

Epigenetische Altersschätzung in der forensischen
Fallarbeit unter Berücksichtigung der biogeografischen
Herkunft

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
philosophiae doctor (PhD)
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jan Felix Fleckhaus
aus Essen

Digitalzentrum - Copyshop
München

2024

Betreuer*in: Prof. Dr. Peter M. Schneider & Prof. Dr. Marielle
Vennemann

Gutachter*in: Prof. Dr. Dr. Michal Ruth Schweiger
Prof. Dr. Michael Nothnagel

Datum der Mündlichen Prüfung: 15.01.2024

Danksagung

Mit dieser Dissertationsschrift endet eine lehrreiche Zeit als Doktorand, in der ich mich akademisch weiterentwickeln und im Berufsfeld der forensischen Molekulargenetik Fuß fassen konnte. Dies wäre nicht ohne die Unterstützung vieler Personen möglich gewesen, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Prof. Peter M. Schneider für die Betreuung meiner Arbeit als Doktorvater, die vielen lehrreichen Gespräche, guten Ratschläge und die stetige Ermutigung die nächsten Schritte zu gehen, auch wenn sie mir manchmal sehr weit erschienen.

Prof. Marielle Vennemann für die spontane Übernahme der Betreuung meiner Arbeit in der intensiven, finalen Phase. Danke für die vielen guten Ratschläge und Einschätzungen, die mir die nötige Sicherheit zur Vollendung dieser Arbeit gegeben haben.

Prof. Michal R. Schweiger und Prof. Michael Nothnagel für die Begleitung meiner Promotion als Tutoren und den hilfreichen Austausch bei den regelmäßigen Treffen.

Meinen Freunden Morgan und Johannes und ihren Familien für die nötige Ablenkung in stressigen Zeiten und den stetigen Zuspruch. Es macht mich stolz, dass ich mich als Teil eurer Familien fühlen darf.

Meiner Familie für ihre bedingungslose Liebe. Ihr habt schon früh mein Interesse für die Biologie geweckt und mir jede Möglichkeit gegeben meinen Weg zu gehen. Vor allem danke ich euch, dass ihr niemals an mir gezweifelt habt. Mit dieser Sicherheit konnte ich so oft meinen eigenen Zweifel überwinden.

Mira für Ihren Rückhalt auch in den schwierigsten Zeiten. Ihre bedingungslose Unterstützung, ihr positives Wesen und ihr Blick auf die Welt, verleihen meinem Leben Leichtigkeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Einführung in die Forensische Molekulargenetik.....	1
1.2 Erweiterte DNA-Analyse.....	2
1.2.1 Juristische Hintergründe.....	2
1.2.2 DNA-Phänotypisierung.....	3
1.2.3 Biogeografische Herkunft.....	5
1.2.3.1 Populationsgegentische Grundlagen.....	5
1.2.3.2 Forensische AIM-Panels.....	6
1.3 Forensische Altersdiagnostik.....	8
1.4 Epigenetische Altersschätzung.....	10
1.4.1 Molekulare Grundlagen der DNA-Methylierung.....	10
1.4.2 CpG-Methylierung als Biomarker für das chronologische Alter.....	11
1.4.2.1 Prinzip einer epigenetischen Uhr.....	11
1.4.2.2 Modelle zur Altersschätzung.....	12
1.4.2.3 Einfluss von Lebensstil- und Umweltfaktoren auf die DNA-Methylierung.....	13
1.4.3 Methodische Grundlagen der quantitativen Methylierungsanalyse.....	14
1.4.4 Methoden zur quantitativen Methylierungsanalyse.....	16
1.4.4.1 Sequencing-by-synthesis Methoden.....	16
1.4.4.2 Illumina Methylation Microarrays und SNaPshot-Minisequenzierung.....	17
1.5 Epigenetische Altersschätzung im Kontext der Spurenanalyse.....	18
1.5.1 Anforderungen an das Probenmaterial.....	18
1.5.2 Praktische Herausforderungen in der Fallarbeit.....	19
1.6 Zielsetzung und Forschungsfragen.....	20
2. Publikationen	21
2.1 Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via Pyrosequencing.....	21
2.2 Investigation of the impact of biogeographic ancestry on DNA methylation based age predictions comparing a Middle East and a Central European population.....	37
3. Weitere Erst- oder Co-Autorschaften	48

3.1 Erstautorschaften	48
3.1.1 DNA-Methylierungsanalyse–Neues Verfahren der forensischen Altersschätzung.....	48
3.2 Co-Autorschaften.....	48
3.2.1 A collaborative exercise on DNA methylation-based age prediction and body fluid typing .	48
3.2.2 Forensische DNA-Methylierungsanalyse; Erster, technischer Ringversuch der Arbeitsgruppe „Molekulare Altersschätzung“ der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin	49
3.2.3 Forensische DNA-Methylierungsanalyse; Zweiter, technischer Ringversuch der Arbeitsgruppe „Molekulare Altersschätzung“ der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin.....	49
3.2.4 Epigenetic age signatures in bones	49
3.2.5 Collaborative Exercise: Analysis of Age Estimation Using a Qiagen Protocol and the Pyromark Q48 Platform.....	50
4. Diskussion.....	51
4.1 Etablierung der Multiplex-Strategie für die Pyrosequenzierung (Publikation 1)	51
4.2 Anpassung der Multiplex-Strategie für die Altersschätzung aus Spurenproben.....	53
4.3 Einfluss der Herkunft auf die epigenetische Altersschätzung (Publikation 2).....	54
4.3.1 Mögliche Ursachen der populationspezifischen Methylierungsunterschiede	56
5. Zusammenfassende Beantwortung der Forschungsfragen	58
6. Ausblick	59
<i>Kurzfassung der Dissertationsschrift in englischer Sprache</i>	64
<i>Kurzfassung der Dissertationsschrift in deutscher Sprache</i>	65
Referenzen.....	66
Übersicht der Publikationen:	77
Erklärungen	78

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
VNTRs	variable number of tandem repeats
STRs	short-tandem-repeats
PCR	Polymerase-Ketten-Rektion
BGA	biogeografische Herkunft
StPO	Strafprozessordnung
SNPs	Einzel-Nukleotid Polymorphismen
p	Wahrscheinlichkeit
ROC	Receiver-Operating-Characteritics
AUC	area under curve
VISAGE	VISible Attributes Through Genomics
AIMs	ancestry informative marker
HGDP-CEPH	Human Genome Diversity Project Cell Line Panel
EUROFORGEN	EUROPEAN FORENSIC GENETICS Network of Excellence
SGDP	Simons Foundation human genome diversity panel
EGDP	Estonian Biocentre human genome diversity panel
PCA	Principal component analysis
MCMC	Markow-Chain-Monte-Carlo-Verfahren
AGFAD	Arbeitsgemeinschaft für forensische Altersdiagnostik
DGRM	Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin
JGG	Jugendgerichtsgesetz
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
AufenthG	Aufenthaltsgesetz
AsylG	Asylgesetz
SGB	Sozialgesetzbuch
UNICEF	Kinderhilfswerks der vereinten Nationen
RöV	Röntgenverordnung
MRT	Magnetresonanztomographie
DNMT	DNA-Methyltransferase
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
TET	ten eleven translocation
MAD	mittlere absolute Abweichung
MPS	Massive Parallele Sequenzierungsplattform
PPi	Pyrophosphats
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten
SBE	single base extension
CE	Kapillarelektrophorese
meQTL	methylation quantitative trait loci

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Prinzip der Bisulfit-Konvertierung	15
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht juristisch relevanter Altersgrenzen nach verschiedenen Rechtsvorschriften (übersetzt und ergänzt nach Schmeling et al. 2016 ⁶⁰)	8
--	---

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Forensische Molekulargenetik

Im Zentrum der forensischen Molekulargenetik steht die DNA-Typisierung, über die es möglich ist, Menschen mit Ausnahme von eineiigen Zwillinge, über ihr einzigartiges DNA-Profil zu unterscheiden. Die interindividuellen Unterschiede finden sich vor allem im nicht-codierenden Bereich der DNA, in Strukturen von kurzen, sich tandemartig wiederholenden DNA-Sequenzen, die als VNTRs (engl.: variable number of tandem repeats) bzw. STRs (engl.: short-tandem-repeats) bezeichnet werden. Die Möglichkeit, anhand dieser hochpolymorphen Merkmalssysteme ein „individualspezifisches DNA-Profil“ zu erstellen, wurde erstmals durch Sir Alec Jeffreys im Jahr 1985 beschrieben.^{1,2} Unterstützt durch den technologischen Fortschritt, vor allem durch den Einsatz der 1983 durch Mullis et al. erfundenen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), sowie der Verwendung hochpolymorpher STR-Marker, hat sich die DNA-Typisierung bis heute zur Goldstandard-Methode der forensischen Molekularbiologie entwickelt.³

In der forensischen Fallarbeit wird sie vor allem im Rahmen von Spurenuntersuchungen, Abstammungsbegutachtungen sowie zur Identifizierung von Personen angewandt, die z.B. durch Verwesung oder Schadensereignisse nicht über äußerliche Merkmale sicher identifiziert werden können. Trotz ihrer Leistungsfähigkeit liefert die DNA-Analyse vor allem bei der Spurenuntersuchung, aber auch in Identifizierungsfällen nicht immer einen Hinweiswert für die polizeiliche Ermittlung. Dies liegt darin begründet, dass für die Identifizierung einer Person bzw. der Zuordnung eines Spuren-DNA-Profiles zu einer Person ein entsprechendes Referenzprofil der verstorbenen bzw. der bei der Spurenentstehung beteiligten Person vorhanden sein muss. Vor allem in Spurenfällen stellt diese Tatsache häufig eine Einschränkung dar, weil hier für einen Abgleich lediglich bereits tatverdächtige Personen bzw. nationale und internationale DNA-Datenbanken zur Verfügung stehen. Kann ein Spuren-DNA-Profil nicht zugeordnet werden, muss der entsprechende Urheber zunächst durch die polizeiliche Fahndung ermittelt werden, bevor dieser durch einen anschließenden Abgleich der DNA-Profile sicher identifiziert werden kann.

Als Unterstützung für die polizeiliche Ermittlung befasst sich ein Forschungszweig der forensischen Molekularbiologie seit einiger Zeit mit DNA-Untersuchungen, die Aufschluss über das Aussehen (Phänotyp), die biogeografische Herkunft (BGA) sowie das chronologische Alter einer Person geben können.⁴ Diese als „erweiterte DNA-Analyse“ zusammengefassten Methoden finden immer häufiger Anwendung in der forensischen Fallarbeit.

1.2 Erweiterte DNA-Analyse

1.2.1 Juristische Hintergründe

Die neuen Methoden der erweiterten DNA-Analyse werden seitens der Ermittlungsbehörden und der Justiz als hilfreiches und nötiges Fahndungsmittel angesehen. Jedoch gibt es auch Zweifel an der ethischen Rechtmäßigkeit der Untersuchungen aus Reihen der Sozialwissenschaften, welche in den Analysen vor allem einen Eingriff in die Persönlichkeitsrechte und bezogen auf die Vorhersage der BGA, die Gefahr der Diskriminierung von Minderheiten sehen.⁵⁻¹⁰ Die aus diesem Spannungsfeld entstehende Debatte hat vor allem in Deutschland durch die Legalisierung der Methodik im Rahmen der Strafverfolgung an Intensität gewonnen und wird kontrovers diskutiert.⁸

Die Legalisierung der erweiterten DNA-Analyse erfolgte in Deutschland im Zuge der Novellierung der Strafprozessordnung (StPO) im Jahr 2019. Dabei wurde der Paragraph 81e, welcher den Einsatz molekulargenetischer Untersuchungen regelt, angepasst bzw. um den folgenden Satz erweitert:

„Ist unbekannt, von welcher Person das Spurenmaterial stammt, dürfen zusätzlich Feststellungen über die Augen-, Haar- und Hautfarbe sowie das Alter der Person getroffen werden.“ (§ 81e Absatz 2 Satz 2)

Demnach ist die Vorhersage von Augen-, Haar- und Hautfarbe sowie des chronologischen Alters strafrechtlich erlaubt, die der BGA jedoch nicht, sofern die Identität des Spurenlegers unbekannt ist. Gleichermäßen gilt dies nach § 88 StPO auch für die Anwendung der Methoden zum Zwecke der Identifizierung unbekannter Toter im Strafverfahren, da sich dieser explizit auf den §81e bezieht:

„Zur Feststellung der Identität und des Geschlechts sind die Entnahme von Körperzellen und deren molekulargenetische Untersuchung zulässig; für die molekulargenetische Untersuchung gilt § 81f Abs. 2 entsprechend.“ (§ 88 Absatz 1 Satz 3)

„Mit der Untersuchung nach § 81e sind in der schriftlichen Anordnung Sachverständige zu beauftragen [...]“ (§ 81f Absatz 2 Satz 1)

Im europäischen Vergleich ist Deutschland damit neben der Schweiz, den Niederlanden und der Slowakei eines der wenigen Länder mit einer expliziten gesetzlichen Regelung für den

Einsatz der erweiterten DNA-Analyse.¹¹⁻¹³ In den folgenden Abschnitten werden die Methoden zur Phänotypisierung kurz vorgestellt, bevor im Anschluss, als zentraler Gegenstand dieser Arbeit, die wissenschaftlichen Grundlagen und Methoden zur Vorhersage der BGA und des chronologischen Alters umfassend beschrieben werden.

1.2.2 DNA-Phänotypisierung

Die Vorhersage der Augen-, Haar- und Hautfarbe basiert auf der Analyse von Einzel-Nukleotid Polymorphismen (SNPs), deren Ausprägung mit einer bestimmten Pigmentierung assoziiert ist. Durch die parallele Analyse mehrerer solcher SNPs und anhand von Vorhersagemodellen können für die unterschiedlichen Merkmalstypen (Augen-, Haar- und Hautfarbe) Wahrscheinlichkeitswerte (p) für das Vorhandensein der einzelnen Ausprägungen (z.B. blond, braun, etc.) berechnet und anhand dieser der wahrscheinlichste Phänotyp vorhergesagt werden. Die Interpretation der p -Werte ist dabei nicht immer trivial, da sich in Grenzfällen die Wahrscheinlichkeit für keine der Ausprägungen deutlich abhebt.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit klarer Interpretationsrichtlinien, die Schwellenwerte für p definieren, ab denen eine bestimmte Ausprägung vorhergesagt werden kann. Diese Schwellenwerte werden anhand von umfangreichen Referenzstudien ermittelt. Dabei wird für jedes Merkmal untersucht, ab welchem p -Wert die Rate richtig positiver Vorhersagen möglichst hoch und die Rate falsch positiver Vorhersagen möglichst gering ist. Die grafische Gegenüberstellung der Raten richtig positiver und falsch positiver Vorhersagen bei variierenden Schwellenwerten für p wird als ROC (Receiver-Operating-Characteristics)-Kurve bezeichnet. Anhand der ROC-Kurven kann für die jeweiligen Merkmalstypen überprüft werden, ab welchem p -Wert die Rate falsch positiver Vorhersagen ausreichend gering ist, um diesen Wert als entsprechenden Schwellenwert festzulegen. Zudem stellt die Fläche unter der ROC-Kurve, die als AUC (Area Under Curve) bezeichnet wird, ein Maß für die Güte des Vorhersagemodells dar. Ein AUC von 1 stellt dabei ein perfektes Vorhersagemodell dar, während bei einem AUC von 0,5 die Vorhersage rein zufällig ist.^{4,14,15} In vielen Studien wird der AUC-Wert deshalb als Maß der Schätzgenauigkeit für die jeweiligen Merkmalstypen angegeben.

Als Gold-Standard für die probabilistische Vorhersage der Augen-, Haar- und Hautfarbe gilt das HirisPlex-S System.¹⁶ Das System besteht aus insgesamt 41 SNPs, von denen 6 SNPs für die Vorhersage der Augenfarbe, 18 SNPs für die Vorhersage der Haarfarbe und 17 SNPs (zusammen mit 19 SNPs, die ebenfalls für die Vorhersage der Augen- und Haarfarbe verwendet werden) für die Vorhersage der Hautfarbe dienen. Das Vorhersagemodell für die Augenfarbe basiert auf dem 2011 publizierten IrisPlex System und erlaubt eine Differenzierung von einer blauen, braunen und einer intermediären Augenfarbe.¹⁷⁻¹⁹ Die

Vorhersagewahrscheinlichkeiten für die jeweiligen Farbtypen liegen bei 0,95 AUC für braune, 0,94 AUC für blaue, und 0,74 AUC für eine intermediäre Augenfarbe, gemessen in einem Kollektiv aus 9188 Referenzproben aus acht verschiedenen europäischen Ländern.^{20,21}

Die Erweiterung des IrisPlex zum HirisPlex System mit 18 weiteren SNPs für die Vorhersage der Haarfarbe erfolgte im Jahr 2013.²² Das entsprechende Vorhersagemodell für die Haarfarbe umfasst die Farbtypen blond, braun, schwarz und rot, die mit einer Genauigkeit von AUC = 0,81 für blonde, AUC = 0,75 für braune, AUC = 0,85 für schwarze und AUC = 0,92 für rote Haare vorhergesagt werden können (das Referenzkollektiv umfasst 1601 Personen aus Polen, Griechenland, Irland und Japan). Neben p-Werten für die genannten Ausprägungen wird zudem ein p-Wert für einen hellen oder dunklen Typen berechnet.

Durch die Erweiterung mit 17 zusätzlichen SNPs für die Vorhersage der Hautfarbe, wurde das Hiris-Plex-S System letztlich vervollständigt. Dabei werden für die Vorhersage der Hautfarbe nicht nur die 17 neu hinzugefügten SNPs verwendet, sondern auch 19 SNPs, die ebenfalls als Marker für die Augen bzw. Haarfarbe verwendet werden.^{16,23} Anhand dieser insgesamt 36 SNPs können die fünf Hauttypen „sehr blass“ (AUC = 0,74), „blass“ (AUC = 0,72), „intermediär“ (AUC = 0,73), „dunkel“ (AUC = 0,87) und „dunkel bis schwarz“ (AUC = 0,97) vorhergesagt werden.²³

Der Vergleich der AUC-Werte zeigt, dass sich die Augen-, Haar- und Hautfarbe nicht mit demselben Maß an Genauigkeit vorhersagen lassen. Aus diesem Grund sind in den Hiris-Plex-S Interpretationsrichtlinien verschiedene Strategien zur Bestimmung des wahrscheinlichsten Phänotyps vorgesehen. Nur die Augenfarbe kann dabei direkt über den höchsten p-Wert bestimmt werden. Für die Vorhersage der Haarfarbe wird ein schrittweiser Ansatz verfolgt, in dem zunächst für den höchsten p-Wert geprüft wird, ob dieser einen Schwellenwert von $p = 0,7$ erreicht, um im zweiten Schritt über den p-Wert für eine helle oder dunkle Ausprägung mögliche Zwischentypen zu bestimmen. Bei einem Ergebnis mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für blonde Haare mit $p < 0,7$ und einer Wahrscheinlichkeit für eine helle Ausprägung $p < 0,9$ würde zum Beispiel als wahrscheinlichster Phänotyp eine dunkelblonde bis braune Haarfarbe vorhergesagt. Der einzige Farbtyp, für den keine Zwischentypen definiert werden, ist eine rote Haarfarbe. Unabhängig von der Höhe des p-Wertes wird eine rote Haarfarbe vorhergesagt, sofern der p-Wert die der anderen Haarfarben übertrifft.

Am komplexesten ist die Vorhersage der Hautfarbe. Hier wird zunächst der Farbtyp mit der höchsten Wahrscheinlichkeit bestimmt. Liegt diese über $p = 0,9$ gilt dieser Farbtyp als der wahrscheinlichste Phänotyp. Ist die Wahrscheinlichkeit kleiner 0,9, jedoch größer 0,7 bzw. 0,5, wird die Farbkategorie mit der zweithöchsten Wahrscheinlichkeit hinzugezogen und ein entsprechender Zwischentyp bestimmt (z.B. dunkel bis schwarz).

Es zeigt sich, dass für eine sachgemäße Interpretation der Wahrscheinlichkeitswerte der einzelnen Merkmalstypen, hin zur Vorhersage des wahrscheinlichsten Phänotyps, ein grundlegendes Methodenverständnis vorliegen muss. Aus diesem Grund ist es nötig, neben der technischen Weiterentwicklung der Methodik, zum Beispiel durch die Anwendung der massiven parallelen Sequenzierung, die entsprechenden Ermittlungsbehörden in Bezug auf die Ergebnisauswertung und Interpretation zu schulen.²⁴⁻²⁷

Einen wichtigen Beitrag dazu erbrachte eine interdisziplinäre Gruppe aus 13 universitären und polizeilichen Institutionen aus acht verschiedenen Ländern, welche im Rahmen des EU-geförderten VISAGE-Projekts (VISible Attributes Through GENomics) in den Jahren 2017-2022 ein kombiniertes Analyse- und Interpretationstool zur erweiterten DNA-Analyse entwickelte, und im Anschluss über Train-The-Trainer Workshops, sowie Symposien in deutscher, französischer und spanischer Sprache, Schulungen zum Einsatz des Tools anbot.²⁷⁻²⁹

1.2.3 Biogeografische Herkunft

Die genetische Variabilität innerhalb der Weltbevölkerung ist nicht gleichmäßig verteilt, sondern bildet zu einem gewissen Maße populationsspezifische Muster aus.³⁰⁻³³ Über DNA-Polymorphismen, die mit unterschiedlichen Frequenzen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen auftreten, so genannte ancestry informative marker (AIMs), können diese Muster abgebildet und die BGA einer Person bestimmt werden. Die BGA-Analyse gibt somit Aufschluss über die geografische Region, aus der die direkten Vorfahren einer Person stammen.³⁴ Die Präzision, mit der einzelne Populationen voneinander abgrenzbar sind, ist dabei maßgeblich von der genetischen Divergenz zwischen den Populationen abhängig.³⁵

1.2.3.1 Populationsgegentische Grundlagen

Die heute existierenden menschlichen Populationen gehen auf ursprüngliche Populationen zurück, die sich im Rahmen der Expansion des modernen Menschen (*Homo sapiens*) entwickelten. Vor ca. 45.000 – 60.000 Jahren begann der moderne Mensch ausgehend von Afrika, neue geografische Regionen zu erschließen.³⁶⁻³⁸ Verfolgt man den Weg der Expansion, so findet sich eine graduelle Reduktion der genetischen Variabilität mit zunehmender geografischer Entfernung von Afrika.^{39,40} Zu diesem Phänomen wurden verschiedene Erklärungsmodelle diskutiert. Am wahrscheinlichsten bzw. als hauptursächlich gilt jedoch heute, dass sich im Rahmen der Erschließung neuer Regionen mehrfach kleine Gruppen von Individuen isolierten, was zu einer wiederholten drastischen Reduzierung des Genpools (Gründereffekt) führte.^{41,42} Die Variabilität der Genpools steht in einem direkten

Zusammenhang mit der genetischen Divergenz, da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten populationsspezifischer genetischer Varianten mit der Variabilität eines Genpools steigt. So ist zum Beispiel die genetische Divergenz zwischen Afrika und Eurasien deutlich größer als zwischen Eurasien und Ost-Asien.^{43,44} Folglich sind später entstandene Populationen im Rahmen der BGA-Analyse deutlich schwieriger zu differenzieren als ältere Populationen. Ein weiterer Faktor, der zu den heute existierenden Populationsstrukturen beigetragen hat, sind große Migrationsbewegungen in der jüngeren Menschheitsgeschichte, die zu Mischungen der ursprünglichen Genpools von teilweise weit entfernten Populationen führten.³⁷ In Amerika wurde der ursprüngliche Genpool zum Beispiel durch die europäische Kolonialisierung vor ca. 500 Jahren und die anschließende Übersiedlung afrikanischer Sklaven stark mit dem europäischen und afrikanischen Genpool gemischt.^{37,42,45} In Australien wurden die Ureinwohner im Rahmen der europäischen Kolonialisierung sogar fast vollständig verdrängt, sodass sich heute nur noch wenige Merkmale des ursprünglichen australischen Genpools finden.⁴⁶ Durch die Mischung von Genpools werden auch vorher isoliert oder mit großen Frequenzunterschieden auftretende genetische Varianten ausgetauscht, was zu einer Reduzierung der Divergenz führt. Gleichzeitig entstehen durch die Mischung neue Kombinationen von genetischen Varianten, die wiederum zur Unterscheidung der Populationen genutzt werden können.³⁵ Bei der Auswahl von AIM-SNPs für die BGA-Analyse sollten somit nicht nur die populationsspezifischen Frequenzunterschiede der einzelnen SNPs berücksichtigt werden, sondern auch mögliche Korrelationen zwischen verschiedenen SNPs, über die die Herkunft erklärt werden kann.

1.2.3.2 Forensische AIM-Panels

Die erste detaillierte Beschreibung weltweiter populationsgenetischer Muster wurde Anfang des 21. Jahrhunderts durch Rosenberg et al. auf Basis des HGDP-CEPH-Probenkollektivs (Human Genome Diversity Project Cell Line Panel), ein Probenset lymphoblastoider Zelllinien von 1064 Probanden aus 52 verschiedenen weltweiten Populationen, publiziert.^{30,47} Rosenberg et al. zeigten, dass die stärkste genetische Differenzierung zwischen den kontinentalen Populationen Eurasien, Afrika unterhalb der Sahara, Ostasien, Amerika und Ozeanien vorliegt und diese anhand von 377 STR-Loci unterschieden werden können. Zudem ist eine weitere Differenzierung Eurasiens in Europa, Mittlerer Osten und Zentral/Südost Asien ebenfalls möglich, jedoch mit einer geringeren Differenzierungsstärke.

Im Jahr 2008 untersuchten Li et al. populationsgenetische Strukturen ebenfalls im HGDP-CEPH Proben Kollektiv, jedoch anhand von 650.000 SNPs, und identifizierten dieselben fünf kontinentalen Populationen wie Rosenberg et al. als die am besten genetisch differenzierbaren Populationen.³⁴

Erste forensische Assays, wie der 34-plex SNP Assay oder ein 47-SNPs Assay aus den Niederlanden, wurden für die damals in der forensischen Praxis übliche Minisequenzierung entwickelt und waren demnach bezogen auf die Anzahl parallel untersuchbarer SNPs begrenzt. Deshalb erlaubten sie zunächst nur die Unterscheidung der drei (Afrika, Europa, Ost-Asien) bzw. vier (Afrika–Amerika–Asien–Eurasien) genetisch am stärksten differenzierten Populationen.^{48,49} Mit dem vermehrten Einsatz der massiven parallelen Sequenzierung (MPS) konnte der Umfang der Assays enorm gesteigert werden. Im Jahr 2014 wurde das im Rahmen des EU geförderte EUROFORGEN (EUROpean FORensic GENetics Network of Excellence)-Projekts entwickelte Global AIMs Panel publiziert, welches anhand von 128 AIM-SNPs die Vorhersage afrikanischer, europäischer, ost-asiatischer, ur-amerikanischer und ozeanischer Herkunft erlaubt.⁵⁰ Eine Besonderheit des Global AIMs Panels im Vergleich zu den bis dahin publizierten Assays bestand darin, dass die 128 SNPs zwischen den fünf definierten Populationen eine fast identische Divergenz aufweisen. Dies wurde durch die Inkorporation einer höheren Anzahl an SNPs für die genetisch weniger differenzierten Populationen (Europa, Ost-Asien, Ozeanien, Amerika) mit jeweils ca. 30 SNPs erreicht, im Vergleich zu nur acht SNPs für die Vorhersage einer afrikanischen Herkunft.

Im selben Zeitraum wurden viele weitere zum Teil umfangreiche Assays zur BGA-Vorhersage publiziert, die sich, bedingt durch abweichende Referenzpopulationen, Sequenzierungsstrategien und mathematische Algorithmen bzw. Auswertungskonzepte, zum Teil stark in der Auswahl der AIM-SNPs unterscheiden.⁵¹ Die beiden neuesten Panels zur BGA-Analyse sind in dem Ion AmpliSeq™ PhenoTrivium Panel und dem VISAGE Enhanced Tool integriert.^{26,52} Sie wurden für die modernen Sequenzierungsplattformen, den MiSeq FGx (Fa. Verogen) und den Ion S5 (Fa. ThermoFisher Scientific) entwickelt und forensisch validiert.²⁷ Das PhenoTrivium Panel umfasst 163 autosomale AIM-SNPs sowie 120 Y-chromosomale SNPs. Die 163 AIM-SNPs erlauben die Differenzierung der sieben Populationen Afrika, Ost-Asien, Süd-Asien, Süd-West-Asien, Europa, Amerika und Ozeanien. Zusätzlich können über die Y-chromosomalen SNPs 20 Haplogruppen sowie 100 Sub-Haplogruppen bestimmt werden. Die Y-(Sub)-Haplogruppe gibt dabei zusätzliche Auskunft über die Abstammung in väterlicher Linie und kann besonders bei Personen mit gemischter Herkunft wichtige zusätzliche Informationen über die Herkunft der väterlichen Linie geben.

Das VISAGE Enhanced Tool wurde im Rahmen des bereits erwähnten VISAGE Projekts sowohl für die MiSeq FGx und die Ion S5 Plattform entwickelt und validiert. Es umfasst 104 autosomale AIM-SNPs, 16 X-chromosomale AIM-SNPs, 85 Y-chromosomale AIM-SNPs und 21 AIM-Mikrohaplotypen (= Einheit aus mehreren SNPs in einem Abstand von weniger als 200 bp). Diese erlauben eine Differenzierung der Populationen Afrika unterhalb der Sahara, Europa, Ost-Asien, Süd-Asien, (Ur-)Amerika, Ozeanien sowie Mittlerer Osten. Eine Besonderheit des VISAGE Enhanced Tools ist die Menge und geografische Verteilung der

Referenzproben. Neben den Proben der bereits erwähnten HGDP-CEPH und 1000 Genomes Kollektive wurden ergänzend weitere Proben aus diversen Probenkollektiven ergänzt.⁵²⁻⁵⁵

1.3 Forensische Altersdiagnostik

Anders als die bereits im Rahmen dieser Arbeit besprochenen Methoden der erweiterten DNA-Analyse ist die forensische Altersschätzung keine von Grund auf neue Disziplin im Portfolio der Rechtsmedizin, sondern findet im Rahmen der forensischen Altersdiagnostik schon seit vielen Jahren Anwendung in der rechtsmedizinischen Praxis. Die Methoden sind in den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für forensische Altersdiagnostik (AGFAD) der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) zusammengefasst. Diese umfassen die „Altersdiagnostik bei Lebenden im Strafverfahren“, die „Altersdiagnostik bei Lebenden im Rentenverfahren“, die „Altersdiagnostik bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen außerhalb des Strafverfahrens“ und die „Forensische Geschlechts- und Altersdiagnose am Skelett“.⁵⁶⁻⁵⁹ Aus den Empfehlungen geht hervor, dass das chronologische Alter einer Person in verschiedenen Rechtsbereichen sowie auch Altersbereichen von juristischer Bedeutung ist. Sowohl im Strafrecht als auch im Zivilrecht sind an verschiedenen Stellen in der Gesetzgebung Altersgrenzen formuliert (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht juristisch relevanter Altersgrenzen nach verschiedenen Rechtsvorschriften (übersetzt und ergänzt nach Schmeling et al. 2016⁶⁰)

Rechtsgebiete	Altersgrenzen in Jahren	Fragestellungen	Rechtsvorschrift(en)
Strafrecht	14	Strafmündigkeit	§ 19 StGB
Strafrecht	18, 21	Anwendung des Jugend- bzw. Erwachsenenstrafrechts	§ 1 JGG
Familienrecht	18	Vormundschaft	§ 1773 BGB
Ausländerrecht	18	Handlungs- und Verfahrensfähigkeit	§ 80 AufenthG, § 12 AsylG
Sozialrecht	18	Inobhutnahme von Kindern und Jugendlichen	§ 42 SGB VIII
Sozialrecht	18	Gewährung von Erziehungshilfe	§§ 27 ff. SGB VIII
Sozialrecht	67	Anspruch auf Regelaltersrente	§35 SGB VI

Im Strafrecht ist klar geregelt, dass eine Person erst mit dem Erreichen des 14. Lebensjahres strafmündig ist und nach dem Jugendstrafrecht belangt werden kann. Voll strafmündig ist eine Person ab dem 18. Lebensjahr, wobei sie bis zum Erreichen des 21. Lebensjahres den Status

des „Heranwachsenden“ innehat und nach Ermessen des Gerichts entweder nach dem Jugend- oder dem Erwachsenenstrafrecht behandelt wird. Eine vergleichbare Übergangsregelung zwischen Jugend- und Erwachsenenstatus findet sich im Zivilrecht nicht. Hier gilt z.B. im Familienrecht, Ausländerrecht oder Sozialrecht eine Person ab dem 18. Lebensjahr als volljährig.

In Deutschland sowie auch in vielen anderen Ländern der Welt werden Kinder nach ihrer Geburt registriert und somit der Geburtstag des Kindes offiziell dokumentiert. Laut einem Bericht des Kinderhilfswerks der vereinten Nationen (UNICEF) sind dennoch ca. 25 % der weltweiten Kinder unter einem Alter von fünf Jahren, vor allem aus politisch instabilen Regionen oder Entwicklungsländern nicht registriert.⁶¹ Durch zunehmende Migrationsbewegungen von Personen aus eben diesen Regionen nach Europa und auch Deutschland sind die Behörden immer häufiger zunächst im Rahmen des Aufenthalts- bzw. Asylgesetzes, aber ggf. auch des Strafgesetzes oder anderen Gesetzbüchern des Zivilrechts mit der Situation konfrontiert, das chronologische Alter junger unbegleiteter Schutzsuchender ohne gültige bzw. mit zweifelhaften Ausweispapieren über ein forensisches Sachverständigengutachten bestimmen zu müssen.^{62,63} Gemäß den Empfehlungen der AGFAD sollte eine forensische Altersschätzung bestenfalls aus der Zusammenschau der Befunde einer körperlichen Untersuchung, einer Untersuchung des Zahnstatus und der Skelettreife erfolgen. Die Altersschätzung erfolgt dann nach dem Mindestalter Prinzip, wobei neben dem wahrscheinlichsten Alter auch das Mindestalter angegeben wird, welches über die jüngste Person im Referenzkollektiv definiert ist, die denselben Reifezustand wie die untersuchte Person aufweist.⁶⁰

Mit Ausnahme der körperlichen Untersuchung greifen alle genannten Methoden auf den Einsatz von Röntgenuntersuchungen zurück. Nach der Röntgenverordnung (§25 Abs. 1 RöV) bedarf die Anwendung einer Röntgenuntersuchung jedoch einer rechtlichen oder medizinischen Rechtfertigungsgrundlage.⁶⁴ Da die Altersfeststellung keinem medizinischen Zwecke dient, bedarf es demnach einer entsprechenden gesetzlichen Norm für die Durchführung. In der Strafprozessordnung bietet der Paragraph 81a StPO die normative Rechtfertigungsgrundlage für die Durchführung einer Röntgenuntersuchung, auch gegen den Willen eines Betroffenen als Zwangsmaßnahme. Im Zivilprozessrecht ist eine solche Norm nicht zu finden, weshalb eine Röntgenuntersuchung nur freiwillig im Sinne der Mitwirkungspflicht am Prozess erfolgen kann. Laut den Empfehlungen der AGFAD kann ohne die notwendigen Untersuchungsbefunde der Röntgenuntersuchung keine zuverlässige Altersschätzung erfolgen. Eine Lösung für diese Problematik könnte die Hinzuziehung alternativer Methoden zur Altersfeststellung darstellen, die auf weniger invasiven Untersuchungsmethoden basieren. Eine neue diesbezüglich vielversprechende Methode ist die epigenetische Altersschätzung. Die Methode untersucht die altersabhängige DNA-Methylierung und kann prinzipiell anhand

aller DNA-haltigen Zellen oder Gewebetypen durchgeführt werden.⁶⁵⁻⁶⁷ Diese Flexibilität bei der Probengewinnung lässt somit auch eine nicht-invasive Probenentnahme z.B. von Mundschleimhautzellen oder Speichel zu. Zudem ist die epigenetische Altersschätzung nicht auf einen bestimmten Altersbereich begrenzt.⁶⁸

1.4 Epigenetische Altersschätzung

Das erste Modell zur Schätzung des chronologischen Alters über DNA-Methylierungsmarker wurde 2011 durch Bockland et al. beschrieben und erlaubte eine Altersschätzung aus Speichelproben mit einem mittleren Schätzfehler von 5,2 Jahren.⁶⁹ In der Folge wurde die Methodik in einer Vielzahl von Studien weiterentwickelt. Diese Studien umfassen verschiedene Methoden zur Methylierungsanalyse, biologische Matrices, mathematische Verfahren zur Modellierung der altersabhängigen Methylierungsänderung sowie eine unterschiedliche Auswahl und Anzahl an DNA-Methylierungsmarkern.^{70,71} Für die Anwendung der Methodik in der forensischen Fallarbeit muss neben der Präzision der jeweiligen Altersschätzungsmodelle auch die Praktikabilität berücksichtigt werden. Vor allem im Kontext der Spurenuntersuchung sind die Sensitivität der Methodik, die Robustheit des Assays bezogen auf die Qualitätsanforderungen an das zu untersuchende biologische Material und letztlich auch die Kosten für die Analyse entscheidende Faktoren.

1.4.1 Molekulare Grundlagen der DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist eine epigenetische Modifikation der DNA, bei der Methyl-Gruppen, katalysiert durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs), kovalent an die DNA gebunden werden.⁷² Während bei Prokaryonten die Basen Adenin und Cytosin methyliert werden, tritt bei Eukaryoten die DNA-Methylierung nur an Cytosinen auf, denen in der DNA-Sequenz unmittelbar ein Guanin folgt, weshalb diese Positionen auch als CpGs bezeichnet werden.⁷²⁻⁷⁴ Der Mensch besitzt drei verschiedene DNMTs.⁷⁵ Die DNMT1 dient der Aufrechterhaltung der CpG-Methylierung, da sie bevorzugt an hemimethylierte CpG-Positionen ansetzt, also solchen Positionen, bei denen das Cytosin, zum Beispiel im Anschluss an die DNA-Replikation, nur in einem der beiden komplementären Stränge methyliert ist und dort die Methylierung der entsprechenden CpG im neu synthetisierten Strang katalysiert.^{76,77} Durch diese Funktion bietet die DNMT1 die Grundlage für die Vererbbarkeit der CpG-Methylierung.⁷⁸

Die DNMT3A und DNMT3B werden als de novo DNMTs bezeichnet, da sie die Methylierung von vollständig unmethylierten CpGs katalysieren.⁷⁹ Die De-Methylierung der CpGs kann entweder passiv, durch das Ausbleiben der Methylierung des neu synthetisierten Stranges während der DNA-Replikation durch die DNMT1, oder aktiv durch eine Gruppe von so

genannten ten eleven translocation enzymes (TET-Enzymen) erfolgen.^{80,81} Die TET-Enzyme führen zu einer Oxidation methylierter Cytosine, die so von zelleigenen Reparaturmechanismen erkannt und durch unmethylierte Cytosine ausgetauscht werden.⁸² Die Methylierung und De-Methylierung von Cytosinen ist maßgeblich an der Kontrolle der Genaktivität beteiligt.⁸³ So finden sich CpG-Stellen im menschlichen Genom nicht gleichmäßig verteilt, sondern in Form von so genannten CpG-Inseln vor allem in den Promotorregionen von Genen.^{84,85} Als Teil des epigenetischen Netzwerks wird die DNA-Methylierung durch komplexe Wechselwirkungen zwischen der Umwelt und dem Genom kontrolliert.^{86–88} Verschiedene Studien an eineiigen Zwillingen konnten zeigen, dass Lebensstil- und Umwelteinflüsse trotz identischer DNA-Sequenzen zwischen den Zwillingen zu abweichenden DNA-Methylierungsmustern führen.^{89,90} Der potenzielle Einfluss von Lebensstil und Umweltfaktoren auf die DNA-Methylierung stellt eine methodische Herausforderung für die epigenetische Altersschätzung dar und wird im folgenden Kapitel näher besprochen. Neben Lebensstil und Umweltfaktoren können auch genetische Mutation in Sequenznähe der CpGs Einfluss auf deren Methylierung haben.^{91,92} Auch wenn dies in der Literatur vor allem im Kontext von Krankheiten besprochen wird, sollte diese genetische Komponente auch im Rahmen der epigenetische Altersschätzung berücksichtigt werden.

1.4.2 CpG-Methylierung als Biomarker für das chronologische Alter

1.4.2.1 Prinzip einer epigenetischen Uhr

Grundlage für ihre Funktion als Biomarker für das chronologische Alter ist die kontinuierliche Veränderung der CpG-Methylierung mit fortschreitendem Alter. Die kontinuierliche altersabhängige Methylierungsänderung kann dabei jedoch auf zwei fundamental unterschiedliche Weisen erfolgen, als „Epigenetische Drift“ und als „Epigenetische Uhr“.⁹³ Als „Epigenetische Drift“ werden all jene altersabhängigen Veränderungen der CpG-Methylierung beschrieben, die z.B. durch den Lebensstil oder Umwelteinflüsse individuell bei einer Person auftreten, jedoch nicht oder in abweichender Art und Weise bei anderen Personen.^{94,95} Als „Epigenetische Uhr“ erfolgt die altersabhängige Methylierungsänderung in Form eines kollektiven Phänomens gleichartig zwischen Individuen.⁹³ Nur eine altersabhängige Methylierungsänderung in Form einer „Epigenetischen Uhr“ kann modelliert werden und als Grundlage für die Altersschätzung unbekannter Personen dienen. Die Modellierung einer „Epigenetischen Uhr“, die in der Folge als Altersschätzungsmodell bzw. Modell bezeichnet wird, basiert auf der Analyse von Referenzproben, die somit auch die Spezifität des Altersschätzungsmodells definieren.⁹⁶ Aus diesem Grund sollten die Referenzproben eine große Altersspanne sowie eine gleichmäßige Altersverteilung aufweisen. Ebenso sind der

Probenursprung, bezogen auf das untersuchte Gewebe bzw. den Zelltyp (vergleiche Kapitel 1.4.2.2) sowie Charakteristika der untersuchten Probanden, z.B. deren Lebensstil, Umweltfaktoren oder Gesundheitszustand zu berücksichtigen (vergleiche Kapitel 1.4.2.3).

Nachdem ein Referenzkollektiv zusammengestellt wurde, wird in diesem entweder eine gezielte Auswahl bereits bekannter altersabhängiger CpGs untersucht, oder neue CpG-Kandidaten z.B. über eine umfangreiche Microarray-Analyse, bei der bis hin zu 850.000 verschiedene CpGs parallel gemessen werden, ermittelt.⁹⁷ Über verschiedene mathematische Strategien, die von einfacher Linearer Regression bis hin zu Machine Learning Algorithmen reichen, werden anhand der gemessenen Methylierungswerte und dem bekannten Alter der Referenzproben getestet, über welche Auswahl von CpGs die chronologische Altersänderung bestmöglich modelliert werden kann.^{98,99} Bevor das resultierende Modell zur Altersschätzung unbekannter Proben genutzt werden kann, muss anhand eines repräsentativen Testproben-Sets die zu erwartende Schätzgenauigkeit des Modells ermittelt werden. Diese wird i.d.R. über die mittlere absolute Abweichung (MAD) zwischen geschätztem und tatsächlichem Alter innerhalb der Testproben angegeben.

1.4.2.2 Modelle zur Altersschätzung

Das Ziel bei der Entwicklung eines Altersschätzungsmodells ist es, eine Kombination von CpGs zu finden, die gemeinsam über ihre Methylierung das chronologische Alter bestmöglich abbilden. Seit der Entwicklung des ersten epigenetischen Altersschätzungsmodell durch Bockland et al. im Jahr 2011 wurde eine Vielzahl verschiedener Altersschätzungsmodelle publiziert, die sich vor allem in der Anzahl und Auswahl der CpG-Stellen sowie ihrer Gewebespezifität unterscheiden. Die verschiedenen Modelle und Ansätze sind in mehreren Übersichtsarbeiten umfassend beschrieben.^{68,70,100,101}

Das wohl bekannteste Modell zur epigenetischen Altersschätzung ist die von dem Bioinformatiker Steve Horvath entwickelte „Horvath-Clock“, die auf 7844 Proben aus 82 öffentlich verfügbaren Datensets weltweiter Methylierungsstudien basiert.¹⁰² Sie umfasst 353 CpGs und erlaubt die Altersschätzung aus 51 verschiedenen Geweben und Zelltypen. Der mittlere Schätzfehler über alle Gewebe liegt bei +/- 2,6 Jahren, wobei einzelne Gewebe, wie zum Beispiel Herzgewebe mit +/- 9,2 Jahren deutlich höhere Schätzfehler zeigen.

Auch wenn die „Horvath-Clock“ in ausgewählten Geweben hohe Schätzgenauigkeiten zeigt verdeutlicht die Studie, dass eine präzise Altersschätzung in verschiedenen Geweben mit nur einem Altersschätzungsmodell schwer zu realisieren ist.

Aus diesem Grund und mit dem Ziel, eine möglichst präzise Altersschätzung sicherzustellen, sind die meisten Altersschätzungsmodelle im forensischen Kontext gewebespezifisch.⁹³ Das Spektrum an untersuchten Geweben nimmt dabei stetig zu. Während anfangs die meisten

Modelle für Blut und Mundschleimhaut bzw. Speichel entwickelt wurden, finden sich mittlerweile auch mehrere Modelle für Sperma, Knochen, Haare oder Zähne.⁷¹ Der mittlere Schätzfehler der meisten gewebespezifischen Modelle liegt bei 3 - 5 Jahren, wobei für Blut und Mundschleimhaut die höchsten Schätzgenauigkeiten erreicht werden. Die Anzahl der CpGs pro Modell reicht von zwei bis zu mehreren hundert, wobei die meisten Modelle nicht mehr als zehn CpGs beinhalten.^{103,104} Vergleicht man die Modelle untereinander, so finden sich einige CpGs nur in Modellen für einzelne Gewebetypen, während andere CpGs in Modellen für verschiedene Gewebetypen integriert sind.¹⁰⁵ Als beste Marker für die epigenetische Altersschätzung, vor allem aus Blut, aber auch aus anderen Geweben, gelten dabei mehrere CpGs in dem Gen *ELOVL2* (*ELOVL fatty acid elongase 2*).^{106,107}

Altersschätzungsmodelle für Blutproben spielen im forensischen Kontext eine besondere Rolle, da Spurenmaterial aus anderen Geweben häufig nicht ausreichend DNA für eine Analyse beinhaltet (vergleiche Kapitel 1.5.2). Vergleicht man die Modelle zur Altersschätzung aus Blutproben, findet sich nicht nur fast ausnahmslos der Marker *ELOVL2*, sondern in vielen Modellen dieselbe Auswahl an CpGs, bestehend aus fünf CpGs in den Genen *ELOVL2*, *MIR29B2CHG* (ehemals *C1orf132*), *FHL2*, *KLF14* und *TRIM59*.^{105,108} Dieses Marker-Set wurde erstmals von Zbieć-Piekarska et al. beschrieben und gilt als das geeignetste Set für die Schätzung des chronologischen Alters aus Blut.^{71,109}

1.4.2.3 Einfluss von Lebensstil- und Umweltfaktoren auf die DNA-Methylierung

Während die Variabilität der CpG-Methylierung die Grundlage dafür ist, dass sie als Biomarker für eine kontinuierliche Variable wie das chronologische Alter verwendet werden kann, stellt sie gleichzeitig eine Herausforderung dar, da ebenfalls ungerichtete oder spontane Veränderungen der CpG-Methylierung z.B. durch Lebensstil oder Umweltfaktoren möglich sind, die folglich zu einem Fehler bei der Altersschätzung führen können. Eine umfassende Übersichtsarbeit von Koop et al. fasst eine Vielzahl möglicher Einflussfaktoren zusammen, die in verschiedenen Studien bereits identifiziert wurden.¹¹⁰ Darunter fallen vor allem Einflüsse durch Krankheiten und extreme Lebensstile wie starker Alkoholkonsum oder sportliche Aktivität.¹¹¹⁻¹¹⁴ Inwieweit die Erkenntnisse der einzelnen Studien auf andere Altersschätzungsmodelle und CpGs übertragbar sind, muss im Rahmen von Validierungsstudien jeweils individuell geprüft werden. Welche praktische Konsequenz das Auffinden eines Einflussfaktors hat, hängt davon ab, ob der Einfluss zu einem systematischen Schätzfehler führt, der über eine mathematische Anpassung des Modells kompensiert werden kann oder es sich um einen ungerichteten Einfluss handelt. Bei letzterem käme je nach Größe des resultierenden Schätzfehlers in Betracht, diesen als Teil der „natürlichen“ Streuung des

Modells zu betrachten, oder aber die betroffene(n) CpG(s) aus dem Modell zu entfernen, sofern die verbleibenden CpGs trotzdem eine verlässliche Altersschätzung zulassen.¹¹⁵

Grundsätzlich gilt: Je spezifischer ein Vorhersagemodell wird, desto mehr Kenntnis über die entsprechenden Eigenschaften der zu untersuchenden Probanden bzw. Proben ist erforderlich. Während bei der Altersfeststellung von bekannten Personen vorstellbar ist, dass solche Informationen z.B. über Krankenakten oder diagnostische Verfahren ermittelt bzw. belegt werden können, ist die Informationslage bei der Untersuchung unbekannter Spurenleger begrenzt. Bei letzterer können lediglich solche Eigenschaften berücksichtigt werden, die über die DNA selbst vorhersagt werden können und dürfen, wie z.B. das Geschlecht der Person, der Gewebeansprung der Probe oder Informationen über den Spurenleger, die aus der polizeilichen Ermittlung hervorgehen.

1.4.3 Methodische Grundlagen der quantitativen Methylierungsanalyse

Auf Ebene der DNA-Sequenz kann eine CpG-Position entweder methyliert oder unmethyliert vorliegen und wäre in dieser Form als binärer Marker nicht geeignet, um eine kontinuierliche Variable wie das chronologische Alter abzubilden. Aus diesem Grund wird bei der epigenetischen Altersschätzung die durchschnittliche Methylierung einer CpG-Position in einem Gewebe oder Zellverband analysiert. Um sicherzustellen, dass die durchschnittliche Methylierung in der untersuchten Probe auch der durchschnittlichen Methylierung des Ursprungsgewebe bzw. Zellverbands entspricht, muss aus stochastischen Gründen eine ausreichende Menge an DNA-Molekülen untersucht werden.¹¹⁶ Als Richtwert wird für eine valide Untersuchung eine Mindestmenge von 10 ng DNA (entspricht ca. 2785 DNA-Molekülen) empfohlen.¹¹⁷

Für die Analyse der DNA-Methylierung können verschiedene Analysemethoden verwendet werden, die sich in ihrer Sensitivität, Präzision und den Untersuchungskosten stark unterscheiden und in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden. Alle im Kontext der forensischen Altersschätzung genutzten Methoden haben jedoch gemeinsam, dass die DNA-Methylierung auf Ebene der DNA-Sequenz untersucht wird. Dazu muss der Methylierungsunterschied der CpG-Positionen zunächst in einen Sequenzunterschied übersetzt werden.¹¹⁸ Als Goldstandard-Methode gilt dafür die Bisulfit-Konvertierung, bei der durch die Behandlung der DNA mit Natriumhydrogensulfit (Bisulfit) unmethylierte Cytosine in Uracil konvertiert werden, während methylierte Cytosine unverändert bleiben (Abbildung 1).¹¹⁹ Uracil wird in der anschließenden PCR als Thymin amplifiziert, wodurch der ursprüngliche Methylierungsstatus der Cytosine in den Sequenzunterschied C (methyliert) zu T (unmethyliert) übersetzt wird und durch geeignete Analysemethoden quantitativ bestimmt werden kann.

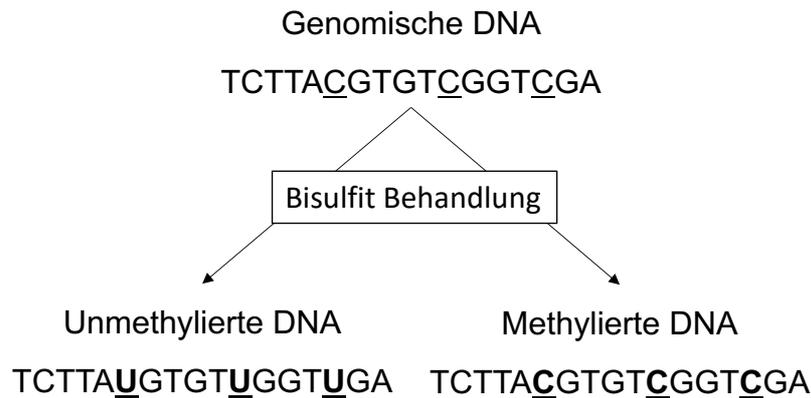


Abbildung 1 Prinzip der Bisulfit-Konvertierung

Die Bisulfit-Konvertierung ist ein chemisch aggressiver Prozess, der zur Degradation der DNA führt.¹²⁰ Aus diesem Grund sollte die Bisulfit-Exposition der DNA möglichst kurz sein.¹²¹ In einer vergleichenden Studie untersuchten Kint et al. die DNA-Fragmentierung, den DNA-Verlust und die Konvertierungseffizienz verschiedener kommerziell erhältlicher Bisulfit-Konvertierungs-Kits.¹²² Neben Kit-spezifischen Unterschieden stellten sie fest, dass bei der Bisulfit-Konvertierung grundsätzlich mit einem deutlichen DNA-Verlust gerechnet werden muss. Um sicher zu stellen, dass bei der Methylierungsanalyse mindestens 10 ng DNA untersucht werden, muss dieser Verlust deshalb einkalkuliert werden und eine entsprechend größere Menge genomischer DNA konvertiert werden.

Eine Alternative zur Bisulfit-Konvertierung, die jedoch in der Praxis bisher noch selten eingesetzt wird, ist die Enzymatische-Konvertierung.¹²³ Die Methode verspricht deutlich geringere DNA-Verluste durch DNA-Degradation, da die Konvertierung durch Enzyme katalysiert wird, ohne dass aggressive Chemikalien zum Einsatz kommen. Inwieweit dieser neue Ansatz im Rahmen der forensischen Altersschätzung eine tatsächliche Alternative zur Bisulfit-Konvertierung darstellt, muss jedoch in entsprechenden Validierungsstudien zunächst getestet werden.

Methodisch folgt auf die Konvertierung der DNA die quantitative Bestimmung der vorher methylierten (Cytosin) und unmethylierten (Uracil bzw. Thymin) Cytosine an den entsprechenden CpG-Positionen. Im Kontext der Altersschätzung werden für die Analyse vor allem Sequencing-by-synthesis Methoden, Illumina Microarrays und die SNaPshot Minisequenzierung verwendet.⁷¹ Alternative Methoden wie die Massenspektrometrie über die EpiTYPER Plattform oder die methylation-sensitive high resolution melting Technik werden seltener benutzt, da sie entweder Instrumente benötigen, die nicht zur Standardausstattung forensischer Labore gehören oder keine ausreichende Präzision aufweisen.^{124–128} Aus diesem Grund werden letztere Methoden in den folgenden Abschnitten nicht näher beschrieben.

1.4.4 Methoden zur quantitativen Methylierungsanalyse

1.4.4.1 Sequencing-by-synthesis Methoden

Die Sequencing-by-synthesis Methoden basieren auf der Analyse einer DNA-Zielsequenz über die Synthese des komplementären DNA-Strangs.¹²⁹ Im Rahmen der forensischen Altersschätzung werden vor allem die Sequenzierung über die MiSeq-Plattform (MPS) und die Pyrosequenzierung eingesetzt.^{130–132}

Bei der MPS-Analyse über die MiSeq-Plattform werden die DNA-Zielsequenzen (Targets) zunächst über eine Multiplex-PCR (Target amplification) amplifiziert und in einer zweiten Reaktion mit probenspezifischen DNA-Barcodes sowie Adaptersequenzen, die der Immobilisierung während der Sequenzierung dienen, gekoppelt.¹³³ Durch die Verwendung probenspezifischer Barcodes, die eine spätere Zuordnung der detektierten Sequenzen zu den entsprechenden Proben erlauben, können bei der folgenden Sequenzierung mehrere Proben parallel untersucht werden. Im Anschluss an die Sequenzierung folgt eine aufwändige bioinformatische Aufbereitung der Rohdaten, bei der die gemessenen Fluoreszenzsignale zunächst in die entsprechenden Nukleotidsequenzen übersetzt und im Anschluss über die Barcodes den Proben zugeordnet werden. Durch die Target amplification in Form einer Multiplex-PCR ist die Methylierungsanalyse mit der MiSeq-Plattform sehr sensitiv, da alle CpGs, die für die Altersschätzung benötigt werden, ausgehend von nur einem einzigen DNA-Einsatz von 10 ng untersucht werden können.

Die Pyrosequenzierung ist eine singleplex Sequenzierungs-Strategie, die vor allem in Verbindung mit Altersschätzungsmodellen angewandt wird, die auf nur wenigen CpGs beruhen.¹³² Die Methode erlaubt eine Methylierungsanalyse inklusive der Probenvorbereitung innerhalb von nur einem Tag. Zudem kann der Umfang der Analyse, im Gegensatz zu der MiSeq-Sequenzierung, variabel an die Anzahl zu untersuchender CpGs bzw. Proben angepasst werden, wodurch die Methode auch bei der Analyse einzelner Proben unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten sinnvoll eingesetzt werden kann. Die Technologie der Pyrosequenzierung wurde 1998 durch Mostafa Ronaghi, Pål Nyrén und Mathias Uhlén entwickelt und basiert nicht wie andere Methoden auf der Detektion von Fluoreszenz markierten Nukleotiden, sondern auf der quantitativen Messung des Pyrophosphats (PPi), welches bei der Basen-Inkorporation freigesetzt wird.¹³⁴ In einer PCR mit Biotin gelabelten Primern werden die Target-Sequenzen zunächst amplifiziert. Für die Sequenzierung werden sie im Anschluss über das gebundene Biotin immobilisiert und an einen spezifischen Sequenzierungsprimer gebunden, der durch eine DNA-Polymerase und die entsprechenden

Nukleotide komplementär zur Zielsequenz verlängert wird. Die verschiedenen Nukleotide werden der Sequenzierungsreaktion nacheinander und in einer festgelegten Reihenfolge zugegeben. Werden Nukleotide inkorporiert, wird das freigegebene PPi über eine enzymatische Kaskade in ein proportionales Lichtsignal zu der Anzahl PPis bzw. eingebauter Nukleotide umgesetzt.¹³⁵ Durch die Detektion aller Nukleotide über dasselbe Fluoreszenzsignal, erlaubt die Pyrosequenzierung eine rein quantitative Methylierungsmessung. Andere Methoden wie z.B. die Minisequenzierung oder die MiSeq-Sequenzierung, liefern einen semiquantitativen Messwert, da die Messung zusätzlich von den unterschiedlichen Signalintensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe für die verschiedenen Nukleotide abhängt. Dies verdeutlichen auch die Ergebnisse eines technischen Ringversuchs der Arbeitsgruppe „Molekulare Altersschätzung“ der DGRM, in dem gezeigt werden konnte, dass sich Methylierungsmessungen über die Pyrosequenzierung zwischen verschiedenen Laboren nicht signifikant unterscheiden, während Messungen über die Kapillarelektrophorese, selbst bei der Verwendung derselben Gerätschaften, systematische Messunterschiede aufweisen können.¹³⁶ Eine methodische Schwäche der Pyrosequenzierung, die vor allem bei der forensischen Altersschätzung aus Spurenmaterial mit geringen DNA-Mengen ins Gewicht fällt, ist die bereits oben erwähnte Begrenzung auf singleplex Sequenzierungen. Da die meisten Altersschätzungsmodelle die Analyse mehrerer CpGs erfordern, sind mehrere Messungen mit mehrfachem DNA-Einsatz nötig, wodurch insgesamt eine größere Menge an DNA erforderlich wird.

1.4.4.2 Illumina Methylation Microarrays und SNaPshot-Minisequenzierung

Anders als die sequencing-by-synthesis Methoden, bei denen ganze DNA-Sequenzen untersucht werden, werden bei den Illumina Methylation Microarrays einzelne CpG-Position untersucht. Die Technologie beruht auf der Hybridisierung der zu untersuchenden Targets mit komplementären DNA-Sequenzen, die auf einem so genannten BeadChip gebunden sind.¹³⁷ Je nach Konfiguration können dabei auf einem BeadChip zwischen 27.000 und 850.000 verschiedene CpGs gleichzeitig untersucht werden.¹³⁸ Im Kontext der forensischen Altersschätzung eignen sich die Illumina Microarrays vor allem bei der Anwendung von Modellen wie der Horvath-Clock, die auf mehreren hundert CpGs beruhen (vergleiche Kapitel 1.4.2.2) sowie zum Screening möglicher CpG-Kandidaten zur Entwicklung neuer Altersschätzungsmodelle.^{97,102} Für die forensische Spurenanalyse ist die Methodik durch den hohen Bedarf an DNA, der bei dem neuesten Array, dem Infinium MethylationEPIC BeadChip, bei 250 ng liegt, jedoch nur sehr begrenzt einsetzbar, da die wenigsten biologischen Tatortspuren ausreichend DNA enthalten.^{139,140}

Anders verhält es sich mit der SNaPshot-Minisequenzierung, die im forensischen Kontext häufig zur quantitativen Methylierungsanalyse eingesetzt wird. Sie ist verhältnismäßig günstig, durch die Analyse im Multiplex-Verfahren sehr sensitiv und kann gut in den Laborablauf integriert werden, weil die Kapillarelektrophorese zu den Standardmethoden forensischer Labore gehört.¹⁴¹ Ein Nachteil der Methodik besteht in der bereits besprochenen schlechten Vergleichbarkeit der gemessenen quantitativen Methylierungswerte zwischen verschiedenen Laboren und Analysegeräten.¹³⁶ Zudem ist die Entwicklung robuster Assays anspruchsvoll, da z.B. PCR-Artefakte oder unterschiedliche Amplifikationseffizienzen in der Multiplex-PCR zu unspezifischen oder nicht balancierten Signalen in der Kapillarelektrophorese führen können, welche die quantitative Messung stören können.¹⁴²

1.5 Epigenetische Altersschätzung im Kontext der Spurenanalyse

1.5.1 Anforderungen an das Probenmaterial

Die Methodik der epigenetischen Altersschätzung setzt voraus, dass die zu untersuchende Probe aus einem einzigen Gewebe und von einer einzigen Person stammt. Dies liegt darin begründet, dass als Biomarker für das Alter die durchschnittliche Methylierung der CpGs in der Probe gemessen wird, wodurch sich unterschiedliche Komponenten von verschiedenen Personen oder Geweben nicht differenzieren bzw. zuordnen lassen.

In Ausnahmefällen und unter bestimmten Voraussetzungen können Gewebemischungen, die von nur einer Person stammen trotzdem untersucht werden. Dazu bedarf es jedoch einer präzisen Quantifizierung der Mischungsanteile sowie eines Modells, welches die altersabhängige Methylierung aller in der Mischung befindlichen Gewebe abbildet. Eipel et al. konnten zeigen, dass bei der Altersschätzung aus Mundschleimhautproben, die neben Mundschleimhautzellen immer auch eine gewisse Beimischung von Leukozyten aufweisen, eine Quantifizierung der Zelltypen und die Berücksichtigung des Mischungsverhältnisses bei der Altersschätzung zu einer höheren Schätzgenauigkeit führen.^{143,144} Inwieweit dieser Ansatz jedoch auf andere Gewebetypen übertragbar ist, hängt maßgeblich von dem Vorhandensein von Methoden ab, die eine valide Quantifizierung der unterschiedlichen Zell- bzw. Gewebetypen zulassen. Eine Variante, bei der eine Probe mit Gewebe- und Personenmischungen für die Altersschätzung genutzt werden kann, stellt eine Mischung aus Sperma und Vaginalschleimhaut dar. Li et al. konnten zeigen, dass bis zu einer 9:1 Mischung von Sperma in der Haupt-, und Vaginalschleimhaut in der Nebenkomponente, eine Altersschätzung der männlichen (Sperma) Komponente möglich ist.¹⁴⁵ Ein Vorteil bei diesem Ansatz ist, dass das Mischungsverhältnis in der Probe nicht über die Zelltypen quantifiziert werden muss, sondern über die Quantifizierung männlicher bzw. weiblicher DNA über die

Geschlechtschromosomen erfolgen kann. Neben den qualitativen Anforderungen sind auch quantitative Anforderungen an das Probenmaterial zu beachten. In vielen Spurenfällen wird die aus stochastischen Gründen festgelegte Mindestmenge von 10 ng DNA für eine valide Methylierungsmessung nicht erreicht.¹¹⁶ Bis zu einem gewissen Maße kann die Mindestmenge zwar unterschritten werden, jedoch sollte bei der Ergebnismitteilung die Möglichkeit eines zusätzlichen, stochastisch bedingten Schätzfehlers angegeben werden.

1.5.2 Praktische Herausforderungen in der Fallarbeit

Neben den Anforderungen an Probenquantität und -qualität muss bei der epigenetischen Altersschätzung vor allem sichergestellt sein, dass das angewandte Modell bezogen auf die abgebildete altersabhängige Methylierungsänderung für die untersuchte Probe repräsentativ ist. Dadurch, dass die CpG-Methylierung unter anderem von Lebensstil und Umweltfaktoren kontrolliert wird, ist die Spezifität aller Altersschätzungsmodelle grundsätzlich durch die Eigenschaften der Probanden des Referenzkollektivs des Modells definiert. Um also sicherzustellen, dass ein Modell für eine zu untersuchende Probe repräsentativ ist, müssten die Eigenschaften der zu untersuchenden Person mit den Eigenschaften der Probanden des Referenzkollektivs verglichen werden. Die Möglichkeit eines solchen Abgleichs ist bei der Analyse von unbekanntem Spurenlegern jedoch nur sehr begrenzt möglich. Folglich müssen im Kontext der Spurenuntersuchung Strategien entwickelt werden, die trotz des Mangels an konkreten Informationen über den Spurenleger eine möglichst valide Altersschätzung zulassen. Eine mögliche Strategie wäre, Eigenschaften, die über die DNA selbst vorhergesagt werden können, als Co-Faktoren bei der epigenetischen Altersschätzung zu verwenden. Dazu könnte neben dem Geschlecht einer Person auch die BGA zählen, die durch moderne Methoden relativ genau über die DNA vorhergesagt werden kann (vergleiche Kapitel 1.2.3). Mehrere Studien konnten bereits feststellen, dass Altersschätzungsmodelle, die mit Referenzproben aus bestimmten kontinentalen Regionen entwickelt wurden, in anderen Populationen größere Schätzfehler zeigen.^{146,147} Allerdings muss bei diesen Vergleichen berücksichtigt werden, dass die CpG-Methylierung in verschiedenen Laboren mit unterschiedlichen Geräten und Versuchsaufbauten gemessen wurden, die ebenfalls systematische Messunterschiede zur Folge haben können.^{127,148} In einer Studie mit einem standardisierten Versuchsaufbau verglichen Becker et al. 22 altersabhängig methylierte CpGs in Mundschleimhautproben von deutschen und japanischen Probanden und fanden signifikante Methylierungsunterschiede in zwei CpGs.¹⁴⁹ Auch wenn diese Studie ohne direkten Bezug zu einem etablierten Altersschätzungsmodell durchgeführt wurde, zeigen diese Ergebnisse, dass die Herkunft einer Person einen möglichen Einflussfaktor auf die CpG-Methylierung im Kontext der forensischen Altersschätzung darstellen könnte.

1.6 Zielsetzung und Forschungsfragen

Genetische Unterschiede zwischen Populationen sowie regionalspezifische Lebensstil- und Umweltfaktoren, können durch ihren Einfluss auf das epigenetische Netzwerk zu populationsspezifischen Unterschieden der DNA-Methylierung führen. Folglich stellt die Herkunft einer Person auch einen potenziell relevanten Einflussfaktor auf die epigenetische Altersschätzung dar. Eine Berücksichtigung der Herkunft einer Person, die zum Beispiel durch eine parallel durchgeführte BGA-Analyse ermittelt werden kann, könnte demnach die Genauigkeit der epigenetischen Altersschätzung erhöhen bzw. große Schätzfehler bei der Untersuchung nicht europäischer Personen vermeiden.

Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel zweier exemplarisch gewählter Populationen aus Zentraleuropa und dem Mittleren Osten sowie eines bekannten Marker-Sets, welches die CpGs in den Genen *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* und *TRIM59* umfasst, den möglichen Einfluss der Herkunft auf die epigenetische Altersschätzung zu untersuchen und, sofern nötig, populationsspezifische Altersschätzungsmodelle zu trainieren.

Da sich Methylierungsmessungen zwischen verschiedenen experimentellen Workflows oder Messmethoden unterscheiden können sollten die Analysen dieser Studie mit einem Workflow durchgeführt werden, der auch in der forensischen Fallarbeit angewandt werden kann, sodass die Studienergebnisse als direkte Referenz in der forensischen Fallarbeit verwendet werden können. Dazu sollte in einer vorangestellten technischen Erprobungsstudie ein optimierter Multiplex-Workflow für die Pyrosequenzierung konzipiert und validiert werden, der durch die Möglichkeit der parallelen Untersuchung mehrerer Targets eine sensitive Altersschätzung erlaubt.

2. Publikationen

2.1 Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via Pyrosequencing

J. Fleckhaus*, P. M. Schneider

Forensic Science International: Genetics, 44, 102189

**Corresponding author*

Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Melatengürtel 60-62, D-50823, Cologne, Germany

Received 8 July 2019, Revised 11 October 2019, Accepted 12 October 2019, Available online 14 October 2019, Version of Record 21 October 2019.

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Die Projektidee sowie das Konzept zu der wissenschaftlichen Studie wurden selbständig durch mich entworfen. Die konkrete Projektplanung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Schneider festgelegt, wobei im Kern die Finanzierung, der Umfang der Versuchsreihen sowie der Ablauf der Experimente besprochen wurden. Alle praktischen Arbeiten wurden ausschließlich durch mich ausgeführt. Dies umfasst die Probensammlung, verschiedene Testläufe zur Optimierung der neuen Multiplex-Strategie (besonders im Hinblick auf die PCR- und Sequenzierungsbedingungen), die Messungen der Projektproben und die Auswertung der Ergebnisse. Während des gesamten Projekts stand Herr Prof. Schneider in beratender Funktion zur Verfügung.

Das Manuskript, inklusive der Datenaufbereitung und deren Interpretation, der fachlichen Diskussion sowie aller Schreivarbeiten und Illustrationen, wurde eigenständig durch mich angefertigt. Für die statistischen Auswertungen erhielt ich im Rahmen eines Beratungsgesprächs Unterstützung von Herrn Dr. Rolf Fimmers (Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie in Bonn). Das Manuskript wurde durch Herrn Prof. Schneider sprachlich und inhaltlich korrigiert und ergänzt.



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Research paper

Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via Pyrosequencing

Jan Fleckhaus*, Peter M. Schneider

Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Melatengürtel 60-62, D-50823, Cologne, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Multiplex pyrosequencing
Chronological age prediction
DNA methylation
Forensic casework DNA samples

ABSTRACT

DNA methylation-based age estimation is a promising new tool for forensic molecular biology. There is growing understanding of the best predictive CpG loci and their performance in various sample types. Since forensic samples usually provide only small amounts of DNA, the sensitivity of the method is crucial. Pyrosequencing is one of the most sensitive methods but only capable to analyze different target regions separately. Thus, multiple input DNA samples are required for investigations of different target regions, which is required for all current age estimation models. To overcome this limitation, we developed a novel multiplex strategy for Pyrosequencing, which allows the investigation of different target regions from a single small amount of input DNA. A pre-amplification step was introduced to increase the amount of target-specific template for the subsequent sequencing PCR step. We tested this multiplex strategy for eight target regions including 15 age CpGs associated with the genes of *ELOVL2*, *FHL2*, *CCDC102B*, *C1orf132*, *KLF14*, *EDARADD*, *PDE4C* and *SST*. Except for *FHL2*, all target regions were successfully sequenced with the multiplex strategy and the precision in terms of reproducibility of the measurements was equal to the singleplex strategy. The measured methylation values at the age CpGs displayed borderline significant differences between both analytical strategies for six out of 14 CpG sites whereas both strategies delivered equal methylation values for the remaining eight age CpGs. In total, our results indicate that the multiplex strategy can act as a promising alternative for age estimation studies in cases when only limited amounts of DNA samples are available.

1. Introduction

1.1. Quantitative methylation analysis techniques for forensic age estimations

The number of different methodological workflows that has been applied for quantitative methylation analysis in the course of methylation-based age estimation is considerable [1–3]. All methods quantify the ratio between methylated and unmethylated variants of specific age dependent methylated CpG sites (age CpGs) following different strategies. The most frequently applied quantification methods are sequencing, mass spectrometry or array based [1] but there are also alternative approaches like methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) which is based on methylation-sensitive enzymatic restriction of the DNA [4,5].

To quantify methylation, which is invisible at the sequence level it is required to transform the methylation difference into a sequence difference. This is usually done by treating genomic DNA with sodium bisulfite which converts unmethylated cytosines to uracils (recognized

as thymine during PCR) while methylated cytosines remain unconverted [6–8]. The resulting ratio between methylated (C) and unmethylated (T) cytosines represents the methylation pattern at the positions of interest. Bisulfite sequencing is the gold standard for quantitative methylation analysis but is also criticized for its aggressive chemical treatment leading to degradation and loss of DNA [9,10]. An adequate alternative may display a recently invented bisulfite free enzymatic conversion of methylated cytosines [11]. However, the performance of this new technique needs to be further investigated and validated for forensic applications.

The most commonly applied methylation quantification methods are whole genome bisulfite sequencing (WGBS), Illumina Infinium HumanMethylation arrays, massively parallel sequencing (MPS), EpiTYPER® mass spectrometry, Pyrosequencing and SNaPshot® minisequencing, all exhibiting different features in terms of sensitivity, costs and coverage of CpG sites. Their suitability is thus dependent on the particular application. For the discovery of new age-associated CpG loci, WGBS as well as the Illumina Infinium HumanMethylation (27k/450k) and MethylationEPIC BeadChip microarrays are most suitable

* Corresponding author.

E-mail addresses: jan.fleckhaus@uk-koeln.de (J. Fleckhaus), peter.schneider@uk-koeln.de (P.M. Schneider).<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102189>

Received 8 July 2019; Received in revised form 11 October 2019; Accepted 12 October 2019

Available online 14 October 2019

1872-4973/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
List of all eight investigated target sequences including fifteen age CpGs.

Gene	Internal ID	CpG-ID	GRCh38	Ref.
<i>ELOVL2</i>	CpG1	cg21572722	chr6:11044661	[13,17,24,25,26]
	CpG5	cg16867657 (-17 bp)	chr6:11044642	
	CpG7	cg16867657 (-20 bp)	chr6:11044634	
<i>FHL2</i>	CpG1	cg06639320	chr2:105399282	[17,27]
	<i>CCDC102B</i>	CpG1	chr18:68722183	[17,19]
<i>C1orf132</i>	CpG2	none	chr1:207823715	[17]
<i>KLF14</i>	CpG6	cg14361627	chr7:130734355	[24,27]
<i>EDARADD</i>	CpG2	cg09809672 (-12 bp)	chr1:236394371	[28]
	<i>PDE4C</i>	CpG6	chr19:18233091	[17,29,30,31]
	CpG5	cg17861230 (+14 bp)	chr19:18233105	
	CpG4	cg17861230 (+36 bp)	chr19:18233127	
	CpG3	cg17861230 (+40 bp)	chr19:18233131	
	CpG2	cg17861230 (+42 bp)	chr19:18233133	
	CpG1	cg17861230 (+48 bp)	chr19:18233139	
	<i>SST</i>	CpG3	cg00481951	chr3:187669863

since they allow whole epigenome wide *de novo* investigations of age-associated CpGs [12–15]. MPS and mass spectrometry display considerably lower but still sufficiently high coverages [16–18]. Since MPS allows parallel investigations of multiple samples it is highly suitable for analyzing reference data for the development of age estimation models. Pyrosequencing [19,20] and SNaPshot® Minisequencing [21] in contrast can only investigate small numbers of specific sequences or CpG sites. They are thus reliant on the previous discovery and validation of the age CpG sites with the high coverage approaches [22].

The casework application of methylation-based age estimation requires significantly different methodological features such as high sensitivity and fast processing. These are rather not given by the high coverage methods but by the smaller and more versatile Pyrosequencing and SNaPshot® minisequencing approaches, which are capable to perform quantitative methylation analysis from only a few nanograms of DNA within a day [1]. To avoid stochastic variations regarding quantitative reliability, it is recommended to perform quantitative methylation analysis of no less than 10 ng of DNA [23]. However, 10 ng input DNA is well below the sensitivity threshold of the previously mentioned high coverage methods but Pyrosequencing and SNaPshot® minisequencing can easily be used to sequence even smaller amounts of input DNA. They are thus more suitable for forensic casework application allowing age estimations from small amounts of sample DNA.

1.2. Concept of a novel multiplex strategy for quantitative methylation analysis via Pyrosequencing

The investigation of entire target fragments via Pyrosequencing offers a great advantage since several closely located age CpGs can be analyzed at once in the same target fragment. SNaPshot® minisequencing in contrast investigates individual positions requiring specific sequencing primers for each CpG site. Considering that age CpGs typically occur in CpG rich regions and CpGs represent variable positions after bisulfite conversion the primer design can be quite challenging. Furthermore, the location of the sequencing primer within the target sequence is flexible for pyrosequencing whereas SNaPshot® minisequencing requires primer locations immediately 5' adjacent to the CpG site under investigation.

A limitation of Pyrosequencing is the requirement to perform an independent PCR and sequencing reaction for each target region. As most of the age estimation models include several different target regions, a minimum of 10 ng for each of the target fragments is required. If five fragments have to be analyzed, at least 50 ng are needed which might not be available from most forensic casework samples.

To overcome this limitation, we developed and tested a novel two-step multiplex strategy for Pyrosequencing that allows investigations of

different target regions from a single DNA aliquot. We extended the common pyrosequencing workflow with a multiplex pre-amplification step following the bisulfite conversion. Within this pre-amplification step, all target sequences relevant for the age estimation model are simultaneously pre-amplified from the same aliquot of input DNA. During the subsequent step, all different target regions are independently amplified from this pre-amplified DNA. Only the singleplex PCRs contain biotin-labeled variants of the primers allowing the immobilization of the specific target sequences during Pyrosequencing. By using unlabeled primers for the multiplex PCR only the target sequences amplified in the singleplex PCRs can be immobilized and sequenced.

1.3. Study design

To test and validate the new multiplex strategy we took a comparable approach for both the new multiplex and the conventional singleplex strategy. Using a sample set of ten independent and unrelated blood samples we analyzed eight different target regions including 15 age CpGs with both strategies and directly compared the methylation results for the age CpGs. All measurements were performed in triplicates.

In the first part of the study we investigated if all target regions within the multiplex PCR were correctly amplified. We analyzed control samples with the multiplex strategy and checked for correct sequencing in the positive controls while no sequencing should occur in the negative controls. In the second part we tested for significant strategy differences in terms of precision (reproducibility of the triplicate measurements) and actual methylation values.

2. Material and methods

2.1. Selection of target CpG sites and assay design

Fifteen CpG sites displaying age dependent methylation changes in blood or buccal mucosa tissue were selected from the literature (Table 1). The CpG sites are located in eight different target regions associated with the genes *ELOVL2*, *FHL2*, *CCDC102B*, *C1orf132*, *KLF14*, *EDARADD*, *PDE4C* and *SST*. For each target region, PCR and corresponding sequencing primers were either designed with the PyroMark Assay Design 2.0 software (Qiagen, Hilden, Germany) or adopted from the literature (see Table 2). All primers were custom-synthesized by biomers.net GmbH (Ulm, Germany).

2.2. Sample collection and preparation

Venous blood samples were provided by ten voluntary donors after

2. Publikationen

Publikation 1 [Haupttext]

J. Fleckhaus and P.M. Schneider

Forensic Science International: Genetics 44 (2020) 102189

Table 2

List of all primer sequences: Forward (F), Reverse (R) and Sequencing (Seq) primers are denoted in 5'-3'-direction. Biotin labels (-bio) are indicated at the 5'-end of the respective forward or reverse primers.

Primer	Sequence (5'-3')
ELOVL2_F	GGAGGGGAGTAGGGTAAGTGA-bio
ELOVL2_R	ACCATTTCGCCCTAATATATACTTCA
ELOVL2_Seq	ACAACCAATAAATATCTCTAAAAC
CCDC102B_F	GGGATTGTTTGTGAAGTAAGAGAGTA
CCDC102B_R	ATTCCAATCAAAATAAATTCCTTAAAC-bio
CCDC102B_Seq	GGAGGGGAATGTTTG
C1orf132_F	TGGAGTAAGAGGTTGTGG
C1orf132_R	CCCCTAATCCCAACAAATACAT-bio
C1orf132_Seq	ATGGGATTAATTTTGAATA
KLF14_F	GGGAGAGGTTGTGTAATTTAGAAGT
KLF14_R	ACCCCCCACTAAATCATATTTAACA-bio
KLF14_Seq	GGTTGTTGTAATTTAGAAGTT
EDARADD_F	TTGGTGATTAGGAGTTTATGTTTT
EDARADD_R	CCTACAAATCCCAAAAAACIT-bio
EDARADD_Seq	TGTTATGGAAGAAGTAATAGA
PDE4C_F	GGTAGAGGTTGTAGTAGGTT
PDE4C_R	ACCACCTACCCCTACAAAAA-bio
PDE4C_Seq	GGTTGTAGTAGGTTGAG
SST_F	AGGTGAGTTTATTGGTATTTAAGAAA
SST_R	CTTTAAATTACCCCTTACCCCTAATC-bio
SST_Seq	AATTTGGGTAGTTGTTTG
FHL2_F	TGTTTTAGGGTTTGGGAGTATAGTAG
FHL2_R	AATAACCCCTCCTCCCT-bio
FHL2_Seq	GTTTTGGGAGTATAGTAGTTA

Table 3

T-test of the age CpG methylation: Methylation values of the age CpGs were compared between multiplex and singleplex strategy measurements with paired t-test individually for each age CpG site. Negative values indicate higher measurements with the multiplex strategy.

CpG site	p-value	95 percent confidence interval		mean of the differences
ELOVL2_CPG1	0.0061	-0.026151	-0.005849	-0.0160000
ELOVL2_CPG5	0.0434	-0.034679	-0.000654	-0.0176667
ELOVL2_CPG7	0.4713	-0.005691	0.011358	0.0028333
CCDC102B_CpG1	0.2397	-0.004515	0.015849	0.0056667
C1orf132_CpG1	0.6926	-0.006055	0.008722	0.0013333
KLF14_CpG6	0.3092	-0.004132	0.001466	-0.0013333
EDARADD_CpG2	0.0012	-0.019791	-0.006876	-0.0133333
PDE4C_CpG1	0.2013	-0.016284	0.003951	-0.0061667
PDE4C_CpG2	0.8439	-0.006773	0.008106	0.0006667
PDE4C_CpG3	0.0108	0.001811	0.010522	0.0061667
PDE4C_CpG4	0.0045	0.004838	0.019496	0.0121667
PDE4C_CpG5	0.3836	-0.010410	0.004410	-0.0030000
PDE4C_CpG6	0.0018	0.004423	0.013911	0.0091667
SST_CpG3	0.8473	-0.004137	0.003470	-0.0003333

providing informed consent. The sample donors were randomly selected in terms of age and gender but all shared European ancestry. Genomic DNA was extracted from 2 ml whole blood using the NucleoSpin® Blood L kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). DNA

concentrations were measured by quantitative real time PCR using the Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) and the 7500 Fast-Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). From each DNA sample 2 µg DNA were bisulfite converted using the EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and eluted into 40 µL elution buffer. The exact concentration of bisulfite-converted DNA was not measured but expected to be lower than 50 ng/µL, assuming a certain loss of DNA during conversion. However, by using 1 µL converted DNA as input volume for PCR all investigations of a given blood sample could be performed from the same converted DNA stock solution.

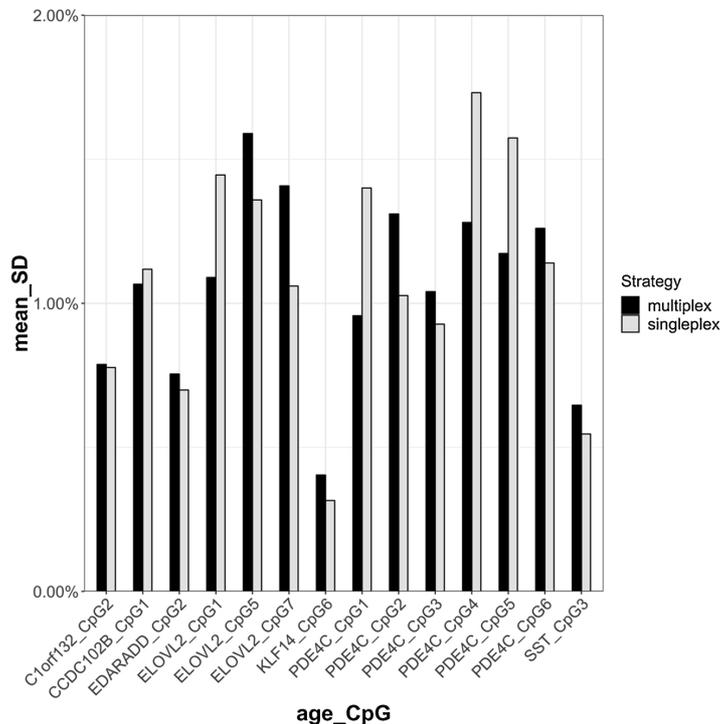


Fig. 1. Reproducibility of the measurements with the both strategies: Standard deviations of the measured triplicates were calculated as absolute percent values and the mean-SDs for each age CpG plotted. Black bars – multiplex results; grey bars – singleplex results.

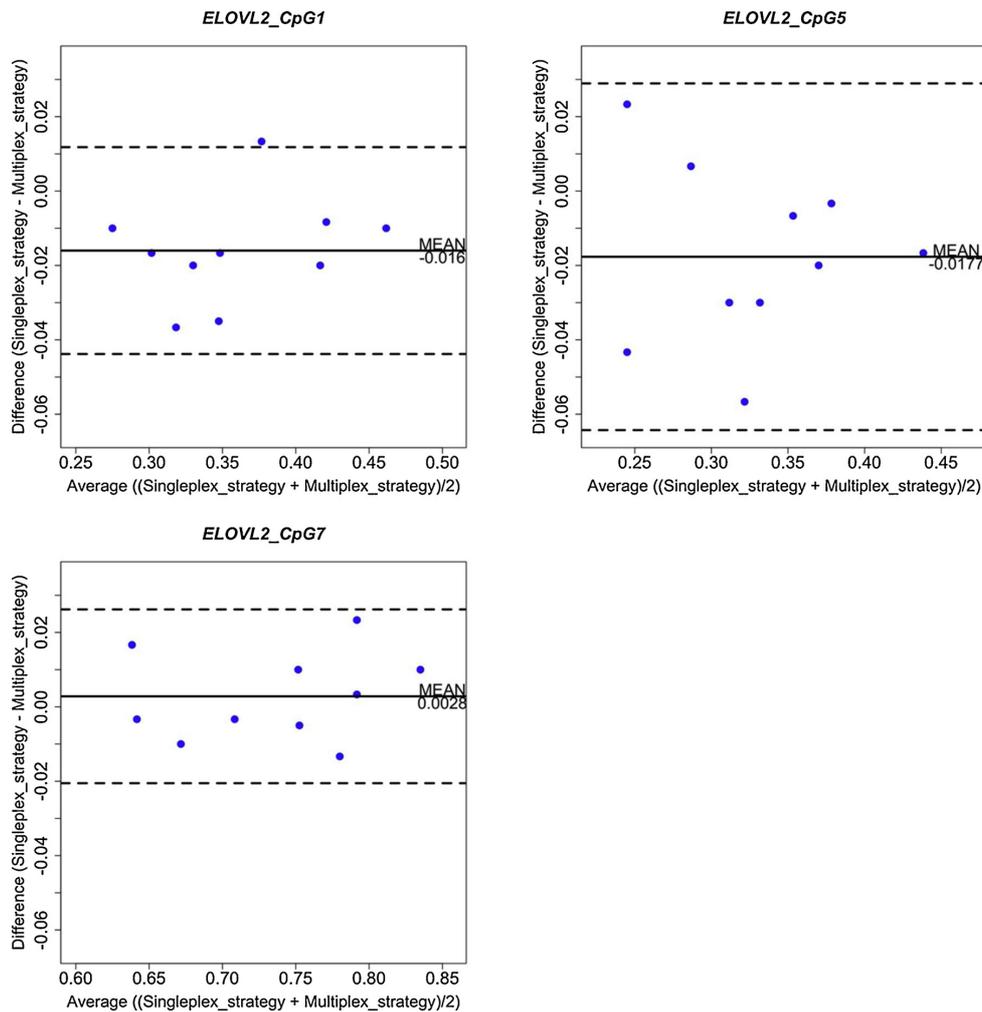


Fig. 2. Bland-Altman plots of three age CpGs in ELOVL2: Each data point represents one analyzed sample. The differences were calculated by subtracting the multiplex measurements from the singleplex measurements. Solid lines represent the mean differences, dashed lines the lower and upper Limits of Agreement.

2.3. PCR amplification strategies

All reactions were performed using the PyroMark PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). For each sample both singleplex and multiplex PCR strategies were carried out in triplicates from the same converted DNA sample.

2.3.1. Singleplex strategy

Within each assay either the forward or the reverse PCR primer was biotin-labelled allowing the immobilization of the amplified target sequences for subsequent pyrosequencing. PCR was performed in a total volume of 25 μ L containing 2 μ L of each PCR primer (2,5 μ M), 2,5 μ L of 10x CoralLOAd concentrate, 12,5 μ L PyroMark PCR Master Mix, 5 μ L nuclease free water and 1 μ L bisulfite converted DNA. All targets were identically amplified under the following conditions: 30 s denaturation at 94 $^{\circ}$ C; 30 s annealing at stepwise reduced temperatures (see below); 30 s extension at 72 $^{\circ}$ C. To cover different annealing temperatures and ensure specific amplifications the annealing temperature was stepwise reduced by 1 $^{\circ}$ C every second cycle for the first 14 cycles starting at

56 $^{\circ}$ C, followed by 35 cycles with 49 $^{\circ}$ C annealing temperature.

2.3.2. Multiplex strategy

All eight DNA fragments were collectively pre-amplified in a single multiplex PCR step. The PCR primers were identical to the singleplex strategy but without biotin modifications. PCR was set up as follows: 9 μ L of primer mix, 2,5 μ L of 10x CoralLOAd concentrate, 12,5 μ L PyroMark PCR Master Mix and 1 μ L bisulfite converted DNA. The cycling program conformed to the singleplex strategy but only 8 instead of 35 cycles at 49 $^{\circ}$ C annealing temperature were performed. After digesting the remaining PCR primers by using 10 μ L of ExoSAP-IT[™] (USB[®] - Affymetrix, Cleveland, OH, USA) for 15 min, the pre-amplified DNA was equally distributed (4 μ L per reaction) to the subsequently performed singleplex reactions. The reaction setup of the individual singleplex PCRs was identical to the singleplex strategy but the amplification program was performed for only 30 cycles with 49 $^{\circ}$ C annealing temperature.

2.4. Pyrosequencing

All PCR products from the singleplex and multiplex PCR strategies were sequenced using the PyroMark Q48 platform and the PyroMark Q48 CpG reagents (Qiagen, Hilden, Germany). The resulting pyrograms were checked for sufficient sequencing quality in terms of peak height, correctness of the observed sequence and complete bisulfite conversion. The absolute methylation values at the CpG positions of interest were calculated by the software and exported for further statistical analyses.

2.5. Statistical analysis

All statistical tests and plots were prepared using the RStudio statistical software (RStudio Inc., Boston, MA).

2.5.1. T-test of the methylation values

To test for systematic strategy differences, we performed paired *t*-tests of the measured CpG methylation values between the results from the singleplex and multiplex strategies individually for each CpG site. Since all measurements were carried out in triplicates, we used the mean of the triplicates as input value for the *t*-test with a significance level of 0.05.

2.5.2. T-test of the standard deviations

To test the precision of the measurements we compared the standard deviations exhibited by the measured triplicates between the results from the multiplex and singleplex strategies. We also performed a paired *t*-test of the standard deviations independently for each CpG site at a significance level of 0.05.

2.5.3. Bland-Altman-Plots

The Bland-Altman-plot (BAP) is a graphical method to visualize the agreement between two quantitative measurements [33]. For each sample, the difference and the mean of the methylation values measured with the two strategies were calculated and plotted against each other. The differences were always calculated by subtracting the multiplex from singleplex strategy values. In this way, the BAPs display the size and direction of the strategy differences over the entire methylation range. We constructed individual BAPs for each CpG site and built mean differences (MD) and Limits of agreements (LoA) into the BAPs. The MD quantifies the general difference between the two strategies and the LoAs define the range that covers 95% of the observed differences. The LoA were calculated as follows:

$$\text{LoA} = \text{mean difference} \pm \text{standard deviation} * 1.96$$

3. Results and discussion

3.1. Assay performance

All assays were initially tested for technically adequate performance by analyzing converted DNA samples as positive controls as well as negative controls without DNA input. The assays were tested once in a singleplex and subsequently in a multiplex approach. For all singleplex assays the pyrosequencing results displayed the expected target sequences in the positive controls while no signals were detected in the negative controls. Thus, we concluded that the individual assays performed as expected. Similarly, we also observed correct sequencing results for the positive controls analyzed with the multiplex strategy. However, the negative controls for the *FHL2* assay displayed an unknown sequence that did not correspond to the target sequence of *FHL2*. Since this artifact sequence was reproduced in independent negative controls, we assumed an unspecific binding of the biotin labelled *FHL2* primer within the multiplex PCR. Since this would have influenced all *FHL2* results analyzed with the multiplex strategy, we excluded the *FHL2* assay from the project. We could have designed and

tested alternative primers for *FHL2* if we were particularly interested in *FHL2*. However, we considered the remaining seven target sequences which were correctly amplified and sequenced to exemplify the strategy comparison and continued thus without *FHL2*.

3.2. Precision of the two strategies

To analyze the expectable technical variation also referred to as precision of the two strategies we investigated the reproducibility of the measurements. We calculated and compared the mean standard deviations (mean SD) exhibited by the triplicate measurements for each age CpG and strategy, respectively (Fig. 1). On average the observed mean SDs were around 1%, the highest were found for *ELOVL2* and *PDE4C* (up to 1.7%), and the lowest for *KLF14*, *SST*, *EDARADD* and *C1orf132* (down to 0.3%). However, more meaningful is the mean SD difference between the two strategies. The CpGs in *ELOVL2* and *PDE4C* displayed the highest strategy differences but all of them were $\leq 0.5\%$. Thereby, some CpG sites were measured more precisely with the singleplex, some with the multiplex strategy. Thus, none of the strategies displayed generally higher precision. To compare the mean SDs between the strategies, we performed paired *t*-tests of the SDs for each CpG site (Supplementary Table 1). As expected, none of the CpGs displayed significant mean SD differences between the strategies. Both strategies provide thus highly precise methylation measurements without exhibiting any significant precision differences.

3.3. Strategy comparison of the methylation measurements

In the second part of the study we investigated if and how the modified PCR conditions of the multiplex strategy lead to differentially measured methylation values. We directly compared the observed CpG methylation values between the strategies. To statistically test for significant differences, we performed paired *t*-tests (Table 3) and for a graphical representation of the agreement, we constructed Bland Altman Plots (BAPs) (Fig. 2, Supplementary Fig. 1).

Eight of the fourteen investigated age CpGs displayed *p*-values higher than 0.2 which strongly indicates that both strategies measure equally for these CpG sites. In contrast, the measurements for the other six age CpGs displayed significant differences between the strategies: *ELOVL2* CpG1 ($p = 0.0061$), *ELOVL2* CpG5 ($p = 0.043$), *EDARADD* CpG2 ($p = 0.0012$), *PDE4C* CpG3 ($p = 0.0108$), *PDE4C* CpG4 ($p = 0.0045$) and *PDE4C* CpG6 ($p = 0.0018$). Among those six CpGs, CpG1 and CpG5 in *ELOVL2* displayed the highest MDs (-1.6% and -1.8%). However, the MD is an average value and thus error-prone for small sample numbers. More meaningful are the confidence intervals (COIs) provided by the *t*-test. By considering the variation of the data as well as the sample size the COIs describe the strategy difference not as a fixed value but as a range of possible values the "true" difference (i.e. actual difference in the entire population) could be. Consequently, a small number of samples and high variations lead to large confidence intervals and vice versa. However, as the number of samples is limited in the present study, the COIs give a more reliable information about the strategy difference compared to the mean values of the differences.

For CpG5 in *ELOVL2* we observed a considerable high variation of the individual differences in the BAP (LoA range = 9.3%) (Supplementary Table 2) and consequently large COIs (-3.47% to -0.07%). Smaller variation as well as COIs displayed CpG1 in *ELOVL2*: LOA range = 5.6%; COIs = -2.6% to -0.6%. Interestingly, the three CpG sites of *ELOVL2* displayed higher variation of the methylation measurements compared to the other target regions.

Mentionable, as we already showed that both strategies performed equally precise, the variations are not caused by only one of the strategies but rather by the performance of the individual assays. This is actually true for all investigated age CpGs.

Compared to *ELOVL2*, the overall variation of the measurements for the *PDE4C* targets were noticeably smaller. CpG3 (LoA range = 2.4%)

and CpG6 (LoA range = 2.6%) in *PDE4C* for example displayed such small variations that we were able to narrow the COIs down to a margin of 1% (CpG3: 0.2% to 1.1%; CpG6: 0.4% to 1.4%). CpG4 in *PDE4C* exhibited higher variation (LoA range = 4.0%) resulting in larger COIs (0.5% to 2.0%). CpG2 in *EDARADD* displayed a similarly high variation (LoA range = 3.5%) and consequently also similarly large COIs (−2.0% to −0.7%).

Summarized, we were able to identify significant measurement differences for only six out of fourteen age CpGs. Among those, for some age CpGs the multiplex for some the singleplex strategy measured higher methylation values. Thus, the observed strategy differences are not general but specific for the age CpGs. Similarly, also the variation of the methylation measurements differed between the age CpGs allowing either considerably precise or vague statements about the strategy differences. However, it was not the main focus of the study to define the strategy differences but rather to initially test if the strategies provide statistically different measurements for the age CpGs or not. Accordingly, we decided to perform triplicate measurements to enable precision testing rather than investigating a bigger sample set. The assessment of the strategy offset for the six significantly different measured age CpGs will be the next step. Therefore, greater sample sets need to be investigated. If the strategy-specific offset can be sufficiently defined the multiplex strategy measurements can be normalized. Subsequently, methylation data from both multiplex and singleplex strategies can be applied to the same age estimation models.

4. Conclusions

The results of this study strongly indicate that our novel multiplex strategy for pyrosequencing is a promising solution for investigations of small amounts of casework DNA samples. We demonstrated that the multiplex pre-amplification step has no impact on the precision of the measurements. However, it has to be noted that primer-primer interactions as discovered for *FHL2* must be tested and, if observed, need to be resolved in advance by designing alternative primer pairs. The good precision of the data obtained with the multiplex strategy indicates that the new workflow enables accurate quantitative methylation analysis which is the basic requirement for the application in a forensic context.

We furthermore found that the multiplex strategy provided no statistically different methylation measurements compared to the singleplex strategy for eight out of fourteen investigated age CpGs. Thus, these eight age CpGs require no adjustment of the age estimation models' reference data for any of the strategies. Consequently, both strategies could be alternatively used in casework. The remaining six investigated age CpGs displaying significant measurement differences require adjusted models for the respective strategy. More precisely, the methylation values measured for those age CpGs need to be normalized first before applying them to the age estimation model. Therefore, the multiplex strategy specific offset of the methylation measurements needs to be validated on larger sample sets. However, this effort is worth it, considering that the new multiplex strategy enables the investigation of casework samples that cannot be investigated with the common singleplex strategy due to lack of sufficient amounts of DNA.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgement

We thank Rolf Fimmers from the Institute of Medical Biometrics, Informatics and Epidemiology, Faculty of Medicine, University of Bonn, Germany, for helpful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102189>.

References

- [1] A. Freire-Aradas, C. Phillips, M.V. Lareu, Forensic individual age estimation with DNA: from initial approaches to methylation tests, *Forensic Sci. Rev.* (2017) 29.
- [2] P.W. Laird, Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 191.
- [3] W. Parson, Age estimation with DNA: from forensic DNA fingerprinting to forensic (epi) genomics: a mini-review, *Gerontology* 64 (2018) 326–332.
- [4] T. Ushijima, S. Yamashita, Methylation-sensitive Representational Difference Analysis (MS-RDA). *DNA Methylation*, Springer, 2009, pp. 117–130.
- [5] S.H. Yi, L.C. Xu, K. Mei, R.Z. Yang, D.X. Huang, Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction, *Forensic Sci. Int. Genet.* 11 (2014) 117–125.
- [6] J.Ci Susan, J. Harrison, C.L. Paul, M. Frommer, High sensitivity mapping of methylated cytosines, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 2990–2997.
- [7] H. Hayatsu, Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis—a personal account, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 84 (2008) 321–330.
- [8] R.Y.-H. Wang, C.W. Gehrke, M. Ehrlich, Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 4777–4790.
- [9] C. Grunau, S.J. Clark, A. Rosenthal, Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e65–e65.
- [10] A.M. Raizis, F. Schmitt, J.-P. Jost, A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation, *Anal. Biochem.* 226 (1995) 161–166.
- [11] Y. Liu, P. Siejka-Zielińska, G. Velikova, Y. Bi, F. Yuan, M. Tomkova, et al., Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution, *Nat. Biotechnol.* (2019) 1.
- [12] R. Pidsley, E. Zotenko, T.J. Peters, M.G. Lawrence, G.P. Risbridger, P. Molloy, et al., Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling, *Genome Biol.* 17 (2016) 208.
- [13] G. Hannum, J. Guinney, L. Zhao, L. Zhang, G. Hughes, S. Sada, et al., Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates, *Mol. Cell* 49 (2013) 359–367.
- [14] S. Horvath, DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.* 14 (2013) 3156.
- [15] S. Horvath, K. Raj, DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing, *Nat. Rev. Genet.* (2018) 1.
- [16] R. Richards, J. Patel, K. Stevenson, S. Harbison, Evaluation of massively parallel sequencing for forensic DNA methylation profiling, *Electrophoresis* 39 (2018) 2798–2805, <https://doi.org/10.1002/elps.201800086>.
- [17] A. Freire-Aradas, C. Phillips, A. Mosquera-Miguel, L. Giron-Santamaría, A. Gómez-Tato, M.C. De Cal, et al., Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system, *Forensic Sci. Int. Genet.* 24 (2016) 65–74.
- [18] C. Xu, H. Qu, G. Wang, B. Xie, Y. Shi, Y. Yang, et al., A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model, *Sci. Rep.* 5 (2015) 17788, <https://doi.org/10.1038/srep17788>.
- [19] J.-L. Park, J.H. Kim, E. Seo, D.H. Bae, S.-Y. Kim, H.-C. Lee, et al., Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use, *Forensic Sci. Int. Genet.* 23 (2016) 64–70.
- [20] M. Ronaghi, M. Nygren, J. Lundeberg, Nyrén Pal, Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing, *Anal. Biochem.* 267 (1999) 65–71.
- [21] H.Y. Lee, S.-E. Jung, Y.N. Oh, A. Choi, W.I. Yang, K.-J. Shin, Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study, *Forensic Sci. Int. Genet.* 19 (2015) 28–34.
- [22] M.J. Ziller, E.K. Stamenova, H. Gu, A. Gnirke, A. Meissner, Targeted bisulfite sequencing of the dynamic DNA methylome, *Epigenetics Chromatin* 9 (2016) 55.
- [23] J. Naue, H.C. Hoefsloot, A.D. Kloosterman, P.J. Verschure, Forensic DNA methylation profiling from minimal traces: how low can we go? *Forensic Sci. Int. Genet.* 33 (2018) 17–23.
- [24] R. Zbieć-Piekarska, M. Spólnicka, T. Kupiec, A. Parys-Proszek, Ż Makowska, A. Paleczka, et al., Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis, *Forensic Sci. Int. Genet.* 17 (2015) 173–179, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>.
- [25] D. Zubakov, F. Liu, I. Kokmeijer, Y. Choi, J.B.J. van Meurs, W.F.J. van IJcken, et al., Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length, *Forensic Sci. Int. Genet.* 24 (2016) 33–43, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.014>.
- [26] R. Zbieć-Piekarska, M. Spólnicka, T. Kupiec, Ż Makowska, A. Spas, A. Parys-Proszek, et al., Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science, *Forensic Sci. Int. Genet.* 14 (2015) 161–167.
- [27] S.-E. Jung, S.M. Lim, S.R. Hong, E.H. Lee, K.-J. Shin, H.Y. Lee, 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 (2019) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.010>.
- [28] I. Smeers, R. Decorte, W. Van de Voorde, B. Bekaert, Evaluation of three statistical

2. Publikationen

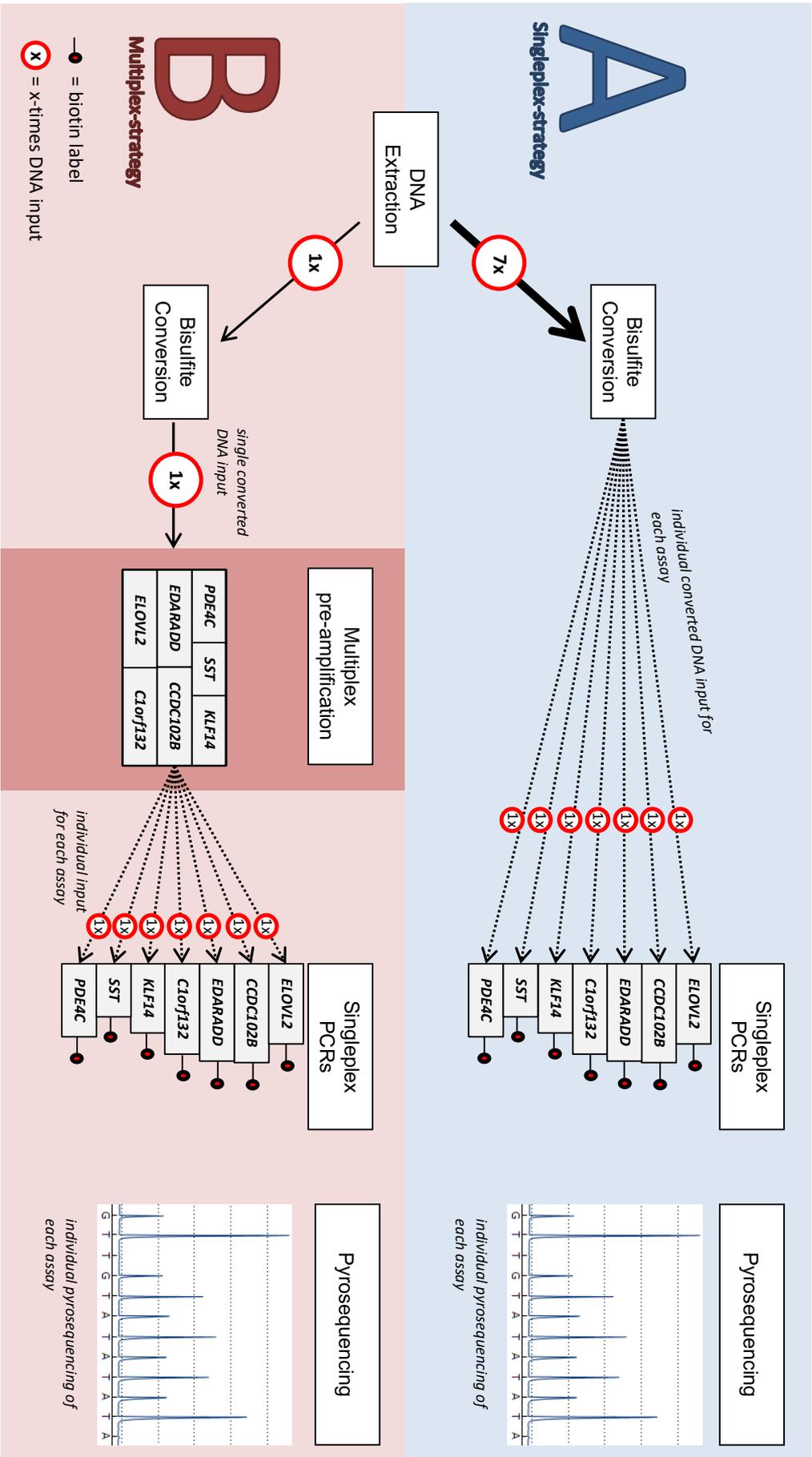
Publikation 1 [Haupttext]

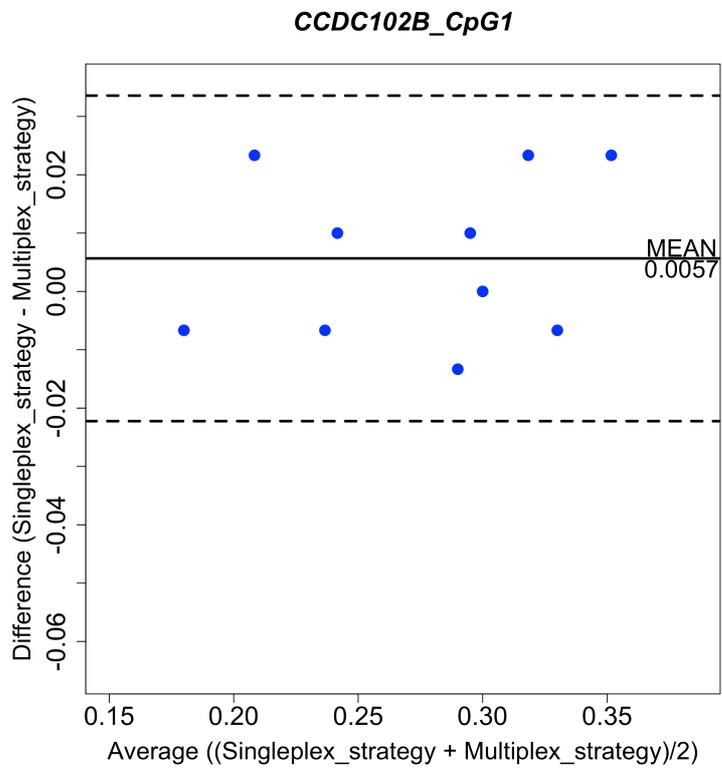
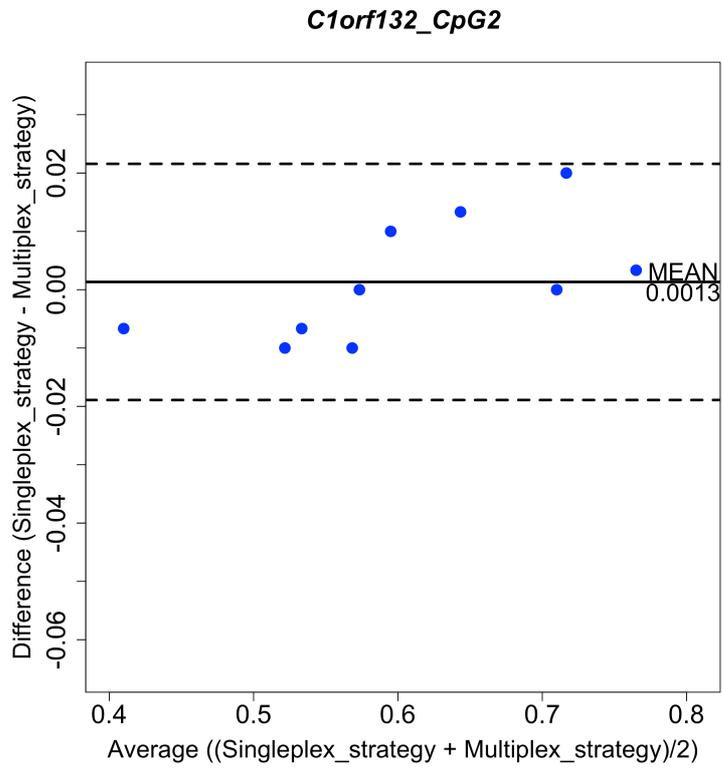
J. Fleckhaus and P.M. Schneider

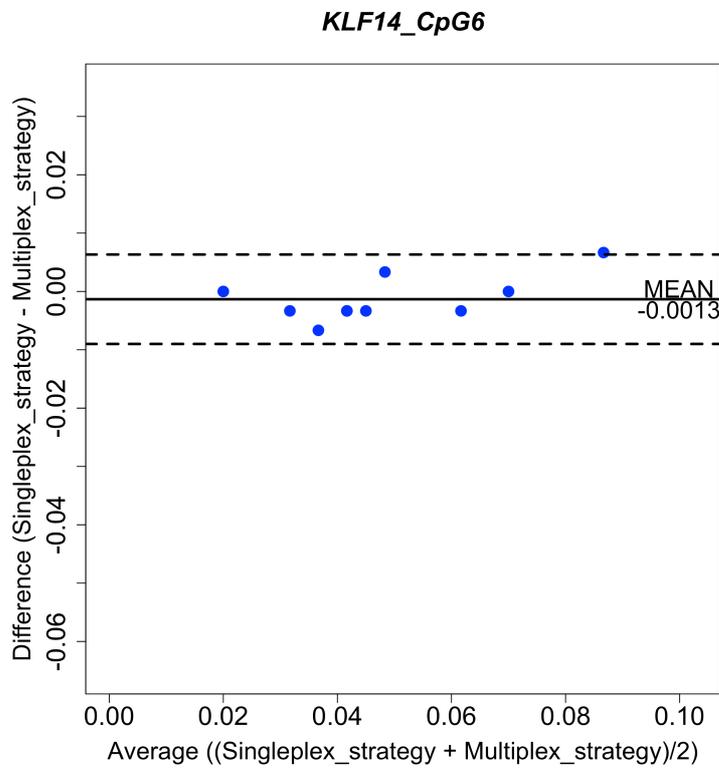
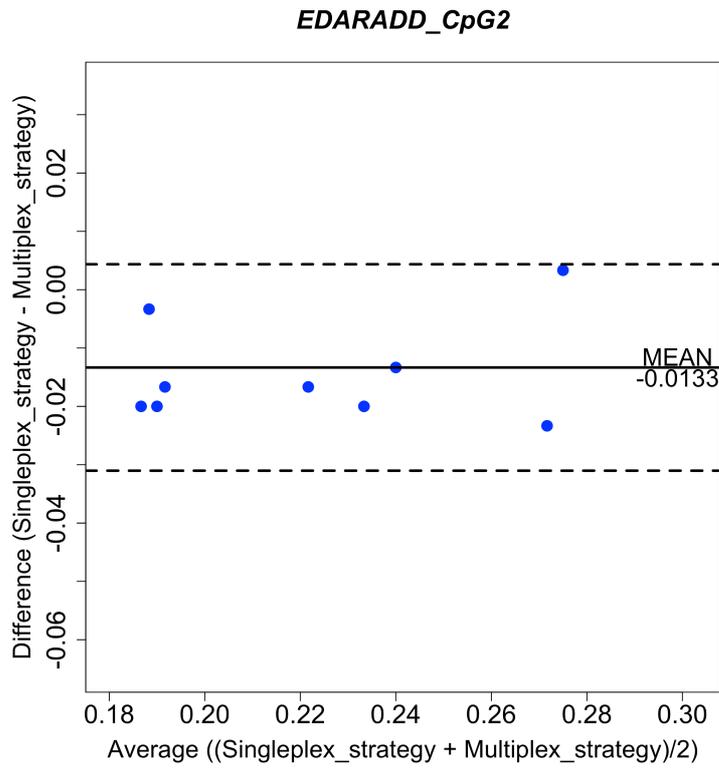
Forensic Science International: Genetics 44 (2020) 102189

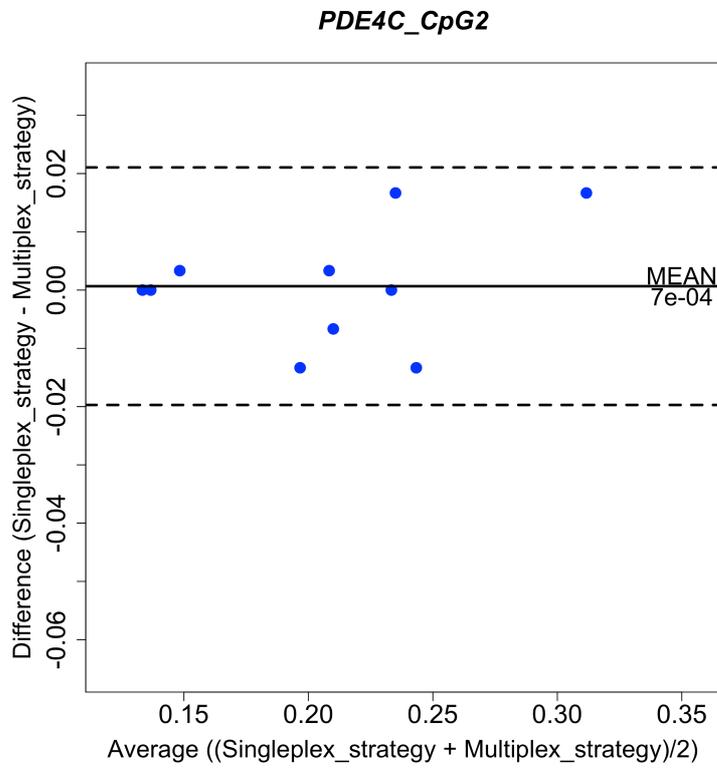
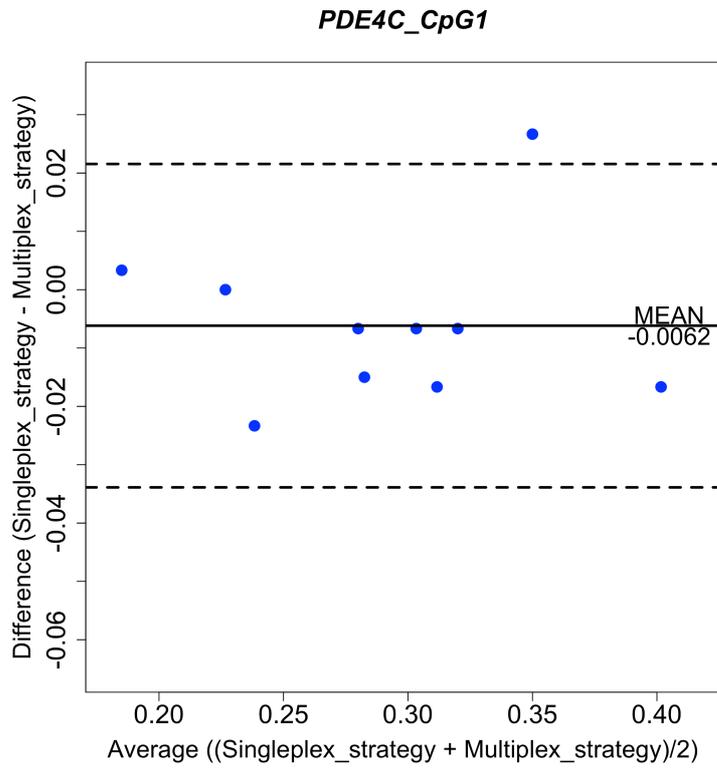
- prediction models for forensic age prediction based on DNA methylation, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 128–133, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.02.008>.
- [29] M. Eipel, F. Mayer, T. Arent, M.R.P. Ferreira, C. Birkhofer, U. Gerstenmaier, et al., Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures, *Aging* 8 (2016) 1034–1044, <https://doi.org/10.18632/aging.100972>.
- [30] B. Bekaert, A. Kamalandua, S.C. Zapico, W.V. Voorde de, R. Decorte, Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers, *Epigenetics* 10 (2015) 922–930, <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>.
- [31] C.I. Weidner, Q. Lin, C.M. Koch, L. Eisele, F. Beier, P. Ziegler, et al., Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites, *Genome Biol.* 15 (2014) R24, <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>.
- [32] S.R. Hong, S.-E. Jung, E.H. Lee, K.-J. Shin, W.I. Yang, H.Y. Lee, DNA methylation-based age prediction from saliva: high age predictability by combination of 7 CpG markers, *Forensic Sci. Int. Genet.* 29 (2017) 118–125, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.006>.
- [33] D. Giavarina, Understanding Bland Altman analysis, *Biochem. Med.* 25 (2) (2015) 141–151, <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>.

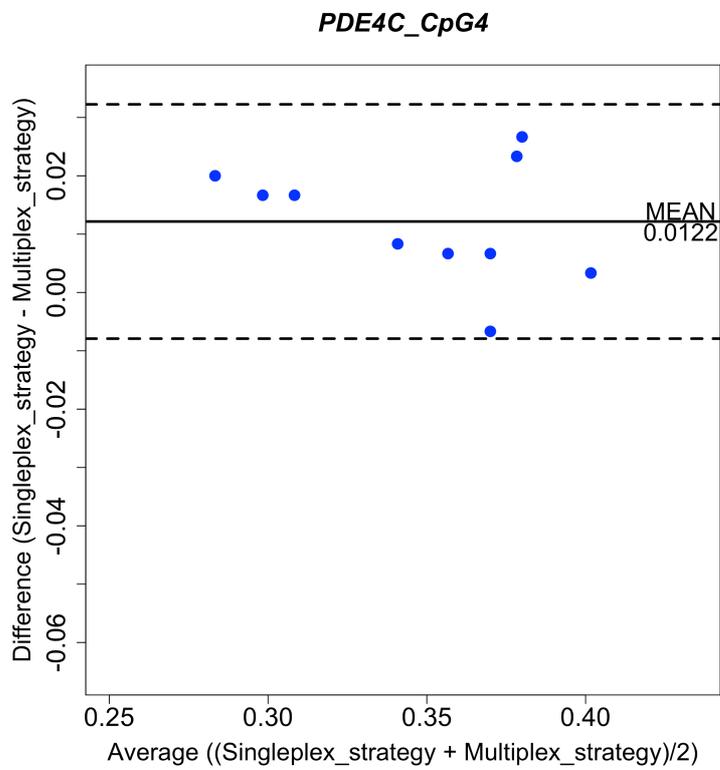
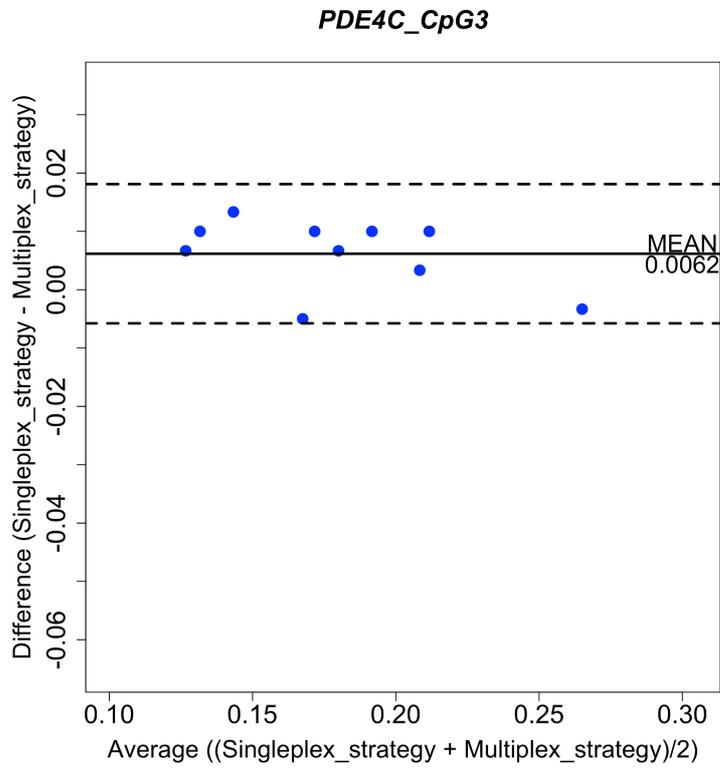
Publikation 1 [Graphical Abstract]

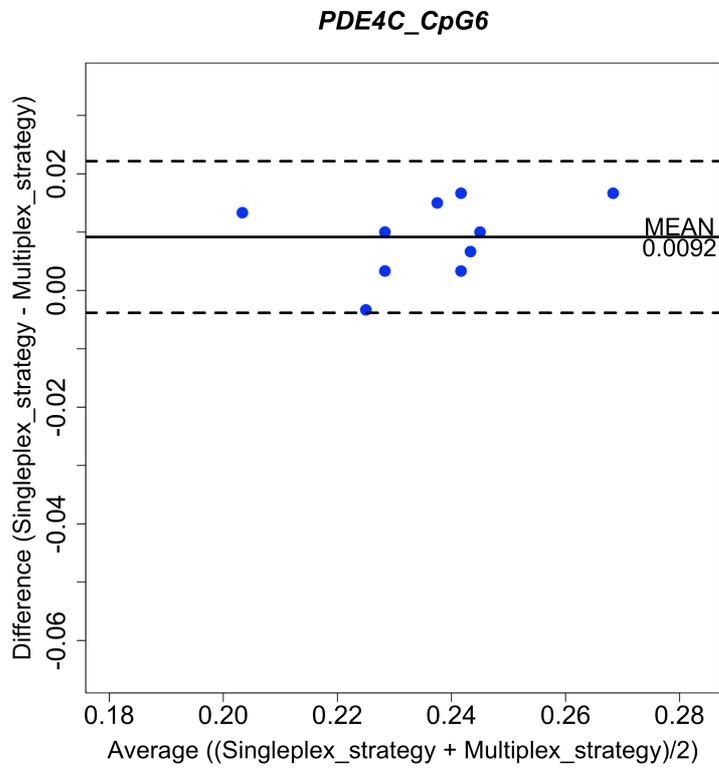
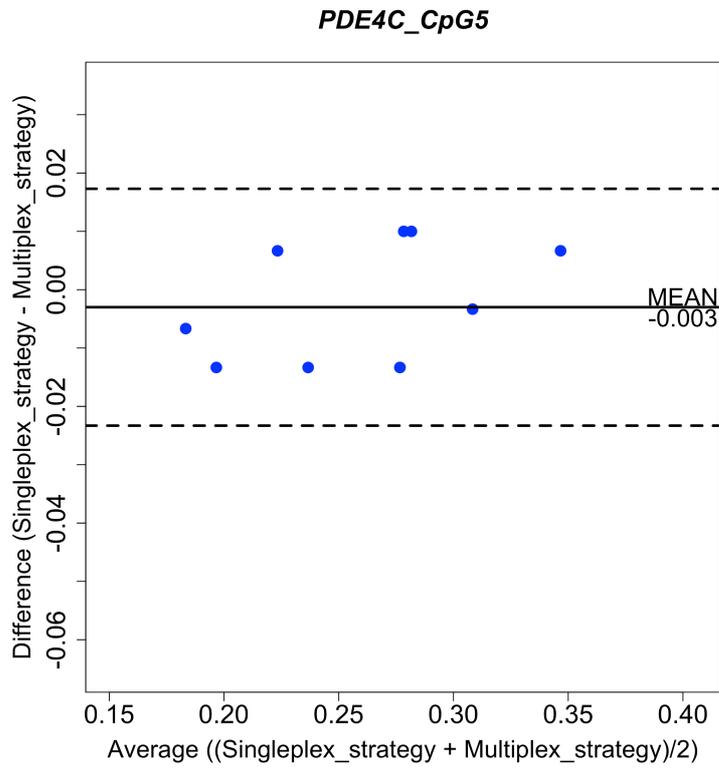


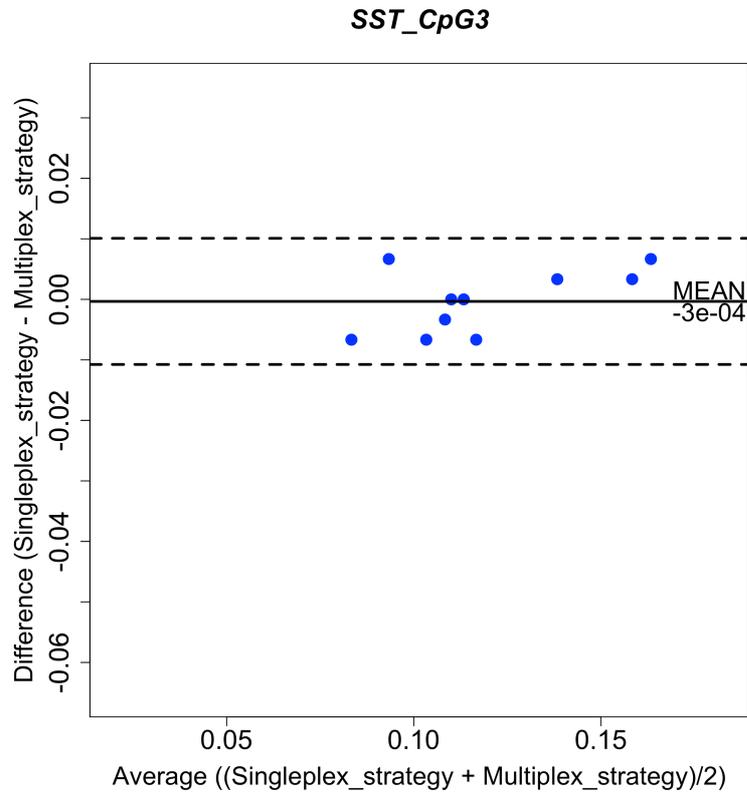












Supplementary Figure 1. Bland Altman plots: Each data point represents one analyzed sample. The differences were calculated by subtracting the multiplex measurements from the singleplex measurements. Solid lines represent the mean differences, dashed lines the lower and upper Limits of Agreement.

2. Publikationen

Publikation 1 [Supplementary Tables]

Supplementary Table 1. T-test of the standard deviations: Standard deviations of the measured triplicates were compared individually between multiplex and singleplex strategy with paired t-test for each age CpG. Negative MD values indicate higher measurements with the multiplex strategy.

CpG site	p-value	95 % confidence interval (CoI)		mean of the differences (MD)
ELOVL2_CPG1	0.2191	-0.003345	0.010461	0.0035579
ELOVL2_CPG5	0.4383	-0.008738	0.004126	-0.0023058
ELOVL2_CPG7	0.4676	-0.013842	0.006890	-0.0034757
CCDC102B_CpG1	0.8856	-0.007414	0.008452	0.0005190
C1orf132_CpG1	0.9647	-0.005313	0.005104	-0.0001049
KLF14_CpG6	0.6442	-0.005085	0.003312	-0.0008868
EDARADD_CpG2	0.7916	-0.005159	0.004050	-0.0005541
PDE4C_CpG1	0.2135	-0.003058	0.011925	0.0044335
PDE4C_CpG2	0.3068	-0.008747	0.003082	-0.0028323
PDE4C_CpG3	0.4645	-0.004476	0.002216	-0.0011298
PDE4C_CpG4	0.1411	-0.001811	0.010819	0.0045042
PDE4C_CpG5	0.2189	-0.002854	0.010874	0.0040097
PDE4C_CpG6	0.5916	-0.006089	0.003686	-0.0012017
SST_CpG3	0.6046	-0.005216	0.003216	-0.0010000

Supplementary Table 2. Bland Altman Limits of Agreement. Lower and upper Limits of Agreement (LoA), as well as the total ranges between the LoAs are calculated and listed.

CpG site	Lower LoA	Upper LoA	Total range LoA
ELOVL2_CPG1	-0.0438	0.0118	0.0556
ELOVL2_CPG5	-0.0643	0.0289	0.0932
ELOVL2_CPG7	-0.0205	0.0262	0.0467
CCDC102B_CpG1	-0.0222	0.0336	0.0558
C1orf132_CpG1	-0.0189	0.0216	0.0405
KLF14_CpG6	-0.0090	0.0063	0.0153
EDARADD_CpG2	-0.0310	0.0044	0.0354
PDE4C_CpG1	-0.0339	0.0216	0.0555
PDE4C_CpG2	-0.0197	0.0210	0.0407
PDE4C_CpG3	-0.0058	0.0181	0.0239
PDE4C_CpG4	-0.0079	0.0322	0.0401
PDE4C_CpG5	-0.0233	0.0173	0.0406
PDE4C_CpG6	-0.0038	0.0222	0.0260
SST_CpG3	-0.0108	0.0101	0.0209

2.2 Investigation of the impact of biogeographic ancestry on DNA methylation based age predictions comparing a Middle East and a Central European population

***J. Fleckhaus**¹, P. Bugert², N.A.M. Al-Rashedi³ and M.A. Rothschild¹

Forensic Science International: Genetics 67 (2023): 102923.

**Corresponding author*

¹*Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Melatengürtel 60-62, D-50823, Cologne, Germany*

²*Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Heidelberg University, Medical Faculty Mannheim, German Red Cross Blood Service of Baden-Württemberg - Hessen gGmbH, Mannheim, Germany.*

³*Department of Biology, College of Science, Al Muthanna University, Samawah, Iraq*

Received 13 April 2023, Revised 10 July 2023, Accepted 1 August 2023, Available online 3 August 2023, Version of Record 18 August 2023.

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Die Projektidee sowie das Konzept zu der wissenschaftlichen Studie wurden selbständig durch mich entworfen. Da in dem Projekt europäische Probanden mit Probanden einer abweichenden Herkunft verglichen werden sollten, war es nötig, Kooperationspartner zu finden, die über den Zugang zu geeigneten Probanden verfügen. Mit Unterstützung von Herrn Prof. Schneider wurden mehrere potenzielle Kooperationspartner angesprochen, bis mit Herrn Prof. Bugert (Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Universität Heidelberg, Deutschland) und Herrn Dr. Al Rashedi (Institut für Biologie an der Al Muthanna Universität in Samawah, Irak) zwei geeignete Kooperationspartner gewonnen werden konnten. Nach Absprache zum Umfang und der Zusammensetzung der Probenkollektive, führte Herr Dr. Al Rashedi eine entsprechende Sammlung von Blutproben im Irak durch und übersandte die Proben an mich. Analog dazu sammelte Herr Prof. Bugert Blutproben europäischer Probanden und übersandte bereits isolierte DNA dieser Proben an mich.

Nach Ankunft aller DNA- bzw. Blutproben wurden alle weiteren experimentellen Arbeiten durch mich ausgeführt. Dies umfasst die Optimierung und Validierung der PCR- und Sequenzierungsbedingungen des im Rahmen der Studie angewandten Multiplex-Assays aus insgesamt fünf Altersmarkern, die Messungen der Projektproben und die Auswertung der Ergebnisse. Während des gesamten Projektverlaufs stand Herr Prof. Schneider in beratender Funktion zur Verfügung.

Das Manuskript, inklusive der Datenaufbereitung und deren Interpretation, der fachlichen Diskussion sowie aller Schreibearbeiten und Illustrationen wurde eigenständig durch mich angefertigt. Für die statistischen Auswertungen erhielt ich im Rahmen eines

2. Publikationen

Publikation 2 [Informationen]

Beratungsgesprächs besondere Unterstützung von Herrn Prof. Nothnagel aus dem CCG (Cologne Center for Genomics, Statistical Genetics and Bioinformatics) der Universität Köln. Das Manuskript wurde durch alle Co-Autoren mit Ausnahme des leider im Zeitraum der Anfertigung verstorbenen Herrn Prof. Schneider sprachlich und inhaltlich korrigiert und ergänzt.



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Investigation of the impact of biogeographic ancestry on DNA methylation based age predictions comparing a Middle East and a Central European population[☆]

J. Fleckhaus^{a,*}, P. Bugert^b, N.A.M. Al-Rashedi^c, M.A. Rothschild^a

^a Institute of Legal Medicine, Medical Faculty, University Hospital and University of Cologne, Melatenguertel 60-62, D-50823 Cologne, Germany

^b Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Heidelberg University, Medical Faculty Mannheim, German Red Cross Blood Service of Baden-Württemberg - Hessen gGmbH, Mannheim, Germany

^c Department of Biology, College of Science, Al Muthanna University, Samawah, Iraq

ARTICLE INFO

Keywords:

Forensic age estimation
Population specific DNA methylation
Biogeographic ancestry
Bisulfite pyrosequencing

ABSTRACT

DNA methylation based age prediction is a new method in the toolbox of forensic genetics. Typically, the method is applied in the course of police investigation e.g. to predict the age of an unknown person that has left a biological trace at a crime scene. The method can also be used to answer other forensic questions, for example to estimate the age of unknown human bodies in the course of the identification process. In the present study, we tested for a potential impact of biogeographic ancestry (BGA) on age predictions using five age dependent methylated CpG sites within the genetic regions of *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* and *TRIM59*. We collected 102 blood samples each from donors living in Iraq, Middle East (ME) and Germany, Central Europe (EU). Both sample sets were matched in sex and age ranging from 18 to 68 years with exactly one male and female sample per year of age. All samples were analyzed by bisulfite pyrosequencing applying a multiplex pre-amplification strategy based on a single input of 35 ng converted DNA in the PCR. For the CpGs in *MIR29B2CHG*, *FHL2* and *KLF14*, we observed significantly different methylation levels between the two populations. While we were able to train two highly accurate prediction models for the respective population with mean absolute deviations between predicted and actual ages (MAD) of 3.34 years for the ME model, and 2.72 years for the EU model, we found an absolute prediction difference between the two population specific models of more than 4 years. A combined model for both populations compensated the methylation difference between the two populations, providing MADs of prediction of only 3.81 years for ME and 3.31 years for EU samples. In total, the results of the present study strongly support the benefit of BGA information for more reliable methylation based age predictions.

1. Introduction

DNA methylation based age prediction has been investigated intensively in recent years and has established itself as a promising new tool for forensic casework [1,2].

Adjustments to national legislation have been made in different countries, especially in those where the investigation of phenotypic traits and age was previously prohibited, to now allow the use of phenotypic and age prediction in forensic investigations [3]. Before this new method is introduced into routine forensic casework, however, it is important to understand that the properties of forensic casework

samples will very likely differ from research samples [4]. Such properties include the sample quality where forensic casework samples are likely to be more degraded than research samples, show admixture with DNA from different tissues and contributors and are affected by PCR inhibition. Fortunately, methods are available to account for these properties and provide information whether a sample is suitable for investigation [5]. The challenge, however, is deciding which age prediction model is most appropriate given the properties presented in the sample under investigation. In the literature we find a considerable number of different age prediction models targeting different age informative CpG sites (aCpGs) and possessing different sample

[☆] Dedicated to the memory of Prof. Peter M. Schneider.

* Corresponding author.

E-mail address: jan.fleckhaus@med.uni-muenchen.de (J. Fleckhaus).

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102923>

Received 13 April 2023; Received in revised form 10 July 2023; Accepted 1 August 2023

Available online 3 August 2023

1872-4973/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

characteristics especially regarding the tissue origin of the sample to be investigated [6]. Considering that DNA methylation is an epigenetic modification that is controlled by a network of various intracellular and extracellular factors that interact with external factors such as the environment or lifestyle, it is evident that the age dependent methylation change represented by an age prediction model can only be accurately described for certain types of samples [7]. Examples of impacting factors that were found to cause systematic methylation differences of certain aCpGs include excessive alcohol abuse, diseases or the athletic state of a person [8–10]; thus pointing to the need for adjusted age prediction models. When the person of interest is unknown, however, models that are too specialized are not practical since much of the required information (e.g. about the lifestyle) is not known. Therefore, when developing age prediction models for unknown sample donors, it is important to have a tradeoff between required and optional co-variables.

In this context, the biogeographical ancestry (BGA) of a person that can be estimated via ancestry-informative SNP markers [11,12] from the sample is a promising candidate for a co-variable of age predictions. DNA methylation shows population specific patterns for multiple loci [13] which can be traced back to genetic variation [14,15] between populations as well as the exposure of different environmental and lifestyle factors [16–18].

In a preliminary study, our group compared the methylation of 5 aCpGs between populations from Middle East, West Africa and Central Europe and found significant differences regarding the strength of correlation between methylation and age [19]. Becker et al. [20] discovered significant methylation differences between German and Japanese individuals for two out of twenty aCpGs included in their age prediction model for buccal mucosa samples which interestingly did not lead to significant prediction differences between the populations. Cho et al. [21] applied an age prediction model for blood samples based on Polish reference data [22] to 100 Korean sample donors. The resulting mean absolute deviation of the predicted ages from the actual ages (in the following referred to as MAD) was 4.18 years and thus ca. 0.3 years higher than in the original study (MAD = 3.9 years). After training a model based on the Korean samples, they observed a MAD in of 3.34 years in the training set which was almost identical to the training set of the original Polish study (MAD = 3.4 years). Thong et al. [23] trained a new model targeting the same 5 aCpGs as Cho et al. [21] and Zbieć-Piekarska et al. [22] but for a combined sample set of Chinese, Malays and Indian sample donors. They found no significant prediction differences among the three populations but between the three populations and the Polish samples investigated in Zbieć-Piekarska et al.

All studies indicated that BGA could serve as a valuable co-variable to be included into age prediction models. Mentionable, since the experimental and laboratory conditions of these studies differed, it is possible that the observed methylation differences between populations are to some extent also caused by technical differences [24,25].

In the present study we aimed to set up a comprehensive study targeting the most frequently investigated marker set for blood in the forensic context comprising five aCpGs associated with the genetic regions of *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* and *TRIM59* in two populations: a Middle East population and a Central European population [22].

All measurements were carried out in the same laboratory and with the same experimental workflow to rule out any technical bias. Furthermore, the sample sets for the two populations were designed so that the sex and age of the sample donors matched (paired design) and the ages of the donors were equally distributed in an age range from 18 to 68 years with exactly one male and female sample per years of age. Due to the equal representation within the age range, the paired design of the samples, and the standardized experimental workflow, we were able to investigate the isolated influence of BGA between the two populations.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and preparation

Blood samples of 102 healthy Iraqi donors were drawn from the arm vein and collected on QiaCard Classic FTA Cards (Qiagen, Hilden, Germany) in the Department of Biology at the College of Science, Al-Muthanna University, Samawah, Iraq. The dried blood samples were shipped to the Institute of Legal Medicine in Cologne, Germany. Genomic DNA was extracted using the QIAAsymphony DNA Investigator Kit and the QIAAsymphony extraction robot (Qiagen, Hilden, Germany). Venous blood samples of 102 healthy Central European donors were collected at the German Red Cross Blood Service of Baden-Württemberg - Hessen GmbH in Mannheim, Germany and DNA was manually extracted using the FlexiGene Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The study was approved by the ethics committees of the College of Science of Al-Muthanna University (Ethics Vote 4/98) and the Ethics Committee of the Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Ethics Vote 87/04). Written informed consent was provided by all participants.

The Middle East and Central European sample sets were matched in sex and age ranging from 18 to 68 years with exactly one male and female sample per year of age. In the following, the two samples with the same age and sex in the two populations are denoted as “samples pairs”. DNA concentrations were measured by quantitative real time PCR using the Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) and the 7500 Fast-Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). For each sample between 46 and 65 ng of DNA was bisulfite converted using the EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer’s protocol for low-concentration samples. Converted DNA was eluted in 13 µL elution buffer and diluted with additional elution buffer down to a concentration of 3.5 ng/µL (based on the measured quantity of input DNA prior conversion) in order to normalize all samples.

2.2. Target amplification

PCR amplification comprised of five individual assays for the target regions in *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* and *TRIM59*. The targeted aCpG sites are displayed in Table 1. All PCR reactions were performed using the PyroMark PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). The PCR and sequencing primers were designed by Qiagen (Hilden, Germany) in preparation of a commercially available kit, the PyroMark Q48 FX age assay, and tested in an international field test. A manuscript about the results of the field test including the primer sequences will be published soon.

2.2.1. Multiplex pre-amplification

All DNA loci were collectively pre-amplified in a multiplex PCR using PCR primers without biotin modifications. The PCR was set up as follows: 2 µL of 100 µM primer mix, 5 µL of 10 × CoralLoad concentrate, 25 µL PyroMark PCR Master Mix, 8 µL Q-Solution and 10 µL normalized (3.5 ng/µL) bisulfite converted DNA. The primer mix was prepared using the following relative amounts: 4.5 units *ELOVL2*, 5 units *MIR29B2CHG*, 1 unit *FHL2*, 1 unit *KLF14* and 1.5 units *TRIM59* (unit = certain volume

Table 1

List of the investigated aCpGs and their genomic location: CpG-ID refers to the Illumina nomenclature.

Gene	CpG-ID	GRCh38
<i>ELOVL2</i>	none	chr6:11044634
<i>MIR29B2CHG</i>	none	chr1:207823681
<i>FHL2</i>	none	chr2:105399288
<i>KLF14</i>	cg14361627	chr7:130734355
<i>TRIM59</i>	none	chr3:160450199

of 100 μM Primer stock; equal amounts/units of forward and reverse primer per assay used) resulting in the following, final primer concentration in the multiplex PCR: 0.69 μM for *ELOVL2*, 0.77 μM *MIR29B2CHG*, 0.23 μM for *TRIM59* and 0.15 μM for *FHL2* and *KLF14*. The thermal cycling protocol was set up as touchdown PCR to ensure specific target amplification under the following conditions: 15 min activation of HotStarTaq polymerase at 95 °C followed by 14 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 30 s annealing at stepwise reduced temperatures every second cycle by one degree starting at 55 °C, 30 s extension at 72 °C followed by 14 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 48 °C, 30 s extension at 72 °C and final extension at 72 °C for 10 min

2.2.2. Purification

The entire PCR products were purified using the AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld, Germany) following the manufacturer's protocol with 1.8x bead to PCR product ratio. After purification the DNA was eluted into 30 μL low TE.

2.2.3. Singleplex target amplification

DNA loci were amplified in individual singleplex PCRs using biotin labelled reverse PCR primers to allow immobilization of the PCR products in the subsequent pyrosequencing reaction. The PCR was set up for each sample with 1.5 μL of 10 \times CoralLOAd concentrate, 12.5 μL PyroMark PCR Master Mix, 4 μL Q-Solution, 5 μL pre-amplified purified DNA and 1 μL of forward and reverse primer (final primer concentration in the PCR reaction: 0.6 μM for *ELOVL2* and *MIR29B2CHG*, 0.3 μM for *TRIM59* and 0.2 μM for *FHL2* and *KLF14*).

The thermal cycling was performed under the following conditions: 15 min activation of HotStarTaq polymerase at 95 °C followed by 10 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 30 s annealing at stepwise increased annealing temperatures (starting with 48 °C and increasing every second cycle by 1° and 1.5° in the final cycle), 30 s extension at 72 °C followed by 31 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 52 °C, 30 s extension at 72 °C and final extension at 72 °C for 10 min.

2.3. Pyrosequencing

For each sample, 10 μL of each PCR product was sequenced on the PyroMark Q48 platform using the PyroMark Q48 CpG reagents (Qiagen, Hilden, Germany). The resulting pyrograms were automatically checked for sufficient quality by the PyroMark Q48 Autoprep Instrument software (Qiagen, Hilden, Germany) using the default settings. The quality assessment considers the relative peak heights, correctness of the observed sequence and complete bisulfite conversion and assigns the quality labels "Passed", "Check" or "Failed". For samples with "Check" quality, the sequence location of the questionable measurement was checked and if it was distant from the relevant aCpG the sample was included in the study. All other samples with "Check" or "Failed" quality were excluded from the study.

After quality assessment, the relative methylation in percent of the individual CpG sites were calculated based on the observed peak heights at the CpG positions.

2.4. Statistical analysis

Out of all 204 samples, 9 samples either did not provide enough DNA for the investigation or did not pass the above-mentioned quality assessment at the level of pyrosequencing. Those 9 samples and their paired sample in the other sample set (i.e. sample with same age and same sex) were excluded from the study. All statistical tests and plots were prepared using the RStudio statistical software version 2022.12.0 + 353 (RStudio Inc., Boston, MA) and packages listed in Suppl. Table S1.

2.4.1. Comparison of methylation status between populations

To compare the strength of correlation between the methylation at

individual aCpGs and age between the two populations, we performed linear regression analysis using the *lm()* function.

To test for significant methylation differences between the two populations, a two-sided paired t-test was performed on the measured relative methylation values of each investigated aCpG using the *t.test()* function with a significance level of 0.05. As a condition for the t-test, the individual methylation differences between the sample pairs were visually checked for normality by plotting the differences as histograms using the *hist()* function.

2.4.2. Model development and comparison

To test the impact of potential methylation differences between the populations on the age prediction outcome, we developed separate age prediction models for both populations as well as a combined model of both populations. We therefore divided each sample set into a training set of 63 samples and a test set of 30 samples. In order to obtain an even age and sex distribution within test and training sets, we selected every third sample in terms of chronological age and alternated the selection of male and female samples for the test sample set.

The age prediction models were trained using multiple linear regression with the *lm()* function.

All models were then tested on both the Middle East and the Central European test sample sets to test for prediction differences between the populations. It is worth mentioning that the age prediction models were not developed with the purpose of obtaining the most accurate age predictions for the respective population as this would have required larger reference sample sets. The focus of the presents study was the comparison of the age predictions between the two populations. For this purpose, the two sample sets were very well suited as they were matched in sex and age of the sample donors.

3. Results and discussion

3.1. Comparison of the strength of correlation between methylation and age

To compare the strengths of correlation between chronological age and methylation of the five investigated aCpGs in *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* and *TRIM59* between the two populations we performed simple linear regression analysis for each aCpG in the two populations (Suppl. Fig. S1). All aCpGs, except *KLF14*, displayed stronger correlation values for the Central European sample set compared to the Middle East sample set based on the coefficient of determination (R^2) (Table 2). This indicated that the variation of age was better explained by the methylation of the respective aCpGs for Central European compared to the Middle East samples. For both populations, the aCpGs in *ELOVL2* and *FHL2* displayed the strongest correlations between methylation and age among the five investigated aCpGs (Table 2) with

Table 2

Strength of correlation between CpG methylation and age: coefficients of determination (R^2) from linear regression analysis between methylation and chronological age are shown for the individual aCpG sites. The first two columns display the values for the Middle East and the Central European samples measured in the present study. The last two columns display measured values from publications from Zbieć-Piekarska et al. (Polish samples) and Cho et al. (Korean samples).

Gene	R^2			
	Present study		Literature	
	Middle East	Central European	Polish	Korean
<i>ELOVL2</i>	0.76	0.87	0.83	0.72
<i>MIR29B2CHG</i>	0.59	0.67	0.79	0.61
<i>FHL2</i>	0.75	0.84	0.71	0.81
<i>KLF14</i>	0.70	0.65	0.53	0.37
<i>TRIM59</i>	0.41	0.53	0.69	0.78

R^2 values ranging between 0.75 and 0.87. These results were as expected and support the results from Zbieć-Piekarska et al. [22] and Cho et al. [21] who investigated the same five aCpGs in a Polish and Korean sample set also via pyrosequencing (see Table 2). Interestingly, these two studies observed the weakest correlation for the aCpG in *KLF14* with R^2 of 0.53 and 0.37 while in the present study the aCpG in *KLF14* was much stronger correlated with age (R^2 of 0.65 and 0.70, respectively). The weakest correlation observed in the present study was for the aCpG in *TRIM59* with R^2 of only 0.53 and 0.41. Here the Polish and Korean samples in the published studies displayed stronger correlations.

A possible reason for the underperformance of the *TRIM59* locus in the present study may be the application of a multiplex PCR strategy [26] which may lead to more PCR artifacts associated with the *TRIM59* target and thus lead to more variance of the measurements. Different studies have already shown that the experimental workflow (i.e. the sequencing platform used) can lead to differences of the determined relative methylation [24,27]. When comparing the relative methylation determined for the same aCpGs in different studies, it is difficult to estimate to what extent observed methylation differences are caused by technical variation or real methylation differences between samples. The advantage of the standardized experimental workflow in the present study is that we are able to attribute the discussed correlation differences for the five aCpGs between Middle Eastern and Central European samples mainly to population specific impacts.

3.2. Comparison of the age dependent CpG methylation

The above discussed strength of the correlation between methylation and age is a measure for the variance of the methylation measurements which is to some extent reflected in the variance of the age predictions i. e. in the accuracy of the age prediction model. Another factor that contributes to the accuracy of age predictions is the concordance of the age dependent methylation change i.e. the mathematical function between methylation and age between the reference samples of the model and the tested samples. To test for such differences of the age dependent methylation change between the Middle East and Central European samples, we tested for statistically significant differences of the mean methylation of the individual aCpGs via paired t-tests. Due to the paired design, we could exclude chronological age as a variable in the paired t-tests because it was identical between the two populations. As a condition of performing a t-test, we ensured that the methylation differences of all sample pairs (same age and sex) were normally distributed by plotting the differences as histograms and visually checking for Gaussian “bell curve” shape (Suppl. Fig. S2). The results of the t-tests are displayed in Table 3.

For *ELOVL2* and *TRIM59* no statistically significant differences were observed between the methylation status of Middle East and Central European samples indicating highly similar age dependent methylation changes at both aCpGs. For all other aCpGs significant or even highly significant methylation differences were observed between the

populations. The aCpG in *KLF14* displayed a significant methylation difference ($p = 3.67 \times 10^{-3}$) with on average 0.54 % (95 %-CI: 0.18–0.9 %) higher methylation of the Middle East compared to the Central European samples. Since the methylation values of the aCpG in *KLF14* ranges between 1 % and 15 % over the whole age range, the methylation difference of 0.54 %, which is quite small in terms of the numerical value, could nevertheless lead to a noticeable difference of age predictions. Highly significant methylation differences ($p = 3.35 \times 10^{-4}$) with on average 3.23 % lower methylation in the Middle East samples (95 %-CI: -4.95 % to -1.51 %) were found for the aCpG in *MIR29B2CHG*. With $p = 1.15 \times 10^{-10}$ and on average 3.63 % higher methylation (95 %-CI: 2.63–4.62 %) in the Middle East samples, the aCpG in *FHL2* displayed the most significant and largest methylation difference between the two populations.

Interestingly, the aCpG in *MIR29B2CHG* was the only of the five aCpGs that displayed a lower methylation in the Middle East compared to the Central European samples. This is worth mentioning because the methylation of the aCpG in *MIR29B2CHG* is negatively correlated with age while all other aCpGs are positive correlated. Assuming a fixed age prediction model for both populations, all observed significant methylation differences would lead to higher predicted ages for the Middle East samples and lower predicted ages for Central European samples respectively.

3.3. Development and comparison of population specific age prediction models

To estimate the size of prediction differences caused by the observed significant methylation differences between the Middle East and Central European populations, we trained three models: two population specific and a combined age prediction model. The models were then each applied to the test sets of both populations and the prediction accuracies compared (Fig. 1).

As a measure for the fit of the models to the respective test samples, we calculated the mean prediction error, i.e. the mean difference between predicted and actual ages (MD). Furthermore, as a measure for the prediction accuracy, we calculated the mean absolute prediction error, i.e. the mean absolute deviation between predicted and actual ages (MAD).

As expected, the “combined model” (Fig. 1 A, Table 4) generally overestimated the ages of the Middle East samples and underestimated the ages of the Central European samples. Due to the higher variance of methylation measurements the prediction accuracy for the Middle East samples was slightly lower (MAD = 3.81 years) compared to the Central European samples (MAD = 3.31 years). The prediction accuracy for both populations, however, was similar to the original study from Zbieć-Piekarska et al. (MAD = 3.91 years) indicating an overall good performance of the “combined model” developed in the present study. However, the clear discrepancy of the mean prediction errors (MDs: 1.63 years vs -2.04 years) between the Middle East and the Central European samples indicates that the combined model is not optimized for the two populations and consequently, specific models for each population may increase the prediction accuracy.

Actually, for the two population specific models the mean error of prediction for the test samples of the same BGA population were nearly zero (MD = -0.11 years for the Middle East and MD = -0.16 years for the Central European model and test samples) indicating an almost perfect fit. Consequently, also the prediction accuracies for the population specific models increased compared to the combined model to only 3.34 years MAD for the Middle East model and 2.72 years MAD for the Central European model.

Due to the population specific adjustments both models obviously showed lower performance for the samples of the opposite population (MD of 3.94 years for Middle East samples that were predicted with the Central Europe model, and a MD of -4.97 for the Central European test samples that were predicted with the Middle East model). Consequently,

Table 3

T-test of the aCpG methylation: methylation values of the individual CpGs were compared between Middle East and Central European samples with paired t-tests. Negative values indicate higher measurements for the Middle East samples. Asterisk indicate significant (*) or highly significant (**) p-values.

Gene	p-value	95 % confidence interval		Mean of the differences
<i>ELOVL2</i>	0.8702	-0.0099276	0.0117122	0.0009
<i>MIR29B2CHG</i>	*3.35 × 10 ⁻⁴	-0.0495022	-0.0150760	-0.0323
<i>FHL2</i>	**1.15 × 10 ⁻¹⁰	0.0263797	0.0462114	0.0363
<i>KLF14</i>	*3.67 × 10 ⁻³	0.0018182	0.0090741	0.0054
<i>TRIM59</i>	0.5916	-0.0092585	0.0161450	0.0034

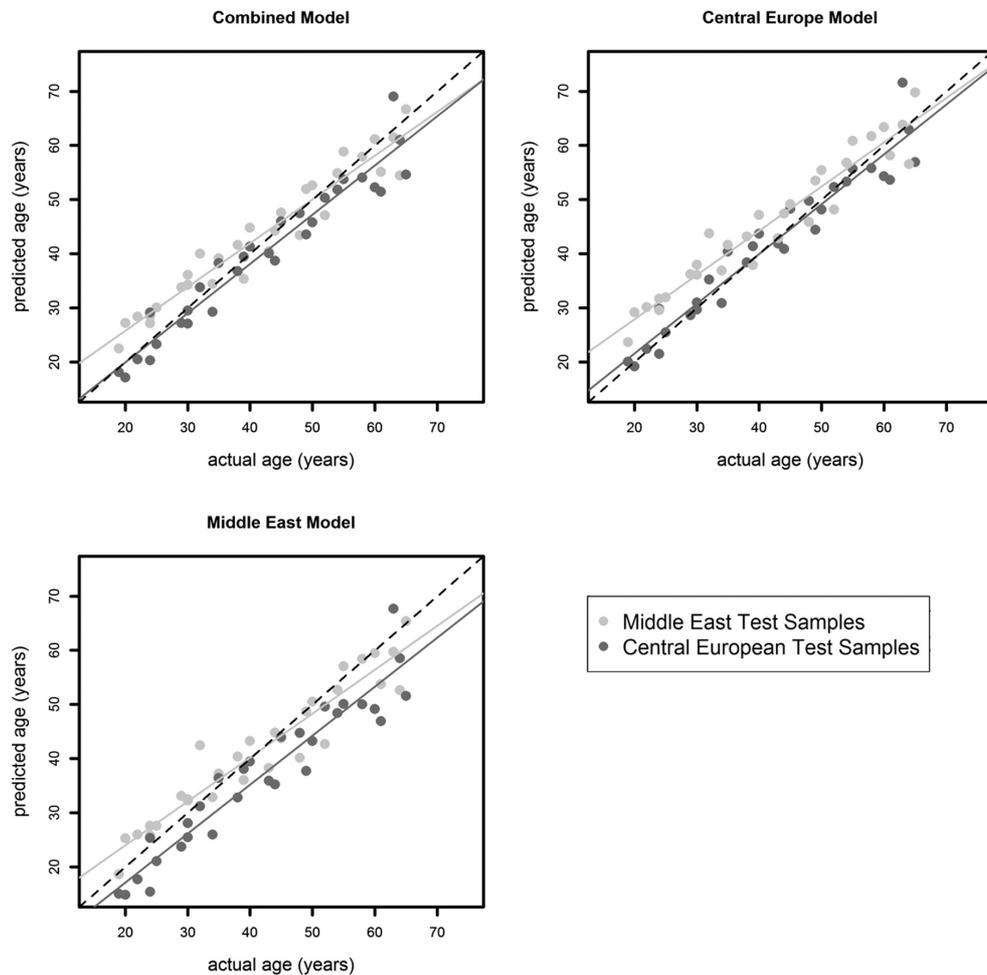


Fig. 1. Age prediction with different models: the plots display age prediction with A: a combined model trained with $n = 126$ age and sex matched Middle East and Central European training samples and B and C: population specific prediction models trained with $n = 63$ Central European and $n = 63$ Middle East samples respectively. Predicted ages are displayed for age and sex matched test sample sets of Middle East ($n = 30$) and Central European ($n = 30$) samples. Solid lines represent linear regression between predicted and actual ages for the respective population.

Table 4

Age prediction results: age prediction results are shown for the population specific (Middle East and Central European) as well as the combined model shown in Fig. 1. Mean differences (MD) and mean absolute differences (MAD) between predicted and actual ages are shown for the Middle East and Central European test sample sets independently.

Test sample sets:	Middle East model		Central European model		Combined model	
	MD	MAD	MD	MAD	MD	MAD
Middle East ($n = 30$)	-0.11	3.34	3.94	5.11	1.63	3.81
Central Europe ($n = 30$)	-4.97	5.46	-0.16	2.72	-2.04	3.31

also the overall prediction accuracies decreased to more than 5 years MAD (5.11 years for the Middle East and 5.46 years for the Central European samples) when using the model that was trained for the opposite population.

As a final measure of the central difference between the age predictions in the two populations, we calculated the average prediction

differences of the sample pairs in the two populations by always subtracting the predicted age of the Central European from the Middle East sample. In the Middle East model the average prediction difference was 4.86 years and in the Central Europe model 4.1 years indicating a central prediction difference of more than 4 years between the populations.

4. Conclusion

The marker set comprising five aCpGs in *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* and *TRIM59* is a well-established marker set for age predictions from blood and implemented in many different age prediction models such as the VISAGE age prediction tool [28]. The results of the present study provide strong evidence that the age dependent methylation change described by these five aCpGs possess a relevant population specific dimension. With our example comprising two populations, a Middle East and Central Europe population, we were able to determine a population specific prediction difference of more than 4 years. It is worth mentioning that this difference was calculated based on relatively small sample sets ($n = 30$ individuals per population) and thus has to be

investigated on larger sample sets in order to quantify the exact prediction difference between the two populations.

Despite the population specific methylation, we have shown that a non-specific population model based on reference samples from both populations provides appropriate prediction accuracies for both populations.

For forensic cases in which the BGA of a certain sample under investigation is not known, it would therefore be ideal to compensate for the population specific methylation by training age prediction models based on reference samples from various populations. Even if such models would probably not represent all global populations it would increase the probability of covering the BGA of the sample under investigation. Whenever BGA is known population specific models should be used because they outperform more general models as shown in the present study.

In practice, most age prediction models currently available in the forensic field are trained on local reference samples, which makes them specific for local populations.

For a reliable application of these models to unknown sample donors the information about the BGA of the sample must be determined. Fortunately, forensic tools for DNA based BGA prediction [11,12] are already available and can be applied to the same sample. This joint application is a promising strategy to gain accuracy of DNA methylation based age predictions and should be further investigated in a comprehensive study that combines both BGA and age prediction.

In this context it is worth mentioning that several countries, such as Germany, currently prohibit the use of predictive models for BGA in criminal investigations by law [29]. Considering the potential relevance of ancestry information for chronological age predictions that was found in the present as well as in other studies it would be recommended to review existing legislation in order to make amendments that appropriately allow BGA prediction into the legal framework.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

We thank Prof. Marielle Vennemann from the Institute of Legal Medicine, University of Münster, and Prof. Michael Nothnagel from the Cologne Center for Genomics, University of Cologne, University Hospital Cologne, for helpful discussions.

Appendix A. Supporting information

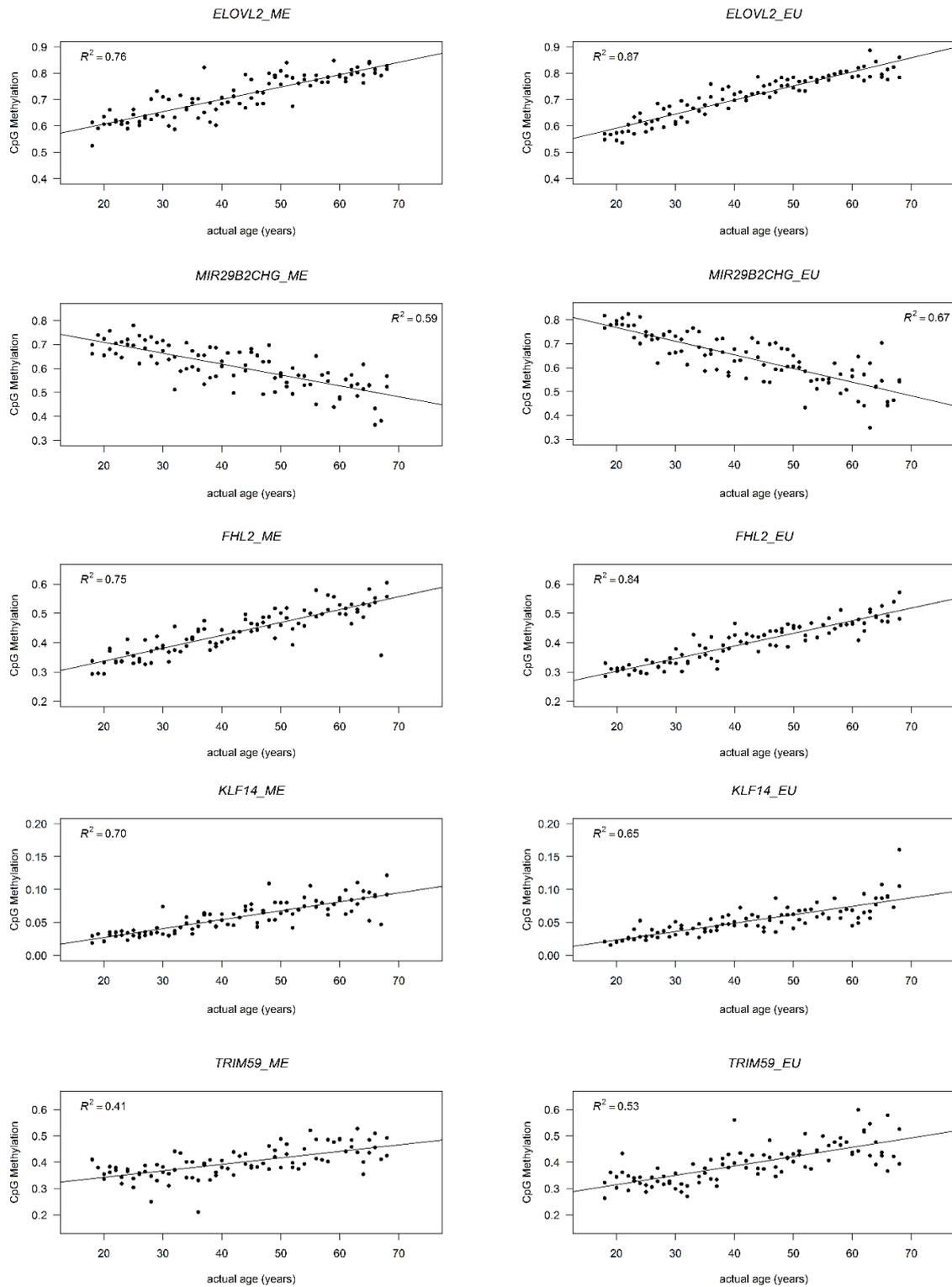
Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.fsigen.2023.102923](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102923).

References

- W. Parson, Age estimation with DNA: from forensic DNA fingerprinting to forensic (Epi) genomics: a mini-review, *Gerontology* 64 (4) (2018) 326–332, <https://doi.org/10.1159/000486239>.
- T.E. Gross, J. Fleckhaus, P.M. Schneider, Progress in the implementation of massively parallel sequencing for forensic genetics: results of a European-wide survey among professional users, *Int. J. Leg. Med.* 135 (4) (2021) 1425–1432, <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02569-0>.
- P.M. Schneider, B. Prainsack, M. Kayser, The use of forensic DNA phenotyping in predicting appearance and biogeographic ancestry, *Dtsch. Arztebl. Int.* 51–52 (51–52) (2019) 873–880, <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0873>.
- H. Correia Dias, E. Cunha, F. Corte Real, L. Manco, Challenges and (un)certainities for DNAm age estimation in future, *Forensic Sci.* 2 (3) (2022) 601–614, <https://doi.org/10.3390/forensicsci2030044>.
- P.R. Hadrill, Developments in forensic DNA analysis, *Emerg. Top. Life Sci.* 5 (3) (2021) 381–393, <https://doi.org/10.1042/ETLS20200304>.
- A. Freire-Aradas, C. Phillips, M.V. Lareu, Forensic individual age estimation with DNA: from initial approaches to methylation tests, *Forensic Sci. Rev.* 29 (2) (2017) 121–144.
- C.G. Bell, R. Lowe, P.D. Adams, A.A. Baccarelli, S. Beck, J.T. Bell, et al., DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations, *Genome Biol.* 20 (1) (2019), 249, <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>.
- D. Piniewska-Róg, A. Heidegger, E. Pośpiech, C. Xavier, A. Pisarek, A. Jarosz, et al., Impact of excessive alcohol abuse on age prediction using the VISAGE enhanced tool for epigenetic age estimation in blood, *Int. J. Leg. Med.* 135 (6) (2021) 2209–2219, <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02665-1>.
- D.J. Simpson, T. Chandra, Epigenetic age prediction, *Aging Cell* 20 (9) (2021), e13452, <https://doi.org/10.1111/acel.13452>.
- B.E. Koop, A. Reckert, J. Becker, Y. Han, W. Wagner, S. Ritz-Timme, Epigenetic clocks may come out of rhythm-implications for the estimation of chronological age in forensic casework, *Int. J. Leg. Med.* 134 (6) (2020) 2215–2228, <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02375-0>.
- M. de La Puente, J. Ruiz-Ramírez, A. Ambroa-Conde, C. Xavier, J. Pardo-Seco, J. Álvarez-Dios, et al., Development and evaluation of the ancestry informative marker panel of the VISAGE basic tool, *Genes* 12 (8) (2021) 1284, <https://doi.org/10.3390/genes12081284>.
- M. Diepenbroek, B. Bayer, K. Schwender, R. Schiller, J. Lim, R. Lagacé, et al., Evaluation of the ion AmpliSeq™ PhenoTrivium panel: MPS-based assay for ancestry and phenotype predictions challenged by casework samples, *Genes* 11 (12) (2020) 1398, <https://doi.org/10.3390/genes11121398>.
- H.B. Fraser, L.L. Lam, S.M. Neumann, M.S. Kober, Population-specificity of human DNA methylation, *Genome Biol.* 13 (2) (2012) R8, <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-2-r8>.
- S. Villicana, J.T. Bell, Genetic impacts on DNA methylation: research findings and future perspectives, *Genome Biol.* 22 (1) (2021), 127, <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02347-6>.
- J.S. Hawe, R. Wilson, K.T. Schmid, L. Zhou, L.N. Lakshmanan, B.C. Lehne, et al., Genetic variation influencing DNA methylation provides insights into molecular mechanisms regulating genomic function, *Nat. Genet.* 54 (1) (2022) 18–29, <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00969-x>.
- F. Kader, M. Ghai, DNA methylation-based variation between human populations, *Mol. Genet. Genom.* 292 (1) (2017) 5–35, <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1264-2>.
- H. Heyn, S. Moran, I. Hernando-Herraez, S. Sayols, A. Gomez, J. Sandoval, et al., DNA methylation contributes to natural human variation, *Genome Res.* 23 (9) (2013) 1363–1372, <https://doi.org/10.1101/gr.154187.112>.
- E.M. Martin, R.C. Fry, Environmental influences on the epigenome: exposure-associated DNA methylation in human populations, *Annu. Rev. Public Health* 39 (2018) 309–333, <https://doi.org/10.1146/annurev-publichealth-040617-014629>.
- J. Fleckhaus, A. Freire-Aradas, M.A. Rothschild, P.M. Schneider, Impact of genetic ancestry on chronological age prediction using DNA methylation analysis, *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 6 (2017) e399–e400, <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.162>.
- J. Becker, P. Böhme, A. Reckert, S.B. Eickhoff, B.E. Koop, J. Blum, et al., Evidence for differences in DNA methylation between Germans and Japanese, *Int. J. Leg. Med.* 136 (2) (2022) 405–413, <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02736-3>.
- S. Cho, S.-E. Jung, S.R. Hong, E.H. Lee, J.H. Lee, S.D. Lee, et al., Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood, *Forensic Sci. Int. Genet.* 29 (2017) 250–256, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.020>.
- R. Zbieć-Piekarska, M. Spólnicka, T. Kupiec, A. Parys-Proszek, Z. Makowska, A. Paleczka, et al., Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis, *Forensic Sci. Int. Genet.* 17 (2015) 173–179, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>.
- Z. Thong, J.Y.Y. Tan, E.S. Loo, Y.W. Phua, X.L.S. Chan, C.K.-C. Syn, Artificial neural network, predictor variables and sensitivity threshold for DNA methylation-based age prediction using blood samples, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021), 1744, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81556-2>.
- T. Bergsma, E. Rogaeva, DNA methylation clocks and their predictive capacity for aging phenotypes and healthspan, *Neurosci. Insights* 15 (2020), 2633105520942221, <https://doi.org/10.1177/2633105520942221>.
- S.R. Hong, K.-J. Shin, Can we integrate method-specific age-predictive models?: analysis method-induced differences in detected DNA methylation status, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 62 (2023), 102805, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102805>.
- J. Fleckhaus, P.M. Schneider, Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via pyrosequencing, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 44 (2020), 102189, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102189>.
- A. Freire-Aradas, E. Pośpiech, A. Aliferi, L. Girón-Santamaría, A. Mosquera-Miguel, A. Pisarek, et al., A comparison of forensic age prediction models using data from four DNA methylation technologies, *Front. Genet.* 11 (2020), 932, <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00932>.
- A. Wozniak, A. Heidegger, D. Piniewska-Róg, E. Pośpiech, C. Xavier, A. Pisarek, et al., Development of the VISAGE enhanced tool and statistical models for epigenetic age estimation in blood, buccal cells and bones, *Aging* 13 (5) (2021) 6459–6484, <https://doi.org/10.18632/aging.202783>.
- M. Zieger, Forensic DNA phenotyping in Europe: how far may it go? *J. Law Biosci.* 9 (2) (2022) <https://doi.org/10.1093/jlb/lzac024>.

2. Publikationen

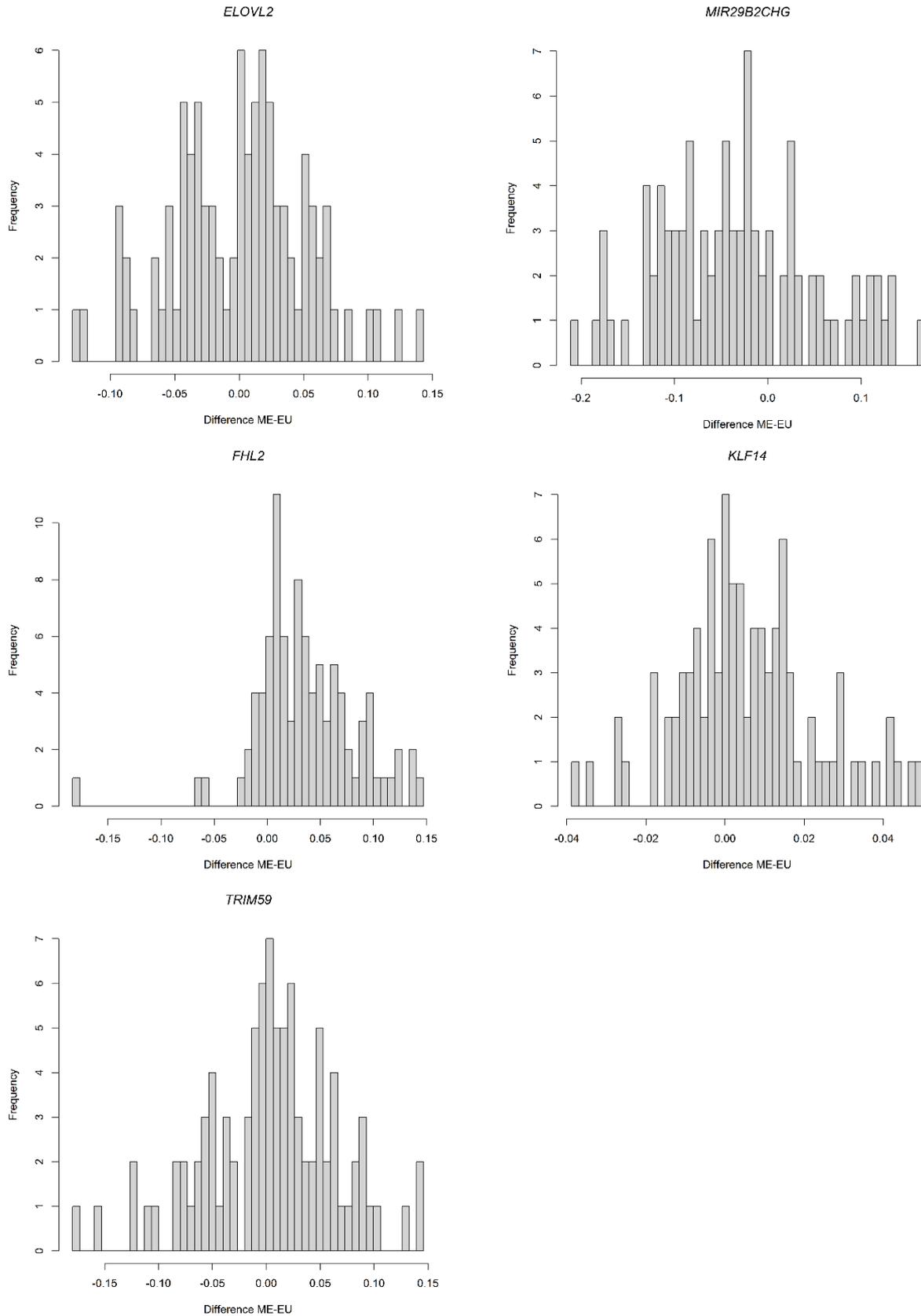
Publikation 2 [Supplementary Figure]



Suppl. Figure S1. Correlation between CpG methylation and age : Measured CpG methylation is plotted against the actual ages of the donors individually for each aCpG and separately for the Middle East (ME) and the Central European (EU) sample set. Coefficients of determination (R^2) from linear regression analysis are displayed as measure for the strength of correlation.

2. Publikationen

Publikation 2 [Supplementary Figure]



Suppl. Figure S2. Histograms of the methylation difference between the sample pairs : Methylation differences were calculated between the sample pairs in the Middle East (ME) and the Central European (EU) sample sets. Differences were plotted as histograms to visually check for normal distribution of the differences

2. Publikationen

Publikation 2 [Supplementary Table]

Suppl. Table S1. List of all R packages used for statistical analysis and plotting:

Package	Citation
readr	Wickham H, Hester J, Bryan J (2023). readr: Read Rectangular Text Data. https://readr.tidyverse.org , https://github.com/tidyverse/readr .
broom	Robinson D, Hayes A, Couch S (2023). broom: Convert Statistical Objects into Tidy Tibbles. https://broom.tidymodels.org/ , https://github.com/tidymodels/broom .
dplyr	Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2023). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. https://dplyr.tidyverse.org , https://github.com/tidyverse/dplyr .
tidyr	Wickham H, Vaughan D, Girlich M (2023). tidyr: Tidy Messy Data. https://tidyr.tidyverse.org , https://github.com/tidyverse/tidyr .
openxlsx	Schauberger P, Walker A (2022). <code>_openxlsx</code> : Read, Write and Edit xlsx Files. R package version 4.2.5.1, < https://CRAN.R-project.org/package=openxlsx >.
base, datasets, graphics, grDevice, methods, stats, utils	R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/ .

3. Weitere Erst- oder Co-Autorschaften

Aufgeführt werden weitere wissenschaftliche Publikationen mit Bezug zu den im Rahmen der Dissertationsschrift besprochenen Haupt-Publikationen des Doktorarbeitsprojekts.

3.1 Erstautorschaften

3.1.1 DNA-Methylierungsanalyse–Neues Verfahren der forensischen Altersschätzung

Schwender, K.*, **Fleckhaus, J.***, Schneider, P.M. Vennemann, M. (2021).

* Autoren haben als Erstautoren zu gleichen Teilen zum Manuskript beigetragen
Rechtsmedizin, 31(3), 183-191.

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Konzeption und Anfertigung des Übersichtsartikels inklusive der Literaturrecherche in gemeinschaftlicher Arbeit mit Dr. Schwender. Das Manuskript wurde durch Prof. Vennemann und Prof. Schneider inhaltlich überprüft und ergänzt.

3.2 Co-Autorschaften

3.2.1 A collaborative exercise on DNA methylation-based age prediction and body fluid typing

Lee, J. E., Lee, J. M., Naue, **J.**, **Fleckhaus, J.**, Freire-Aradas, A., Neubauer, J., ... & Lee, H. Y. (2022)

Forensic Science International: Genetics, 57, 102656.

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Durchführung der Versuche des Ringversuchs gemäß den Instruktionen des ausrichtenden Instituts für Rechtsmedizin an der Seoul National University in Seoul (Korea). Aufbereitung der Ergebnisse und Übermittlung an das ausrichtende Institut. Sprachliche und inhaltliche Korrekturen des Manuskripts sowie inhaltliche Ergänzungen.

3.2.2 Forensische DNA-Methylierungsanalyse; Erster, technischer Ringversuch der Arbeitsgruppe „Molekulare Altersschätzung“ der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin

Holländer, O., Schwender, K., Böhme, P., **Fleckhaus, J.**, Haas, C., Han, Y., Arbeitsgemeinschaft Molekulare Altersschätzung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM)... & Vennemann, M. (2021).

Rechtsmedizin, 31(3), 192-201.

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Durchführung der Versuche des Ringversuchs gemäß den Instruktionen des ausrichtenden Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Münster. Aufbereitung der Ergebnisse und Übermittlung an das ausrichtende Institut. Sprachliche und inhaltliche Korrekturen des Manuskripts sowie inhaltliche Ergänzungen.

3.2.3 Forensische DNA-Methylierungsanalyse; Zweiter, technischer Ringversuch der Arbeitsgruppe „Molekulare Altersschätzung“ der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin

Naue, J., Pfeifer, M., Augustin, C., Becker, J., **Fleckhaus, J.**, ... & Arbeitsgemeinschaft Molekulare Altersschätzung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM). (2021)

Rechtsmedizin, 31(3), 202-216.

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Durchführung der Versuche des Ringversuchs gemäß den Instruktionen des ausrichtenden Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg. Aufbereitung der Ergebnisse und Übermittlung an das ausrichtende Institut. Sprachliche und inhaltliche Korrekturen des Manuskripts sowie inhaltliche Ergänzungen.

3.2.4 Epigenetic age signatures in bones

Lee, H. Y., Hong, S. R., Lee, J. E., Hwang, I. K., Kim, N. Y., Lee, J. M., **Fleckhaus, J.**, ... & Lee, Y. H. (2020)

Forensic Science International: Genetics, 46, 102261.

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Datenanalyse inklusive der Entwicklung eines Analyseskripts zur Auswertung von Microarray Rohdaten sowie der anschließenden Altersschätzung mittels der R bzw. RStudio Software. Sprachliche und inhaltliche Korrekturen des Manuskripts sowie inhaltliche Ergänzungen.

3.2.5 Collaborative Exercise: Analysis of Age Estimation Using a Qiagen Protocol and the Pyromark Q48 Platform

Kampmann, M. L., **Fleckhaus, J.**, Børsting, C., Jurtikova, H., Piters, A., Papin, J., ... & Morling, N. (2023)

Forensic Science Research, Available at SSRN 4065578

Beschreibung des Eigenanteils an der Arbeit

Durchführung der Versuche des Feldtests der FXage-Assays gemäß den Instruktionen der Firma QIAGEN. Sammlung und Auswertung der Ergebnisse aller Feldtestteilnehmer und gemeinsame Auswertung mit der Erstautoring des Manuskripts Dr. Kampmann. Sprachliche und inhaltliche Korrekturen des Manuskripts sowie inhaltliche Ergänzungen.

4. Diskussion

4.1 Etablierung der Multiplex-Strategie für die Pyrosequenzierung (Publikation 1)

Die neu konzipierte Multiplex-Strategie zur Pyrosequenzierung verbindet das Standard-Singleplex-Protokoll der Pyrosequenzierung mit einer Multiplex-Prä-Amplifikation und ermöglicht damit, dass verschiedene DNA-Sequenzen ausgehend von nur einem einzigen DNA-Input analysiert werden können. Das Konzept, den Workflow mit einer Multiplex-Prä-Amplifikation zu ergänzen, anstatt die Singleplex-PCR vollständig mit einer Multiplex-PCR auszutauschen, sollte die Gefahr minimieren, dass mögliche Artefakte der Multiplex-PCR die Sequenzierung stören. Zudem sollte durch die Beibehaltung der Target-spezifischen Singleplex-PCR im Anschluss an die Multiplex-Prä-Amplifikation sichergestellt werden, dass alle Targets in ausreichender Menge amplifiziert werden und somit valide quantitative Methylierungsmessungen erlauben. Ziel der Studie war zunächst die technische Validierung des neu konzipierten Workflows. Dabei sollten möglichst viele Assays parallel untersucht werden, um auch die technischen Grenzen bezogen auf die Anzahl parallel untersuchbarer Assays zu testen. Aus diesem Grund wurden die untersuchten Targets bzw. CpGs nicht in Bezug auf ein konkretes Altersschätzungsmodell zusammengestellt, sondern alle aus vorherigen Projekten verfügbare Assays kombiniert.

Die Primer der Assays wurden dabei in keiner Weise spezifisch angepasst, um z.B. mögliche Dimer-Bildungen zu verhindern, oder die PCR-Eigenschaften der einzelnen Assays, vor allem bezogen auf die Annealing-Temperaturen anzugleichen. Über dieses Set-Up sollte so gleichzeitig getestet werden, inwieweit die Multiplex-Prä-Amplifikation in Form einer Touch-Down-PCR wie geplant zu einer spezifischen Amplifikation aller Targets führt, auch wenn die individuellen Primer unterschiedliche Eigenschaften aufweisen.¹⁵⁰

Es konnte gezeigt werden, dass die Multiplex-Strategie für fast alle Targets eine spezifische Amplifikation erlaubte, was für die Robustheit des Workflows spricht. Allerdings wurde auch für einen Assay (*FHL2*) festgestellt, dass es im Rahmen der Multiplex-Prä-Amplifikation zur Ausbildung eines Dimers der beiden Primer dieses Assays kam. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da dieselben Primer in einer Singleplex-PCR keine Dimere bilden. Grundsätzlich sind unspezifische Primer-Bindungen oder Primer-Dimere jedoch bei der Analyse Bisulfit-konvertierter DNA nicht selten, da die DNA-Sequenz nach der Konvertierung durch den Austausch unmethylierter Cytosine mit Thymin deutlich weniger komplex ist.^{151,152} Das Beispiel des Assays für *FHL2* verdeutlicht diese Gefahr und zeigt, dass veränderte PCR-Bedingungen leicht mit veränderten Bindungsaffinitäten der Primer einhergehen und so zu möglichen PCR-Artefakten führen können. Bei der Validierung der Multiplex-Strategie mit

CpG-Targets eines konkreten Altersschätzungsmodells sollte demnach im Rahmen der Validierung zwingend geprüft werden, ob es bei der Multiplex-Prä-Amplifikation zur Ausbildung von Primer-Dimeren kommt und, sofern nötig, deren Auftreten durch eine Veränderung der PCR-Bedingungen oder eine Anpassung der Sequenzen der betroffenen Primer verhindert werden kann.

Für die spezifisch amplifizierten und sequenzierten Targets konnte gezeigt werden, dass die Multiplex-Strategie reproduzierbare quantitative Methylierungsmessungen erlaubt, deren Streuung sich nicht signifikant von den Messungen mit der etablierten Singleplex-Strategie unterscheidet. Die Präzision der Methylierungsmessung ist ein entscheidendes Kriterium für die epigenetische Altersschätzung, da jede technische Messschwankung einen direkten Einfluss auf die Präzision der Altersschätzung hat. Da Messschwankungen auch durch stochastische Effekte bei der Untersuchung geringer DNA-Mengen hervorgerufen werden, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass im Rahmen der Multiplex-Prä-Amplifikation alle Targets in ausreichender Menge prä-amplifiziert und in die einzelnen Singleplex-Reaktionen überführt wurden.

Eine wichtige Erkenntnis der Studie mit direkter Relevanz für die Anwendung der Multiplex-Strategie für spätere chronologische Altersschätzungen war, dass sich die gemessenen Methylierungswerte mittels der Multiplex-Strategie für einige CpGs signifikant von den Messungen mit der Singleplex-Strategie unterschieden. Eine plausible Erklärung hierfür wäre eine bevorzugte Amplifikation der unmethylierten bzw. der methylierten Sequenzen in der Multiplex-Prä-Amplifikation. Dieses Phänomen der unproportionalen Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA wurde in verschiedenen Studien bereits beschrieben.^{153,154} Grundsätzlich sind systematische Messunterschiede zwischen zwei Analysestrategien nicht problematisch und können durch entsprechende Anpassungen der Schätzmodelle für das chronologische Alter kompensiert werden.¹²⁷ Würden diese Messunterschiede jedoch ignoriert und das chronologische Alter unabhängig von der Messmethode mit demselben Modell geschätzt werden, würde dies in der Konsequenz auch zu systematischen Schätzfehlern führen. Bei der Anwendung der Multiplex-Strategie für die Altersschätzung mit einem Modell, dessen Referenzdaten mit der Singleplex-Strategie gemessen wurden, sollte die Notwendigkeit der Anpassung des Modells demnach zwingend geprüft werden. Alternativ zur Anpassung des Schätzmodells könnte über eine Optimierung der PCR-Bedingungen, z.B. durch Anpassung der Annealing-Temperatur, auch versucht werden, das Auftreten unproportionaler Amplifikationen in der Multiplex-PCR zu verhindern und somit die Messungen beider Strategien anzugleichen.¹⁵⁵

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der technischen Validierungsstudie, dass sich die Methylierungsmessungen mit der Multiplex-Strategie bezüglich der Präzision der Messungen qualitativ nicht von den Messungen mit der Singleplex-Strategie unterscheiden, sofern gewährleistet ist, dass es im Rahmen der Multiplex-Prä-Amplifikation nicht zu unspezifischen Primer-Bindungen kommt. Somit stellt die Pyrosequenzierung mittels der Multiplex-Strategie eine optimale Analysestrategie für die chronologische Altersschätzung aus niedrig konzentrierten Tatortspuren dar.

4.2 Anpassung der Multiplex-Strategie für die Altersschätzung aus Spurenproben

Nach der erfolgreichen technischen Validierung wurde die Multiplex-Strategie für die Analyse der fünf CpGs in den Genen *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* und *TRIM59* zur Altersschätzung aus Blutproben bzw. -spuren entsprechend den im vorherigen Abschnitt aufgeführten Kriterien angepasst und validiert. Die Anpassungen erfolgten vor allem im Rahmen der erfolgreichen Akkreditierung der Methodik nach DIN EN ISO/IEC 17025:2018 im Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln und sind demnach nicht in einer wissenschaftlichen Publikation zusammengefasst. Die erfolgten Anpassungen werden deshalb im folgenden Abschnitt kurz zusammengefasst.

Die verwendeten PCR-Primer für die fünf Assays wurden durch die Firma Qiagen im Rahmen der Entwicklung eines kommerziellen Kits zur Altersschätzung (FX-Age Kit) entwickelt und für die Analyse mit der Pyrosequenzierungsplattform PyroMark Q48 (Qiagen) sowie der entsprechenden Kits der Firma Qiagen optimiert. Im Rahmen einer im Jahr 2019 durch die Firma Qiagen initiierten, internationalen Feldstudie zum Test dieser Assays, erwiesen sich die Analysen mit diesen Assays als sehr robust und präzise (vergleiche 3.2.5).¹⁵⁶

Ein weiteres Entscheidungskriterium für die Wahl der FX-Age Primer war, dass diese sehr ähnliche PCR-Eigenschaften aufweisen. Dadurch war zum einen davon auszugehen, dass alle Targets auch in der gemeinsamen Multiplex-Prä-Amplifikation gleichmäßig amplifiziert werden. Zum anderen ergab sich der Vorteil, dass alle Assays bei der Singleplex-Extension-PCR unter denselben PCR-Bedingungen amplifiziert werden können. Im Rahmen der laborinternen Validierungsstudie zur Akkreditierung der epigenetischen Altersschätzung nach DIN EN ISO/IEC 17025:2018 in der Rechtsmedizin Köln wurde die Multiplex-Strategie mit den FX-Age Assays unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus der technischen Vorstudie (Publikation 1) validiert. Die Singleplex-Extension-PCR wurde dabei, wie im experimentellen Protokoll der FX-Age Feldstudie vorgegeben, in Form einer Touch-Up PCR durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Singleplex-Extension-PCRs mittels der TapeStation Plattform (Fa. Agilent) zeigten dabei für alle Assays mit Ausnahme von *ELOVL2*

eine spezifische Amplifikation. Für *ELOVL2* zeigte sich ein unspezifisches PCR-Produkt und zudem eine im Verhältnis zu allen anderen Assays geringere Amplifikation der Target-Sequenz.

Über eine Steigerung der Zyklenzahl der Multiplex-Prä-Amplifikation von acht auf vierzehn Zyklen -bezogen auf die Zyklen bei gleicher Temperatur am Ende der *Touch-down* PCR- sowie dem Zusatz einer „Q-Solution“ bei der PCR, konnte die Amplifikation des unspezifischen PCR-Produkts weitgehend verhindert und die Amplifikationseffizienz der *ELOVL2*-Sequenz gesteigert werden. Die „Q-Solution“ ist im Lieferumfang der PyroMark-PCR-Kits (Qiagen) enthalten und unterstützt die Amplifikation GC-reicher Sequenzen bzw. von Sequenzen, die für die Amplifikation hinderliche Sekundärstrukturen ausbilden.¹⁵⁷ Mit den genannten Anpassungen erbrachte die Multiplex-Strategie spezifische und reproduzierbare Methylierungsmessungen für alle fünf Targets. Laborinterne Validierungsmessungen zeigten zudem, dass die Messungen zwischen der Singleplex- und Multiplex-Strategie, anders als in der technischen Validierungsstudie, nicht zu systematischen Messunterschieden führten, sodass beide Strategien analog und ohne Anpassungen der Altersschätzungsmodelle in der Routinearbeit der Rechtsmedizin Köln etabliert wurden.

4.3 Einfluss der Herkunft auf die epigenetische Altersschätzung (Publikation 2)

Untersuchungen der altersabhängigen Methylierungsänderung erfordern, dass Probenkollektive mit einer gleichmäßigen Altersverteilung und einer möglichst großen Altersspanne analysiert werden, damit das chronologische Alter als kontinuierliche Variable bzw. die mathematische Funktion zwischen dem chronologischen Alter und der DNA-Methylierung valide modelliert werden kann.⁶⁵ Für den Vergleich der altersabhängigen Methylierungsänderung zweier Probenkollektive sollte sich die Altersverteilung innerhalb dieser nicht oder nicht maßgeblich voneinander unterscheiden, um einen Stichprobenfehler zu vermeiden. Im Rahmen der Studie ist es uns gelungen, Probenkollektive aus Zentraleuropa (EU) und dem Mittleren Osten (ME) zusammenzustellen und zu vergleichen, die in einem Altersbereich von 18 - 68 Jahren jeweils genau eine männliche und eine weibliche Person pro Lebensjahr enthielten. Das Alter innerhalb der Probenkollektive war somit nicht nur gleichmäßig verteilt, sondern auch die Geschlechts- und Altersverteilung zwischen den Probenkollektiven identisch. Durch diesen Versuchsaufbau wurde sichergestellt, dass weder die Alters- noch die Geschlechtsverteilung zusätzliche Variablen bei dem Vergleich der altersabhängigen Methylierung zwischen den beiden Populationen darstellen. Zudem war es möglich für beide Probenkollektive individuelle Altersschätzungsmodelle zu trainieren, um damit die Schätzunterschiede zu quantifizieren, die durch mögliche populationsspezifische Unterschiede der altersabhängigen CpG-Methylierung entstehen.

Populationsspezifische Unterschiede der altersabhängigen CpG-Methylierung können sich entweder über eine unterschiedlich starke Korrelation zwischen CpG-Methylierung und dem chronologischen Alter und/oder durch systematische Unterschiede bezogen auf die altersabhängige Methylierungsänderung zeigen. Während erstere zu einer unterschiedlich starken Streuung der Schätzwerte und somit einer unterschiedlich hohen Präzision der Altersschätzung führen, führen letztere zu systematischen Schätzunterschieden, die jedoch durch die Entwicklung populationsspezifischer Modelle kompensiert werden könnten.

Über lineare Regressionsanalysen auf Ebene der einzelnen CpGs wurde zunächst untersucht, ob und inwieweit sich die Korrelation zwischen dem Alter und den einzelnen CpGs zwischen den Populationen unterscheidet. Dabei zeigten vier der fünf untersuchten CpGs in der EU-Population einen stärkeren linearen Zusammenhang zwischen der CpG-Methylierung und dem Alter als in der ME-Population. Diese Unterschiede gaben somit bereits einen Hinweis darauf, dass das chronologische Alter in der EU-Population etwas präziser geschätzt werden kann als in der ME-Population. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass indirekte Zusammenhänge bzw. Korrelationen der einzelnen Variablen (CpGs) untereinander dazu führen können, dass die unterschiedlich starken Korrelationen auf Ebene der einzelnen CpGs bei der Modellierung der Altersschätzungsmodelle mittels multipler linearer Regression zu einem gewissen Maße kompensiert werden können.¹⁵⁸ Inwieweit eine ähnliche Kompensation auch bei der Modellierung der populationsspezifischen Altersschätzungsmodelle in dieser Studie von Bedeutung war ist schwer zu bemessen, jedoch zeigte sich wie erwartet, dass das EU-Modell, bezogen auf den mittleren absoluten Schätzfehler (MAD), etwas präzisere Schätzungen zuließ als das ME-Modell (vgl. Table 4 Publikation 2). Die Schätzgenauigkeiten beider Modelle lagen allerdings mit MADs von 2,72 Jahren für das EU-Modell und 3,34 Jahren für das ME-Modell höher als in der Originalstudie von Zbieć-Piekarska et al. (MAD = 3,91 Jahre), welche erstmals und ebenfalls auf Basis von Pyrosequenzierungsanalysen ein Altersschätzungsmodell für Blutproben mittels der fünf CpGs beschrieben.¹⁰⁹ Die Unterschiede zwischen den Populationen, bezogen auf die Korrelation zwischen CpG-Methylierung und dem Alter, ist demnach vor allem auf eine vergleichsweise hohe Korrelation im EU-Probenkollektiv zurückzuführen.

Während die populationsspezifischen Modelle für ihre jeweilige Referenzpopulation präzise Altersschätzungen erlaubten, zeigten sich bei der Schätzung der Proben des jeweils anderen Kollektivs (ME mit dem EU-Modell und umgekehrt) deutlich größere Schätzfehler (MAD = 5,46 und 5,11 Jahre). Die Berechnung des mittleren Schätzfehlers (MD) offenbarte, dass sich diese hohen absoluten Schätzfehler jeweils durch einen systematischen Fehler erklären lassen.

Dabei wurde das Alter in der ME-Population jeweils höher geschätzt (vgl. auch Fig.1 Publikation 2). Insgesamt betrug der populationsspezifische Schätzunterschied mehr als vier Jahre (4,1 Jahre mit dem EU- und 4,86 Jahre mit dem ME-Modell).

Über einen statistischen Mittelwertvergleich (t-Test) konnte gezeigt werden, dass die systematischen Schätzunterschiede zwischen den Populationen vor allem auf signifikante populationsspezifische Methylierungsunterschiede der drei CpGs in den Genen *FHL2*, *MIR29B2CHG* und *KLF14* zurückzuführen sind.

Die systematischen Schätzunterschiede zwischen den Populationen zeigten sich auch bei der Schätzung mit einem populationsunspezifischen Modell, welches auf Basis der Trainings-Sets beider Populationen erstellt wurde. Dabei wurde das Alter der ME-Probanden im Mittel um 1,63 Jahre überschätzt und das der EU-Probanden um 2,04 Jahre unterschätzt. Daraus ergibt sich in der Summe ein systematischer Schätzunterschied von 3,67 Jahren, der im Vergleich zu den populationsspezifischen Modellen, die einen systematischen Schätzunterschied von jeweils über 4 Jahren zwischen den Populationen zeigten, etwas niedriger liegt. Daraus folgt, dass über die Modellierung der gemeinsamen altersabhängigen Methylierungsänderung mittels multipler linearer Regression der tatsächliche populationsspezifische Unterschied der altersabhängigen Methylierung zwischen den Populationen zu einem gewissen Maße kompensiert werden kann.

4.3.1 Mögliche Ursachen der populationsspezifischen Methylierungsunterschiede

Im Rahmen der Studie wurden Probanden verglichen, deren Geburts- und dauerhafter Wohnort in der Provinz Al-Muthanna im Südosten des Iraks (ME-Kollektiv) und in Deutschland (EU-Kollektiv) lag. Mögliche Einflussfaktoren, die zu den ermittelten populationsspezifischen Methylierungsunterschieden beigetragen haben können, sind demnach zum einen in populationsgenetischen Unterschieden und zum anderen in regionalspezifischen Umweltfaktoren und Lebensstilen zu suchen. In Bezug auf Umweltfaktoren unterscheiden sich die Regionen vor allem im Klima, welches sich im Irak vor allem in deutlich höheren Temperaturen darstellt, die in den Sommermonaten Juli und August im Durchschnitt bei über 45°C liegen und im Winter bei durchschnittlich 16°C.¹⁵⁹ Ein möglicher Einfluss der Umgebungstemperatur auf die altersabhängige CpG-Methylierung ist allerdings bisher nicht bekannt. Anders verhält es sich für den Lebensstilfaktor Alkoholkonsum, für den in verschiedenen Studien bereits ein signifikanter Einfluss auf die DNA-Methylierung festgestellt wurde.¹¹⁰ Da die irakische Bevölkerung hauptsächlich islamisch ist und demnach kulturell bedingt keinen Alkohol trinkt, während Alkohol in Zentraleuropa sehr regelmäßig konsumiert wird ist es wahrscheinlich, dass sich die im Rahmen dieser Studie untersuchten Populationen in Bezug auf diese Variable tatsächlich systematisch unterscheiden. Demnach könnte der

Lebensstilfaktor „Alkoholkonsum“ tatsächlich zu einem gewissen Maße zu den in dieser Studie aufgefundenen, populationsspezifischen Methylierungsunterschieden beigetragen haben.

Grundsätzlich ist es sehr schwierig, den Einfluss einzelner Lebensstilfaktoren auf die CpG-Methylierung exakt zu quantifizieren. Dies liegt zum einen daran, dass verschiedene Lebensstile, wie zum Beispiel Alkoholkonsum, in verschiedenen Intensitäten ausgeführt werden können und demnach einen unterschiedlich starken Einfluss auf die CpG-Methylierung haben können. Gleichzeitig ist es sehr schwer, objektiv zu beurteilen bzw. zu bemessen, wie stark eine Person einen Lebensstil ausgeführt hat. Zum anderen wäre für die Untersuchung des isolierten Einflusses eines Lebensstils erforderlich, Probenkollektive zu untersuchen, die sich ausschließlich in diesem unterscheiden, da durch die komplexe epigenetische Regulation der CpG-Methylierung andernfalls nicht sichergestellt werden könnte, dass weitere Faktoren zu den möglichen Methylierungsunterschieden beigetragen haben.

In Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten CpGs ist jedoch nicht davon auszugehen, dass gängige Lebensstilfaktoren, wie Alkoholkonsum, einen großen Einfluss auf die altersabhängige Methylierung haben, da diese CpGs bereits in vielen verschiedenen Studien mit heterogenen Probenkollektiven untersucht wurden und durchgängig eine hohe Korrelation mit dem chronologischen Alter zeigten. Anders verhält es sich mit möglichen Methylierungsunterschieden, die durch populationsgenetische Unterschiede verursacht werden, da die publizierten Studien in der Regel auf Referenzkollektiven aus geografisch begrenzten Regionen basieren, sodass populationsgenetische Unterschiede durch diese nicht abgebildet werden. Aus den genannten Gründen ist es deutlich wahrscheinlicher, dass genetische Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen maßgeblich zu den in dieser Studie festgestellten, populationsspezifischen Methylierungsunterschieden beigetragen haben. Diese Hypothese wird durch viele bereits publizierte Studien aus anderen Fachbereichen unterstützt, die zeigen, dass sich die DNA-Methylierung zwischen Populationen stark unterscheidet und dass diese Unterschiede zu einem hohen Maße auf genetische Polymorphismen zurückzuführen sind.^{160,161} Husquin et al. zeigten, dass ca. 70 % der populationsspezifisch-methylierten CpGs mit DNA-Sequenzvarianten in der Nähe der CpGs assoziiert sind.¹⁶² Ein sehr ähnliches Ergebnis erlangten Heyn et al., welche die DNA-Methylierung in kaukasischen Amerikanern, Afroamerikanern und Han Chinesen verglichen und herausfanden, dass zwei Drittel der populationsspezifisch methylierten CpGs mit DNA-Sequenzvarianten assoziiert sind.¹⁶³

5. Zusammenfassende Beantwortung der Forschungsfragen

Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel zweier exemplarisch gewählter Populationen aus Zentraleuropa (EU) und dem Mittleren Osten (ME) den möglichen Einfluss der Herkunft auf die epigenetische Altersschätzung zu untersuchen und, sofern nötig, populationsspezifische Altersschätzungsmodelle zu trainieren. Dazu sollte zunächst ein Workflow etabliert werden, der auch in der forensischen Fallarbeit zur Anwendung kommen kann.

Im Rahmen der ersten Studie (Publikation 1) dieser Arbeit wurde über die Neukonzeption der Multiplex-Strategie zur quantitativen Methylierungsmessung mittels der Pyrosequenzierung eine neue Analysestrategie etabliert und validiert, die im Vergleich zur bisher verwendeten Singleplex-Strategie eine parallele Untersuchung verschiedener DNA-Targets in einem gemeinsamen Arbeitsablauf erlaubt. Dies löst die bisher bestehende Problematik, dass bei der Pyrosequenzierungsanalyse zur epigenetischen Altersschätzung mit Modellen, die auf mehreren CpGs beruhen, ein multipler DNA-Einsatz notwendig ist, wodurch die Sensitivität der Gesamtanalyse sinkt. Mit der Multiplex-Strategie ist nun möglich, die Pyrosequenzierung auch zur epigenetischen Altersschätzung aus Spurenproben mit nur geringen DNA-Mengen anzuwenden.

Im Rahmen der zweiten Studie (Publikation 2) wurde die zentrale Forschungsfrage dieser Arbeit nach dem möglichen Einfluss der Herkunft auf die epigenetische Altersschätzung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Herkunft einer Person einen relevanten Einfluss auf die epigenetische Altersschätzung haben kann. Sofern sich der Einfluss, wie am Beispiel der exemplarisch untersuchten ME- und EU-Population gezeigt wurde, vor allem in systematischen Methylierungsunterschieden widerspiegelt, können und sollten Schätzmodelle spezifisch für verschiedene Population angepasst werden, um so eine präzise Altersschätzung von Personen mit unterschiedlicher Herkunft sicherzustellen. Werden diese populationsspezifischen Modelle allerdings für die Altersschätzung einer abweichenden Population angewandt (z.B. ME-Probe mit dem EU-Modell oder umgekehrt), führt dies im Vergleich zu Schätzungen mit populationsunspezifischen Modellen in der Konsequenz zu einem deutlich höheren Schätzfehler. Daraus ergibt sich für die Anwendung in der Fallarbeit, dass populationsspezifische Modelle nur dann angewandt werden sollten, wenn die Herkunft einer Person sicher vorhergesagt werden kann, während bei unbekannter Herkunft eher populationsunspezifische Modelle, also solche, die auf Referenzdaten verschiedener Populationen beruhen, verwendet werden sollten. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass viele bereits in der forensischen Fallarbeit angewandten Schätzmodelle, ohne dass dies bei der Entwicklung intendiert war, populationsspezifische Modelle darstellen, weil die Referenzproben zur Modellierung in der entsprechenden Region gesammelt wurden. Für eine

Altersschätzung ohne Berücksichtigung der Herkunft sollten diese Modelle deshalb mit weiteren, bezogen auf die Herkunft heterogenen Referenzproben erweitert werden.

6. Ausblick

Da die Altersschätzung mit populationsspezifischen Modellen unter der Voraussetzung der korrekten Modellwahl die höchsten Schätzgenauigkeiten hervorbringen, sollte die Herkunft einer Person zukünftig, sofern möglich, bei der Schätzung berücksichtigt werden. Dies wäre im forensischen Kontext vor allem im Rahmen der Altersdiagnostik bekannter Personen zum Beispiel unbegleiteter minderjähriger Flüchtlinge leicht umsetzbar, da hier die Herkunft der zu untersuchenden Person über offizielle Dokumente, eine Befragung oder auch phänotypische Merkmale mit einer recht hohen Sicherheit festgestellt werden kann. Im Kontext der Analyse von Tatortspuren unbekannter Spurenleger stellt sich die Feststellung der Herkunft deutlich schwieriger dar, da i.d.R. wenig über den Spurenleger bekannt ist. Möglicherweise könnte durch Erkenntnisse der polizeilichen Ermittlung oder Zeugenaussagen die mögliche Herkunft zumindest grob eingegrenzt werden. Allerdings wäre an dieser Stelle im Einzelfall abzuwägen, ob die Indizien zur Herkunft des Spurenlegers ausreichend belastbar sind, um die Anwendung eines populationsspezifischen Altersschätzungsmodells zu rechtfertigen.

Eine alternative Möglichkeit, für eine populationsspezifische Altersschätzung verwertbare Informationen zur Herkunft eines unbekanntem Spurenlegers zu erlangen, besteht in der Untersuchung der biogeografischen Herkunft (BGA) über eine DNA-Analyse (Vergleiche Kapitel 1.2.3). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die BGA-Analyse einen entsprechenden Wahrscheinlichkeitswert liefert, mit der eine Person genetisch einer Population zugeordnet werden kann. Auf dieser Basis kann entschieden werden, ob die Anwendung eines populationsspezifischen Modells sinnvoll ist oder zur Vermeidung großer Schätzfehler besser ein unspezifisches Modell verwendet werden sollte. Die Kombination der BGA-Analyse mit der Altersschätzung stellt somit eine vielversprechende Strategie dar, die jedoch in zukünftigen Studien zunächst validiert werden muss.

Im Rahmen dieser Validierung muss auch der mögliche Einfluss regionaler Lebensstil- und Umweltfaktoren auf die zur Altersschätzung verwendeten CpGs näher beleuchtet werden. Die Notwendigkeit ergibt sich daraus, dass sich Lebensstil- und Umweltfaktoren durch einen Wechsel des Aufenthaltsortes einer zu untersuchenden Person verändern können. Demnach würde, sofern festgestellt würde, dass diese regionalen Lebensstil- und Umweltfaktoren einen Einfluss auf die Altersschätzungen haben, das Alter von im Ausland lebenden Personen, die über ihre BGA dem entsprechenden populationsspezifischen Modell zugeordnet werden, weniger präzise geschätzt. In Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten populationsspezifischen Altersschätzungsmodelle wurde in Kapitel 4.3.1 diskutiert, dass es

deutlich wahrscheinlicher ist, dass die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Unterschiede der altersabhängigen CpG-Methylierung zwischen Personen aus dem Mittleren Osten und Zentraleuropa maßgeblich auf populationsgenetische Unterschiede zurückzuführen sind. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass auch Einflüsse durch Lebensstil- oder Umweltfaktoren in begrenztem Maße zu diesen beigetragen haben. Zur Überprüfung der potenziellen Einflüsse dieser Faktoren auf die entwickelten, populationspezifischen Modelle, könnten diese in einer Folgestudie an Probanden mit ME- bzw. EU-BGA getestet werden, die sich jedoch in der jeweils anderen geografischen Region aufhalten. Dabei sollten im besten Fall solche Probanden herangezogen werden, die schon möglichst lange in der von ihrer genetischen Herkunft abweichenden Region leben. Würde auch bei diesen Probanden das der BGA entsprechende, populationspezifische Altersschätzungsmodell eine präzisere Altersschätzung erlauben als zum Beispiel das populationsunspezifische Modell, wäre damit gezeigt, dass die Modellzuordnung über die BGA grundsätzlich sinnvoll ist.

Anschließend müssen Strategien zur Verknüpfung der BGA-Analyse und der epigenetischen Altersschätzung entwickelt werden. Dabei wird es vor allem von entscheidender Bedeutung sein, dass die Ergebnisse der BGA-Analyse korrekt beurteilt werden, um eine falsche Modellzuordnung zu vermeiden. Dazu müssen klare Richtlinien definiert werden, ab denen eine BGA-Analyse ausreichend verlässlich ist, um eine Probe einem populationspezifischen Modell sicher zuordnen zu können. Diese Notwendigkeit zeigten auch Katsara et al., die im Kontext der Phänotypisierungsanalyse ebenfalls die Möglichkeit untersuchten, die BGA als Co-Faktor zu berücksichtigen, da verschiedene phänotypische Merkmale, wie zum Beispiel blaue Augen, blonde Haare oder eine dunkle Hautfarbe bekanntermaßen in verschiedenen Populationen mit unterschiedlichen Häufigkeiten auftreten.^{164,165}

Katsara et al. konnten zeigen, dass die a-priori Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten bestimmter phänotypischer Merkmale in Abhängigkeit der vorhergesagten BGA angepasst werden können und somit die Schätzgenauigkeit der Merkmale gesteigert werden kann.¹⁶⁶ Allerdings ergab die Studie auch, dass diese Strategie nur bei sehr sicheren BGA-Vorhersagen angewandt werden sollte, da die Veränderung der a-priori Wahrscheinlichkeit auf Basis einer falschen BGA-Vorhersage im Umkehrschluss die Vorhersage des Phänotyps auch verschlechtern kann.

Bei der Untersuchung unbekannter Spurenleger ist die mögliche BGA, soweit keine weiteren Indizien aus der polizeilichen Ermittlung vorliegen, nicht eingegrenzt. Deshalb müssen für die BGA-Analyse zunächst globale AIM-SNP-Panels eingesetzt werden. Auf dieser Ebene ist über die derzeit verfügbaren und forensisch validierten Panels jedoch nur eine Differenzierung der kontinentalen Herkunft mit ausreichender Sicherheit möglich. Allerdings wäre eine Überlegung, in einem zweiten Schritt auf Basis der kontinentalen Herkunftsvorhersage ein

geringer skaliertes AIM-SNP-Panel für die entsprechend vorhergesagte Region zu untersuchen. Ein solches, zweiseitiges Verfahren sollte jedoch nur dann angewandt werden, wenn die kontinentale Herkunftsanalyse ein eindeutiges Ergebnis hervorbringt.

Für die BGA-Vorhersage wäre vor allem die Principal component analysis (PCA-Analyse) sowie die Anwendung der STRUCTURE Software geeignet, da diese nicht nur die wahrscheinlichste BGA vorhersagen, sondern auch sehr differenziert mögliche Beimischungen anderer Populationen erkennen lassen.^{167–169} Anhand der Mischungsanteile, auch wenn diese ggf. niedrig sind, können erfahrene Gutachter Muster erkennen, die auf eine bestimmte geografische Region hindeuten, und auf Basis dieser Erkenntnis eine erneute Untersuchung mit einem regionalen AIM-SNP-Panel anschließen, mit dem eine bessere Differenzierung der Populationen dieser Region möglich ist. Die im Rahmen dieser Studie untersuchte Population des Mittleren Ostens ist ein gutes Beispiel, bei dem dieses Prinzip gewinnbringend angewandt werden könnte. Durch die geografische Lage des Mittleren Ostens, welcher von den kontinentalen Regionen Süd- und Zentral-Asien, Europa und Afrika umschlossen ist, hat sich der Genpool, vor allem durch verschiedene Migrationereignisse in der Geschichte, stark mit den Genpools der umliegenden Populationen vermischt¹⁶⁵. Folglich repräsentiert der Mittlere Osten genetisch eine Mischung der drei umliegenden Populationen, die sich auch so bei der kontinentalen BGA-Analyse zeigt.¹⁷⁰ Über dieses charakteristische Muster kann eine Abstammung aus dieser „Übergangsregion“ abgeleitet werden, sodass in einem zweiten Schritt über ein regionales AIM-SNP-Panel die Herkunft differenzierter untersucht werden kann. Als Panel könnte das durch das EUROFORGEN-Konsortium entwickelte „NAME“-Panel verwendet werden, welches allerdings nur die Populationen Nordafrika, Mittlerer Osten und Europa und nicht Süd- und Zentral-Asien abdeckt.¹⁷¹ Truelsen et al. konnten jedoch zeigen, dass eine Ergänzung mit SNPs aus dem Precision ID Ancestry Panel (ThermoFischer) sowie entsprechender Referenzpopulationen eine Differenzierung auch zur Süd- und Zentral-Asiatischen Population zulässt.^{172,173} Eine weitere Lösung bietet das Visage Enhanced Tool welches, im Vergleich zum VISAGE Basic Tool, ebenfalls die AIM-SNPs des EUROFORGEN „NAME“-Panels inkludiert.^{52,174} Der Vorteil des Visage Enhanced Tools ist, dass die AIM-SNPs für die Differenzierung des Mittleren Ostens und die der kontinentalen Populationen nicht nur parallel untersucht werden, sondern auch die BGA-Analyse mit allen Populationen als Referenz gemeinsam erfolgt. Somit erübrigt sich eine zweite regionale BGA-Analyse für die Übergangsregion des Mittleren Ostens.

Auch wenn es durch die genannten Tools nun grundsätzlich möglich ist, eine BGA aus dem Mittleren Osten festzustellen, ist eine sichere Zuordnung, im Vergleich zur Zuordnung zu den kontinentalen Regionen, nur für einen geringen Anteil der Personen mit tatsächlicher Herkunft aus dem Mittleren Osten möglich. Der Grund dafür ist die bereits angesprochene geringe genetische Divergenz der Population des Mittleren Ostens, sodass sich viele Personen

genetisch nicht ausreichend von Personen der umliegenden Populationen unterscheiden, um eine sichere Zuordnung zu ermöglichen.⁵²

Es ist somit im Kontext der epigenetischen Altersschätzung fraglich, wie häufig Spurenproben eine eindeutige BGA aus dem Mittleren Osten aufweisen, sodass die Anwendung des im Rahmen dieser Studie entwickelten populationsspezifischen Altersschätzungsmodells für den Mittleren Osten möglich ist. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die BGA-Analyse keine wichtigen Informationen für die Altersschätzung enthält, da das Ergebnis, selbst wenn die Herkunft einer Person aus dem Mittleren Osten nicht eindeutig bestimmt werden kann, zeigt, dass diese keiner der kontinentalen Populationen sicher zuordenbar ist und somit bei der Altersschätzung besser auf ein populationsunspezifisches Modell zurückgegriffen werden sollte. Trotzdem wäre im Hinblick auf die Anwendbarkeit populationsspezifischer Altersschätzungsmodelle zu prüfen, ob diese nicht besser nur auf die fünf großen kontinentalen Regionen begrenzt werden sollten, die mit hoher Präzision über die BGA-Analyse vorhergesagt werden können. Da Zentraleuropa eine dieser kontinentalen Regionen darstellt, würde in der forensischen Fallarbeit in Deutschland eine BGA-Analyse die Altersschätzungen mit den hiesigen Modellen bereits jetzt in vielen Fällen absichern. Dabei kann das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und sehr präzise Altersschätzungsmodell für Zentraleuropa eingesetzt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass die Berücksichtigung der BGA als Co-Faktor bei der epigenetischen Altersschätzung eine vielversprechende Strategie darstellt, um vor allem im Kontext der forensischen Spurenanalyse eine präzise Altersschätzung auch bei nicht europäischen Spurenlegern sicherzustellen. Vor der konkreten Anwendung populationsspezifischer Altersschätzungsmodelle in der forensischen Fallarbeit muss jedoch noch in Folgestudien geprüft werden, ob und in welcher Form die BGA-Analyse geeignet ist, um eine Probe einem entsprechenden populationsspezifischen Altersschätzungsmodell zuordnen zu können. Für ein besseres Verständnis sollten dazu in der Zukunft auch weitere Probenkollektive aus anderen geografischen Regionen hinzugezogen werden, um möglichst viele verschiedene weltweite Populationen abbilden zu können. Da eine BGA-Vorhersage mit hoher Verlässlichkeit vor allem auf kontinentaler Ebene möglich ist, wäre es ggf. sinnvoll, populationsspezifische Altersschätzungsmodelle für diese Populationen zu trainieren. Grundsätzlich sind die methodischen Grenzen der BGA-Analyse zu berücksichtigen, da eine falsche Herkunftsvorhersage und die damit verbundene Anwendung eines nicht für die Untersuchungsprobe repräsentativen Altersschätzungsmodells zu großen Schätzfehlern führen können. Aus diesem Grund sollten über Validierungsstudien konservative Grenzwerte für die Herkunftsvorhersage festgelegt werden, ab denen eine populationsspezifische Altersschätzung angemessen ist.

Bis zur tatsächlichen Anwendung populationspezifischer Altersschätzungsmodelle unter Berücksichtigung der BGA als Co-Faktor müssen somit noch einige praktische Fragen geklärt und Strategien entwickelt werden. Dazu zählt auch die in Deutschland bestehende Schwierigkeit, dass die Vorhersage der BGA im Kontext der Strafverfolgung nicht im entsprechenden Paragraf 81e der Strafprozessordnung als legitime Untersuchungsmethode aufgeführt und somit gesetzlich verboten ist. Es wäre demnach zu prüfen, ob eine indirekte Berücksichtigung der BGA über die Verwendung der für die BGA-Analyse untersuchten SNPs als Co-Variablen der Altersschätzung ebenfalls unter dieses Verbot fällt. Da allerdings auch die konkrete BGA-Information einen wichtigen Hinweiswert für die polizeiliche Ermittlung darstellt, wäre es auch im Interesse der ermittelnden Behörden sinnvoll, die andauernde gesellschaftliche Debatte zur ethischen Rechtmäßigkeit der BGA-Analyse konstruktiv weiterzuführen. Dabei sollte bei aller Kritik an der Methodik, bei der es konkret um die Gefahr der Diskriminierung nicht beteiligter Personen bzw. Bevölkerungsgruppen geht, auch die tatsächliche Opfersituation berücksichtigt werden, da bei Verzicht der Maßnahmen ein ggf. entscheidender Hinweis zur Ermittlung des Täters verwehrt wird.⁸

Kurzfassung der Dissertationsschrift in englischer Sprache

Epigenetic age estimation in forensic casework taking biogeographic ancestry into account.

By Fleckhaus, Jan from the Institute of Legal Medicine at the Faculty of Medicine and University Hospital Cologne

This work investigated the potential impact of a person's ancestry on epigenetic age estimations by DNA methylation analysis. Comparing a Middle East and a Central European population. The aim was to provide results that could be used as a reference for future age estimation in forensic case work.

Therefore, in the first part of this study, a multiplex strategy for quantitative methylation analysis via pyrosequencing was established and validated as an optimized experimental workflow for trace samples. In comparison to the established singleplex strategy, the new multiplex strategy enables the joint analysis of several CpG targets, which makes age estimations with several targets more sensitive overall.

For the age estimations in the comparative population study, we targeted five CpGs associated with the genes of *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* and *TRIM59*. By training and testing population specific models, accurate age estimations were achieved for both population groups. Estimations between the population specific models, however, differed significantly by approximately 4 years due to systematic differences in the age-dependent methylation of the CpGs in *MIR29B2CHG*, *FHL2* and *KLF14*. The application of population specific models thus represents an opportunity to increase the accuracy of epigenetic age estimations. At the same time, incorrect assignment of samples to population specific models would lead to very large estimation errors. For this reason, such models should only be used if the ancestry of a person is known with sufficient certainty. Otherwise, to avoid large estimation errors, population unspecific models based on the combined data sets of different populations should be used. The combined model trained in the present study estimated the ages for both populations with mean absolute errors of 3.81 and 3.31 years, respectively, and thus, with still moderate accuracy.

The results of this work clearly show that in order to estimate the chronological age as accurately as possible and to avoid large estimation errors, strategies should be developed to include ancestry as a co-factor for epigenetic age estimations.

Kurzfassung der Dissertationsschrift in deutscher Sprache

Epigenetische Altersschätzung in der forensischen Fallarbeit unter Berücksichtigung der biogeografischen Herkunft

Von Fleckhaus, Jan aus dem Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

In dieser Arbeit wurde der mögliche Einfluss der Herkunft einer Person auf die epigenetische Altersschätzungen über DNA-Methylierungsmarker untersucht. Dazu wurden zwei Probenkollektive aus dem Mittleren Osten und Zentraleuropa verglichen. Ziel war es, dass die Ergebnisse dieser Studie als Referenz für zukünftige Altersschätzungen in der forensischen Fallarbeit verwendet werden können. Deshalb wurde im ersten Teil dieser Arbeit eine Multiplex-Strategie zur quantitativen Methylierungsanalyse mittels der Pyrosequenzierung etabliert und validiert, die einen optimierten experimentellen Arbeitsablauf für die Untersuchung von Spurenproben darstellt. Im Vergleich zur etablierten Singleplex-Strategie ermöglicht die neue Multiplex-Strategie die gemeinsame Analyse mehrerer CpG-Targets, wodurch Altersschätzungen mit mehreren Targets insgesamt mit einer deutlich höheren Sensitivität durchgeführt werden können.

Für die Altersschätzungen der vergleichenden Populationsstudie wurden fünf CpGs untersucht, die mit den Genen *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *KLF14* und *TRIM59* assoziiert sind. Es wurden populationsspezifische Modelle trainiert und getestet, die für beide Populationen präzise Altersschätzungen erlauben. Die Schätzungen unterschieden sich jedoch zwischen den Modellen aufgrund signifikanter Unterschiede der altersabhängigen Methylierung der CpGs in *MIR29B2CHG*, *FHL2* und *KLF14* systematisch um etwa 4 Jahre voneinander. Folglich stellt die Anwendung populationsspezifischer Modelle eine Möglichkeit dar, die Genauigkeit epigenetischer Altersschätzungen zu erhöhen. Gleichzeitig führt eine nicht korrekte Zuordnung von Proben zu populationsspezifischen Modellen zu großen Schätzfehlern. Diese spezifischen Modelle sollten somit nur dann verwendet werden, wenn die Herkunft einer Person mit hinreichender Sicherheit bekannt ist. Andernfalls sollten zur Vermeidung großer Schätzfehler populationsunspezifische Modelle verwendet werden, die auf den kombinierten Referenzdaten verschiedener Populationen basieren. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit trainierten populationsunspezifischen Modell konnte das Alter für beide untersuchten Populationen mit moderaten mittleren absoluten Fehlern von 3,81 bzw. 3,31 Jahren geschätzt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zur möglichst genauen Schätzung des chronologischen Alters bzw. zur Vermeidung großer Schätzfehler, Strategien entwickelt werden sollten, um die Herkunft als Co-Faktor für die epigenetische Altersschätzungen miteinzubeziehen.

Referenzen

1. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67-73.
2. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76-79.
3. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263-273.
4. Kayser M. (2015) Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet*, 18:33-48.
5. Heinemann T, Lemke T, Prainsack B. (2012) Risky profiles: societal dimensions of forensic uses of DNA profiling technologies. *New Genetics and Society*, 31(3), 249-258.
6. Lipphardt V. (2018) Vertane Chancen? Die aktuelle politische Debatte um Erweiterte DNA-Analysen in Ermittlungsverfahren. *Ber Wiss*, 41(3):279-301.
7. Samuel G, Prainsack B. (2019) Forensic DNA phenotyping in Europe: views "on the ground" from those who have a professional stake in the technology. *New Genetics and Society*, 38(2), 119-141.
8. Sturma D. (2019) Einleitung: Forensische DNA-Phänotypisierung. *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik*, 24(1), 115-118.
9. M'charek A. (2008) Silent witness, articulate collective: DNA evidence and the inference of visible traits. *Bioethics*, 22(9), 519-528.
10. Samuel G. & Prainsack B. (2019) Report on Challenges To The Implementation of FDP in an Ethical And Societally Responsible Manner, With Special Emphasis On Privacy And Data Protection. Visible Attributes Through Genomics (VISAGE).
11. Zieger M. (2022) Forensic DNA phenotyping in Europe: How far may it go? *J Law Biosci*, 9(2).
12. Granja R, Machado H. (2020) Forensic DNA phenotyping and its politics of legitimation and contestation: Views of forensic geneticists in Europe. *Soc Stud Sci*, 306312720945033.
13. SR 363 - Bundesgesetz vom 20. Juni 2003 (Stand am 1. September 2023) über die Verwendung von DNA-Profilen im Strafverfahren und zur Identifizierung von unbekanntem oder vermissten Personen (DNA-Profil-Gesetz). Online: <https://www.fedlex.admin.ch/eli/cc/2004/811/de>. [zugegriffen am: 31.10.2023].
14. Hanley JA. (1989). Receiver operating characteristic (ROC) methodology: the state of the art. *Crit Rev Diagn Imaging*, 29(3), 307-335.
15. Hajian-Tilaki K. (2013) Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med*, 4(2), 627-635.

16. Chaitanya L, Breslin K, Zuñiga S, et al. (2018) The HirisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci Int Genet*, 35,123-135.
17. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. (2011) IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci Int Genet*, 5(3), 170-180.
18. Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, et al. (2009) Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol*, 19(5), R192-3.
19. Walsh S, Lindenbergh A, Zuniga SB, et al. (2011) Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Sci Int Genet*, 5(5), 464-471.
20. Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, et al. (2014) Developmental validation of the HirisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci Int Genet*, 9, 150-161.
21. Walsh S, Wollstein A, Liu F, et al. (2012) DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Sci Int Genet*, 6(3), 330-340.
22. Walsh S, Liu F, Wollstein A, et al. (2013) The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet*, 7(1), 98-115.
23. Walsh S, Chaitanya L, Breslin K, et al. (2017) Global skin colour prediction from DNA. *Hum Genet*, 136(7), 847-863.
24. Breslin K, Wills B, Ralf A, et al. (2019) HirisPlex-S system for eye, hair, and skin color prediction from DNA: Massively parallel sequencing solutions for two common forensically used platforms. *Forensic Sci Int Genet*, 43, 102152.
25. Jäger AC, Alvarez ML, Davis CP, et al. (2017) Developmental validation of the MiSeq FGx Forensic Genomics System for Targeted Next Generation Sequencing in Forensic DNA Casework and Database Laboratories. *Forensic Sci Int Genet*, 28, 52-70.
26. Diepenbroek M, Bayer B, Schwender K, et al. (2020) Evaluation of the Ion AmpliSeq™ PhenoTrivium Panel: MPS-Based Assay for Ancestry and Phenotype Predictions Challenged by Casework Samples. *Genes*, 11(12),1398.
27. Xavier C, La Puente M de, Mosquera-Miguel A, et al. (2022) Development and inter-laboratory evaluation of the VISAGE Enhanced Tool for Appearance and Ancestry inference from DNA. *Forensic Sci Int Genet*, 61, 102779.
28. Heidegger A, Pisarek A, La Puente M de, et al. (2022) Development and inter-laboratory validation of the VISAGE enhanced tool for age estimation from semen using quantitative DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet*, 56, 102596.
29. Schneider PM, Cheung EYY, Laurent FX, Hollard C, Bouakaze C, Mosquera-Miguel A, Lareu MV, Carracedo A, de la Puente M, Freire A, Phillips C (2021) Report on Three International Expert Symposia Disseminating the Results of the VISAGE Project (www.visage-h2020.eu)
30. Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, et al. (2002) Genetic structure of human populations. *Science*, 298(5602), 2381-2385.

31. Lewontin RC. (1972) The Apportionment of Human Diversity. In: *Evolutionary Biology*: Springer, New York, NY, 381-398.
32. Jobling M, Hurles M, Tyler-Smith C. (2013) Human Evolutionary Genetics: Origins, Peoples & Disease. *Garland Science*
33. David Serre, Svante Pääbo. (2004) Evidence for Gradients of Human Genetic Diversity Within and Among Continents. *Genome Res*, 14(9), 1679-1685.
34. Li JZ, Absher DM, Tang H, et al. (2008) Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science*, 319(5866), 1100-1104.
35. Phillips C. (2015) Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. *Forensic Sci Int Genet*, 18, 49-65.
36. Carlberg C, Klotz L-O, Molnár F. (2022) Das menschliche Genom und seine Variationen. In: *Nutrigenomik*: Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 27-43.
37. Pickrell JK, Reich D. (2014) Toward a new history and geography of human genes informed by ancient DNA. *Trends Genet*, 30(9), 377-389.
38. Henn BM, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. (2012) The great human expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(44), 17758-17764.
39. Harpending H, Rogers A. (2000) Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 361-385.
40. Prugnolle F, Manica A, Balloux F. (2005) Geography predicts neutral genetic diversity of human populations. *Curr Biol*, 15(5), R159-60.
41. Deshpande O, Batzoglou S, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. (2009) A serial founder effect model for human settlement out of Africa. *Proc Biol Sci*, 276(1655), 291-300.
42. Wang S, Lewis Jr CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, ... & Ruiz-Linares A. (2007). Genetic variation and population structure in Native Americans. *PLoS genetics*, 3(11), e185
43. Kitada S, Nakamichi R, Kishino H. (2021) Understanding population structure in an evolutionary context: population-specific FST and pairwise FST. *G3 (Bethesda)*, 11(11).
44. Nevo E. (2001) Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11), 6233-6240.
45. Gravel S, Zakharia F, Moreno-Estrada A, et al. (2013) Reconstructing Native American migrations from whole-genome and whole-exome data. *PLoS Genet*, 9(12), e1004023.
46. McEvoy BP, Lind JM, Wang ET, et al. (2010) Whole-genome genetic diversity in a sample of Australians with deep Aboriginal ancestry. *Am J Hum Genet*, 87(2), 297-305.
47. Cann HM, Toma C de, Cazes L, et al. (2002) A human genome diversity cell line panel. *Science*, 296(5566), 261-262.
48. Phillips C, Salas A, Sánchez JJ, et al. (2007) Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int Genet*, 1(3-4), 273-280.

49. Kersbergen P, van Duijn K, Kloosterman AD, Dunnen JT den, Kayser M, De Knijff P. (2009) Developing a set of ancestry-sensitive DNA markers reflecting continental origins of humans. *BMC Genet*, 10(1),69.
50. Phillips C, Parson W, Lundsberg B, et al. (2014) Building a forensic ancestry panel from the ground up: The EUROFORGEN Global AIM-SNP set. *Forensic Sci Int Genet*, 11, 13-25.
51. Soundararajan U, Yun L, Shi M, Kidd KK. (2016) Minimal SNP overlap among multiple panels of ancestry informative markers argues for more international collaboration. *Forensic Sci Int Genet*, 23, 25-32.
52. Ruiz-Ramírez J, La Puente M de, Xavier C, et al. (2023) Development and evaluations of the ancestry informative markers of the VISAGE Enhanced Tool for Appearance and Ancestry. *Forensic Sci Int Genet*, 64,102853.
53. Mallick S, Li H, Lipson M, et al. (2016) The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature*, 538(7624), 201-206.
54. Pagani L, Lawson DJ, Jagoda E, et al. (2016) Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature*, 538(7624), 238-242.
55. Almarri MA, Haber M, Lootah RA, et al. (2021) The genomic history of the Middle East. *Cell*, 184(18), 4612-4625.e14.
56. Rösing FW, Graw M, Marré B, et al. (2005) Empfehlungen für die forensische Geschlechts- und Altersdiagnose am Skelett. *Anthropologischer Anzeiger*,63(2), 221-232.
57. Schmeling A, Grundmann C, Fuhrmann A, Kaatsch HJ, Knell B, Ramsthaler F, ... & Geserick G. (2008). Aktualisierte Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für Forensische Altersdiagnostik für Altersschätzungen bei Lebenden im Strafverfahren. *Rechtsmedizin*, 18(6), 451-453.
58. Ritz-Timme S, Kaatsch H-J, Marré B, et al. (2002) Empfehlungen für die Altersdiagnostik bei Lebenden im Rentenverfahren. *Anthropologischer Anzeiger*, 60(4), 389-392.
59. Lockemann U, Fuhrmann A, Püschel K, Schmeling A, & Geserick G. (2004). Arbeitsgemeinschaft für Forensische Altersdiagnostik der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin: Empfehlungen für die Altersdiagnostik bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen außerhalb des Strafverfahrens. *Rechtsmedizin*, 14, 123-126.
60. Schmeling A, Dettmeyer R, Rudolf E, Vieth V, Geserick G. (2016) Forensic Age Estimation. *Dtsch Arztebl Int*, 113(4), 44-50.
61. United Nations Children’s Fund. (2019) Birth registration for every child by 2030: Are we on track? Online <https://www.unicef.org/media/62981/file/Birth-registration-for-every-child-by-2030.pdf> [zugegriffen am: 31.10.2023]
62. Statistisches Bundesamt (2022). Statistiken der Kinder- und Jugendhilfe: Vorläufige Schutzmaßnahmen. Online: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Soziales/Kinderschutz/Publicationen/Downloads-Kinderschutz/vorlaeufige-schutzmassnahmen-52252032_17_004.pdf?_blob=publicationFile [zugegriffen am: 31.10.2023].
63. Hagen M, Schmidt S, Schulz R, et al. (2020) Forensic age assessment of living adolescents and young adults at the Institute of Legal Medicine, Münster, from 2009 to 2018. *Int J Legal Med*, 134(2), 745-751.

64. Bundesministerium der Justiz .Verordnung zum Schutz vor Schäden durch Röntgenstrahlen (Röntgenverordnung – RöV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 30.04.2003. Justiz Bd 2003 BGBl I
65. Refn MR, Kampmann M-L, 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 Sciences Research*
66. Noroozi R, Ghafouri-Fard S, Pisarek A, et al. (2021) DNA methylation-based age clocks: From age prediction to age reversion. *Ageing Res Rev*, 68, 101314.
67. Parson W. (2018) Age Estimation with DNA: From Forensic DNA Fingerprinting to Forensic (Epi)Genomics: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(4), 326-332.
68. Kayser M, Branicki W, Parson W, Phillips C. Recent advances in Forensic DNA Phenotyping of appearance, ancestry and age. *Forensic Sci Int Genet*. 2023, 65,102870.
69. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, et al. (2011) Epigenetic predictor of age. *PLoS One*, 6(6), e14821.
70. 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.
71. Naue J. (2023) Getting the chronological age out of DNA: using insights of age-dependent DNA methylation for forensic DNA applications. *Genes Genomics*, 1-23.
72. Klose RJ, Bird AP. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, 31(2), 89-97.
73. Wilson GG, Murray NE. (1991) Restriction and Modification Systems. *Annu. Rev. Genet*, 25(1), 585-627.
74. Rottach A, Leonhardt H, Spada F. (2009) DNA methylation-mediated epigenetic control. *J Cell Biochem*, 108(1), 43-51.
75. Lyko F. (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*, 19(2), 81-92.
76. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, 71(5), 865-873.
77. Chen Z, Riggs AD. (2011) DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*, 286(21), 18347-18353.
78. Lim DHK, Maher ER. (2010) DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 12(1), 37-42.
79. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.
80. Li E, Zhang Y. (2014) DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(5), a019133.
81. Wu X, Zhang Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*, 18(9), 517-534.

82. Orlanski S, Labi V, Reizel Y, et al. (2016) Tissue-specific DNA demethylation is required for proper B-cell differentiation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(18), 5018-5023.
83. Jaenisch R, Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 Suppl(3), 245-254.
84. Jones PA. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13(7), 484-492.
85. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, 10(8), 2709-2721.
86. Waddington C. H. (1942) The epigenotype. *Endeavour*, 1, 18-20.
87. Tronick E, Hunter RG. (2016) Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Front Behav Neurosci*, 10,107.
88. Quina AS, Buschbeck M, Di Croce L. (2006) Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol*, 72(11), 1563-1569
89. Wong AHC, Gottesman II, Petronis A. (2005) Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1(suppl_1), R11-8.
90. Szyf M. (2011) DNA methylation, the early-life social environment and behavioral disorders. *J Neurodev Disord*, 3(3), 238-249.
91. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, et al. (2011) DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol*, 12(1), R10.
92. Wagner JR, Busche S, Ge B, Kwan T, Pastinen T, Blanchette M. (2014) The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts. *Genome Biol*, 15(2), R37.
93. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. (2015) DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*, 14(6), 924-932.
94. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(30), 10604-10609.
95. Fraga MF, Esteller M. (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*, 23(8), 413-418.
96. Field AE, Robertson NA, Wang T, Havas A, Ideker T, Adams PD. (2018) DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Mol Cell*, 71(6), 882-895.
97. McEwen LM, Jones MJ, Lin DTS, et al. (2018) Systematic evaluation of DNA methylation age estimation with common preprocessing methods and the Infinium MethylationEPIC BeadChip array. *Clin Epigenetics*, 10(1), 123.
98. 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.

99. Smeers I, Decorte R, van de Voorde W, Bekaert B. (2018) Evaluation of three statistical prediction models for forensic age prediction based on DNA methylation. *Forensic Sci Int Genet*, 34, 128-133.
100. Lee HY, Lee SD, Shin K-J. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Rep.* 2016;49(7):359-369. doi:10.5483/BMBRep.2016.49.7.070.
101. 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.
102. Horvath S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14(10), R115.
103. Sukawutthiya P, Sathirapatya T, Vongpaisarnsin K. (2021) A minimal number CpGs of ELOVL2 gene for a chronological age estimation using pyrosequencing. *Forensic Sci Int*, 318, 110631.
104. Simpson DJ, Chandra T. (2021) Epigenetic age prediction. *Aging Cell*, 20(9), e13452.
105. 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.
106. Paparazzo E, Lagani V, Geracitano S, et al. (2023) An ELOVL2-Based Epigenetic Clock for Forensic Age Prediction: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, 24(3), 2254.
107. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, et al. (2012) Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell*, 11(6), 1132-1134.
108. Heidegger A, Xavier C, Niederstätter H, et al. (2020) Development and optimization of the VISAGE basic prototype tool for forensic age estimation. *Forensic Sci Int Genet*, 48, 102322.
109. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, et al. (2015) Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet*, 17, 173-179.
110. Koop BE, Reckert A, Becker J, Han Y, Wagner W, Ritz-Timme S. (2020) Epigenetic clocks may come out of rhythm-implications for the estimation of chronological age in forensic casework. *Int J Legal Med*, 134(6), 2215-2228.
111. Spólnicka M, Pośpiech E, Adamczyk JG, et al. (2018) Modified aging of elite athletes revealed by analysis of epigenetic age markers. *Aging (Albany NY)*, 10(2), 241-252.
112. Spólnicka M, Zbieć-Piekarska R, Karp M, et al. (2018) DNA methylation signature in blood does not predict calendar age in patients with chronic lymphocytic leukemia but may alert to the presence of disease. *Forensic Sci Int Genet*, 34, e15-e17.
113. Gross AM, Jaeger PA, Kreisberg JF, et al. (2016) Methylome-wide Analysis of Chronic HIV Infection Reveals Five-Year Increase in Biological Age and Epigenetic Targeting of HLA. *Mol Cell*, 62(2), 157-168.
114. Fiorito G, McCrory C, Robinson O, et al. (2019) Socioeconomic position, lifestyle habits and biomarkers of epigenetic aging: a multi-cohort analysis. *Aging (Albany NY)*, 11(7), 2045-2070.

115. Bell CG, Lowe R, Adams PD, et al. (2019) DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biol*, 20(1), 249.
116. Naue J, Hoefsloot HCJ, Kloosterman AD, Verschure PJ. (2018) Forensic DNA methylation profiling from minimal traces: How low can we go? *Forensic Sci Int Genet*, 33, 17-23.
117. Schwender K, Fleckhaus J, Schneider PM, Vennemann M. (2021) DNA-Methylierungsanalyse – Neues Verfahren der forensischen Altersschätzung. *Rechtsmedizin*, 31(3), 183-191.
118. Kurdyukov S, Bullock M. (2016) DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)*, 5(1).
119. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5), 1827-1831.
120. Darst RP, Pardo CE, Ai L, Brown KD, Kladde MP. (2010) Bisulfite sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 7(1), Unit 7.9.1-17.
121. Munson K, Clark J, Lamparska-Kupsik K, Smith SS. (2007) Recovery of bisulfite-converted genomic sequences in the methylation-sensitive QPCR. *Nucleic Acids Res*, 35(9), 2893-2903.
122. Kint S, Spiegelare W de, Kesel J de, Vandekerckhove L, van Criekinge W. (2018) Evaluation of bisulfite kits for DNA methylation profiling in terms of DNA fragmentation and DNA recovery using digital PCR. *PLoS One*, 13(6), e0199091.
123. New England Biolabs (2019). Enzymatic Methyl-seq: the next generation of methylome analysis. Online https://www.neb.sg/-/media/nebus/files/feature-articles/fa_nebexpressions_issue1_2019_nebnext.pdf?rev=df00016be2ba4e63b29d55f025712dd8&hash=dda5ce871292a0eddd01b74f118af622. [zugegriffen am: 31.10. 2023].
124. Hamano Y, Manabe S, Morimoto C, Fujimoto S, Tamaki K. (2017) Forensic age prediction for saliva samples using methylation-sensitive high resolution melting: exploratory application for cigarette butts. *Sci Rep*, 7(1), 10444.
125. Hamano Y, Manabe S, Morimoto C, Fujimoto S, Ozeki M, Tamaki K. (2016) Forensic age prediction for dead or living samples by use of methylation-sensitive high resolution melting. *Leg Med (Tokyo)*, 21, 5-10.
126. Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, et al. (2016) Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Sci Int Genet*, 24,65-74.
127. Freire-Aradas A, Pośpiech E, Aliferi A, et al. (2020) A Comparison of Forensic Age Prediction Models Using Data From Four DNA Methylation Technologies. *Front Genet*, 11, 932.
128. Samsø Mathiasen S, Bińkowski J, Kjeldsen T, Wojdacz TK, Hansen LL. (2022) Methylation levels assessment with Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM). *PLoS One*, 17(9), e0273058.
129. Uhlen M, Quake SR. (2023) Sequential sequencing by synthesis and the next-generation sequencing revolution. *Trends Biotechnol*, 0(0).

130. Woźniak A, Heidegger A, Piniewska-Róg D, et al. (2021) Development of the VISAGE enhanced tool and statistical models for epigenetic age estimation in blood, buccal cells and bones. *Aging (Albany NY)*, 13(5), 6459-6484.
131. Gross TE, Fleckhaus J, Schneider PM. (2021) Progress in the implementation of massively parallel sequencing for forensic genetics: results of a European-wide survey among professional users. *Int J Legal Med*, 135(4), 1425-1432.
132. Ghemrawi M, Tejero NF, Duncan G, McCord B. (2023) Pyrosequencing: Current forensic methodology and future applications-a review. *Electrophoresis*, 44(1-2), 298-312.
133. CD Genomics Blog (2018). Principle and Workflow of Illumina Next-generation Sequencing. Online: <https://www.cd-genomics.com/blog/principle-and-workflow-of-illumina-next-generation-sequencing/> [zugegriffen am: 31.10.2023].
134. Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281(5375), 363, 365.
135. Langaee T, Ronaghi M. (2005) Genetic variation analyses by Pyrosequencing. *Mutat Res*, 573(1-2), 96-102.
136. Holländer O, Schwender K, Böhme P, et al. (2021) Forensische DNA-Methylierungsanalyse. *Rechtsmedizin*, 31(3), 192-201.
137. Bumgarner R. (2013) Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 22(1), Unit 22.1.
138. Kling T, Carén H. (2019) Methylation Analysis Using Microarrays: Analysis and Interpretation. *Methods Mol Biol*, 1908, 205-217.
139. Kayser M, De Knijff P. (2011) Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet*, 12(3), 179-192.
140. Illumina Website, Infinium MethylationEPIC v2.0 Kit | Methylation profiling array for EWAS. Online: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-methylation-epic.html>. [zugegriffen am: 31.10.2023].
141. Butler, J. M. (2011). *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Academic press.
142. Dash HR, Shrivastava P, Das S. (2020) Analysis of Capillary Electrophoresis Results by GeneMapper® ID-X v 1.5 Software. In: *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing*: Humana, New York, NY, 213-237.
143. 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 (Albany NY)*, 8(5), 1034-1048.
144. Thiede C, Prange-Krex G, Freiberg-Richter J, Bornhäuser M, Ehninger G. (2000) Buccal swabs but not mouthwash samples can be used to obtain pretransplant DNA fingerprints from recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*, 25(5), 575-577.
145. Li L, Song F, Lang M, et al. (2020) Methylation-Based Age Prediction Using Pyrosequencing Platform from Seminal Stains in Han Chinese Males. *J Forensic Sci*, 65(2), 610-619.

146. Thong Z, Tan JYY, Loo ES, Phua YW, Chan XLS, Syn CK-C. (2021) Artificial neural network, predictor variables and sensitivity threshold for DNA methylation-based age prediction using blood samples. *Sci Rep*, 11(1), 1744.
147. 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.
148. Naue J, Pfeifer M, Augustin C, et al. (2021) Forensische DNA-Methylierungsanalyse. *Rechtsmedizin*, 31(3), 202-216.
149. Becker J, Böhme P, Reckert A, et al. (2022) Evidence for differences in DNA methylation between Germans and Japanese. *Int J Legal Med*, 136(2), 405-413.
150. Korbie DJ, Mattick JS. (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*, 3(9), 1452-1456.
151. Lu J, Johnston A, Berichon P, Ru K-L, Korbie D, Trau M. (2017) PrimerSuite: A High-Throughput Web-Based Primer Design Program for Multiplex Bisulfite PCR. *Sci Rep*, 7(1), 41328.
152. Lobo J, Gillis AJM, Looijenga LHJ. (2021) Targeted Methylation Analyses: From Bisulfite Treatment to Quantification. *Methods Mol Biol*, 2195, 167-180.
153. Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. (2008) A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Res Notes*, 1(1), 54.
154. Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. (1997) Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res*, 25(21), 4422-4426.
155. Shen L, Guo Y, Chen X, Ahmed S, Issa J-PJ. (2007) Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *Biotechniques* 42(1), 48, 50, 52 passim.
156. Kampmann M-L, Fleckhaus J, Børsting C, et al. (2022) Collaborative Exercise: Analysis of Age Estimation Using a Qiagen Protocol and the Pyromark Q48 Platform. *SSRN Journal*.
157. Strien J, Sanft J, Mall G. (2013) Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol*, 54(3), 1048-1054.
158. Holtmann D. (1984) Interpretation der Effekte in der multivariaten Modellbildung. *Zeitschrift für Soziologie*, 13(1), 60-71.
159. Al-Ansari N. (2021) Topography and Climate of Iraq. *Journal of Earth Sciences and Geotechnical Engineering*, 11(2), 1-13.
160. Kader F, Ghai M. (2017) DNA methylation-based variation between human populations. *Mol Genet Genomics*, 292(1), 5-35.
161. Fraser HB, Lam LL, Neumann SM, Kobor MS. (2012) Population-specificity of human DNA methylation. *Genome Biol*, 13(2), R8.
162. Husquin LT, Rotival M, Fagny M, et al. (2018) Exploring the genetic basis of human population differences in DNA methylation and their causal impact on immune gene regulation. *Genome Biol*, 19(1), 1-17.

163. Heyn H, Moran S, Hernando-Herraez I, et al. (2013) DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res*, 23(9), 1363-1372.
164. Schneider PM, Prainsack B, Kayser M. (2019) The Use of Forensic DNA Phenotyping in Predicting Appearance and Biogeographic Ancestry. *Dtsch Arztebl Int*, 51-52(51-52), 873-880.
165. Luis JR, Rowold DJ, Regueiro M, et al. (2004) The Levant versus the Horn of Africa: evidence for bidirectional corridors of human migrations. *Am J Hum Genet*, 74(3), 532-544.
166. Katsara M-A, Branicki W, Pośpiech E, et al. (2021) Testing the impact of trait prevalence priors in Bayesian-based genetic prediction modeling of human appearance traits. *Forensic Sci Int Genet*, 50, 102412.
167. Zhang D, Dey R, Lee S. (2020) Fast and robust ancestry prediction using principal component analysis. *Bioinformatics*, 36(11), 3439-3446.
168. Pritchard Lab, Stanford University Website, Structure Software for Population Genetics Inference. Online: <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>. [zugegriffen am: 31.10.2023]
169. Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour*, 9(5), 1322-1332.
170. Phillips C, Freire Aradas A, Kriegel AK, et al. (2013) Eurasiaplex: a forensic SNP assay for differentiating European and South Asian ancestries. *Forensic Sci Int Genet*, 7(3), 359-366.
171. Pereira V, Freire-Aradas A, Ballard D, et al. (2019) Development and validation of the EUROFORGEN NAME (North African and Middle Eastern) ancestry panel. *Forensic Sci Int Genet*, 42, 260-267.
172. Truelsen D, Tvedebrink T, Mogensen HS, et al. (2021) Assessment of the effectiveness of the EUROFORGEN NAME and Precision ID Ancestry panel markers for ancestry investigations. *Sci Rep*, 11(1), 18595.
173. Pereira V, Mogensen HS, Børsting C, Morling N. (2017) Evaluation of the Precision ID Ancestry Panel for crime case work: A SNP typing assay developed for typing of 165 ancestral informative markers. *Forensic Sci Int Genet*, 28, 138-145.
174. Xavier C, La Puente M de, Mosquera-Miguel A, et al. (2020) Development and validation of the VISAGE AmpliSeq basic tool to predict appearance and ancestry from DNA. *Forensic Sci Int Genet*, 48, 102336.

Übersicht der Publikationen:

Hauptpublikationen:

1. Fleckhaus, J., & Schneider, P. M. (2020). Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via Pyrosequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 44, 102189.
2. Fleckhaus, J., Bugert, P., Al-Rashedi, N. A. M., & Rothschild, M. A. (2023). Investigation of the impact of biogeographic ancestry on DNA methylation based age predictions comparing a Middle East and a Central European population. *Forensic Science International: Genetics*, 67, 102923.

Weitere Erst- oder Co-Autorschaften:

1. Schwender, K., Fleckhaus, J., Schneider, P. M., & Vennemann, M. (2021). DNA-Methylierungsanalyse–Neues Verfahren der forensischen Altersschätzung. *Rechtsmedizin*, 31(3), 183-191.
2. Lee, J. E., Lee, J. M., Naue, J., Fleckhaus, J., Freire-Aradas, A., Neubauer, J., ... & Lee, H. Y. (2022). A collaborative exercise on DNA methylation-based age prediction and body fluid typing. *Forensic Science International: Genetics*, 57, 102656.
3. Holländer, O., Schwender, K., Böhme, P., Fleckhaus, J., Haas, C., Han, Y., ... & Vennemann, M. (2021). Forensische DNA-Methylierungsanalyse. *Rechtsmedizin*, 31(3), 192-201.
4. Naue, J., Pfeifer, M., Augustin, C., Becker, J., Fleckhaus, J., Grabmüller, M., ... & Böhme, P. (2021). Forensische DNA-Methylierungsanalyse. *Rechtsmedizin*, 31(3), 202-216.
5. Lee, H. Y., Hong, S. R., Lee, J. E., Hwang, I. K., Kim, N. Y., Lee, J. M., ... & Lee, Y. H. (2020). Epigenetic age signatures in bones. *Forensic Science International: Genetics*, 46, 102261.
6. Kampmann, M. L., Fleckhaus, J., Børsting, C., Jurtikova, H., Piters, A., Papin, J., ... & Morling, N. Collaborative Exercise: Analysis of Age Estimation Using a Qiagen Protocol and the Pyromark Q48 Platform. Available at SSRN 4065578.

Erklärungen

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht ohne Genehmigung der Dekanin / dem Dekan vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Ordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. M. Schneider und Frau Prof. Dr. M. Vennemann betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Promotionsausschuss unverzüglich mitzuteilen.“

17.01.2024

Datum

.....

Unterschrift