll dabei als unterstützendes Werkzeug dienen, nicht als Ersatz für menschliche Expertise. Die Frage der Verantwortlichkeit bei möglichen Fehleinschätzungen bleibt eine komplexe

⁴ In der Publikation sind keine weiteren Informationen zum verwendeten Teil des Zahns enthalten.

Herausforderung. Wer haftet, wenn ein KI-System fehlerhafte Schlussfolgerungen zieht? Diese bislang ungeklärten Fragen unterstreichen die Notwendigkeit einer engen interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Informatikern, Forensikern, Juristen und Ethikern, wenn KI Einzug in die forensische Praxis halten soll [184].

Durch einen umsichtigen Einsatz und offenen Dialog kann das Potenzial von KI genutzt und gleichzeitig sichergestellt werden, dass deren Integration in die Forensik und Begutachtung ethisch vertretbar bleibt und der Gerechtigkeit dient.

5 Ausblick

Der genetische Fingerabdruck, 1984 von Alec John Jeffreys entwickelt, revolutionierte die Täter- und Opferidentifizierung in der Forensik. Trotz seiner Bedeutung wurden manche Fälle zunächst eingestellt, hauptsächlich aufgrund begrenzter DNA-Spuren-Verfügbarkeit, fehlender Vergleichsproben oder nicht erfasster Täter in Datenbanken.

Moderne Technologien ermöglichen es nun durch eine wesentlich höhere Sensitivität selbst alte oder degradierte DNA-Proben zu untersuchen, die früher als unbrauchbar galten. KI-gestützte Systeme können diese DNA-Proben mit vorhandenen großen Datenbanken abgleichen, um mögliche Übereinstimmungen zu finden. Im Jahr 2018 konnten durch den Einsatz von KI auf DNA-Beweise in Verbindung mit einer Genealogie-Datenbank Anklagen in mehr als einem Dutzend Fällen erhoben werden, die jahrzehntelang ungelöst geblieben waren, darunter der Fall des "Golden State Killers" [187]. Diese Fortschritte in der KI-gestützten Verbrechensaufklärung zeigen das enorme Potenzial dieser Technologien für die Lösung von Einzelfällen und *Cold Cases*.

Auch die Fortschritte in der forensischen Lebensaltersschätzung durch *Machine Learning* repräsentieren ein solches Potenzial:

Die in dieser Arbeit aufgeführten Publikationen beweisen die Machbarkeit unserer Vision eines molekularen „Werkzeugkastens“ für die unterschiedlichsten Situationen in der forensischen Praxis. Dem breiten Spektrum an Ausgangssituationen soll mit einem System aus *Machine Learning* basierten Modellen unter Nutzung verschiedener Parameter aus verschiedenen Geweben begegnet werden. Je nach Verfügbarkeit von Geweben soll in jeder Situation (z.B., wenn nur eine Achillessehne oder nur eine Epiglottis vorhanden ist) durch optimierte Modelle über eine Kombination der Parameter (D-Asp, Pen und DNAm) eine möglichst präzise Schätzung des Lebensalters möglich sein.

Zukünftig kann der so erstellte „Werkzeugkasten“ erweitert werden; weitere Gewebe oder auch Proben aus unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb eines Gewebes können berücksichtigt werden. Auch nicht-molekulare Parameter wie morphologische Merkmale, histologische Parameter und auch Umgebungsinformationen bei Auffinden von unbekannten Verstorbenen usw. können und sollten in die Modelle einbezogen werden.

Die so erreichbare höhere Zuverlässigkeit von Altersdiagnosen resultiert in einer höheren Sicherheit der Identifizierung unbekannter Verstorbener und eröffnet neue Möglichkeiten zur Lösung des Einzelfalls oder *Cold Cases*.

Insgesamt verspricht die Zukunft der forensischen Lebensaltersschätzung eine noch engere Verzahnung von traditionellen und hochmodernen Methoden, unterstützt durch KI und interdisziplinäre Zusammenarbeit. Die Entwicklung in diesem Bereich schreitet rasch voran. KI-gestützte Datenbanksysteme werden zunehmend leistungsfähiger und können immer komplexere Analysen durchführen. Gleichzeitig müssen ethische und rechtliche Fragen im Zusammenhang mit dem Einsatz dieser Technologien sorgfältig adressiert werden, um einen verantwortungsvollen und gerechten Einsatz in der Begutachtung zu gewährleisten.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. **Becker, J.**, et al., *Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study*. Int J Legal Med, 2020. 134(2): p. 721-733.
2. **Becker, J.**, et al., *Nutzung von Altersinformationen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen und DNA-Methylierung zur postmortalen Lebensaltersschätzung*. Rechtsmedizin, 2021. 31(3): p. 234-242.
3. **Becker, J.**, et al., *Molecular age prediction using skull bone samples from individuals with and without signs of decomposition: a multivariate approach combining analysis of posttranslational protein modifications and DNA methylation*. International Journal of Legal Medicine, 2024: p. 1-18.
4. Saini, M. and A.K. Kapoor, *Biometrics in forensic identification: applications and challenges*. J Forensic Med, 2016. 1(108): p. 2.
5. Klotzbach, H., et al., *Identifizierung der Tsunami-Opfer im Einsatzabschnitt Sri Lanka*. Rechtsmedizin, 2005. 6(15): p. 467-472.
6. Dettmeyer, R., et al., *Identifizierung*. Rechtsmedizin, 2011: p. 239-246.
7. Ondruschka, B., F. Ramsthaler, and C. Birngruber, *Forensic implications of body modifications*. Rechtsmedizin, 2017. 27: p. 443-451.
8. Ritz-Timme, S., et al., *Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practise*. International journal of legal medicine, 2000. 113: p. 129-136.
9. Madea, B., *Autolysis, Putrefactive Changes and Post-mortem Chemistry, in Estimation of the time since death*. 2023, CRC Press. p. 187-281.
10. DeBruyn, J.M. and K.A. Hauther, *Postmortem succession of gut microbial communities in deceased human subjects*. PeerJ, 2017. 5: p. e3437.
11. Hau, T.C., et al., *Decomposition process and post mortem changes*. Sains Malaysiana, 2014. 43(12): p. 1873-1882.
12. Dash, H.R. and S. Das, *Thanatomicrobiome and epinecrotic community signatures for estimation of post-mortem time interval in human cadaver*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. 104(22): p. 9497-9512.
13. Dettmeyer, R.B., H.F. Schütz, and M.A. Verhoff, *Forensische Osteologie*, in *Rechtsmedizin*, R.B. Dettmeyer, H.F. Schütz, and M.A. Verhoff, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 239-247.
14. Grosskopf, B. and A. Gramsch, *Leichenbrand-biologische Quelle für Genderforschung*. Anthropologischer Anzeiger, 2004: p. 281-289.
15. Bach, H., *Zur Berechnung der Körperhöhe aus den langen Gliedmaßenknochen weiblicher Skelette*. Anthropologischer Anzeiger, 1965: p. 12-21.
16. Rother, P., et al., *Über die Rekonstruktion der Körperhöhe aus den Mafien langer Rohrenknochen sowie über den Einfluss des Alters und der Akzeleration auf die Körperhöhe und die vertikalen Proportionen des Menschen*. Gegenbaurs Morph. Jb.(Leipzig), 1973. 119: p. 767-795.
17. Daeid, N.N., L. Hackman, and P.R. Haddrill, *Developments in forensic DNA analysis*. Emerging Topics in Life Sciences, 2021. 5(3): p. 381-393.
18. Stanley, U.N., et al., *Forensic DNA profiling: autosomal short tandem repeat as a prominent marker in crime investigation*. The Malaysian journal of medical sciences: MJMS, 2020. 27(4): p. 22.
19. Krishan, K., T. Kanchan, and A.K. Garg, *Dental evidence in forensic identification—An overview, methodology and present status*. The open dentistry journal, 2015. 9: p. 250.
20. Uthman, A.T., et al., *Evaluation of frontal sinus and skull measurements using spiral CT scanning: an aid in unknown person identification*. Forensic science international, 2010. 197(1-3): p. 124. e1-124. e7.
21. Nedunchezian, K. and N. Aswath, *Applicability of Willems Method for Dental Age Estimation in Dravidian Children 6–16 Years of Age*. Journal of Indian Academy of Forensic Medicine, 2018. 40(1): p. 23-29.

22. Abdullah, H.N.A., et al., *Examining the Deciduous Tooth Eruption and Carpal Osteogenesis in Relation to Forensic age Estimation*. Pakistan Journal of Medical & Health Sciences, 2022. 16(09): p. 919-919.
23. Gustafson, G., *Age estimation up to 16 years of age based on dental development*. Odontologisk revy, 1974. 25: p. 297-306.
24. Lucy, D. and A. Pollard, *Further comments on the estimation of error associated with the Gustafson dental age estimation method*. Journal of Forensic Sciences, 1995. 40(2): p. 222-227.
25. Thorson, J. and U. Hägg, *The accuracy and precision of the third mandibular molar as an indicator of chronological age*. Swedish dental journal, 1991. 15(1): p. 15-22.
26. Abdul Rahim, A.H., J.A. Davies, and H.M. Liversidge, *Reliability and limitations of permanent tooth staging techniques*. Forensic Science International, 2023. 346: p. 111654.
27. Köhler, S., et al., *Die entwicklung des weisheitszahnes als kriterium der lebensaltersbestimmung*. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, 1994. 176(4): p. 339-345.
28. Engström, C., H. Engström, and S. Sagne, *Lower third molar development in relation to skeletal maturity and chronological age*. The Angle orthodontist, 1983. 53(2): p. 97-106.
29. Demirjian, A., H. Goldstein, and J.M. Tanner, *A new system of dental age assessment*. Human biology, 1973. 45(2): p. 211-227.
30. Bayer, L.M., *RADIOGRAPHIC ATLAS OF SKELETAL DEVELOPMENT OF THE HAND AND WRIST: Second Edition*. Calif Med. 1959 Jul;91(1):53.
31. Loder, R.T., et al., *Applicability of the Greulich and Pyle skeletal age standards to black and white children of today*. Am J Dis Child, 1993. 147(12): p. 1329-33.
32. Brooks, S.T., *Skeletal age at death: the reliability of cranial and pubic age indicators*. American journal of physical anthropology, 1955. 13(4): p. 567-597.
33. Dudar, J.C., S. Pfeiffer, and S. Saunders, *Evaluation of morphological and histological adult skeletal age-at-death estimation techniques using ribs*. Journal of forensic sciences, 1993. 38(3): p. 677-685.
34. Gilbert, B.M. and T.W. McKern, *A method for aging the female os pubis*. American Journal of Physical Anthropology, 1973. 38(1): p. 31-38.
35. Borrman, H., et al., *Inter-examiner variation in the assessment of age-related factors in teeth*. International Journal of Legal Medicine, 1995. 107: p. 183-186.
36. Lamendin, H., et al., *A simple technique for age estimation in adult corpses: the two criteria dental method*. Journal of forensic sciences, 1992. 37(5): p. 1373-1379.
37. Charles, D.K., et al., *Cementum annulation and age determination in Homo sapiens. I. Tooth variability and observer error*. American Journal of Physical Anthropology, 1986. 71(3): p. 311-320.
38. Condon, K., et al., *Cementum annulation and age determination in Homo sapiens. II. Estimates and accuracy*. American Journal of Physical Anthropology, 1986. 71(3): p. 321-330.
39. Grosskopf, B., *Individual age determination using growth rings in the cementum of buried human teeth*. Zeitschrift fur Rechtsmedizin. Journal of Legal Medicine, 1990. 103(5): p. 351-359.
40. Baccino, E., et al., *Evaluation of seven methods of estimating age at death from mature human skeletal remains*. Journal of Forensic Sciences, 1999. 44(5): p. 931-936.
41. Lovejoy, C.O., et al., *Multifactorial determination of skeletal age at death: a method and blind tests of its accuracy*. American Journal of Physical Anthropology, 1985. 68(1): p. 1-14.
42. Meindl, R.S., C.O. Lovejoy, and R.P. Mensforth, *Skeletal age at death: accuracy of determination and implications for human demography*. Human Biology, 1983: p. 73-87.
43. Fujii, N., et al., *D-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging*. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2018. 1866(7): p. 840-847.

44. Salameh, Y., Y. Bejaoui, and N. El Hajj, *DNA Methylation Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases*. Front Genet, 2020. 11: p. 171.
45. Jylhävä, J., N.L. Pedersen, and S. Hägg, *Biological age predictors*. EBioMedicine, 2017. 21: p. 29-36.
46. Truscott, R.J., K.L. Schey, and M.G. Friedrich, *Old proteins in man: a field in its infancy*. Trends in biochemical sciences, 2016. 41(8): p. 654-664.
47. Khan, S.S., B.D. Singer, and D.E. Vaughan, *Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans*. Aging cell, 2017. 16(4): p. 624-633.
48. Horvath, S., *DNA methylation age of human tissues and cell types*. Genome Biol, 2013. 14(10): p. R115.
49. Geiger, T. and S. Clarke, *Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation*. Journal of Biological Chemistry, 1987. 262(2): p. 785-794.
50. Advanced Chemistry Development, I.A.L., *Chemsketch; version 2023.2.1; Toronto, ON, Canada; www.acdlabs.com*.
51. Ritz-Timme, S., *Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche*. 1999: Schmidt-Römhild.
52. Toyama, B.H., et al., *Identification of long-lived proteins reveals exceptional stability of essential cellular structures*. Cell, 2013. 154(5): p. 971-982.
53. Baynes, J.W., *The role of AGEs in aging: causation or correlation*. Experimental gerontology, 2001. 36(9): p. 1527-1537.
54. Bathaie, S.Z., F. Bahmani, and A. Farajzadeh, *Role of Amino Acids on Prevention of Nonenzymatic Glycation of Lens Proteins in Senile and Diabetic Cataract*, in *Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*. 2014, Elsevier. p. 141-155.
55. Li, H. and S.J. Yu, *Review of pentosidine and pyrrole in food and chemical models: Formation, potential risks and determination*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. 98(9): p. 3225-3233.
56. Maillard, L., *Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way*. Compte-Rendu de l'Academie des Science, 1912. 154: p. 66-68.
57. Ahmed, N., *Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. 67(1): p. 3-21.
58. Lackner, K.J. and D. Peetz, *Pentosidin*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1848-1848.
59. Steiner, D., C. Marçon, and E. Cohen Sabban, *Diabetes, Non-Enzymatic Glycation, and Aging*. 2018. p. 243-279.
60. Singh, R., H.K. Rao, and T.G. Singh, *Advanced glycated end products (ages) in diabetes and its complications: an insight*. Plant Arch, 2020. 20(1): p. 3838-3841.
61. Yamagishi, S.-i., *Diabetes and advanced glycation end products*. Diabetes and Aging-related Complications, 2018: p. 201-212.
62. Pilin, A., F. Pudil, and V. Bencko, *Changes in colour of different human tissues as a marker of age*. International journal of legal medicine, 2007. 121: p. 158-162.
63. Verzijl, N., et al., *Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(50): p. 39027-39031.
64. Verzijl, N., et al., *Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover*. Matrix biology, 2001. 20(7): p. 409-417.
65. Jeltsch, A., *Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases*. Chembiochem, 2002. 3(4): p. 274-93.
66. Freire-Aradas, A., C. Phillips, and M.V. Lareu, *Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests*. Forensic Sci Rev, 2017. 29(2): p. 121-144.

67. Ciccarone, F., et al., *DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms?* Mechanisms of ageing and development, 2018. 174: p. 3-17.
68. Adams, R.L., *Eukaryotic DNA methyltransferases—structure and function*. Bioessays, 1995. 17(2): p. 139-145.
69. Chiang, P.K., et al., *S-Adenosylmethionine and methylation*. The FASEB journal, 1996. 10(4): p. 471-480.
70. Gibney, E. and C. Nolan, *Epigenetics and gene expression*. Heredity, 2010. 105(1): p. 4-13.
71. Deaton, A.M. and A. Bird, *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes & development, 2011. 25(10): p. 1010-1022.
72. Cooper, D.N. and S. Gerber-Huber, *DNA methylation and CpG suppression*. Cell Differentiation, 1985. 17(3): p. 199-205.
73. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. 409(6822): p. 860-921.
74. Martino, D.J., et al., *Evidence for age-related and individual-specific changes in DNA methylation profile of mononuclear cells during early immune development in humans*. Epigenetics, 2011. 6(9): p. 1085-1094.
75. Weidner, C.I., et al., *Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites*. Genome Biol, 2014. 15(2): p. R24.
76. Hannum, G., et al., *Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates*. Molecular cell, 2013. 49(2): p. 359-367.
77. Horvath, S., et al., *Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue*. Genome biology, 2012. 13: p. 1-18.
78. Alisch, R.S., et al., *Age-associated DNA methylation in pediatric populations*. Genome Res, 2012. 22(4): p. 623-32.
79. McClay, J.L., et al., *A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects*. Human molecular genetics, 2014. 23(5): p. 1175-1185.
80. Ong, M.L. and J.D. Holbrook, *Novel region discovery method for Infinium 450K DNA methylation data reveals changes associated with aging in muscle and neuronal pathways*. Aging cell, 2014. 13(1): p. 142-155.
81. Lokk, K., et al., *DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns*. Genome biology, 2014. 15: p. 1-14.
82. Naue, J., *Getting the chronological age out of DNA: using insights of age-dependent DNA methylation for forensic DNA applications*. Genes Genomics, 2023. 45(10): p. 1239-1261.
83. Böhme, P., et al., *Molecular methods for age estimation*. Rechtsmedizin, 2021.
84. Ross, A.B., J.D. Langer, and M. Jovanovic, *Proteome Turnover in the Spotlight: Approaches, Applications, and Perspectives*. Mol Cell Proteomics, 2021. 20: p. 100016.
85. Swovick, K., et al., *Interspecies Differences in Proteome Turnover Kinetics Are Correlated With Life Spans and Energetic Demands*. Mol Cell Proteomics, 2021. 20: p. 100041.
86. Sivan, S.S., et al., *Collagen turnover in normal and degenerate human intervertebral discs as determined by the racemization of aspartic acid*. J Biol Chem, 2008. 283(14): p. 8796-801.
87. C. Zapico, S. and D.H. Ubelaker, *Application of Aspartic Acid Racemization for Age Estimation in a Spanish Sample*. Biology, 2022. 11(6): p. 856.
88. Chen, S., et al., *Aspartic acid racemization in dentin of the third molar for age estimation of the Chaoshan population in South China*. Forensic science international, 2016. 266: p. 234-238.
89. Rastogi, M., et al., *Age estimation of living Indian individuals based on aspartic acid racemization from tooth biopsy specimen*. J Forensic Dent Sci, 2017. 9(2): p. 83-90.

90. Wochna, K., et al., *Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a Polish population sample*. Forensic Science, Medicine and Pathology, 2018. 14: p. 285-294.
91. Ohtani, S. and T. Yamamoto, *Age estimation by amino acid racemization in human teeth*. J Forensic Sci, 2010. 55(6): p. 1630-3.
92. Ritz, S., H. Schütz, and C. Peper, *Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: its applicability for root dentin*. International journal of legal medicine, 1993. 105: p. 289-293.
93. Tjäderhane, L., *Dentin basic structure, composition, and function*. The root canal anatomy in permanent dentition, 2019: p. 17-27.
94. Greis, F., et al., *Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation?* Int J Legal Med, 2018. 132(3): p. 799-805.
95. Siahaan, T., et al., *Molecular and morphological findings in a sample of oral surgery patients: What can we learn for multivariate concepts for age estimation?* Journal of Forensic Sciences, 2021.
96. Sirin, N., et al., *Age estimation based on aspartic acid racemization in dentine: what about caries-affected teeth?* International Journal of Legal Medicine, 2018. 132: p. 623-628.
97. Ritz-Timme, S., I. Laumeier, and M. Collins, *Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments*. International journal of legal medicine, 2003. 117: p. 96-101.
98. Dobberstein, R.C., S.M. Tung, and S. Ritz-Timme, *Aspartic acid racemisation in purified elastin from arteries as basis for age estimation*. Int J Legal Med, 2010. 124(4): p. 269-75.
99. Ritz, S., et al., *Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: basis for an accurate age at death determination*. Forensic science international, 1996. 77 1-2: p. 13-26.
100. Ritz-Timme, S., I. Laumeier, and M.J. Collins, *Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin*. British Journal of Dermatology, 2003. 149(5): p. 951-959.
101. Ritz, S., A. Turzynski, and H.W. Schütz, *Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in noncollagenous bone proteins*. Forensic Sci Int, 1994. 69(2): p. 149-59.
102. Ritz, S. and H.W. Schütz, *Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to postmortem estimation of age at death*. J Forensic Sci, 1993. 38(3): p. 633-40.
103. Pillin, A., et al., *Contents of pentosidine in the tissue of the intervertebral disc as an indicator of the human age*. Soudni lekarstvi, 2007. 52(4): p. 60-64.
104. König, L., et al., *Molecular age estimation based on posttranslational protein modifications in bone: why the type of bone matters*. Int J Legal Med, 2023. 137(2): p. 437-443.
105. Mahlke, N., et al., *Molecular clocks in ancient proteins: Do they reflect the age at death even after millennia?* International Journal of Legal Medicine, 2021. 135: p. 1-9.
106. Dobberstein, R.C., et al., *Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis*. Forensic Sci Int, 2008. 179(2-3): p. 181-91.
107. Castagnola, M., F. Medina Paz, and S. C. Zapico, *Uncovering Forensic Evidence: A Path to Age Estimation through DNA Methylation*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. 25: p. 4917.
108. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. Nature Reviews Genetics, 2012. 13(7): p. 484-492.
109. Piniewska-Róg, D., et al., *Impact of excessive alcohol abuse on age prediction using the VISAGE enhanced tool for epigenetic age estimation in blood*. International Journal of Legal Medicine, 2021. 135: p. 2209-2219.
110. Carlsen, L., et al., *DNA methylation-based age estimation for adults and minors: considering sex-specific differences and non-linear correlations*. International Journal of Legal Medicine, 2023. 137(3): p. 635-643.

111. Mayer, F., et al., *Altered DNA methylation at age-associated CpG sites in children with growth disorders: impact on age estimation?* International Journal of Legal Medicine, 2022. 136(4): p. 987-996.
112. Becker, J., et al., *Evidence for differences in DNA methylation between Germans and Japanese.* International Journal of Legal Medicine, 2022. 136(2): p. 405-413.
113. Koop, B.E., et al., *Epigenetic clocks may come out of rhythm-implications for the estimation of chronological age in forensic casework.* Int J Legal Med, 2020. 134(6): p. 2215-2228.
114. Koop, B.E., et al., *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, 2021. 135(1): p. 167-173.
115. Naue, J., et al., *Forensic DNA methylation profiling from minimal traces: How low can we go?* Forensic Science International: Genetics, 2018. 33: p. 17-23.
116. Wozniak, A., et al., *Development of the VISAGE enhanced tool and statistical models for epigenetic age estimation in blood, buccal cells and bones.* Aging (Albany NY), 2021. 13(5): p. 6459-6484.
117. Lee, H.Y., et al., *Epigenetic age signatures in bones.* Forensic Sci Int Genet, 2020. 46: p. 102261.
118. Naue, J., et al., *Proof of concept study of age-dependent DNA methylation markers across different tissues by massive parallel sequencing.* Forensic Sci Int Genet, 2018. 36: p. 152-159.
119. Gopalan, S., J. Gaige, and B.M. Henn, *DNA methylation-based forensic age estimation in human bone.* 2019.
120. Marquez-Ruiz, A.B., et al., *DNA methylation levels and telomere length in human teeth: usefulness for age estimation.* Int J Legal Med, 2020. 134(2): p. 451-459.
121. Giuliani, C., et al., *Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth.* Am J Phys Anthropol, 2016. 159(4): p. 585-95.
122. Jung, J.Y., et al., *Epigenetic age prediction using costal cartilage for the investigation of disaster victims and missing persons.* Journal of forensic sciences, 2024.
123. Freire-Aradas, A., et al., *Development of an epigenetic age predictor for costal cartilage with a simultaneous somatic tissue differentiation system.* Forensic Science International: Genetics, 2023. 67: p. 102936.
124. Fokias, K., et al., *Age determination through DNA methylation patterns in fingernails and toenails.* Forensic Sci Int Genet, 2023. 64: p. 102846.
125. Holmes, E.E., et al., *Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine.* PloS one, 2014. 9(4): p. e93933.
126. Zbieć-Piekarska, R., et al., *Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science.* Forensic Science International: Genetics, 2015. 14: p. 161-167.
127. Hong, S.R., et al., *DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers.* Forensic Sci Int Genet, 2017. 29: p. 118-125.
128. Heidegger, A., et al., *Development and optimization of the VISAGE basic prototype tool for forensic age estimation.* Forensic Sci Int Genet, 2020. 48: p. 102322.
129. Heidegger, A., et al., *Development and inter-laboratory validation of the VISAGE enhanced tool for age estimation from semen using quantitative DNA methylation analysis.* Forensic Science International: Genetics, 2022. 56: p. 102596.
130. Aliferi, A., et al., *Combining current knowledge on DNA methylation-based age estimation towards the development of a superior forensic DNA intelligence tool.* Forensic Science International: Genetics, 2022. 57: p. 102637.
131. Ryan, J., et al., *A Systematic Review and Meta-analysis of Environmental, Lifestyle, and Health Factors Associated With DNA Methylation Age.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2020. 75(3): p. 481-494.

132. Jung, S.E., et al., *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, 2019. 38: p. 1-8.
133. Elfawal, M.A., S.I. Alqattan, and N.A. Ghallab, *Racemization of aspartic acid in root dentin as a tool for age estimation in a Kuwaiti population*. Med Sci Law, 2015. 55(1): p. 22-9.
134. Bekaert, B., et al., *Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers*. Epigenetics, 2015. 10(10): p. 922-30.
135. Shapiro, S., et al., *Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon*. The Journal of clinical investigation, 1991. 87(5): p. 1828-1834.
136. Matzenauer, C., A. Reckert, and S. Ritz-Timme, *Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in elastic cartilage of the epiglottis*. Int J Legal Med, 2014. 128(6): p. 995-1000.
137. Valenzuela, A., et al., *Differences in non-enzymatic glycation products in human dentine and clavicle: changes with aging*. Int J Legal Med, 2018. 132(6): p. 1749-1758.
138. Dias, H.C., et al., *DNA methylation age estimation in blood samples of living and deceased individuals using a multiplex SNaPshot assay*. Forensic Sci Int, 2020. 311: p. 110267.
139. Lin, X., et al., *The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration*. Front Pharmacol, 2020. 11: p. 757.
140. Corrado, A., et al., *Molecular Basis of Bone Aging*. Int J Mol Sci, 2020. 21(10).
141. Park-Min, K.H., *Metabolic reprogramming in osteoclasts*. Semin Immunopathol, 2019. 41(5): p. 565-572.
142. Tomsia, M., et al., *Cartilage Tissue in Forensic Science—State of the Art and Future Research Directions*. Processes, 2022. 10(11): p. 2456.
143. Schulze-Tanzil, G., et al., *Tendon healing: a concise review on cellular and molecular mechanisms with a particular focus on the Achilles tendon*. Bone & Joint Research, 2022. 11: p. 561-574.
144. Coupe, C., et al., *Human Achilles tendon glycation and function in diabetes*. Journal of applied physiology, 2016. 120(2): p. 130-137.
145. Yoon, J.H. and J. Halper, *Tendon proteoglycans: biochemistry and function*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005. 5(1): p. 22-34.
146. Whatley, B.R. and X. Wen, *Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration*. Materials Science and Engineering: C, 2012. 32(2): p. 61-77.
147. Pattappa, G., et al., *Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function*. Journal of anatomy, 2012. 221(6): p. 480-496.
148. Karamanos, N.K., et al., *A guide to the composition and functions of the extracellular matrix*. The FEBS journal, 2021. 288(24): p. 6850-6912.
149. Serikawa, M., K. Ambe, and A. Usami, *Histological observations of age-related changes in the epiglottis associated with decreased deglutition function in older adults*. ACB, 2023. 56(3): p. 374-381.
150. Pauken, C.M., R. Heyes, and D.G. Lott, *Mechanical, cellular, and proteomic properties of laryngotracheal cartilage*. Cartilage, 2019. 10(3): p. 321-328.
151. Badillo, S., et al., *An introduction to machine learning*. Clinical pharmacology & therapeutics, 2020. 107(4): p. 871-885.
152. Chen, J.X., *The evolution of computing: AlphaGo*. Computing in Science & Engineering, 2016. 18(4): p. 4-7.
153. Danford, T., A. Rolfe, and D. Gifford, *GSE: a comprehensive database system for the representation, retrieval, and analysis of microarray data*. Pac Symp Biocomput, 2008: p. 539-50.
154. Agrawal, A. and A. Choudhary, *Deep materials informatics: Applications of deep learning in materials science*. Mrs Communications, 2019. 9(3): p. 779-792.
155. Schmeling, A., et al., *Age estimation*. Forensic science international, 2007. 165(2-3): p. 178-181.

156. Ritz-Timme, S., et al., *Altersschätzung auf Basis der DNA-Methylierung*. Rechtsmedizin, 2018. 28(3): p. 202-207.
157. Kikuta, J. and M. Ishii, *Bone Imaging: Osteoclast and Osteoblast Dynamics*, in *Intravital Imaging of Dynamic Bone and Immune Systems : Methods and Protocols*, M. Ishii, Editor. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 1-9.
158. Parfitt, A., et al., *Structural and cellular changes during bone growth in healthy children*. Bone, 2000. 27(4): p. 487-494.
159. Schini, M., et al., *Bone Turnover Markers: Basic Biology to Clinical Applications*. Endocrine Reviews, 2022. 44(3): p. 417-473.
160. De Martinis, M., et al., *Vitamin D Deficiency, Osteoporosis and Effect on Autoimmune Diseases and Hematopoiesis: A Review*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. 22(16): p. 8855.
161. Sobh, M.M., et al., *Secondary Osteoporosis and Metabolic Bone Diseases*. Journal of Clinical Medicine, 2022. 11(9): p. 2382.
162. Epsley, S., et al., *The effect of inflammation on bone*. Frontiers in physiology, 2021. 11: p. 511799.
163. Delitala, A.P., A. Scuteri, and C. Doria, *Thyroid hormone diseases and osteoporosis*. Journal of clinical medicine, 2020. 9(4): p. 1034.
164. Pignolo, R.J., S.F. Law, and A. Chandra, *Bone Aging, Cellular Senescence, and Osteoporosis*. JBMR Plus, 2021. 5(4).
165. Moro, V.D.F. and C. Foresta, *Carboxylation-dependent conformational changes of human osteocalcin* Andrea Cristiani¹, Fabio Maset², Luca De Toni³, Diego Guidolin⁴, Davide Sabbadin⁵, Giacomo Strapazzon^{3, 6}, Stefano. Frontiers in Bioscience, 2014. 19: p. 1105-1116.
166. Li, J., et al., *An overview of osteocalcin progress*. Journal of bone and mineral metabolism, 2016. 34: p. 367-379.
167. Komori, T., *What is the function of osteocalcin?* Journal of oral biosciences, 2020. 62(3): p. 223-227.
168. Poser, J.W. and P. Price, *A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins. Properties of the decarboxylated gamma-carboxyglutamic acid protein from calf bone*. The Journal of biological chemistry, 1979. 254(2): p. 431-436.
169. Atkinson, R.A., et al., *Conformational studies of osteocalcin in solution*. European journal of biochemistry, 1995. 232(2): p. 515-521.
170. Smith, C., et al., *Osteocalcin and its forms across the lifespan in adult men*. Bone, 2020. 130: p. 115085.
171. Diemar, S.S., et al., *Effects of age and sex on osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase—reference intervals and confounders for two bone formation markers*. Archives of osteoporosis, 2020. 15: p. 1-10.
172. Guvatova, Z.G., et al., *Age-Related Changes in Extracellular Matrix*. Biochemistry (Moscow), 2022. 87(12): p. 1535-1551.
173. Gethin, G., et al., *The impact of patient health and lifestyle factors on wound healing: part 1: Stress, sleep, smoking, alcohol, common medications and illicit drug use*. Journal of wound management, 2022.
174. Serikawa, M., K. Ambe, and A. Usami, *Histological observations of age-related changes in the epiglottis associated with decreased deglutition function in older adults*. Anatomy & Cell Biology, 2023. 56(3): p. 374-381.
175. Kano, M., et al., *A morphometric study of age-related changes in adult human epiglottis using quantitative digital analysis of cartilage calcification*. Cells Tissues Organs, 2005. 180(2): p. 126-137.
176. Correia Dias, H., et al., *DNA methylation age estimation from human bone and teeth*. Australian Journal of Forensic Sciences, 2020: p. 1-14.
177. Vinueza-Espinosa, D.C., et al., *Human DNA extraction from highly degraded skeletal remains: How to find a suitable method?* Electrophoresis, 2020. 41(24): p. 2149-2158.
178. Roeper, A., W. Reichert, and R. Mattern, *The Achilles tendon as a DNA source for STR typing of highly decayed corpses*. Forensic Sci Int, 2007. 173(2-3): p. 103-6.

179. Becker, J., et al., *The human intervertebral disc as a source of DNA for molecular identification*. Forensic Sci Med Pathol, 2021. 17(4): p. 660-664.
180. Shi, L., et al., *DNA methylation markers in combination with skeletal and dental ages to improve age estimation in children*. Forensic Science International: Genetics, 2018. 33: p. 1-9.
181. Cho, S., et al., *Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood*. Forensic Sci Int Genet, 2017. 29: p. 250-256.
182. Piraianu, A.-I., et al., *Enhancing the evidence with algorithms: how artificial intelligence is transforming forensic medicine*. Diagnostics, 2023. 13(18): p. 2992.
183. Tournois, L., et al., *Artificial intelligence in the practice of forensic medicine: a scoping review*. International Journal of Legal Medicine, 2024. 138(3): p. 1023-1037.
184. Tynan, P., *The integration and implications of artificial intelligence in forensic science*. Forensic Science, Medicine and Pathology, 2024: p. 1-3.
185. Ondruschka, B., et al., *A critical review of "Artificial intelligence in the practice of forensic medicine: a scoping review"*. International Journal of Legal Medicine, 2024. 138(4): p. 1667-1668.
186. Longo, L., et al., *Explainable Artificial Intelligence (XAI) 2.0: A manifesto of open challenges and interdisciplinary research directions*. Information Fusion, 2024. 106: p. 102301.
187. Wickenheiser, R.A., *Forensic genealogy, bioethics and the Golden State Killer case*. Forensic Science International: Synergy, 2019. 1: p. 114-125.

7 Abkürzungsverzeichnis

AGE	<i>Advanced Glycation End Product</i>
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BestG	Bestattungsgesetz
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotide
D-Asp	D-Asparaginsäure
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNA _m	DNA-Methylierung
DNMT	DNA-Methyltransferasen
Lit	Literatur
MAD	Mittlere absolute Abweichung
MAE	Mittlerer absoluter Fehler
MVM	Multivariates Modell
n.s.	Nicht spezifiziert
Pen	Pentosidin
PI	Prognoseintervall
R	Korrelationskoeffizient
RMSE	<i>Root Mean Squared Error</i> ; Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers
SAH	S-Adenosinhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SE	Standardfehler
SEE	Standardfehler der Schätzung
StPO	Strafprozessordnung

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Intravitale Umwandlung von L-Asparaginsäure in ihre D-Form	4
Abbildung 2: Bildung von AGEs durch Maillard Reaktion	5
Abbildung 3: Methylierung von Cytosin	6
Abbildung 4: Grundlegender <i>Workflow</i> zur Erstellung eines <i>Machine Learning</i> Modells.	17

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Möglichkeiten der postmortalen Lebensaltersschätzung durch konventionelle morphologische Methoden	3
Tabelle 2: Möglichkeiten der Altersschätzung durch molekulare Methoden	11

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt nach PO § 5 Absatz 1b; § 6 Absatz 5, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 10.12.2024

Julia Becker

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank allen nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Zuerst möchte ich ganz herzlich bei meiner Doktormutter und Chefin Prof. Stefanie Ritz für die Möglichkeit bedanken, meine Promotion im Institut für Rechtsmedizin Düsseldorf durchzuführen und anfertigen zu können. Vielen Dank für das Aufbauen, das Inspirieren sowie Motivieren, die Betreuung, das Zuhören, Lösungen finden, die Forschungsideen und vieles mehr.

Zudem danke ich Prof. William F. Martin, dass er bereit war meine Doktorarbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu vertreten. Außerdem bedanke ich mich herzlichst für das immer offene Ohr und die vielen aufbauenden Worte sowie seelische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Arbeitsgruppe, den "Proteinis", bedanken: Bei Bärbel Seeling für die Einarbeitung im Labor, das immer offene Ohr und ihren unermüdlichen Einsatz; bei Alex Reckert für die wissenschaftliche und auch nicht-wissenschaftliche Unterstützung, wenn es mal wieder schwer war; bei Lisa König für den Kaffee ;) sowie bei Valerie Bühnen und Melanie Schröder für den mentalen Support und dem „zwischen durch dem Frust mal Luft machen“.

Zudem möchte ich auch bei Georga Flint und Claudia Heier bedanken, die mir unermüdlich den Rücken gestärkt haben.

Darüber hinaus bedanke ich mich auch ganz herzlich beim Sektionsteam für das Sammeln der Proben nicht nur für diese Promotion, sondern auch für das gesamte DFG-Projekt.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei unserer Kooperationspartnerin unseres DFG-Projektes Frau PD Dr. Jana Naue für die gute Zusammenarbeit und die große Unterstützung, Motivation und auch Betreuung vor allem bei Publikation 3 bedanken.

Mein persönlicher Dank geht an Lucas, meine Freunde und meine Familie, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützen und immer an mich glauben und mich aufbauen.

Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.