

Rechtsmedizin 2021 · 31:192–201
<https://doi.org/10.1007/s00194-021-00492-7>
 Angenommen: 30. März 2021
 Online publiziert: 7. Mai 2021
 © Der/die Autor(en) 2021



Olivia Holländer¹ · Kristina Schwender^{1,2} · Petra Böhme³ · Jan Fleckhaus⁴ · Cordula Haas⁵ · Yang Han⁶ · Frank Heidorn⁷ · Rachel Klein-Unseld⁸ · Julia Lichtenwald⁹ · Jana Naue¹⁰ · Jacqueline Neubauer⁵ · Micaela Poetsch¹¹ · Peter M. Schneider⁴ · Wolfgang Wagner⁶ · Marielle Vennemann¹ · Arbeitsgemeinschaft Molekulare Altersschätzung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM)

¹ Institut für Rechtsmedizin, Universität Münster, Münster, Deutschland

² Institut für Rechtsmedizin, Universität München, München, Deutschland

³ Institut für Rechtsmedizin, Uniklinik Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland

⁴ Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Fakultät, Universität Köln, Köln, Deutschland

⁵ Institut für Rechtsmedizin, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

⁶ Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, Stammzellbiologie und Cellular Engineering, Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Aachen, Deutschland

⁷ Institut für Rechtsmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland

⁸ Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Ulm, Ulm, Deutschland

⁹ Institut für Rechtsmedizin, Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland

¹⁰ Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, Deutschland

¹¹ Institut für Rechtsmedizin, Universitätsmedizin Essen, Essen, Deutschland

Forensische DNA-Methylierungsanalyse

Erster, technischer Ringversuch der Arbeitsgruppe „Molekulare Altersschätzung“ der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin

Einleitung

Die molekulare Altersschätzung bildet einen Teil der sog. forensischen DNA-Phänotypisierung, die darüber hinaus auch die Vorhersage äußerlich sichtbarer Merkmale wie Haut-, Haar und Augenfarbe sowie die biogeografische Herkunft einer Person umfasst [1]. Die Analyse dieser Eigenschaften kann dabei helfen, die Gruppe potenzieller Verursacher einer DNA-Tatortspur einzugrenzen. Besonders in Fällen, in denen eine DNA-Spur von sehr guter Qualität und ausreichender Quantität vorliegt, jedoch die Analyse klassischer

DNA-Merkmalssysteme („short tandem repeats“, STR) zu keinem Treffer in einer nationalen Datenbank führt, kann die weitere Charakterisierung eines unbekanntem Spurenverursachers wichtige Ermittlungshinweise liefern.

Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Techniken ist es möglich, die Haar-, Augen- und Hautfarbe sowie die biogeografische Herkunft eines unbekanntem Spurenverursachers mit molekularen Methoden mit hinreichender Genauigkeit zu schätzen. Die Vorhersage der Pigmentierung und Herkunft erfolgt auf der Grundlage von Sequenzveränderungen („single nucleotide polymorphisms“, SNP) in der DNA selbst [2]. Die Analyse der DNA-Methylierung stellt derzeit die vielversprechendste molekulare Methode zur Schätzung des Alters eines unbekanntem Spurenverursachers dar. Im Dezember 2019 wurde die DNA-Phänotypisierung mit einer Änderung der Straf-

prozessordnung in Deutschland teilweise legalisiert [2]. Dadurch ist nun bundesweit die Untersuchung genetischer Marker möglich, die eine Vorhersage von Haar-, Augen- und Hautfarbe sowie des Alters, nicht aber der biogeografischen Herkunft eines unbekanntem Spurenverursachers erlaubt. In der Schweiz ist eine Gesetzesrevision bezüglich der Untersuchung der Haar-, Augen- und Hautfarbe, der biogeografischen Herkunft sowie des Alters eines unbekanntem Spurenverursachers im Gang, die politische Diskussion dauert allerdings noch an [3].

Als weitere Möglichkeit zur praktischen Anwendung wird aktuell auch die Altersschätzung lebender Personen diskutiert, bei denen als Beschuldigte ohne valide Identitätsdokumente in einem Strafverfahren geprüft werden muss, ob diese Verfahren nach dem Jugend- oder dem Erwachsenenstrafrecht durchzuführen sind [4]. Weitere

Die Mitglieder der Arbeitsgemeinschaft Molekulare Altersschätzung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) werden am Beitragsende gelistet.

Die Autorinnen O. Holländer und K. Schwender haben zu gleichen Teilen zum Manuskript beigetragen.

Tab. 1 Übersicht der verwendeten Reagenzien, Kits und Geräte für die einzelnen Probenbearbeitungsschritte und Anzahl der teilnehmenden Labore, die die jeweilige Chemie einsetzen

Schritt der Probenbearbeitung	Verwendete Reagenzien/Kits/ Geräte	Hersteller	Anzahl der Labore
DNA-Extraktion	DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16	Promega, Walldorf, D	6
	EZ1® DNA Investigator® Kit	Qiagen, Hilden, D	2
	QIAamp® DNA Mini/Micro/ Investigator® Kit	Qiagen, Hilden, D	4
Quantifizierung	PowerQuant® System	Promega, Walldorf, D	5
	Investigator® Quantiplex	Qiagen, Hilden, D	1
	Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit	Thermo Fisher Scientific (TFS), Dreieich, D	1
	Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit	TFS, Dreieich, D	2
	Nanodrop	TFS, Dreieich, D	1
	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	TFS, Dreieich, D	1
	QuantiFluor® ONE dsDNA System (Quantus Fluorometer)	Promega, Walldorf, D	2
Bisulfitkonvertierung	EpiTect® Fast Bisulfite Conversion Kit	Qiagen, Hilden, D	7
	MethylEdge™ Bisulfite Conversion System	Promega, Walldorf, D	2
	EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research, Freiburg, D	2
	EZ DNA Methylation™ Kit	Zymo Research, Freiburg, D	1
Amplifikation	PyroMark® PCR Kit	Qiagen, Hilden, D	9
	HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D	1
	HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, D	1
	AmpliTaq Gold® Kit	TFS, Dreieich, D	1
Minisequenzierung	SNAshot™ Multiplex Kit	TFS, Dreieich, D	9
Pyrosequenzierung	PyroMark® Q48 Autoprep	Qiagen, Hilden, D	2
	PyroMark® Q24 bzw. Q24 Advanced	Qiagen, Hilden, D	2
	PyroMark® Q96 ID, MD bzw. Gold	Qiagen, Hilden, D	3
Fragmentlängenanalyse	310 Genetic Analyzer	TFS, Dreieich, D	1
	3130/3130xL Genetic Analyzer	TFS, Dreieich, D	7
	3500 Genetic Analyzer	TFS, Dreieich, D	1

D Deutschland, TFS Thermo Fisher Scientific

Anwendungsfelder beziehen sich auf die Altersschätzung fraglich minderjähriger geflüchteter Personen, um einen möglichen Anspruch auf besonderen Schutz zu klären, sowie auf die Altersschätzung in Identitätsfragen, z. B. bei unbekanntem Verstorbenen [5].

Die DNA-Methylierung ist eine chemische Modifikation der DNA, die die DNA-Sequenz selbst nicht verändert. Es wird eine Methylgruppe an die Base Cytosin gebunden, wodurch die „fünfte Base“ Methylcytosin entsteht. Im humanen Genom tritt diese Modifikation nahezu

ausschließlich an Cytosinen in Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Nukleotidabfolgen auf [6]. Die DNA-Methylierung spielt eine essenzielle Rolle bei der Regulation der Genexpression, beispielsweise während verschiedener Entwicklungsprozesse bei Säugetieren. Im Laufe des Lebens können sich Methylierungsmuster altersabhängig verändern, wobei auch Lebensgewohnheiten einen Einfluss haben können (z. B. physische Aktivität, Rauchen, Ernährung, [7–9]). Darüber hinaus können sich Methylierungsmuster zwischen Zelltypen unterscheiden;

sie sind demnach weitgehend gewebespezifisch [10]. In den vergangenen Jahren zeigten diverse Studien, dass sich die DNA-Methylierung an bestimmten CpG-Stellen altersabhängig verändert [11–13]. Diese Veränderungen können sowohl in Form einer Zunahme als auch in einer Abnahme der DNA-Methylierung an diesen Stellen bestehen und treten in allen Individuen gleichermaßen auf. Diese Stellen werden als „Altersmarker“ bezeichnet und in der Literatur häufig als „epigenetische Uhr“ zusammengefasst [11, 13]. Für eine forensische Altersschätzung müssen die altersabhängigen Methylierungsänderungen der ausgewählten Stellen zunächst anhand eines Referenzkollektivs biostatistisch modelliert werden, bevor die Methylierungswerte einer Tatortspur anhand dieses Modells in den Schätzwert für das Alter eines unbekanntem Spurenverursachers übersetzt werden können.

Im Laufe der letzten 10 Jahre wurden verschiedene Modelle zur Altersschätzung vorgestellt, die zwischen 2 und 353 CpG-Positionen umfassen [13–16]. In einer aktuellen Studie des Instituts für Rechtsmedizin in Münster wurden 2 Modelle zur Altersschätzung vorgestellt, die auf 2 verschiedenen Methoden beruhen, der Pyrosequenzierung und der Minisequenzierung [17]. Die Pyrosequenzierung gilt derzeit als eine der exaktesten Methoden zur Quantifizierung der DNA-Methylierung an einzelnen Positionen [18]. Die Minisequenzierung hat die Vorteile, dass alle Positionen, deren Methylierungsstatus analysiert werden sollen, in einer einzigen Multiplex-Reaktion gemeinsam analysiert werden können, und dass die benötigten Geräte zur Standardausrüstung forensischer Labore gehören.

Die Arbeitsgemeinschaft „Molekulare Altersschätzung“ der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) hat sich im ersten Ringversuch zum Ziel gesetzt, diese beiden Methoden hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Robustheit in verschiedenen Laboren zu untersuchen. Die Markerauswahl dieses Ringversuchs basiert zwar auf der oben genannten Studie des Instituts für Rechtsmedizin in Münster, jedoch soll dadurch ausdrücklich keine Festlegung auf das hier verwendete Marker-Set erfolgen. Es

Rechtsmedizin 2021 · 31:192–201 <https://doi.org/10.1007/s00194-021-00492-7>
 © Der/die Autor(en) 2021

O. Holländer · K. Schwender · P. Böhme · J. Fleckhaus · C. Haas · Y. Han · F. Heidorn · R. Klein-Unseld · J. Lichtenwald · J. Naue · J. Neubauer · M. Poetsch · P. M. Schneider · W. Wagner · M. Vennemann · Arbeitsgemeinschaft Molekulare Altersschätzung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM)

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

Zusammenfassung

Die quantitative Analyse der relativen DNA-Methylierung gilt als eine der vielversprechendsten Methoden der molekularen Altersschätzung. Viele Studien der letzten Jahre identifizierten geeignete Positionen im Genom, deren DNA-Methylierung sich altersabhängig verändert. Für den Einsatz dieser Methode in der Routine- bzw. Fallarbeit ist es von großer Bedeutung, angewandte Analysetechniken zu validieren. Als ein Teilaspekt dieser Validierung sollte die Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse zur DNA-Methylierung mithilfe der Mini- und Pyrosequenzierung zwischen verschiedenen Laboren evaluiert werden. Die Arbeitsgruppe „Molekulare Altersschätzung“ der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) führte hierzu den ersten, technischen Ringversuch durch, der 4 Positionen in den Genen *PDE4C*, *EDARADD*, *SST* und *KLF14* umfasste.

Diese Marker waren in vorangegangenen Studien als altersabhängige Biomarker charakterisiert worden. Am Ringversuch nahmen 12 Labore teil, wobei jedes die Wahl zwischen der Minisequenzierung und/oder der Pyrosequenzierung für die quantitative Methylierungsanalyse hatte. Jedem teilnehmenden Labor wurden Blut- und Speichelproben von 3 Personen unterschiedlichen Alters übersandt. Die Wahl der Reagenzien für die Probenbearbeitung wurde den Teilnehmern freigestellt. Die Ergebnisse der Minisequenzierung zeigten systematische Abweichungen zwischen den Laboren, die am ehesten auf die Verwendung unterschiedlicher Reagenzien und Analyseplattformen zurückzuführen sein können. Die Resultate der Pyrosequenzierung hingegen wiesen nicht auf systematische Abweichungen zwischen den Laboren hin,

hier zeigte sich jedoch die Tendenz einer markerabhängigen Abweichung. Darüber hinaus konnten Unterschiede hinsichtlich technischer Probleme zwischen Laboren mit mehr Erfahrung in der jeweiligen Sequenzierungsmethode und Laboren mit weniger Erfahrung festgestellt werden. Sowohl die Beobachtung von systematischen als auch die von markerabhängigen Abweichungen lässt den Schluss zu, dass eine Übertragung von Analysemethoden zwischen Laboren grundsätzlich möglich ist, eine Anpassung des jeweiligen Modells zur Altersschätzung jedoch notwendig sein kann.

Schlüsselwörter

DNA-Methylierung · Pyrosequenzierung · Minisequenzierung · Ergebnisreproduzierbarkeit · Laborleistungstests

Forensic DNA methylation analysis. First technical collaborative exercise by the working group on molecular age estimation of the German Society of Legal Medicine

Abstract

Quantitative analysis of relative DNA methylation is currently one of the most promising methods of molecular age estimation. In recent years numerous studies identified potential DNA methylation markers showing age-dependent changes in their relative methylation state. For routine application of this method validation is an important prerequisite. One aspect of validation is the degree of comparability of analytical data between laboratories. The working group on molecular age estimation of the German Society for Legal Medicine (DGRM) conducted a first technical proficiency test comprising four age estimation markers within the genes *PDE4C*, *EDARADD*, *SST*

and *KLF14*. These positions were previously characterized as age-dependent biomarkers. A total of 12 laboratories participated using pyrosequencing and/or minisequencing techniques for quantitative analysis of DNA methylation. Each laboratory received blood and buccal swab samples from three individuals of different ages. Laboratories were free in their choice of reagents and material for sequencing. Minisequencing results showed systematic deviations between laboratories, which are believed to originate from differing reagents and sequencing platforms. The results of pyrosequencing did not show clear signs of systematic deviation but did show differences

in the comparability between markers. Different levels of technical problems were reported, which correlated with the amount of experience with the sequencing technology. Both systematic and specific differences between analytical data produced in different laboratory settings lead to the conclusion that while it is generally possible to transfer an age estimation method to another laboratory, a mathematical model for age estimation might need to be adjusted accordingly.

Keywords

DNA methylation · Minisequencing · Pyrosequencing · Reproducibility of results · Laboratory proficiency testing

ist eine Vielzahl potenzieller Methylierungsmarker in der Literatur beschrieben worden, die in verschiedenen Modellen Anwendung finden, sodass die hier verwendeten Marker lediglich als Beispiele zu verstehen sind. Dieser Ringversuch sollte zunächst zeigen, welche Herausforderungen sich für Labore ohne vor-

herige Erfahrung mit dieser Methodik ergeben und wie vergleichbar die Ergebnisse zwischen Laboren sind, auch wenn unterschiedliche Reagenzien und Geräteplattformen verwendet werden. In diesem ersten Ringversuch wurden den teilnehmenden Laboren jeweils 3 Blut- und

3 Speichelproben und die zu verwenden- den Primer übersandt.

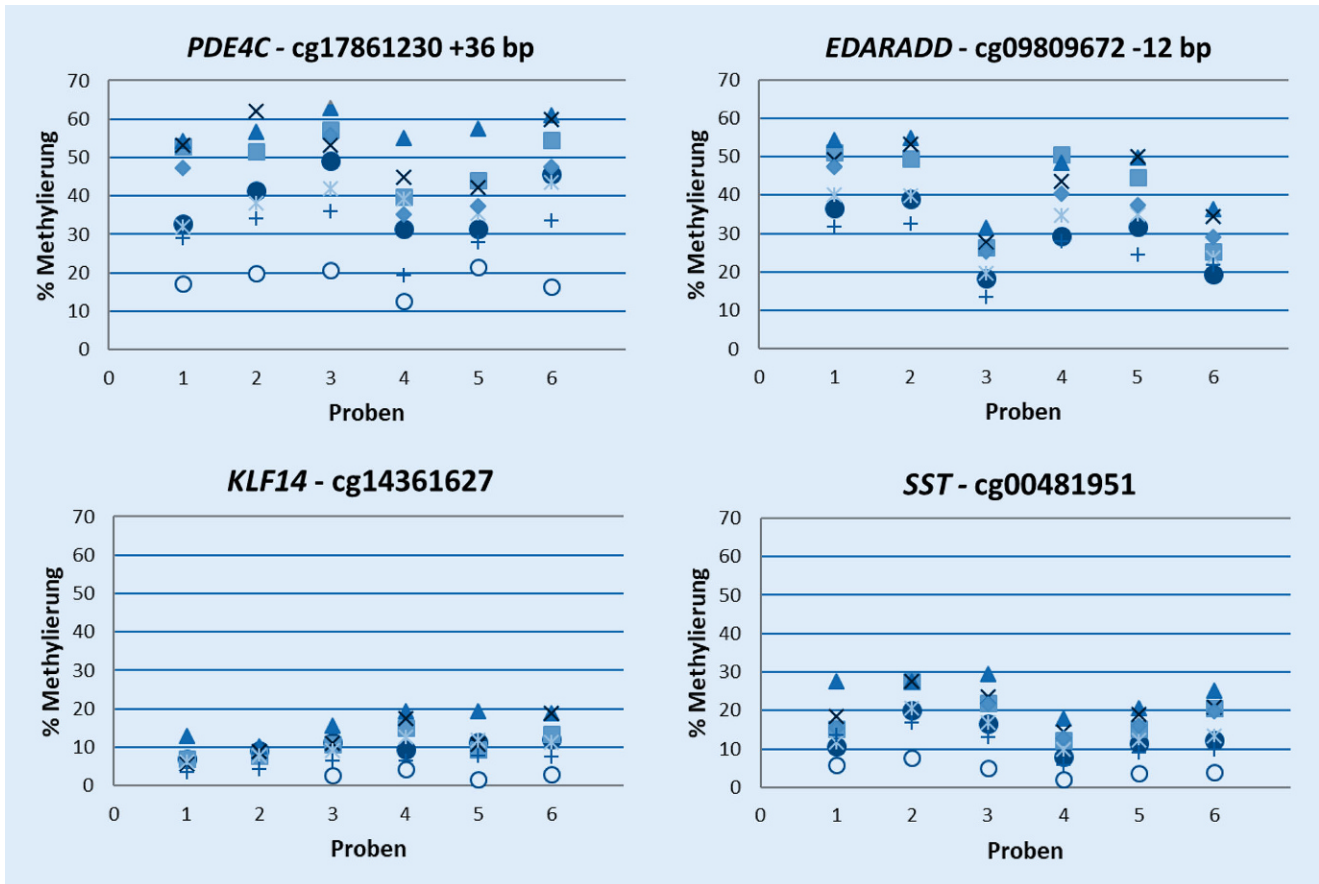


Abb. 1 ▲ Ergebnisse der Methylierungsanalysen mithilfe der Minisequenzierung. Die Ergebnisse der prozentualen Methylierung sind pro Marker und Probe aufgetragen. Die Symbole entsprechen jeweils den Daten aus einem Labor. Da vereinzelt keine oder keine verlässlichen Signale für einzelne Marker detektiert werden konnten, variiert die Anzahl der dargestellten Messwerte. Es ist keine systematische Abweichung zwischen Blutproben (1–3) und Wangenschleimhautproben (4–6) feststellbar. *EDARADD* EDAR Associated Death Domain, *KLF14* Krüppel-Like Factor 14, *PDE4C* Phosphodiesterase 4C, *SST* Somatostatin

Material und Methoden

Teilnehmer und Proben

Es nahmen insgesamt 12 Labore am Ringversuch teil, davon nutzten 3 Labore ausschließlich Pyrosequenzierung, 5 Labore ausschließlich Minisequenzierung und 4 Labore beide Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung. Von 3 Probanden (Alter: 27, 41 und 55 Jahre) wurden jeweils Blut- und Wangenschleimhautproben auf Wattestiel tupfern an die Teilnehmer versendet.

DNA-Methylierungsmarker

Sowohl mithilfe der Pyro- als auch mithilfe der Minisequenzierung wurden 4 CpG-Stellen aus den folgenden Genregionen analysiert: *Phosphodiesterase 4C*-Gen (*PDE4C*; CpG-Stelle:

cg17861230 +36 bp, [19–21]), *EDAR-Associated-Death-Domain*-Gen (*EDARADD*; cg09809672 –12 bp, [17, 20, 21]), *Somatostatin*-Gen (*SST*; cg00481951, [15]) und *Krüppel-Like-Factor 14*-Gen (*KLF14*; cg14361627) [15].

Bestimmung des Methylierungsstatus

Aus den Blut- und Wangenschleimhautproben wurde durch jeden Teilnehmer die DNA extrahiert und anschließend quantifiziert. Im Anschluss erfolgten eine Bisulfitkonvertierung der DNA und die Analyse des Methylierungsstatus der zu untersuchenden CpG-Stellen mithilfe der Pyro- und/oder Minisequenzierung. Die Amplifikation der DNA-Fragmente für die Pyrosequenzierung erfolgte in Singleplex-Ansätzen, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Mini-

sequenzierung in einem Multiplex-Ansatz. Die benötigten PCR-Primer sowie Sequenzier-Primer (Fa. Biomers, Ulm, Deutschland) wurden den teilnehmenden Laboren zur Verfügung gestellt. Alle Primer wurden zuvor erfolgreich validiert [17] und in einem Vorversuch von 2 weiteren Laboren (Rechtsmedizin Köln und Rechtsmedizin Zürich) erfolgreich getestet.

Den Teilnehmern wurden Protokolle zur DNA-Methylierungsanalyse zur Verfügung gestellt, die die bereits beschriebenen Materialien und Methoden umfassten [17], die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller wurde jedoch freigestellt.

Eine Übersicht über die einzelnen Reagenzien, Kits und Geräteplattformen, die für die Probenbearbeitungsschritte und Analysen von den teilnehmenden

Tab. 2 Minisequenzierung: relative („ICCconsistency“) und absolute („ICCabsolute agreement“) Übereinstimmung der gemessenen prozentualen Methylierung pro Marker und Probenotyp mit dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (95 %-KI)

	<i>PDE4C</i>	<i>EDARADD</i>	<i>SST</i>	<i>KLF14</i>
Blut				
ICC-C	0,488 (95 %-KI 0,037–0,978)	0,983 (95 %-KI 0,911–1)	0,659 (95 %-KI 0,179–0,988)	0,727 (95 %-KI 0,260–0,991)
ICC-AA	0,097 (95 %-KI 0,02–0,831)	0,691 (95 %-KI 0,214–0,989)	0,269 (95 %-KI 0,031–0,940)	0,3 (95 %-KI 0,041–0,947)
Wangenschleimhaut				
ICC-C	0,752 (95 %-KI 0,295–0,992)	0,757 (95 %-KI 0,303–0,992)	0,837 (95 %-KI 0,447–0,995)	0,084 (95 %-KI –0,136–0,909)
ICC-AA	0,227 (95 %-KI 0,027–0,924)	0,365 (95 %-KI 0,059–0,960)	0,23 (95 %-KI 0,030–0,924)	0,021 (95 %-KI –0,027–0,698)

EDARADD EDAR-Associated Death Domain, *ICC* „intraclass correlation coefficient“, *ICC-C* ICC consistency, *ICC-AA* ICC absolute agreement, *KLF14* Krüppel-Like Factor 14, *PDE4C* Phosphodiesterase 4C, *SST* Somatostatin

Laboren verwendet wurden, ist in [Tab. 1](#) dargestellt.

Statistische Auswertung

Als Maß der Reliabilität (Reproduzierbarkeit der Messergebnisse) der Messungen aus verschiedenen Laboren wurde der „intraclass correlation coefficient“ (ICC) ermittelt. Dieser Koeffizient spiegelt im Gegensatz zu geläufigen Korrelationskoeffizienten (z. B. Pearsons *r*) nicht nur die Korrelation der Messergebnisse wider, sondern auch die Übereinstimmung [22]. Berechnet wurde der ICC mit den Einstellungen „two-way random, single rater, consistency“ („ICC consistency“, ICC-C) und „two-way random, single rater, absolute agreement“ („ICC absolute agreement“, ICC-AA). Dabei beschreibt ICC-C die relative und ICC-AA die absolute Übereinstimmung zwischen den Messwerten. Ein „Two-way-random“-Modell wird beispielsweise dann gewählt, wenn man eine Methode hinsichtlich ihrer Reliabilität unter leicht abweichenden Bedingungen (z. B. in einem anderen Labor) prüfen möchte. Dabei führen verschiedene Labore/Personen die Datenerhebung unabhängig voneinander durch, wobei die Labore/Personen ähnliche Charakteristika (Ausstattung, fachliche Spezialisierung) aufweisen. Die „Single-rater“-Definition legt fest, dass Werte nicht über mehrere

Labore hinweg gemittelt werden. Mit der relativen Übereinstimmung (ICC-C) ist gemeint, dass die Messergebnisse von 2 Laboren in hohem Maß übereinstimmen können, selbst wenn ein systematischer Fehler vorliegen sollte. Im Gegensatz dazu interessiert bei der absoluten Übereinstimmung (ICC-AA) nur, ob Labor A exakt das gleiche Messergebnis liefert wie Labor B. Die Kombination aus einem hohen ICC-C-Wert und einem niedrigen ICC-AA-Wert könnte demnach auf das Vorliegen eines systematischen Fehlers hindeuten. Zwar ist in diesem Ringversuch insbesondere die absolute Übereinstimmung von Messwerten von Relevanz, die vergleichende Betrachtung mit der relativen Übereinstimmung kann jedoch helfen, systematische Abweichungen zwischen Laboren darzustellen (z. B. bedingt durch unterschiedliche Reagenzien und Untersuchungsplattformen, [22]). Nach den Empfehlungen von Koo und Li indiziert ein ICC < 0,5 geringe Reliabilität, Werte zwischen 0,5 und 0,75 indizieren moderate Reliabilität, ICC zwischen 0,75 und 0,9 gute Reliabilität und ein ICC > 0,9 exzellente Reliabilität [22]. Darüber hinaus empfehlen die Autoren die Einbeziehung der 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-KI) für die Beurteilung der Reliabilität [22]. Diese Grenzen geben an, zwischen welchen Werten sich ein ICC-Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von

95 % befindet. Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse als mindestens moderat einstufen zu können, sollte die untere Grenze des 95 %-KI demnach über 0,5 sein. Die Berechnung wurde mit SPSS Version 26 (IBM, New York, USA) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Minisequenzierung

Die Methode der Minisequenzierung wählten 9 Labore. Ein Labor erhielt keine qualitativ ausreichenden Ergebnisse und wurde daher nicht in der weiteren Auswertung berücksichtigt. Die teilnehmenden Labore hatten die Möglichkeit, auftretende Probleme bei der Anwendung der Methoden bzw. bei der Auswertung in ihrer Ergebnistabelle zu vermerken. Vereinzelt berichteten Labore davon, keine oder keine verlässlichen Signale für einzelne Marker (*KLF14*, *PDE4C*, *EDARADD*) erhalten zu haben. Es zeigte sich, dass Labore mit viel Vorerfahrung in der DNA-Methylierungsanalyse generell weniger technische Probleme berichteten als Labore mit weniger Vorerfahrung.

Übereinstimmung von Analyseergebnissen zwischen Laboren

In [Abb. 1](#) ist zu sehen, dass es zwischen den Laboren, die auswertbare Daten übermittelten, eine starke Streuung der Ergebnisse in Bezug auf die gemessenen prozentualen Methylierungswerte gab. Die stärkste Streuung zeigte sich unabhängig vom Probenotyp für den Marker *PDE4C*. Die geringste Streuung unabhängig vom Probenotyp wies *EDARADD* auf. Anders als für die übrigen Marker fand sich bei *KLF14* ein Unterschied zwischen den Probenotypen mit einer geringeren Streuung der Ergebnisse der Blutproben im Vergleich zu Wangenschleimhautabrieben.

Als Maß der Übereinstimmung der Ergebnisse wurde die Werte für ICC-C und ICC-AA ermittelt. Die Berechnungen wurden getrennt für beide Probenarten durchgeführt (Blut und Wangenschleimhaut; [Tab. 2](#)):

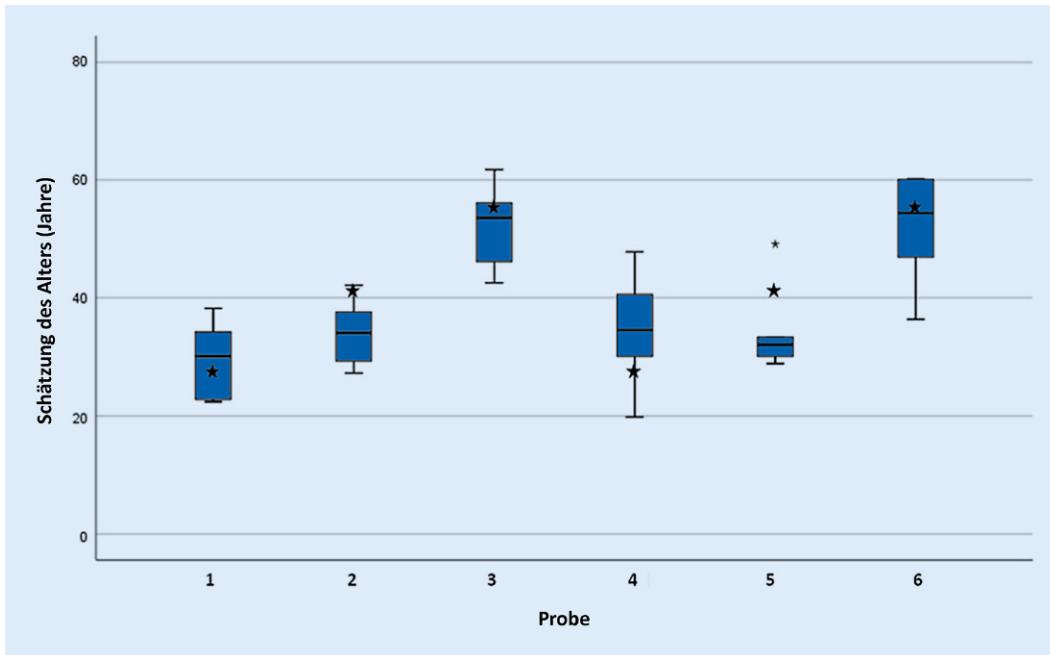


Abb. 2 ◀ Altersschätzung anhand eines Modells für die Minisequenzierung. Dargestellt sind Daten von den 6 Laboren, die für alle 3 Marker des Minisequenzierungsmodells Ergebnisse übermittelt haben. Die Streuungen der Schätzungen sind als *Boxplots* dargestellt, das wahre Alter des jeweiligen Probanden als *Stern*. Die Altersschätzungen der Blutproben (1–3) streuen etwas weniger stark als die der Wangenschleimhautproben (4–6)

Alle Marker erreichten einen ICC-C-Wert über 0,5 (Ausnahme *PDE4C* – Blut und *KLF14* – Wangenschleimhaut) und wiesen somit mindestens moderate Reliabilitäten auf. Für den Marker *EDARADD* ergaben sich eine exzellente Reliabilität, bezogen auf Blutproben, und eine gute Reliabilität für die 3 Wangenschleimhautproben. Die übrigen Marker wiesen jeweils eine moderate bis gute Reliabilität auf. Entsprechend den Empfehlungen von Koo und Li [22] soll eine Schätzung der Reliabilitäten auch die Breite der beobachteten 95%-KI berücksichtigen: Es fällt auf, dass die untere Grenze des 95%-KI lediglich für den Marker *EDARADD* bei der Analyse der Blutproben einen Wert über 0,5 annimmt. Da für diesen Marker ein sehr eng begrenztes 95%-KI (0,911–1) des ICC-C-Wertes vorliegt, kann die Reliabilität von *EDARADD* als exzellent eingestuft werden. Die übrigen Berechnungen zeigen jedoch, dass eine eindeutige Kategorisierung der Reliabilität aufgrund der Breite der jeweiligen 95%-KI nicht möglich ist.

Der Vergleich der relativen Übereinstimmung (ICC-C) mit der absoluten Übereinstimmung (ICC-AA) von Messwerten kann auf systematische Abweichungen hinweisen. Es wurde deutlich, dass die Reliabilität hinsichtlich des ICC-AA bei allen Markern niedriger ist als hin-

sichtlich des ICC-C. Dies spricht für eine systematische Abweichung zwischen Laboren, die am ehesten aufgrund der Nutzung unterschiedlicher Reagenzien und Analyseplattformen zu erklären ist.

Altersschätzung mithilfe der Minisequenzierung

Da die Bestimmung des Methylierungsstatus in nahezu identischer Weise wie in einer bereits veröffentlichten Studie [17] erfolgte, wurde das dort beschriebene Schätzmodell auf die Messergebnisse der teilnehmenden Labore angewandt. Da das finale Modell in der Studie lediglich 3 CpG-Stellen umfasst (*PDE4C*, *EDARADD*, *KLF14*), wurden die Messergebnisse für den Marker *SST* für die Berechnung nicht berücksichtigt.

In **Abb. 2** sind die Ergebnisse der Altersschätzungen dargestellt. Es zeigt sich, dass das Alter des jüngsten Probanden (*Proben 1 und 4*, wahres Alter 27 Jahre) zu hoch und das Alter der beiden älteren Probanden (*Proben 2 und 5*, wahres Alter 41 Jahre; *Proben 3 und 6*, wahres Alter 55 Jahre) zu niedrig geschätzt wurde. Mit Ausnahme der *Probe 5* liegt das wahre Alter in allen Proben jedoch innerhalb der Streuung der unabhängigen Einzelmessungen. Aufgrund der bereits beobachteten Streuung der einzelnen Methylierungsmesswerte war die offensichtlich hohe Streuung der Altersschätzungen zu

erwarten. Wie in **Abb. 2** zu sehen, streuen die Altersschätzungen der Blutproben weniger stark als die Altersschätzungen der Wangenschleimhautabriebe.

Da der Fokus dieses Ringversuchs nicht auf der Messung der Korrektheit der Altersschätzung lag, sondern auf der Robustheit der Methoden zwischen den Laboren, wurde auch hier der ICC-Wert als Maß der absoluten und relativen Übereinstimmung zwischen Laboren herangezogen. Der ICC-C (**Tab. 3**) zeigte, verbunden mit kleinen 95%-KI, gute bis exzellente Reliabilität für die Altersschätzung aus Blutproben, wohingegen für Wangenschleimhautproben zwar eine gute, jedoch durch die Breite der 95%-KI mit größerer Unsicherheit verbundene Reliabilität festgestellt werden konnte.

Die absolute Übereinstimmung (ICC-AA) deutet auf eine gute Reliabilität der Altersschätzungen aus Blutproben und auf eine moderate Reliabilität der Altersschätzungen aus Wangenschleimhautproben hin (**Tab. 3**). Unter Einbeziehung der Breite der 95%-KI lassen sich die Reliabilitäten für die Altersschätzungen aus beiden Probenarten jedoch nicht eindeutig kategorisieren.

Erwartungsgemäß fand sich eine systematische Abweichung der einzelnen Schätzwerte zwischen den Laboren, die sich auf die systematischen Abweichun-

Tab. 3 Altersschätzung mithilfe der Minisequenzierung: relative („ICCconsistency“) und absolute („ICCabsolute agreement“) Übereinstimmung der Altersschätzung mit dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (95 %-KI)

Blut	
ICC-C	0,944 (95 %-KI 0,746–0,999)
ICC-AA	0,778 (95 %-KI 0,331–0,993)
Wangenschleimhaut	
ICC-C	0,769 (95 %-KI 0,322–0,993)
ICC-AA	0,554 (95 %-KI 0,143–0,981)

ICC „intra-class correlation coefficient“, ICC-C ICC consistency, ICC-AA ICC absolute agreement

Tab. 4 Pyrosequenzierung: relative („ICCconsistency“) und absolute („ICCabsolute agreement“) Übereinstimmung der gemessenen prozentualen Methylierung pro Marker und Probentyp mit dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (95 %-KI)

	PDE4C	EDARADD	SST	KLF14
Blut				
ICC-C	0,224 (95 %-KI –0,062–0,944)	0,923 (95 %-KI 0,693–0,998)	0,835 (95 %-KI 0,468–0,995)	0,192 (95 %-KI –0,073–0,937)
ICC-AA	0,168 (95 %-KI –0,035–0,922)	0,927 (95 %-KI 0,726–0,998)	0,737 (95 %-KI 0,336–0,991)	0,097 (95 %-KI –0,028–0,871)
Wangenschleimhaut				
ICC-C	0,373 (95 %-KI 0,002–0,967)	0,772 (95 %-KI 0,355–0,993)	0,667 (95 %-KI 0,218–0,988)	0,055 (95 %-KI –0,115–0,886)
ICC-AA	0,272 (95 %-KI 0,010–0,948)	0,743 (95 %-KI 0,349–0,992)	0,34 (95 %-KI 0,059–0,956)	0,022 (95 %-KI –0,040–0,751)

EDARADD EDAR-Associated Death Domain, ICC „intra-class correlation coefficient“, ICC-C ICC consistency, ICC-AA ICC absolute agreement, KLF14 Krüppel-Like Factor 14, PDE4C Phosphodiesterase 4C, SST Somatostatin

Tab. 5 Altersschätzung auf Basis der Pyrosequenzierungsdaten: Relative („ICCconsistency“) und absolute („ICCabsolute agreement“) Übereinstimmung der Altersschätzung mit dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (95 %-KI)

Blut	
ICC-C	0,792 (95 %-KI 0,387–0,994)
ICC-AA	0,791 (95 %-KI 0,418–0,994)
Wangenschleimhaut	
ICC-C	0,743 (95 %-KI 0,312–0,992)
ICC-AA	0,677 (95 %-KI 0,268–0,989)

ICC „intra-class correlation coefficient“, ICC-C ICC consistency, ICC-AA ICC absolute agreement

gen der Methylierungsanalysen zurückführen lässt. Dadurch wird deutlich, dass ein Schätzmodell nicht ohne weitere Validierungsstudie von einem Labor auf ein anderes übertragen werden kann. Nach eigener, laborinterner Validierung muss ein publiziertes Modell angepasst oder um einen Korrekturfaktor erweitert werden, der die systematischen Abweichungen zwischen den Laboren berücksichtigt [23].

Pyrosequenzierung

Sieben Labore analysierten die DNA-Methylierung mithilfe der Pyrosequenzierung. Von allen Laboren wurden Ergebnisse erhalten. Ein Labor berichtete von Problemen, qualitativ hochwertige Ergebnisse für den Marker *KLF14* zu erzielen.

Übereinstimmung von Analyseergebnissen zwischen Laboren

In **Abb. 3** zeigt sich, dass die Streuung der Messwerte für die einzelnen Marker sehr unterschiedlich ist: Die stärkste Streuung der von den einzelnen Laboren gemessenen prozentualen Methylierung wurde für den Marker *PDE4C* beobachtet, während die Daten für *EDARADD* sehr gut übereinstimmen. Es ist generell kein Unterschied in Bezug auf die Streuung der Messwerte zwischen Blutproben und Wangenschleimhautproben zu beobachten (**Abb. 3**).

Bei der Pyrosequenzierung wurde deutlich, dass die Reliabilität hinsichtlich der relativen (ICC-C) sowie der absoluten (ICC-AA) Übereinstimmung der Methylierungsmesswerte ebenfalls stark markerabhängig ist (**Tab. 4**). Von allen Markern weist *EDARADD* die höchste Reliabilität auf; für die Blutproben ist diese als exzellent zu bewerten, bei Wangenschleimhautproben als gut. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Minisequenzierung für diesen Marker ist das 95 %-KI der berechneten Reliabilitäten deutlich kleiner, sodass den berechneten Werten und deren Kategorisierung nach Koo und Li mehr Vertrauen geschenkt werden kann. Auch der Marker *SST* wies eine moderate bis gute Reliabilität auf. Für die Marker *PDE4C* und *KLF14*

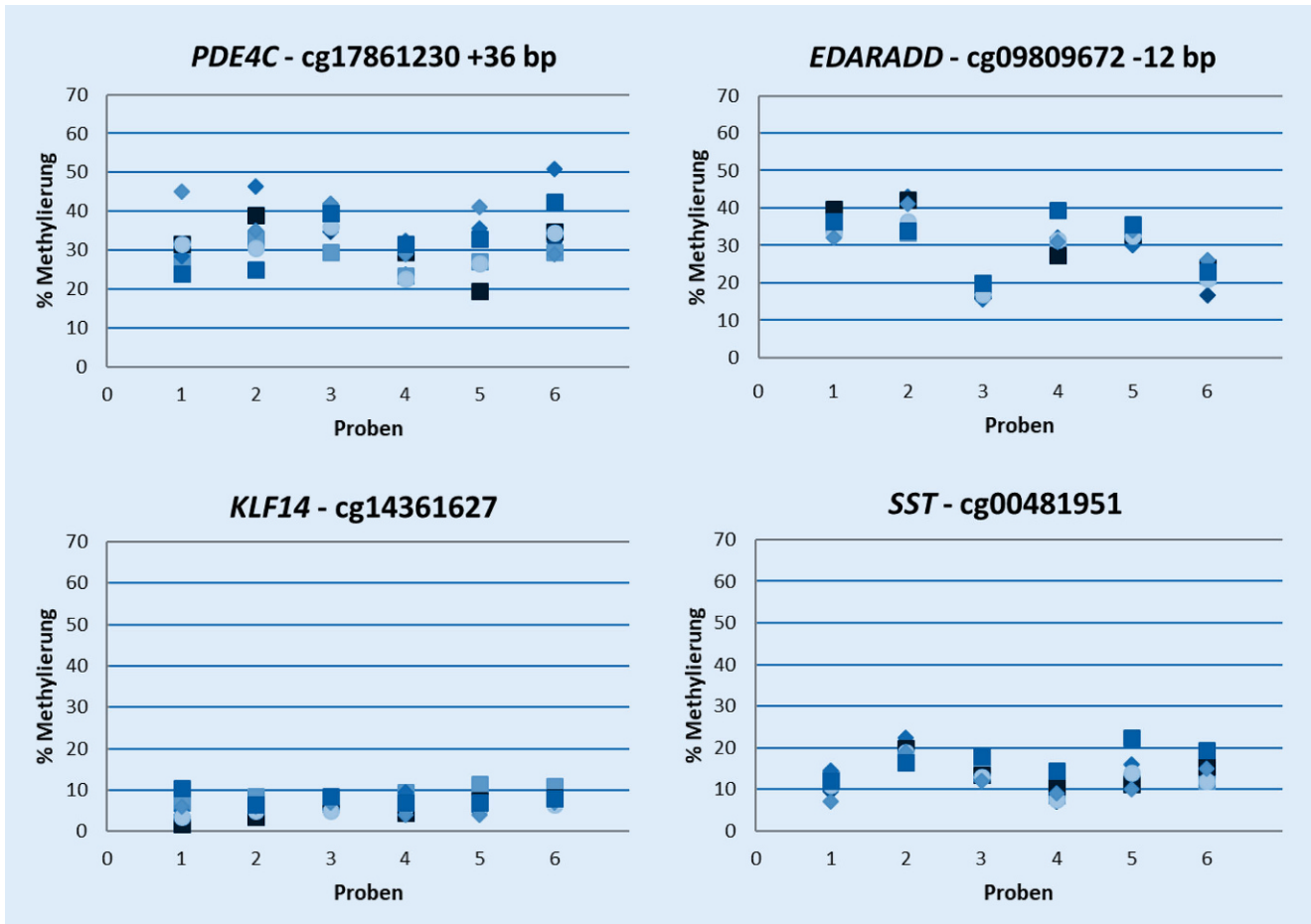


Abb. 3 ▲ Ergebnisse der Methylierungsanalysen mithilfe der Pyrosequenzierung. Die Ergebnisse der prozentualen Methylierung sind pro Marker und Probe aufgetragen. Die Symbole entsprechen jeweils den Daten aus einem Labor. Es ist keine systematische Abweichung zwischen Blutproben (1–3) und Wangenschleimhautproben (4–6) feststellbar. *EDARADD* EDAR Associated Death Domain, *KLF14* Krüppel-Like Factor 14, *PDE4C* Phosphodiesterase 4C, *SST* Somatostatin

hingegen lagen die Reliabilitäten der relativen als auch absoluten Übereinstimmungen unter dem kritischen Wert von 0,5. In Verbindung mit den breiten 95 %-KI ist die Reliabilität dieser Marker gemäß den Empfehlungen von Koo und Li als gering einzustufen [18].

Bei der Pyrosequenzierung ist die Diskrepanz zwischen relativer (ICC-C) und absoluter Übereinstimmung (ICC-AA) geringer als bei den Ergebnissen der Minisequenzierung, was auf geringere systematische Unterschiede hinweist. Besonders zeigt sich dies für den Marker *EDARADD* für Blutproben, bei dem beide ICC-Werte fast identisch sind. Eine Ausnahme bildet der Marker *SST* für die Wangenschleimhautproben. Hier deutet die Diskrepanz zwischen guter relativer und schlechter absoluter Übereinstimmung

auf eine systematische Abweichung zwischen den Laboren hin.

Altersschätzung mithilfe der Pyrosequenzierung

Die Streuung der Altersschätzung auf Grundlage der Daten einzelner Labore ist in **Abb. 4** dargestellt. Das Alter des jüngsten Probanden wurde tendenziell zu hoch und das Alter der beiden älteren Probanden tendenziell zu niedrig geschätzt. Die Streuung der Altersschätzungen weist keine Unterschiede zwischen Blutproben und Wangenschleimhautproben auf.

Der ICC-C der geschätzten Alterswerte zeigt gute Reliabilität für die Altersschätzung aus Blutproben. Die Altersschätzungen für die Wangenschleimhautproben weisen moderate Reliabilität auf, jedoch sind die dazugehörigen 95 %-

KI so groß, dass diese Kategorisierung mit großer Unsicherheit verbunden ist. Die Werte des ICC-C und des ICC-AA sind für beide Probenarten vergleichbar, was für eine geringe systematische Abweichung spricht (**Tab. 5**).

Fazit des ersten forensischen Ringversuchs zur molekularen Altersschätzung

Der vorliegende Ringversuch sollte zeigen, wie vergleichbar DNA-Methylierungsanalysen zur molekularen Altersschätzung zwischen verschiedenen Laboren sind, wenn unterschiedliche Reagenzien und Analyseplattformen verwendet werden sowie unterschiedliche Erfahrungsstände hinsichtlich der Analysetechniken bestehen.

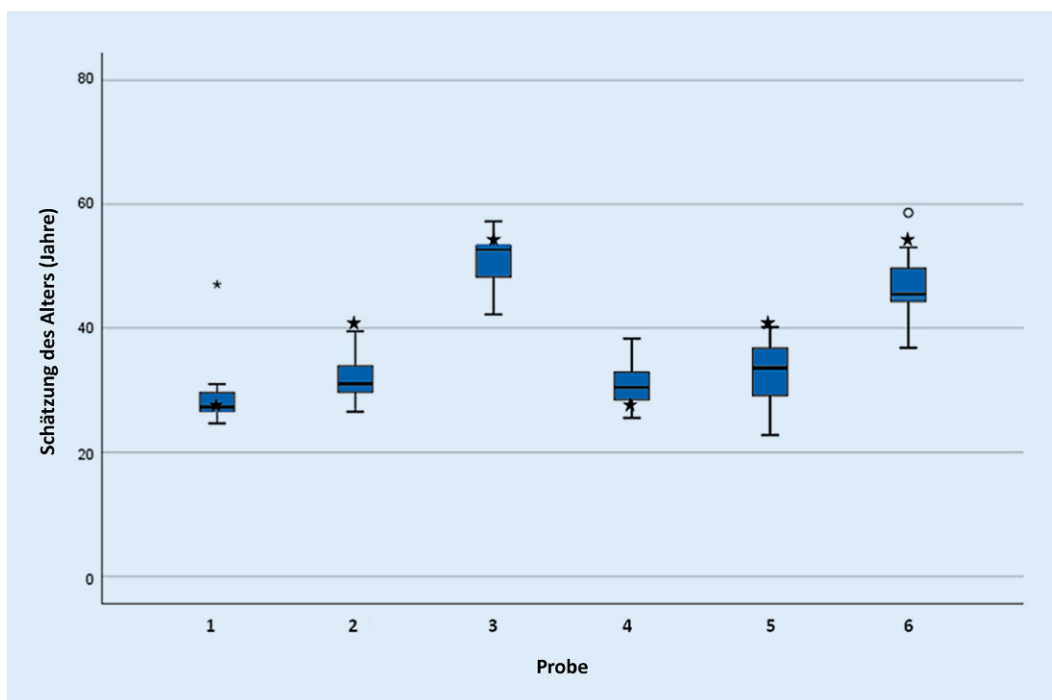


Abb. 4 ◀ Altersschätzung anhand eines Modells für Pyrosequenzierung. Dargestellt sind Daten von den 7 Laboren, die für alle 3 Marker des Pyrosequenzierungsmodells Ergebnisse übermittelt haben. Die Streuungen der Schätzungen sind als *Boxplots* dargestellt, das wahre Alter des jeweiligen Probanden als *Stern*. Es zeigt sich kein Unterschied in der Streuung der Daten zwischen Blutproben (1–3) und Wangenschleimhautproben (4–6)

Für die Minisequenzierung wurden trotz einer hohen relativen Übereinstimmung (ICC-C) der Messergebnisse zwischen den Laboren deutliche Abweichungen hinsichtlich der absoluten Übereinstimmung der Messwerte (ICC-AA) festgestellt. Dies deutet auf systematische Unterschiede zwischen den Laboren hin, die insbesondere durch die Verwendung unterschiedlicher Reagenzien und Analyseplattformen zu erklären sind. Daraus ergibt sich, dass eine Übertragung von Methoden zur Methylierungsanalyse von einem auf ein anderes Labor durchaus möglich ist, jedoch die systematische Abweichung der Messungen berücksichtigt werden muss und die Referenzdaten der Modelle zur Altersschätzung dementsprechend angepasst werden müssen [23].

Bei der Pyrosequenzierung ergaben die ICC-Werte dagegen keine deutlichen Hinweise auf systematische Abweichungen der Messergebnisse zwischen den Laboren. Auch die Werte der Altersschätzung wiesen keine systematischen Abweichungen auf, die bei der Übertragung eines Schätzmodells auf andere Laborbedingungen zu berücksichtigen wären. Die Übereinstimmung der Messergebnisse der prozentualen Methylierung erwies sich als stark markerabhängig und

war weniger von unterschiedlichen Reagenzien und Analyseplattformen beeinflusst. Wenn ein einheitliches Marker-Set für den deutschsprachigen Raum angestrebt wird, sollte dieser Aspekt bei der Auswahl von Markern für die forensische Altersschätzung Berücksichtigung finden. So zeigten im vorliegenden Ringversuch die Analyse-Assays für *EDAR-ADD* und *SST* deutlich höhere Reliabilitäten und geringere Streuungen als die Assays für *KLF14* und *PDE4C*. Hier ist jedoch zu beachten, dass *KLF14* im Vergleich zu den übrigen Markern auch eine geringe altersabhängige Variabilität aufweist, sodass sich Unterschiede in den Messungen einzelner Labore stärker im ICC niederschlagen.

Es ist nicht überraschend, dass Labore mit weniger Erfahrung in der DNA-Methylierungsanalyse bzw. der spezifischen Sequenziermethoden eher technische Probleme berichteten als Labore mit mehr Erfahrung. Unklar bleibt noch, welche Auswirkungen der unterschiedliche Erfahrungsstand der einzelnen Labore auf die beobachteten systematischen Abweichungen hat. Dies sollte Gegenstand eines weiteren Ringversuchs der Arbeitsgemeinschaft „Molekulare Altersschätzung“ werden. Dadurch kann sich zeigen, ob neben dem bis dahin fort-

geschrittenen Erfahrungsstand aller teilnehmenden Labore beispielsweise eine höhere Standardisierung des Probenmaterials durch Versendung bereits extrahierter Proben sowie Verwendung einer Konvertierungskontrolle für die Bisulfithandlung zu einer verbesserten absoluten Übereinstimmung von Messwerten zwischen Laboren führt.

Korrespondenzadresse

Marielle Vennemann

Institut für Rechtsmedizin, Universität Münster
Röntgenstr. 23, 48149 Münster, Deutschland
marielle.vennemann@ukmuenster.de

Mitglieder der Arbeitsgemeinschaft Molekulare Altersschätzung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) (alphabetisch).

Petra Böhme (Institut für Rechtsmedizin, Uniklinik Düsseldorf); Jan Fleckhaus (Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Fakultät, Universität Köln); Cordula Haas (Institut für Rechtsmedizin, Universität Zürich); Yang Han (Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, Stammzellbiologie und Cellular Engineering, Universitätsklinikum der RWTH Aachen); Frank Heidorn (Institut für Rechtsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen); Olivia Holländer (Institut für Rechtsmedizin, Universität Münster); Rachel Klein-Unseld (Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Ulm); Julia Lichtenwald (Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg); Jana Naue (Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg); Jacqueline Neubauer (Institut für Rechtsmedizin, Universität Zürich); Micaela Poetsch (Institut für Rechtsmedizin

der Universitätsmedizin Essen); Peter M. Schneider (Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Fakultät, Universität Köln); Kristina Schwender (Institut für Rechtsmedizin, Universität Münster; Institut für Rechtsmedizin, Universität München); Marielle Vennemann (Institut für Rechtsmedizin, Universität Münster); Wolfgang Wagner (Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, Stammzellbiologie und Cellular Engineering, Universitätsklinikum der RWTH Aachen)

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

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. O. Holländer, K. Schwender, P. Böhme, J. Fleckhaus, C. Haas, Y. Han, F. Heidorn, R. Klein-Unseld, J. Lichtenwald, J. Naue, J. Neubauer, M. Poetsch, P.M. Schneider, W. Wagner und M. Vennemann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz hinzufügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

1. Kayser M, Schneider PM (2009) DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet* 3:154–161. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.01.012>
2. Schneider PM, Prainsack B, Kayser M (2019) The use of forensic DNA phenotyping in predicting appearance and biogeographic ancestry. *Dtsch Arztebl Int* 116:873–880. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0873>
3. Phänotypisierung: Bundesrat will neue Methoden für Ermittlungen nutzbar machen <https://www.admin.ch/gov/de/start/dokumentation/medienmitteilungen.msg-id-81447.html>. Zugegriffen: 6. Jan. 2021
4. Ritz-Timme S, Schneider PM, Mahlke NS, Koop BE, Eickhoff SB (2018) Altersschätzung auf Basis der DNA-Methylierung. *Rechtsmedizin* 28:202–207. <https://doi.org/10.1007/s00194-018-0249-3>
5. Schmeling A, Dettmeyer R, Rudolf E, Vieth V, Geserick G (2016) Forensische Altersdiagnostik: Methoden, Aussagesicherheit, Rechtsfragen. *Dtsch Arztebl Int* 113:44–50. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0044>
6. Miller OJ, Schnedl W, Allen J, Erlanger BF (1974) 5-Methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature* 251:636–637. <https://doi.org/10.1038/251636a0>
7. Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, Caidahl K, Krook A, O’Gorman DJ, Zierath JR (2012) Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab* 15:405–411. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.001>
8. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, Dick KJ, Kanoni S, Nisbet J, Viñuela A, Grundberg E, Nelson CP, Meduri E, Buil A, Cambien F, Hengstenberg C, Erdmann J, Schunkert H, Goodall AH, Ouwehand WH, Dermizakis E, Spector TD, Samani NJ, Deloukas P (2014) Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics* 9:1382–1396. <https://doi.org/10.4161/15592294.2014.969637>
9. Lee HS (2015) Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients* 7:9492–9507. <https://doi.org/10.3390/nu7115467>
10. Ohgane J, Yagi S, Shiota K (2008) Epigenetics: the DNA Methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta* 29:29–35. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.09.011>
11. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada SV, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K (2013) Genome-wide Methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* 49:359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
12. Koch CM, Wagner W (2011) Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging* 3:1018–1027. <https://doi.org/10.18632/aging.100395>
13. Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
14. Alghanim H, Antunes J, Silva DSBS, Alho CS, Balamurugan K, McCord B (2017) Detection and evaluation of DNA methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age. *Forensic Sci Int Genet* 31:81–88. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.011>
15. Hong SR, Jung SE, Lee EH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY (2017) DNA methylation-based age prediction from saliva: high age predictability by combination of 7 CpG markers. *Forensic Sci Int Genet* 29:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.006>
16. Han Y, Franzen J, Stiehl T, Gobs M, Kuo CC, Nikolić M, Hapala J, Koop BE, Strathmann K, Ritz-Timme S, Wagner W (2020) New targeted approaches for epigenetic age predictions. *BMC Biol* 18:71. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00807-2>
17. Schwender K, Holländer O, Klopfleisch S, Eveslage M, Danzer MF, Pfeiffer H, Vennemann M (2020) Development of two age estimation models for buccal swab samples based on 3 CpG sites analysed with pyrosequencing and minisequencing. *Forensic Sci Int Genet*. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102521>
18. Delaney C, Garg SK, Yung R (2015) Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. In: *Methods Mol Biol. Humana Press Inc.*, S 249–264 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_19
19. Eipel M, Mayer F, Arent J, Ferreira MRP, Birkhofer C, Gerstenmaier U, Costa IG, Ritz-Timme S, Wagner W (2016) Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *Aging* 8:1034–1048. <https://doi.org/10.18632/aging.100972>
20. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van De Voorde WR (2015) Decortec, Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics* 10:922–930. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>
21. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel KH, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümmendorf TH, Wagner W (2014) Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
22. Koo TK, Li MY (2016) A guideline of selecting and reporting Intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med* 15:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.02.012>
23. Pfeifer M, Bajanoski T, Helmus J, Poetsch M (2020) Inter-laboratory adaption of age estimation models by DNA methylation analysis—problems and solutions. *Int J Legal Med* 134:953–961. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02263-7>