

„TrACES of Time“

Entwicklung eines Verfahrens zur Schätzung des Depositionstageszeitpunkts zur
Kontextualisierung biologischer Tatortspuren mittels forensischer Transkriptomanalysen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Annica Gosch

Kiel, 2025

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Cornelius Courts

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Manuela Dittmar

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2025

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste.....	i
Weitere Publikationen.....	ii
Vorträge und Poster	iv
Eidesstattliche Erklärung	vi
Vorbemerkungen.....	vii
Zusammenfassung.....	1
Summary	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Allgemeine Einleitung	7
1.1 Forensische Molekularbiologie: Von der Individualisierung zur Kontextualisierung.....	7
1.2 RNA-Analysen in der Forensischen Molekularbiologie	8
1.3 Forensisch relevante RNA-Typen	11
1.4 Detektionsmethoden	13
1.4.1 Endpunkt-PCR-CE	16
1.4.2 quantitative PCR (qPCR).....	16
1.4.3 Digitale PCR (dPCR)	19
1.4.4 Hybridierungs-Assay: Nanostring nCounter-Technologie	19
1.4.5 Schleifen-vermittelte, isothermale Amplifikation (engl.: <i>Loop-mediated isothermal amplification</i> , LAMP)	20
1.4.6 Gesamttranskriptomsequenzierung (MPS).....	21
1.4.7 Gezielte Sequenzierung (MPS)	23
1.4.9 Native Sequenzierung gesamter Transkriptlängen	27
1.5 Chronobiologische Grundlagen.....	28
1.5.1 Circadiane und diurnale Rhythmen.....	28
1.5.2 Die zentrale Steuerung der circadianen Rhythmik.....	29
1.5.3 Die molekulare Grundlage circadianer Rhythmik.....	29
1.5.4 Bedeutung diurnaler Rhythmen für die medizinische Forschung und Anwendung	30
1.6 Bedeutung diurnaler Rhythmen für die forensische Forschung und Anwendung	31
2. Ziele dieser Arbeit	34
3. Publikationen/Manuskripte dieser Arbeit	35
3.1 Publikation 1: Identifizierung von RNA-Markern zur Schätzung der Depositionstageszeit einer Blutspur	35
Einleitung.....	35
Originalpublikation	36

Zusammenfassung und Überleitung zu Publikation 2 und Manuskript 3	56
3.2 Publikation 2: Schwierigkeiten bei der Gesamttranskriptomsequenzierung zur Biomarkeridentifizierung in Speichel	58
Originalpublikation	59
Zusammenfassung	74
3.3 Manuskript 3: Entwicklung einer Methode zur Schätzung der Depositionstageszeit einer Blutspur mittels gezielter RNA-Sequenzierung.....	76
Eingereichtes Manuskript	77
Zusammenfassung	145
4. Allgemeine Diskussion	147
4.1 Möglichkeiten und Limitationen der forensischen Tageszeitbestimmung.....	147
4.1.1 Statistische Modellierungsansätze	147
4.1.2 Ausgewählte mRNA-Marker	154
4.1.3 Untersucher Trainings- und Testdatensatz.....	156
4.1.3.1 Individuelle Eigenschaften.....	156
4.1.3.2 Stabilität von RNA	162
4.1.3.3 Mischungen	163
4.1.3.4 Sensitivität.....	164
4.1.4 Möglichkeiten der Weiterentwicklung	165
4.2 Anwendung von MPS zur Analyse von RNA in der forensischen Molekularbiologie	167
4.2.1 Gesamttranskriptomsequenzierung.....	167
4.2.2 Gezielte Sequenzierung.....	169
5. Schlussfolgerung.....	171
6. Referenzen	172

Publikationsliste

Die der vorliegenden kumulativen Dissertationsschrift zugrunde liegenden Arbeiten wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht. Der Erstautor ist durch Fettdruck hervorgehoben:

Gosch, Annica; Bhardwaj, Archana; Courts, Cornelius (2025): TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains – identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain deposition. In: *Forensic Science International: Genetics* doi:10.1016/j.fsigen.2023.102915.

Veröffentlicht als "Subscription"-Artikel; die Autorin hat das Recht, den Artikel in dieser Dissertationsschrift ohne explizite Genehmigung durch *Elsevier* abzdrukken¹.

Gosch, Annica; Banemann, Regine; Dørum, Guro; Haas, Cordula; Hadrys, Thorsten; Hänggi, Nadescha; Kulstein, Galina; Neubauer, Jaqueline; Courts, Cornelius (2023): Spitting in the wind?-The challenges of RNA sequencing for biomarker discovery from saliva. In: *International Journal of Legal Medicine*. doi:10.1007/s00414-023-03100-3.

Veröffentlicht unter der *Creative Commons Attribution 4.0 International License*²; die Autorin hat das Recht, den Artikel in dieser Dissertationsschrift ohne explizite Genehmigung durch *Springer Nature* abzdrukken.

Gosch, Annica; Sendel, Sebastian; Caliebe, Amke; Courts, Cornelius (2025): TrACES of Time: Towards estimating time-of-day of bloodstain deposition by targeted RNA sequencing. In: *bioRxiv: the preprint server for biology*. doi: 10.1101/2025.02.03.636230.

Manuskript eingereicht und unter Begutachtung bei: *Forensic Science International: Genetics*

Veröffentlicht unter der *Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License*³; die Autorin hat das Recht, den Artikel in dieser Dissertationsschrift ohne explizite Genehmigung durch *Cold Spring Harbor Laboratory* abzdrukken.

¹<https://www.elsevier.com/about/policies-and-standards/copyright> (letzter Zugriff: 03.03.2025); der Original-Artikel wird in unveränderter Form abgedruckt. Das Supplementary Material wird in für den Abdruck in dieser Dissertationsschrift formatierter, jedoch inhaltlich unveränderter Form abdruckt.

²<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> (letzter Zugriff: 03.03.2025); der Original-Artikel wird in unveränderter Form abgedruckt. Das Supplementary Material wird in für den Abdruck in dieser Dissertationsschrift formatierter, jedoch inhaltlich unveränderter Form abdruckt.

³<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/> (letzter Zugriff: 03.03.2025); der Original-Artikel wird in unveränderter Form abgedruckt. Das Supplementary Material wird in für den Abdruck in dieser Dissertationsschrift formatierter, jedoch inhaltlich unveränderter Form abdruckt.

Weitere Publikationen

Während der Arbeit an dieser Dissertation sind weitere Publikationen mit Beteiligung der Autorin entstanden, die zwar nicht direkt Teil dieser Arbeit sind, teilweise jedoch in engem thematischem Zusammenhang stehen:

Salzmann, Andrea Patrizia; Bamberg, Malte; Courts, Cornelius; Dørum, Guro; **Gosch, Annica**; Hadrys, Thorsten; Hadzic, Gavriilo; Neis, Maximilian; Schneider, Peter M.; Sijen, Titia; van den Berge, Margreet; Wiegand, Peter; Haas, Cordula (2021): mRNA profiling of mock casework samples: Results of a FoRNAP collaborative exercise. In: *Forensic science international. Genetics* 50. DOI: 10.1016/j.fsigen.2020.102409.

Dørum, Guro; Hänggi, Nadescha Viviane; Burri, Dario; Marti, Yael; Banemann, Regine; Kulstein, Galina; Courts, Cornelius; **Gosch, Annica**; Hadrys, Thorsten; Haas, Cordula; Neubauer, Jaqueline (2024): Selecting mRNA markers in blood for age estimation of the donor of a biological stain. In: *Forensic science international. Genetics* 68, S. 102976. DOI: 10.1016/j.fsigen.2023.102976.

Courts, Cornelius; **Gosch, Annica**; Rothschild, Markus (2024): RNA-Analyse in der forensischen Molekularbiologie. In: *Deutsches Arzteblatt international* 121, S. 363–369. DOI: 10.3238/arztebl.m2024.0051.

Gosch, Annica; Courts, Cornelius (2025): Comparative Evaluation of Targeted RNA Sequencing Protocols for Gene Expression Quantification With and Without Unique Molecular Indices (UMIs). In: *bioRxiv : the preprint server for biology*. DOI: 10.1101/2025.01.27.635010.

Manuskript eingereicht und in Bearbeitung bei: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*

Koch, Dagobert; **Gosch, Annica**; Courts, Cornelius (2025): "Shedding the status"-a meta-analysis on the individual propensity to shed skin material in the context of forensic trace analysis. In: *International journal of legal medicine*. DOI: 10.1007/s00414-025-03408-2.

Hänggi, Nadescha Viviane; Neubauer, Jaqueline; Marti, Yael; Banemann, Regine; Kulstein, Galina; Courts, Cornelius; **Gosch, Annica**; Hadrys, Thorsten; Haas, Thorsten; Dørum, Guro: „Assessing Transcriptomic Signatures of Aging: Testing an mRNA Marker Panel for Forensic Age Estimation of Blood Samples“; Manuskript eingereicht und in Begutachtung bei: *Forensic science international. Genetics*

Broderius, Kathrin; **Gosch, Annica**; Courts, Cornelius: “Multiplex-RNA-analysis for detection and identification of forensically relevant organ tissues”; Manuskript eingereicht und in Begutachtung bei: *International Journal of Legal Medicine*

Vorträge und Poster

Teile der Arbeit wurden auf folgenden nationalen und internationalen Tagungen in Form eines Posters bzw. eines mündlichen Vortrags präsentiert (der präsentierende Autor ist jeweils durch Fettdruck hervorgehoben):

29. Weltkongress der Internationalen Gesellschaft für Forensische Genetik (ISFG), 29. August - 2. September 2022, Washington D.C., USA

Poster: „TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains – towards estimating the time of deposition“, **Annica Gosch**, Archana Bhardwaj, Cornelius Courts

43. Spurenworkshop der Spurenkommission in Verbindung mit der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), 23. - 25. Februar 2023 in Bielefeld, Deutschland

Vortrag: „TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains - Die Identifizierung von mRNA-Markern zur Bestimmung des Tageszeitpunkts einer Spurendeposition“, **Annica Gosch**, Archana Bhardwaj, Cornelius Courts

44. Spurenworkshop der Spurenkommission in Verbindung mit der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), 07. – 09. März in Frankfurt am Main, Deutschland

Vortrag: „Spitting in the wind? – Die Schwierigkeiten von RNA-Sequenzierung zur Identifizierung von Biomarkern aus humanem Speichel“, **Annica Gosch**, Regine Banemann, Guro Dørum, Cordula Haas, Thorsten Hadrys, Nadescha Haenggi, Galina Kulstein, Jacqueline Neubauer, Cornelius Courts

HIDS 2023, virtuelle Konferenz organisiert durch Thermo Fisher Scientific Inc., 23. - 24. Mai 2023

Vortrag: „Retrieving forensically relevant information from the transcriptome – A perspective from the Institute of Legal Medicine Cologne“, **Annica Gosch**, **Maximilian Neis**, **Cornelius Courts**

30. Weltkongress der Internationalen Gesellschaft für Forensische Genetik (ISFG), 9. - 13. September 2024, Santiago de Compostela, Spanien

Poster: „TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains – towards estimating the time of deposition using targeted RNA sequencing“, **Annica Gosch**, Sebastian Sendel, Amke Caliebe, Cornelius Courts

30. Weltkongress der Internationalen Gesellschaft für Forensische Genetik (ISFG), 9. - 13. September 2024, Santiago de Compostela, Spanien

Poster: „Comparative evaluation of targeted RNA sequencing protocols for gene expression quantification with and without the utilization of unique molecular indices (UMIs)“, Annica Gosch, **Cornelius Courts**

24. European Forensic DNA Working Group Meeting organisiert durch Promega GmbH, 04. - 06. November 2024, Tromsø, Norwegen

Vortrag: „TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains - Towards estimating the time of deposition using targeted RNA sequencing“, **Annica Gosch**, Sebastian Sendel, Amke Caliebe, Cornelius Courts

45. Spurenworkshop der Spurenkommission in Verbindung mit der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), 27. Februar - 01. März 2025 in Salzburg, Österreich

Vortrag: „TrACES of Time: Transkriptomanalysen zur Schätzung des Spurendepositions-Zeitpunktes unter Einsatz eines Ion S5 Benchtop-MPS-Systems“, **Annica Gosch**, Sebastian Sendel, Amke Caliebe, Cornelius Courts

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigenständige und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasste Arbeit ist.

Die Ergebnisse dieser Dissertation (Publikationen 1 und 2) wurden bereits in den Zeitschriften „Forensic Science International: Genetics“ und „International Journal of Legal Medicine“ veröffentlicht. Das Manuskript 3 liegt zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertationsschrift zur Begutachtung bei der Zeitschrift „Forensic Science International: Genetics“ vor und wurde online auf dem Preprint-Server BioRxiv veröffentlicht.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und hat weder im Ganzen noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Weiterhin versichere ich, dass mir kein akademischer Grad entzogen wurde.

Kiel, den (Annica Gosch)

Vorbemerkungen

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertationsschrift das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

Die Verwendung von „Punkt“ und „Komma“ in Zahlen erfolgt in dieser Dissertationsschrift gemäß der üblichen Verwendung in der entsprechenden Sprache. Somit wird in den hier eingebetteten Originalpublikationen in englischer Sprache das Komma als Tausender- und der Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet, wohingegen in den in deutscher Sprache verfassten Abschnitten der Punkt als Tausender- und das Komma als Dezimaltrennzeichen verwendet wird.

Auf Grund des Umfangs werden die zu den Originalpublikationen veröffentlichten „*Supplementary Tables*“ in dieser Dissertationsschrift nicht mit abgedruckt. Diese sind jedoch online auf der Seite der jeweiligen Fachzeitschrift einsehbar und der ausgedruckten Version dieser Arbeit in digitaler Form auf CD-ROM beigelegt. Auf Anfrage können sie zudem jederzeit von der Autorin dieser Arbeit zur Verfügung gestellt werden.

Zusammenfassung

Die DNA-basierte Zuordnung biologischer Spuren zu ihren Verursachern, die das Hauptaufgabengebiet der forensischen Molekularbiologie darstellt, ist alleinstehend häufig nicht ausreichend, um die Abfolge der Geschehnisse und Aktivitäten an einem (Tat-)Ort objektiv rekonstruieren zu können. Möglichkeiten, mittels in biologischem Spurenmaterial enthaltener Information Erkenntnisse über den Kontext der Spurenentstehung zu gewinnen, werden daher in verschiedenen Forschungsprojekten erkundet. Das Transkriptom, dessen Zusammensetzung sich je nach Art und Zustand einer biologischen Spur unterscheidet, weist ein hohes Potential für derartige Untersuchungen auf.

Die in dieser Dissertationsschrift aufgeführten Studien befassten sich mit dem Ziel, ein auf der Messung mit der Tageszeit rhythmisch oszillierend exprimierter mRNA-Transkripte basierendes Verfahren zur Schätzung des Tageszeitpunkts der Deposition menschlicher Blut- und Speichelspuren zu entwickeln. Für dieses Ziel wurden zunächst Gesamttranskriptomsequenzierungen zur unvoreingenommenen Identifizierung geeigneter Markerkandidaten durchgeführt. Dabei stellte sich die Körperflüssigkeit Speichel für Gesamttranskriptomsequenzierungen als sehr problematische Matrix heraus, sodass für diese Körperflüssigkeit keine geeigneten Markerkandidaten identifiziert werden konnten. In einer detaillierten Analyse unter Einbeziehung von Gesamttranskriptomsequenzdaten aus einem weiteren forensisch-molekularbiologischen Kooperationsprojekt konnten der hohe Anteil bakterieller Transkripte, die heterogene Zusammensetzung sowie die durch Umgebungsbedingungen im Mundraum geförderte Degradation als Ursachen dieser Schwierigkeiten festgestellt werden.

Für die Körperflüssigkeit Blut hingegen gelang mittels Gesamttranskriptomsequenzierung und einer Kombination statistischer Algorithmen die Identifizierung von mit der Tageszeit differentiell exprimierten Markerkandidaten. Darauf aufbauend wurde ein Verfahren zur gezielten Sequenzierung und Genexpressionsquantifizierung der ausgewählten Kandidaten auf einem Ion-S5-Tischsequenziergerät entwickelt und optimiert. Mit diesem Analyseverfahren wurde die Expression von 69 Kandidaten in einem Probenkollektiv von 408 zu verschiedenen Tageszeiten deponierten und getrockneten Blutproben von 51 Probanden quantifiziert, mittels geeigneter Verfahren normalisiert und die normalisierten Expressionswerte zur Etablierung und zum Vergleich verschiedener statistischer Tageszeitschätzmodelle verwendet. Das unter Berücksichtigung mehrerer rationaler Selektionskriterien für am besten befundene Schätzmodell basiert auf einer trigonometrischen Transformation der kontinuierlichen, zyklischen Variable Tageszeit gefolgt von zwei separaten penalisierten Regressionsmodellen zur Schätzung der Sinus- und der Kosinuskomponente der Tageszeit. Mit diesem Modell konnte die Depositionstageszeit im vorliegenden Testdatensatz unter Anwendung einer fünffachen Kreuzvalidierung mit einer Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme von 3 Stunden und 44 Minuten und einer Genauigkeit innerhalb von ± 4 Stunden von 78 % geschätzt werden. Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener Eigenschaften der Spurenverursacher und der

Spuren selbst (Menge und Lagerdauer) auf die Schätzgenauigkeit experimentell untersucht und diskutiert.

Das etablierte Verfahren stellt den ersten Ansatz zur Schätzung des Depositionstageszeitpunkts von Blutspuren auf Basis gezielter RNA-Sequenzierung dar. Die Ergebnisse belegen, dass Tageszeitinformation forensisch-realistischen Blutspuren enthalten ist und aus diesen extrahiert werden kann. Während weitere Optimierungsschritte des Analyseverfahrens wünschenswert sind und eine umfangreichere Validierung unter zusätzlichen, forensisch relevanten Bedingungen noch aussteht, stellt die vorliegende Dissertationsschrift eine essenzielle Grundlage für die angestrebte Anwendung des Verfahrens zur Schätzung der Depositionstageszeit von Blutspuren in der forensischen Fallarbeit dar. Zudem konnten im Rahmen dieser Studien relevante und auf andere Fragestellungen übertragbare Erkenntnisse für die Anwendung massiv-paralleler Sequenzierverfahren im Feld der forensischen Molekularbiologie gewonnen werden.

Summary

The DNA-based assignment of biological traces to their individual contributor(s) represents the main task of forensic molecular biology but in many cases remains insufficient to objectively re-construct the course of events and activities having unfolded at a (crime) scene. Different research projects thus aim to explore possibilities of gaining insights on the context of biological trace deposition. The transcriptome, whose composition differs depending on the type and condition of a biological trace, shows a large potential for this type of analysis.

The studies performed as part of this dissertation thesis were aimed to develop a method allowing for an estimation of the time-of-day a human blood or saliva trace was deposited based on expression measurements of diurnally rhythmically transcribed mRNA markers. For this purpose, marker candidates were intended to be identified in an unbiased manner in a whole transcriptome sequencing experiment. The body fluid saliva, however, proved to be a challenging matrix for whole transcriptome sequencing and consequently no marker candidates could be identified for this body fluid. A detailed analysis also including whole transcriptome sequencing data from another collaborative forensic molecular biological research project revealed that these difficulties were attributable to a high proportion of bacterial transcripts, the heterogeneous composition of the body fluid saliva as well as degradation caused by unfavourable conditions in the human oral cavity.

In contrast, whole transcriptome sequencing and a combination of statistical algorithms allowed for an identification of marker candidates showing differential expression between different times of day in the body fluid blood. Building on this, a targeted approach to sequence and quantify the expression of the selected markers on an Ion S5 benchtop sequencing device was developed and optimised. Using this approach, the expression of 69 marker candidates was quantified in a set of 408 dried blood samples from 51 individuals deposited at different times of day and subjected to suitable normalisation procedures. Normalised expression measurements were then used to develop and compare different statistical approaches for time-of-day estimation. The most suitable approach was chosen based on a combination of different criteria. This approach uses trigonometric transformation of the cyclic and continuous variable time-of-day and subsequent estimation of the separate sine and cosine components of time-of-day by penalised regression. This model achieved time-of-day estimation in the test data set using five-fold cross-validation with a root mean squared error of 3 hours and 44 minutes and an accuracy within ± 4 hours of 78 %. Additionally, the impact of different characteristics of the trace donor as well as the trace itself (volume and storage duration) on prediction accuracy were investigated and discussed.

The procedure established in this thesis represents the first approach to estimate the time-of-day of blood trace deposition based on targeted RNA sequencing. The results prove that time-of-day information is encoded in and can be recovered from forensically realistic blood traces as may be

encountered at crime scenes. While further optimisation of the analysis procedure is desirable and more extensive validation considering additional forensically relevant conditions is necessary, this thesis lays the foundation for the envisioned application of this procedure to estimate the time-of-day of blood trace deposition in casework. Furthermore, the presented studies allowed to gain relevant insights on the application of massively parallel sequencing in forensic molecular biology that will also be applicable to other questions of forensic relevance.

Abkürzungsverzeichnis

<i>ARG1</i>	<i>arginase 1</i>
AUC	area under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve)
<i>BMAL1</i>	<i>brain and muscle ARNT-like 1</i>
CCG	clock-controlled genes (dt.: Uhren-kontrollierte Gene)
cDNA	complimentary DNA (dt.: komplementäre DNA)
CE	capillary electrophoresis (dt.: Kapillarelektrophorese)
circRNA	circular RNA (dt.: zirkuläre RNA)
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CRY1-2	Cryptochrome 1-2
CT	circadian time (dt.: zirkadiane Zeit)
<i>CYP2B7P1</i>	cytochrome P450, Family 2, Subfamily B, Polypeptide 7 Pseudogene 1
DGRM	Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin
D-MEQ	deutsche Übersetzung des Horne-Östberg-Morningsness-Eveningness-Questionnaires
DNA	desoxy ribonucleic acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dPCR	digitale PCR
dsDNA	doppelsträngige DNA
dt.	deutsch
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (dt.: Ethylendiamintetraessigsäure)
engl.	englisch
<i>ENHO</i>	<i>energy homeostatis associated gene</i>
ET	external time (dt.: externe Zeit)
<i>FAAH2</i>	<i>tyrosylprotein sulfotransferase 1</i>
GHB	Gammahydroxybuttersäure
GWAS	genom-weite Assoziationsstudien
ISFG	International Society for Forensic Genetics
LAMP	loop-mediated isothermal amplification (dt.: Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation)
LOOCV	Leave-one-out-Crossvalidation (dt.: „einen-auslassen-Kreuzvalidierung“)
MAE	mean absolute error (dt.: mittlerer absoluter Fehler)
MdAE	median absolute error (dt.: medianer absoluter Fehler)
miRNA	microRNA
MPS	massiv-paralleles Sequenzieren
mRNA	messengerRNA
<i>MYO1E</i>	<i>class I myosin</i>
<i>NPAS2</i>	<i>Neuronal PAS domain protein 2</i>
<i>NR1D1/NR1D2</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1/2</i>
PCR	polymerase chain reaction (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
<i>PER1-3</i>	<i>Period 1-3</i>
piRNA	piwi-interacting RNA
PLSR	partial least squares regression (dt.: Regression der partiellen kleinsten Quadrate)
PMI	Post-Mortem-Interval
qPCR	quantitative PCR

RMSE	root mean squared error, dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme
RNA	ribonucleic acid (dt.: Ribonukleinsäure)
<i>RORα, β und γ</i>	<i>retinoic acid receptor-related Orphan receptor α, β und γ</i>
rRNA	ribosomale RNA
<i>SEMG1</i>	<i>Semenogelin 1</i>
SNP	single nucleotid polymorphism (dt.: Einzelnukleotidpolymorphismus)
STR	short tandem repeat
<i>TPST1</i>	<i>tyrosylprotein sulfotransferase 1</i>
TrACES	Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains (dt.: Transkriptomanalysen für die Kontextualisierung beweisbarer Spuren)
UMI	unique molecular identifier (dt.: einzigartige molekulare Identifikatoren)

1. Allgemeine Einleitung

1.1 Forensische Molekularbiologie: Von der Individualisierung zur Kontextualisierung

Das Hauptaufgabengebiet der Forensischen Molekularbiologie besteht in der eindeutigen Zuordnung biologischer, Desoxyribonukleinsäure (engl.: *desoxy ribonucleic acid*, DNA)-haltiger Spuren zu einem Individuum. Dieser Prozess wird als „Individualisierung“ bezeichnet und erfolgt in der Regel durch die Erstellung und den Abgleich von „DNA-Profilen“⁴, also der Untersuchung ausgewählter genetischer Marker, die in ihrer Kombination für jeden Menschen (mit Ausnahme eineiiger Zwillinge) praktisch einzigartige Merkmalsmuster ergeben.

Moderne Analysemethoden ermöglichen die Erstellung von DNA-Profilen aus geringsten Mengen DNA-haltigen biologischen Materials, wie etwa einzelnen Haarwurzeln [2], Hautkontaktsuren in der Größe eines einzelnen Fingerabdrucks [3] und sogar einzelnen Zellen [4]. Auch stark geschädigte oder gealterte Materialien wie Umwelteinflüssen ausgesetzte Knochen [5] können erfolgreich analysiert werden. Aufwendige statistische Algorithmen, sogenannte „vollkontinuierliche Modelle“ [6], ermöglichen zudem selbst bei Vorliegen komplexer Mischspuren mit geringen DNA-Mengen und stochastischen Effekten noch Berechnungen zur Beurteilung der Mitverursacherschaft durch eine oder mehrere Personen.

In der praktischen Fallarbeit wird seit einigen Jahren jedoch vermehrt eine Interessensverschiebung beobachtet: Neben der „Individualisierung“ biologischer Spuren werden in einer steigenden Anzahl an Fällen Fragen der „Kontextualisierung“, also der Einordnung einer biologischen Spur in ihren Entstehungskontext, relevant. Forensisch-molekularbiologische Forschungsprojekte befassen sich mit verschiedenen Ansätzen zur Spurenkontextualisierung; dazu gehören unter anderem Studien zur Charakterisierung beobachteter DNA-Profile nach verschiedenen Aktivitäten (Studien zur Untersuchung von Transfer, Persistenz, Prävalenz und Sicherung von DNA, manchmal vereinfachend als „DNA-Transfer“-Studien bezeichnet) [7,8] oder auch der Nachweis von in unterschiedlichen Mengen(-verhältnissen) auftretenden Mikroorganismen [9], Nukleinsäuren [10], Proteinen [11] oder Metaboliten [12] in biologischen Spuren mit unterschiedlichen Eigenschaften wie etwa unterschiedlichen geweblichen Ursprungs oder unterschiedlichen Alters. Das gemeinsame Ziel dieser

⁴Zur Erstellung eines „DNA-Profiles“ in der forensischen Molekularbiologie werden üblicherweise Bereiche des Genoms untersucht, in denen kurze Sequenzabschnitte wiederholt vorliegen (kurze Tandemwiederholungen, engl. *Short Tandem Repeats*, STR). Die STR-Analyse erfasst, wie viele Wiederholungen eines bestimmten Tandemmotivs in der untersuchten Probe vorliegen. Durch die kombinierte Analyse einer ausreichend hohen Zahl unabhängig vererbter STR-Loci ergeben sich Merkmalsmuster, die in ihrer Ausprägung für einen Menschen praktisch einzigartig sind. Der Abgleich des DNA-Profiles einer Tatortspur mit dem DNA-Profil einer Vergleichsperson ermöglicht somit die Berechnung einer Wahrscheinlichkeit des beobachteten DNA-Profiles unter Annahme einer Verursacherschaft durch die Vergleichsperson [1].

Untersuchungen besteht darin, eine stärker auf Evidenz basierende und damit objektivere Rekonstruktion von Tathergängen zu unterstützen.

1.2 RNA-Analysen in der Forensischen Molekularbiologie

Die Untersuchung differentieller Genexpression, also in variablen Mengen auftretender Ribonukleinsäure (engl.: *ribonucleic acid*, RNA)-Moleküle, hat sich bei der Kontextualisierung biologischer Tatortspuren als besonders informativ herausgestellt. Eine Vielzahl intrinsischer biologischer Prozesse wird durch die Expression verschiedener Gene reguliert und gesteuert. Auch verändert sich das Transkriptom, also die Gesamtheit der exprimierten RNA-Moleküle in einer Zelle bzw. in einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt, dynamisch in Reaktion auf eine Vielzahl extrinsischer Einflüsse. Daraus ergibt sich, dass auch eine große Zahl forensisch relevanter Zustände und Prozesse durch charakteristische Genexpressionsmuster abgebildet wird [10,13].

Des Weiteren ist das RNA-Molekül dem Hauptuntersuchungsobjekt der forensischen Molekularbiologie, dem DNA-Molekül, chemisch sehr ähnlich, sodass die Untersuchung dieses Moleküls für forensisch-molekularbiologische Labore einfacher zugänglich ist als die Untersuchung von Molekülen wie Metaboliten oder Proteinen.

Der folgende Abschnitt soll aufzeigen, welche forensisch relevanten Fragestellungen durch den Nachweis bestimmter RNA-Moleküle in biologischen (Tatort-)Spuren beantwortet werden können (jeweils durch Fettdruck hervorgehoben). Dabei ist zu beachten, dass für den Einsatz einer Analysemethode zur Beantwortung forensisch relevanter Fragestellungen in der Fallarbeit umfangreiche Etablierungs- und Validierungsstudien notwendig sind, die die Validität der Analysemethode unter verschiedenen, forensisch relevanten Bedingungen belegen. Für diese Studien ist die Sammlung und Analyse einer großen Zahl teilweise nur schwierig zu gewinnender oder herstellbarer Proben notwendig, weshalb sie häufig nur unter hohem Zeit- und Kostenaufwand durchführbar sind. Dabei kann auch herauskommen, dass die ausgewählten Marker unter forensischen relevanten Bedingungen nicht ausreichend spezifisch und/oder sensitiv sind. Daraus ergibt sich, dass es zwar viele Prozesse und Zustände gibt, für die Erkenntnisse zu veränderter Genexpression vorliegen, (bislang) jedoch erst wenige RNA-basierte Analysemethoden in der forensischen Fallarbeit praktisch eingesetzt werden.

Das am umfangreichsten erforschte Einsatzgebiet der forensischen RNA-Analyse ist die Bestimmung von in biologischen Spuren vorliegenden **Körperflüssigkeiten/Organgeweben** durch den Nachweis flüssigkeits- bzw. gewebspezifisch exprimierter RNA-Moleküle [14]. Die Identifikation der Körperflüssigkeit kann von hoher Bedeutung für die evidenzbasierte Rekonstruktion eines Tathergangs

sein, wenn die von streitigen Parteien (i.d.R. Anklage und Verteidigung) geschilderten Tathergangsversionen gleichermaßen gut die Anwesenheit der DNA einer tatbeteiligten Person erklären können, dabei jedoch ein unterschiedlicher körperlicher Ursprung postuliert wird. Dies kann beispielsweise der Fall sein, wenn eine weibliche Person zur Anzeige bringt, von einer männlichen Person gegen ihren Willen mit einem Finger vaginal penetriert worden zu sein und die männliche Person diese Tat abstreitet, beide jedoch aussagen, zuvor sozialen Kontakt (zum Beispiel ein Handschlag zur Begrüßung bei einem gemeinsamen Essen im Restaurant) gehabt zu haben. In diesem Fallszenario wäre der Nachweis DNA der weiblichen Person an den Händen der männlichen Person durch beide Tathergangsversionen erklärbar, der Nachweis von Vaginalsekret an den Händen der männlichen Person jedoch deutlich besser mit dem von der Anklage postulierten Aktivitätenszenario in Einklang zu bringen.

Die Anwendung RNA-basierter Verfahren zur Körperflüssigkeitsbestimmung bietet einige Vorteile gegenüber den herkömmlichen zur Körperflüssigkeitsbestimmung eingesetzten, in der Regel (immun-)chemischen Verfahren: Die RNA-Analyse ist spezifischer und ermöglicht die simultane Analyse mehrerer, in verschiedenen Körperflüssigkeiten exprimierter Marker in einem Analyseansatz [15,16]. Dabei können auch Körperflüssigkeiten identifiziert werden, für die keine zuverlässigen immunchemischen Bestimmungsmethoden existieren, wie etwa die im Zusammenhang mit Sexualdelikten sehr relevanten Körperflüssigkeiten Vaginalsekret und Rektalschleimhaut [17,18]. Zudem ermöglichen labortechnische Verfahren eine kombinierte Extraktion von RNA und DNA [19] aus demselben Spurenmaterial, sodass selbst geringe Mengen biologischen Materials für eine kombinierte Bestimmung von Spurenverursacher und Spurenart geeignet sind. Die RNA-basierte Körperflüssigkeitsbestimmung ist durch zahlreiche Forschungsstudien und internationale Laborvergleiche umfangreich validiert worden [20–24] und wird in Laboren weltweit routinemäßig in der forensischen Fallarbeit eingesetzt [14,25].

Zusätzlich zu den relevanten Unterschieden im Transkriptom zwischen unterschiedlichen Zelltypen wird die Genexpression in Körperflüssigkeiten und Organgeweben von weiteren sowohl intrinsischen als auch extrinsischen Faktoren beeinflusst. Verschiedene Forschungsstudien untersuchen die Nutzbarkeit dieser Genexpressionsunterschiede für die Beantwortung weiterer forensisch relevanter Fragestellungen.

Veränderte Genexpression kann als mehr oder weniger systematische Reaktion auf äußere Einflüsse erfolgen: Eine Verwundung der Haut, beispielsweise verursacht durch einen Messerstich, setzt in vitalem Gewebe den Prozess der Wundheilung in Gang, der in klar definierten, aufeinander folgenden Phasen abläuft (Blutstillung, Inflammation, Proliferation und Matrix-Remodellierung). Jede dieser Phasen geht mit der Aktivierung verschiedener Zelltypen einher, zunächst Blutplättchen, dann

verschiedene Typen von Immunzellen und im späteren Verlauf Keratinocyten, Fibroblasten und Endothelzellen, die für die Heilung der Wunde notwendige Funktionen ausüben [26]. Somit geht auch jede dieser Phasen mit einem charakteristischen Genexpressionsmuster einher. Studien an Tiermodellen und post-mortalem menschlichen Gewebe demonstrieren die grundsätzliche Möglichkeit, aus der Expression bestimmter RNA-Moleküle auf das **Alter einer Wunde** zu schließen [27,28].

Weiterhin kann die Einnahme bestimmter Substanzen in einer veränderten Genexpression in verschiedenen Geweben resultieren. Erst wenige Studien haben bislang die Möglichkeit untersucht, Genexpressionsveränderungen zum Nachweis der **Aufnahme toxikologisch relevanter Substanzen** einzusetzen [29–31]. Die Nachweisbarkeit veränderter Genexpression bei der Aufnahme von Substanzen, die nur für äußerst kurze Zeit im menschlichen Körper messbar sind, wie etwa das K.O.-Mittel Gammahydroxybuttersäure (GHB), könnte das Zeitfenster der Nachweisbarkeit derartiger Substanzen verlängern. Die Identifikation zuverlässiger RNA-Biomarker für eine GHB-Aufnahme gelang jedoch bislang mangels geeigneter Probandenkollektive nicht [31].

Zahlreiche intrinsische Prozesse gehen ebenfalls mit veränderter Genexpression einher:

Mit dem **Alter** auftretende physiologische und pathologische Veränderungen werden in zahlreichen humanbiologischen und medizinischen Studien untersucht. Dabei wurden auch mit dem Alter assoziierte systematische Veränderungen im Transkriptom festgestellt [32]. Trotz großer interindividueller Unterschiede konnte gezeigt werden, dass sich das Alter des Verursachers einer Blutspur anhand des Expressionsmusters einer Auswahl bestimmter Gene mit Hilfe mathematischer Modelle schätzen lässt [33].

Weiterhin kann die Untersuchung der Genexpression für rechtsmedizinische Untersuchungen relevante zusätzliche Erkenntnisse liefern: Regelmäßig ist hier die Diagnose bestimmter Krankheitsbilder in Abgrenzung zu nicht-natürlichen Todesursachen gefordert. Eine besondere Herausforderung stellen dabei **plötzliche, unerklärliche Todesfälle** dar, die auf zuvor nicht bekannte Erkrankungen des Herzens ohne morphologische Auffälligkeiten zurückzuführen sein können. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte **Herzerkrankungen** mit veränderter Expression verschiedener RNA-Spezies einhergehen (s. [10] für eine detaillierte Übersicht). Der Nachweis dieser veränderten Genexpression könnte somit die Todesursachenfeststellung im Falle plötzlicher, morphologisch ungeklärter Todesfälle unterstützen.

Neben Veränderungen von Transkriptmengen kann auch die Integrität von Transkripten untersucht werden: Studien zur Beschaffenheit des Transkriptoms in Spuren biologischer Körperflüssigkeiten nach Lagerung für unterschiedliche Zeiträume und unter unterschiedlichen Bedingungen zeigen, dass RNA-

Moleküle mit der Zeit degradieren [34,35]. Dabei wurden sowohl besonders degradationsresistente als auch besonders schnell degradierende Transkripte beschrieben. Für einige Transkripte wurde sogar beobachtet, dass diese nur in bestimmten Bereichen stabil sind, während sie in anderen Bereichen schneller degradieren [36]. Der Fortschritt dieser *differentiellen Degradation* korreliert direkt mit dem **Alter einer biologischen Spur** und kann somit zur Schätzung der seit ihrer Deposition vergangenen Zeit herangezogen werden [36,37].

Auch nach dem Versterben eines Menschen setzt die Degradation von Nukleinsäuren ein, sodass die Untersuchung der Transkriptintegrität nicht nur für die Bestimmung des Alters biologischer Spuren sondern auch für die Bestimmung des **Post-Mortem-Intervals (PMI)** von Bedeutung ist [38]. Untersuchungen des Transkriptoms aus Gewebeproben von Verstorbenen ergaben zudem, dass das Transkriptom nach dem Tod eines Organismus nicht ausschließlich durch Degradation verändert wird, sondern dass bis zu mehrere Stunden nach dem Tod noch aktive Transkription bestimmter Gene stattfindet (bezeichnet als „Thanatotranskription“). Die gezielte Untersuchung dieser mit dem Tod einsetzenden Nukleinsäuredegradation sowie der thanatotranskribierten Gene kann somit ebenfalls zur Feststellung des Post-Mortem-Intervals beitragen [39].

Die oben aufgeführten Beispiele zeigen die Vielfältigkeit und Komplexität der im Transkriptom abgebildeten und für die Anwendung in der forensischen Fallarbeit relevanten Informationen auf. Während grundlegende Forschungsarbeiten die Vielgestaltigkeit des Informationsgehalts des Transkriptoms beschreiben, sind in vielen Bereichen noch Etablierungs- und Validierungsarbeiten notwendig, bevor die Verfahren in der forensischen Fallarbeit eingesetzt werden können.

In Anbetracht der stetigen Fortentwicklung technischer Möglichkeiten (vgl. „1.4 Detektionsmethoden“) und des durch umfangreiche Forschungsstudien stetig wachsenden Wissenstands ist davon auszugehen, dass das Spektrum mittels forensischer RNA-Analyse beantwortbarer Fragestellungen in Zukunft erweitert werden wird.

1.3 Forensisch relevante RNA-Typen

RNA ist eine sehr vielgestaltige Klasse von Biomolekülen, welche sich strukturell und funktional in verschiedene Gruppen bzw. Typen unterteilen lässt. In der forensisch-molekularbiologischen Forschung sind bereits verschiedene RNA-Typen untersucht worden:

messengerRNA (mRNA): Der am besten erforschte RNA-Typ ist die mRNA, die bei der Transkription im Zellkern von der DNA abgelesen und aus dem Zellkern transportiert wird und die bei der Translation an den Ribosomen die Sequenz der zu verknüpfenden Aminosäuren vorgibt. Die mRNA fungiert somit als ein zentrales Molekül bei der Proteinbiosynthese. Reife mRNA-Moleküle in menschlichen Zellen, die

durch Spleißprozesse im Zellkern aus pre-mRNA-Molekülen hervorgehen, weisen Längen von 186 bis zu 109.224 Nukleotiden auf (durchschnittliche Länge 3.392 Basen) [40] und tragen typischerweise ein N7-methyliertes Guanosin an ihrem 5'-Ende („5'-Cap“) sowie eine Reihe von Adenosin-Nukleotiden an ihrem 3'-Ende („Poly-A-Schwanz“) [41].

In vielen der oben genannten Anwendungsgebiete wurde für bestimmte mRNA-Moleküle eine differentielle Expression festgestellt [10,13]. Für einige mRNA-Marker konnte ein biologisch plausibler Zusammenhang zwischen der Funktion des exprimierten Gens und dem Zustand/der Eigenschaft von forensischem Interesse festgestellt werden: So kodiert zum Beispiel der vielfach eingesetzte Samenflüssigkeitsmarker *SEMG1* für das Protein Semenogelin 1, welches einen relevanten Anteil der die Spermien umgebenden Gelmatrix in Ejakulat darstellt [42]. Die Kenntnis eines derartigen funktionellen Zusammenhangs ist jedoch keine zwingende Voraussetzung für den Einsatz eines Markers in forensischen Analysemethoden. So ist der mRNA-Marker *CYP2B7P1* (*Cytochrome P450, Family 2, Subfamily B, Polypeptide 7 Pseudogene 1*) umfangreich durch mehrere Studien als spezifischer Marker für die Körperflüssigkeit Vaginalsekret validiert worden [17,18,23,43]; die Funktion des exprimierten Gens in dieser Körperflüssigkeit ist jedoch bislang nicht bekannt [17].

microRNA (miRNA): MiRNAs sind kurze, nicht-codierende RNA-Moleküle, die im reifen Zustand ca. 22 Nukleotide⁵ lang sind. MiRNAs können an komplementäre Sequenzen auf mRNA-Molekülen binden und damit deren Translation verhindern oder sogar deren Abbau initiieren. Sie spielen somit eine zentrale Rolle bei der Genexpressionsregulation [44].

In mehreren der oben genannten Anwendungsgebiete, wie etwa der Körperflüssigkeits- [45] und Organgewebsidentifikation [46], kann die Untersuchung der differentiellen Expression von miRNA genutzt werden [47,48]. Aufgrund ihrer Kürze und der stabilisierenden Interaktion mit Proteinen erwiesen sich miRNA als besonders resistent gegenüber Degradation, weshalb ihre Erforschung für die forensische Anwendung, in der das Untersuchungsgut durch äußerliche Einflüsse geschädigt sein kann, von besonderen Interesse ist [49,50]. Durch die geringe Länge der Moleküle ist es jedoch schwieriger, unterschiedliche miRNA analytisch zuverlässig voneinander zu unterscheiden, weshalb die Analyse dieses Molekültyps eine Herausforderung darstellt [51]. Weiterhin erwiesen sich im Bereich der Körperflüssigkeitsidentifikation miRNA-Marker als weniger spezifisch als mRNA-Marker [49]. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen jedoch, dass eine kombinierte Analyse von mRNA und miRNA die Vorteile beider RNA-Typen für die Körperflüssigkeitsbestimmung vereinen kann [49,52].

⁵Angaben zur Länge humaner miRNAs können je nach Literaturquelle leicht abweichen. Die hier angegebene Länge von 22 Nukleotiden bezieht sich auf die in der miRBASE (Datenbank für Sequenzen und Annotationen von miRNA) am häufigsten vorkommende Länge humaner miRNA-Sequenzen [44].

Auf Grund der unterschiedlichen Stabilität beider Molekültypen konnte zudem eine Korrelation zwischen dem Verhältnis bestimmter miRNA:mRNA-Marker mit der Lagerdauer einer Spur festgestellt werden [53], sodass sich die kombinierte Analyse auch für Untersuchungen zur Schätzung des Spurenalters anbietet.

PIWI-interacting RNAs (piRNAs): piRNAs sind kurze, nicht-kodierende RNA-Moleküle mit Längen zwischen 21 und 35 Nukleotiden. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Stummschaltung von Transposons und unterstützen damit die Stabilität des Genoms, insbesondere in Zellen der Keimbahn [54].

Neuere Studien zeigen, dass neben der miRNA auch die ebenfalls kurzen, verhältnismäßig degradationsresistenten piRNAs forensisch interessante differentielle Expressionsmuster (z.B. zwischen Körperflüssigkeiten [55] oder veränderte Expression mit dem Lebensalter [56]) aufweisen. Bislang wurden piRNAs jedoch in sehr wenigen Studien mit forensischem Anwendungsbezug untersucht [50], sodass zukünftige Entwicklungen abzuwarten sind, bevor Aussagen über die Relevanz dieses RNA-Typs für die Anwendung in der forensischen Fallarbeit getroffen werden können.

Zirkuläre RNA (circRNA): CircRNA sind RNA-Moleküle von Hunderten bis Tausenden Nukleotiden Länge, die eine zirkuläre Struktur aufweisen. Viele circRNAs entstehen aus mRNAs, die von proteinkodierenden Genen transkribiert wurden, durch einen Spleißprozess, bei dem 5'- und 3'-Enden von aus Exons und ggf. auch Introns bestehenden Abschnitten miteinander verbunden werden. Dabei entstehen für circRNA spezifische „*backsplice junctions*“, anhand derer circRNAs von linearen Transkripten unterschieden und nachgewiesen werden können [57].

Durch die zirkuläre Struktur ist dieser RNA-Typ resistent gegenüber Exonuklease-vermittelter Degradation, weshalb auch dieser RNA-Typ ein interessantes Ziel für forensische Untersuchungen darstellt. Erste Studien erbrachten bereits gute Hinweise darauf, dass die Einbeziehung zirkulärer Transkripte von körperflüssigkeitsspezifisch exprimierten mRNA-Molekülen die Nachweisbarkeit der Körperflüssigkeit insbesondere bei gealterten und degradierten Spuren verbessert [58,59].

1.4 Detektionsmethoden

Zur Detektion differentiell exprimierter RNA (im Zusammenhang mit der jeweiligen Fragestellung häufig als „Marker“ bezeichnet) können verschiedene labortechnische Verfahren eingesetzt werden. Nachfolgend sollen die in der forensischen Fallarbeit oder in Forschungsstudien mit forensischem Schwerpunkt eingesetzten Detektionsverfahren jeweils kurz vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile für den Einsatz in der forensischen Anwendung (zusammengefasst in Tabelle 1) aufgezeigt werden. Die im

Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verfahren (qPCR, Gesamttranskriptomsequenzierung und gezielte Sequenzierung) werden dabei besonders detailliert beleuchtet.

Reverse Transkription

Nahezu allen nachfolgend erläuterten Detektionsmethoden ist der Schritt der reversen Transkription vorangeschaltet, in dem die in einer Probe vorliegende RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (engl.: *complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben wird. Die Umschreibung wird an mit der RNA hybridisierenden *Primern* initiiert, wobei unterschiedliche Priming-Strategien [60] zum Einsatz kommen können:

- universelle Oligo-(dT)-Primer, welche mit dem Poly-A-Schwanz reifer mRNA-Moleküle hybridisieren
- Oligomere mit zufälligen Nukleotidsequenzen (sogenannte „*Random Primers*“), welche stochastisch entlang der gesamten RNA-Sequenz binden können
- Primer mit definierter Sequenz, welche spezifisch mit bestimmten Bereichen ausgewählter RNA-Marker hybridisieren

Der Einsatz der Priming-Strategie kann einen relevanten Einfluss auf das Analyseergebnis haben [60]. Der Prozess der reversen Transkription weist eine gewisse Variation auf und bildet das Mengenverhältnis der RNA-Moleküle im Ausgangsmaterial typischerweise nicht exakt im cDNA-Produkt ab. Während die absolute Effizienz der Reaktion nur schwer quantifiziert werden kann, ist im Allgemeinen davon auszugehen, dass der Schritt der Reversen Transkription in relevantem Maße zur technischen Variabilität der Genexpressionsquantifizierung beiträgt [61] .

	Methoden zur Detektion und Quantifizierung von Genexpression							
	Endpunkt-PCR-CE	qPCR	dPCR	LAMP	Hybridisierung/Nanostring	Gesamttranskriptom (MPS)	gezielte Sequenzierung (MPS)	Gesamtmolekül-Sequenzierung
Zielmolekül, Untersuchungsart	cDNA, gezielt	cDNA, gezielt	cDNA, gezielt	cDNA, gezielt	RNA, gezielt	cDNA, gesamt	cDNA, gezielt	RNA oder cDNA, gesamt oder gezielt*
Quantifizierungsgenauigkeit	gering	hoch	hoch	gering	hoch	hoch	mittel bis hoch ⁺	mittel bis hoch ⁺
Max. Anzahl Marker pro Reaktionsansatz	~20	5	12	2 (ggf. mehr)	800	keine Maximalzahl (gesamtes Transkriptom)	~1000	keine Maximalzahl (gesamtes Transkriptom)*
Implementierung*	einfach	einfach	mittel	einfach	mittel	sehr aufwendig	aufwendig	mittel
Kosten/Probe	gering	gering	gering	gering	mittel	hoch	mittel	mittel
Dauer Vorbereitung	~2 h	~1 h	~1 h	~1 h	~1 h	>1 Tag	~1 Tag	~1 Tag
Dauer Messung	~1 h	~1 h	~1 h	~1 h	~1 h	~1 Tag	~1 Tag	variabel, >1 Tag
Aufwand Auswertung	gering	mittel	mittel	gering	mittel	hoch	mittel bis hoch	hoch
Sequenzinformation	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja (inkl. Modifikation)
sonstige Vorteile	etablierte Richtlinien/Standards	etablierte Richtlinien/Standards	etablierte Richtlinien/Standards	-	-	Möglichkeit der Identifizierung unbekannter Transkripte/Varianten	etablierte Protokolle für andere forensisch-molekularbiologische Anwendungen (z.B. STRs, SNPs)	Möglichkeit der Identifizierung unbekannter Transkripte/Varianten
sonstige Nachteile	-	-	wenig Anwendungsdaten aus der forens. Molekularbiologie	Neuartig, wenig Daten verfügbar	wenig Anwendungsdaten aus der forens. Molekularbiologie	nur bei hohem Durchsatz kosteneffizient; Schwierigkeiten bei schlechter Materialqualität/geringer Menge; wenig Erfahrung in der forens. Molekularbiologie	nur bei mittlerem bis hohem Durchsatz kosteneffizient; mangelnde Richtlinien/Standards; wenig Erfahrung in der forens. Molekularbiologie	erhöhte Fehleranfälligkeit; wenig Erfahrung in der forens. Molekularbiologie; mangelnde Richtlinien/Standards

Tabelle 1: Übersicht in der forensischen Molekularbiologie angewandter Methoden zur Detektion und Quantifizierung von Genexpression

Angaben zu Dauer und Aufwand basieren auf eigenen Erfahrungen sowie Angaben aus Publikationen zu Direkt-Vergleichen [59]; können jedoch je nach Protokollvariation und Erfahrung/Ausstattung des jeweiligen Labors schwanken;

*: je nach verwendeter Probenvorbereitungsstrategie; *: ausgehend von einem standardmäßig ausgestatteten, forensisch-molekularbiologischen Labor in Deutschland; CE: Kapillarelektrophorese; LAMP: Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation; qPCR: quantitative PCR; dPCR: digitale PCR; MPS: massiv-parallele Sequenzierung

1.4.1 Endpunkt-PCR-CE

Bei der Endpunkt-PCR (engl.: *polymerase chain reaction*, dt.: Polymerasekettenreaktion) werden die zu untersuchende Marker ausgehend von der cDNA zunächst mittels zielsequenzspezifischer Primer amplifiziert und die Menge der Amplifikate nach abgeschlossener Amplifikationsreaktion (am „Endpunkt“) gemessen. In forensischen Forschungsarbeiten erfolgt die Detektion der Amplifikate in der Regel durch eine Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese (engl.: *Capillary Electrophoresis*, CE) gefolgt von der Detektion über verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, welche an die bei der Amplifikation eingesetzten Primer gebunden sind [48]. Da Amplifikationsreaktionen verschiedener Zielsequenzen unterschiedlich effizient ablaufen können und die Messung erst am Ende der Reaktion (also in der Regel nach Erreichen der Plateau-Phase der Amplifikation) erfolgt, korreliert die gemessene Fluoreszenzsignalintensität nur bedingt mit der Ausgangsmenge des Zielmoleküls in der Probe. Das Verfahren ist somit geeignet, um zwischen Expression und Nicht-Expression bzw. erheblichen Expressionsunterschieden eines Gens in einer Probe bzw. zwischen Proben zu unterscheiden, feinere Unterschiede zwischen Expressionsniveaus können jedoch mit dieser Messmethode nicht aufgelöst werden [62]. Die Endpunkt-PCR-CE-Methode hat sich als für die Detektion von Genexpressionsunterschieden zwischen verschiedenen Körperflüssigkeiten und Organ Geweben als geeignet und valide erwiesen [15,63] und wird von verschiedenen Laboren in der forensischen Fallarbeit für diesen Zweck eingesetzt [25].

Da labortechnisch nahezu identische Verfahren und Geräte eingesetzt werden wie für die routinemäßige Erstellung forensischer DNA-Profile, kann diese Methode vergleichsweise einfach in standardmäßig ausgestatteten forensisch-molekularbiologischen Laboren etabliert und mit vergleichsweise geringen Kosten pro Probe durchgeführt werden.

Die Zahl der in einem einzelnen Analyseansatz detektierbaren Marker ist durch die Zahl der unterscheidbaren Farbkanäle und den festgelegten Analysebereich (Länge der Amplifikate) limitiert. In etablierten Endpunkt-PCR-CE-basierten Assays mit fünf verschiedenen Fluorophoren werden dabei derzeit um die 20 Zielmarker [18,64] in einem Reaktionsansatz vereint.

1.4.2 quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR ist ein Messverfahren, bei dem die DNA/cDNA mittels klassischer PCR vervielfältigt wird, wobei die Menge der entstandenen Amplifikate bereits während der Amplifikationsreaktion, also in „Echtzeit“, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen gemessen wird. Zum Einsatz kommen dabei entweder sequenzunabhängig an doppelsträngige DNA-Moleküle (dsDNA) bindende Farbstoffe (wie etwa SYBR Green) oder mit Reporter-Fluoreszenzfarbstoffen und fluoreszenzunterdrückenden Molekülen („Quencher“) gekoppelte Sonden (wie etwa TaqMan™-Sonden), die an eine definierte Zielsequenz

binden und durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase während der Amplifikation gespalten werden (TaqMan-Prinzip). Dadurch können sich Reporter und Quencher räumlich voneinander entfernen, sodass die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs demaskiert wird (Abbildung 1a) [65]. Die messbare Fluoreszenzsignalintensität ist dann proportional zur Menge an im Reaktionsansatz vorhandenem Amplifikat und steigt exponentiell an bis die Amplifikationsreaktion die Plateau-Phase erreicht. Der Amplifikationszyklus, in dem die Amplifikationsreaktion einen bestimmten Punkt erreicht (in der Regel wird dabei das Überschreiten eines festgelegten Fluoreszenzschwellenwerts untersucht; der Zyklus, in dem der Schwellenwert überschritten wird, wird als C_q -Wert bezeichnet [66]), ist dabei indirekt proportional zu der ursprünglich vorhandenen Menge des Zielmoleküls; d.h. bei höheren Ausgangskonzentrationen werden niedrigere C_q -Werte gemessen als bei geringeren Konzentrationen (Abbildung 1b). Die Quantifizierung der Zielmolekül-Konzentration kann durch Vergleich mit einer Standardkurve (absolute Quantifizierung) oder in Relation zur Expression der jeweiligen Gene von Interesse in anderen Proben (relative Quantifizierung) erfolgen [65,67].

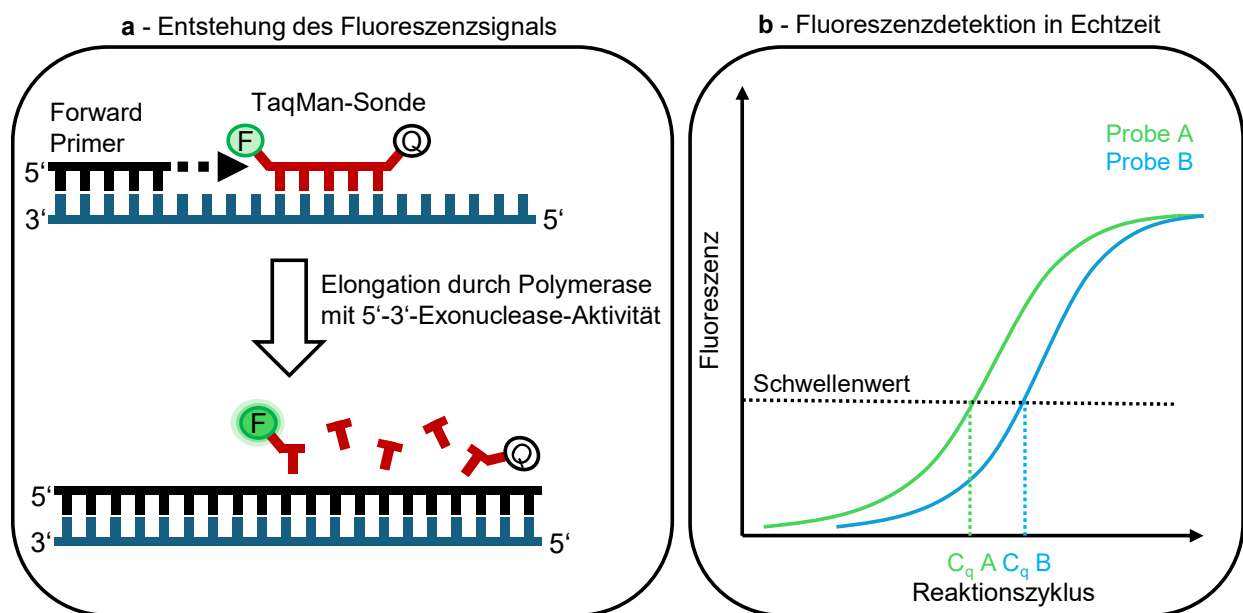


Abbildung 1: Prinzip der quantitativen PCR (qPCR)

a – Darstellung der Entstehung des Fluoreszenzsignals bei Verwendung von TaqMan-Sonden. Die TaqMan-Sonde besteht aus einer zielmolekülspezifischen DNA-Sequenz (rot), die an einen Fluorophor (F) und Quencher-Molekül (Q) gebunden ist, das in räumlicher Nähe zum Fluorophor dessen Fluoreszenz unterdrückt. Im Elongationsschritt wird ein zum Zielmolekül komplementärer Gegenstrang (schwarz) synthetisiert. Durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Polymerase kommt es zur Spaltung der Sonde, wodurch der Fluorophor räumlich vom Quencher getrennt wird, und die Fluoreszenzsignalintensität ansteigt.

b – Darstellung der Fluoreszenzdetektion während einer qPCR. Schematisch gezeigt sind die gemessenen Fluoreszenzsignalintensitäten (y-Achse) mit fortschreitendem Reaktionszyklus (x-Achse) für zwei Proben A (grün) und B (blau). In der Probe A wird der Fluoreszenzschwellenwert in einem früheren Zyklus überschritten als in der Probe B ($C_{qA} < C_{qB}$). Daraus ist zu schließen, dass in Probe A mehr Zielmolekül enthalten ist als in Probe B.

Durch zahlreiche Untersuchungen zur Optimierung und Standardisierung einzelner Analyseschritte (wie etwa der Ermittlung und Einbeziehung unterschiedlicher Amplifikationseffizienzen [68] oder der Identifizierung geeigneter Referenzgene zur Normalisierung [69]) konnte die qPCR zu einem sehr genauen Verfahren zur Genexpressionsquantifizierung entwickelt werden, welches vielfach als „Goldstandard“ auf diesem Gebiet bezeichnet wird [67]. Dem ist jedoch kritisch gegenüberzustellen, dass etablierte Richtlinien zur Sicherung der Qualität von qPCR-Daten (beispielsweise erfasst in den „MIQE“-Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*, dt.: Minimal erforderliche Informationen für die Publikation von Quantitative-Echtzeit-PCR-Experimenten [66]) in vielen Studien, auch im Feld der forensischen Molekularbiologie, nicht eingehalten werden, wodurch die Validität der in diesen Studien erzielten Ergebnisse stark eingeschränkt sein kann [70,71].

In der forensisch-molekularbiologischen Forschung ermöglicht der Einsatz qPCR-basierter Quantifizierung die Etablierung quantitativer Modelle (wie etwa einer Diskriminanzfunktionsanalyse zur Unterscheidung von Körperflüssigkeiten auf Basis gemessener miRNA-Konzentrationen [45]) sowie die Erforschung kontinuierlicher Prozesse wie der differentiellen Degradation von RNA-Molekülen mit der Lagerungsdauer [36]). Da viele forensisch-molekularbiologische Labore qPCR routinemäßig zur Quantifizierung von DNA-Konzentrationen einsetzen [72], ist die Etablierung dieses Verfahrens in standardmäßig ausgestatteten Laboren vergleichsweise einfach.

Ein Nachteil von qPCR-basierter Genexpressionsquantifizierung besteht jedoch darin, dass nur wenige Marker simultan in einem Reaktionsansatz untersucht werden können. Bei Einsatz unspezifischer dsDNA-bindender Farbstoffe kann jeweils nur eine einzelne Zielsequenz pro Reaktion untersucht werden (wobei die Unterscheidung einiger weniger Zielmoleküle durch eine zusätzliche nachgeschaltete Schmelzkurvenanalyse möglich ist [62]). Bei Verwendung von Sonden können verschiedene SONDENSEQUENZEN mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt werden, was Multiplex-Reaktionsansätze ermöglicht. Die Zahl der Marker ist dabei jedoch durch die Anzahl parallel detektierbarer und voneinander unterscheidbarer Fluoreszenzfarbstoffe (bei modernen qPCR-Geräten bis zu sechs [73]) limitiert. Die Entwicklung technischer Lösungen wie zum Beispiel „Taqman-Array-Cards“, bei denen einzelne Reaktionen auf „Reaktionskarten“ in minimalen Reaktionsvolumina von ca. 1,5 µl [74] ablaufen, ermöglichen eine Reduktion des pro Reaktionsansatz benötigten Probenvolumens; dennoch ist die praktische Anwendbarkeit von qPCR bei größeren Zahlen gleichzeitig zu quantifizierender Zielmoleküle insbesondere durch das in forensischen Anwendungen häufig stark limitierte Probenmaterial begrenzt.

1.4.3 Digitale PCR (dPCR)

Die dPCR ist ein Verfahren, welches die Quantifizierung der absoluten Anzahl von Zielmolekülen in einer Probe ermöglicht. Zu diesem Zweck wird der Reaktionsansatz auf viele sehr kleine Partitionen aufgeteilt, sodass jede Partition keins, genau eins oder sehr wenige Zielmoleküle enthält. Für jede Partition wird nach Abschluss der PCR-Amplifikation gemessen, ob sie amplifizierte Zielmoleküle enthält („positiv“) oder nicht enthält („negativ“). Die Partitionierung des Reaktionsansatzes wird zum Beispiel durch Aufteilung in sehr kleine Reaktionskammern oder durch die Bildung von Tröpfchen in Wasser-Öl-Emulsionen („digitale Tröpfchen-PCR“) erreicht [75]. Die Verteilung der Zielmoleküle in den Partitionen wird durch eine Poisson-Verteilung näherungsweise beschrieben, sodass aus dem Anteil der positiven Partitionen auf die absolute Menge an Zielmolekülen in dem partitionierten Reaktionsvolumen zurückgeschlossen werden kann [75]. Somit stellt die dPCR ein hochakkurates Quantifizierungsverfahren dar, welches die Genauigkeit der qPCR in einigen Anwendungsbereichen sogar noch übertrifft [75]. Wie auch bei der qPCR ist die Einhaltung etablierter Standards essentiell für die Generierung aussagekräftiger und valider Ergebnisse [76]. Ebenfalls ähnlich wie bei der qPCR ist die praktische Anwendbarkeit der dPCR für Analyseverfahren, in denen eine große Zahl an Zielmolekülen untersucht werden soll, durch die geringe Multiplexkapazität (in einem Ansatz können bis zu 12 Zielmoleküle untersucht werden [77,78]) begrenzt.

Im Bereich der forensischen RNA-Analyse gibt es erst wenige Studien, die die dPCR zur Genexpressionsquantifizierung einsetzen (möglicherweise bedingt durch die geringere Verbreitung der Geräte in forensisch-molekularbiologischen Laboren). Während diese Studien grundsätzlich die Einsatzbarkeit von dPCR für die forensische Körperflüssigkeitsbestimmung aufzeigen [79,80], stehen umfangreichere Untersuchungen bezüglich der Vor- und Nachteile dieses Verfahrens für die forensisch-molekularbiologische Genexpressionsquantifizierung noch aus.

1.4.4 Hybridierungs-Assay: Nanostring nCounter-Technologie

Eine weitere Methode zur absoluten Quantifizierung exprimierter Transkripte wurde von der Firma Nanostring entwickelt: Bei der Nanostring nCounter-Technologie werden zielmolekülspezifische Sonden verwendet, die an bis zu 800 verschiedene Zielmoleküle pro Probe [81] hybridisiert werden können, wobei für jedes Zielmolekül zwei Sonden benötigt werden. Eine der Sonden dient der Immobilisation der Zielmoleküle auf einer Reaktionsplatte, während die zweite Sonde mit einer für jedes Zielmolekül spezifischen Kombination mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt ist. Das Abscannen der Reaktionsplatte ermöglicht eine Zuordnung der Fluoreszenzsignale und damit die quantitative Erfassung der jeweiligen auf der Reaktionsplatte immobilisierten Zielmoleküle [81,82]. Ein relevanter Vorteil der Hybridisierungstechnologie besteht darin, dass die Sonden mit nativer RNA hybridisieren können, sodass der Schritt der reversen Transkription entfällt [82].

Während Machbarkeitsstudien aus den Jahren 2013 [83] und 2015 [84] die grundsätzliche Eignung zur Genexpressionsquantifizierung für die forensische Körperflüssigkeitsbestimmung zeigten, sind hier zum Zeitpunkt der Niederschrift keine weiteren forensisch-molekularbiologischen Publikationen bekannt, die die Anwendung der Nanostring-Technologie beschreiben. Die hohen Anschaffungskosten für die notwendigen Geräte sowie fehlende Erfahrung mit der Technologie könnten für forensisch-molekularbiologische Labore eine Hürde darstellen.

1.4.5 Schleifen-vermittelte, isothermale Amplifikation (engl.: *Loop-mediated isothermal amplification*, LAMP)

LAMP ist ein DNA/cDNA-Amplifikationsverfahren, welches im Gegensatz zur klassischen PCR bei einer konstanten Temperatur abläuft. Beim LAMP-Verfahren werden vier bis sechs Primer und eine strangverdrängende Polymerase eingesetzt. In einer initialen Phase werden durch Primer mit Überhängen Amplifikate mit selbstkomplementären Sequenzen generiert, die jeweils an ihren Enden Schleifenstrukturen ausbilden. Diese Schleifenstrukturen dienen als Anknüpfungspunkte für die Polymerase zur Synthese der komplementären DNA-Stränge, welche wiederum Schleifenstrukturen ausbilden. Auf diese Art wird die Menge der Amplifikate exponentiell vermehrt [85]. Die Detektion der dsDNA-Amplifikate kann mit Hilfe verschiedener Verfahren erfolgen, wie etwa (i) einer Messung der Trübung der Reaktionslösung mittels Turbidimeter [86], (ii) Fluoreszenzdetektion nach Verwendung fluoreszenzfarbstoffgekoppelter Primer, (iii) Zentrifugation der Reaktionslösungen (bei der die entstandenen Amplifikate ein Präzipitat bilden) [86] oder (iv) Fluoreszenzdetektion eines Reporter-Farbstoffs, der erst nach CRISPR-Cas12a-vermittelter Abspaltung von einem Quencher-Molekül ein Fluoreszenzsignal erzeugt, wobei das Cas12a-Enzym durch Erkennung und Spaltung der über eine *guideRNA* spezifizierten Zielsequenz aktiviert wird [87].

Das LAMP-Verfahren ist für die Körperflüssigkeitsbestimmung in der forensischen Fallarbeit vorgeschlagen worden, da es sehr kostengünstig und mit wenig Aufwand bei Raumtemperatur (und damit auch ohne Thermocycler) durchgeführt werden kann [87]. Ähnlich wie die klassische Endpunkt-PCR-CE-Methode handelt es sich um Verfahren, mit dem lediglich zwischen Expression und Nicht-Expression unterschieden werden kann. Zudem wurde das LAMP-Verfahren für die forensisch-molekularbiologische Anwendung bislang hauptsächlich im Singleplex-Ansatz (und in einem Fall als Duplex-Verfahren [86]) getestet, sodass die Methode zum aktuellen Zeitpunkt vorrangig in Screening-Verfahren zum Einsatz kommen kann [87], für komplexere RNA-basierte Fragestellungen jedoch eher nicht geeignet scheint.

1.4.6 Gesamttranskriptomsequenzierung (MPS)

Die Gesamttranskriptomsequenzierung umfasst Verfahren, bei denen die Gesamtheit aller (zumeist in cDNA umgeschriebenen) RNA-Moleküle in einer Probe mittels massiv-paralleler Sequenzierung (MPS), auch als „Sequenzierverfahren der nächsten Generation“ bezeichnet, vollständig sequenziert wird [88]. Für die Gesamttranskriptomsequenzierung können unterschiedliche Probenvorbereitungs- und Sequenzieretechniken zum Einsatz kommen [88]. Die nachfolgende Beschreibung beschränkt sich auf eines der am häufigsten und auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Gesamttranskriptomsequenzierungsverfahren unter Verwendung von Prozessen und Technologie der Firma Illumina:

Eine vollumfängliche Sequenzierung aller in cDNA umgeschriebenen RNA-Moleküle in einer Probe ist möglich, häufig erfolgt jedoch, um Sequenzierkapazität einzusparen, eine Anreicherung gewünschter Sequenzen in der Probe. Dies kann zum Beispiel durch ein gezieltes Einfangen von RNA-Molekülen mit Poly-A-Schwänzen („Poly-A-Anreicherung“) oder durch gezielten Abbau von in humanen Zellen sehr häufig vertretenen, für die Analysen jedoch zumeist nicht interessanten RNA-Molekülen wie etwa ribosomaler RNA („rRNA-Depletion“) [89] erfolgen. Die Sequenzierung mit Geräten der Firma Illumina (z.B. NextSeq 500 oder NovaSeq 6000 [90]) basiert auf einer „Sequenzierung durch Synthese“: Zur Vorbereitung der Proben (Abbildung 2a) für die Sequenzierung wird die cDNA zunächst fragmentiert und dann mit plattformspezifischen Sequenzieradaptern ligiert. Da für die Sequenzierung eine Signalverstärkung durch Anordnung mehrerer Kopien identischer Ausgangsmoleküle erforderlich ist, erfolgt zunächst eine Vervielfältigung der cDNA-Fragmente über „Brücken-Amplifikation“ [88]: An der Oberfläche einer Sequenzierzelle sind zu den Adaptersequenzen komplementäre Oligonukleotide immobilisiert. Diese hybridisieren mit den Zielmolekülen und durch an den Oligonukleotiden ansetzende Gegenstrangsynthese entstehen an der Sequenzierzelloberfläche immobilisierte DNA-Stränge (Abbildung 2a: Schritt 1). Nach Denaturierung werden die nicht-immobilisierten DNA-Stränge abgewaschen (Abbildung 2a: Schritt 2). Da sich an beiden Enden der immobilisierten Zielmoleküle Adapter befinden, bilden diese an der Oberfläche der Sequenzierzelle brückenartige Strukturen aus. Durch Zugabe eines Enzyms wird die Gegenstrangsynthese dieser Brücken initiiert (Abbildung 2a: Schritt 3). Anschließend wird die nun doppelsträngige Brücke denaturiert, sodass zwei Einzelstränge entstehen, die im nächsten Reaktionszyklus wiederum Brücken ausbilden können (Abbildung 2a: Schritt 3 und 4). Auf diese Art entstehen in der Sequenzierzelle Anhäufungen (engl.: *cluster*) identischer Sequenzstränge (Abbildung 2a: Schritt 5). In einem folgenden Schritt (Abbildung 2b) wird die Sequenzierzelle mit an unterschiedliche Fluorophore gekoppelten Nukleotiden gespült, welche zur Synthese des Gegenstrangs des Zielmoleküls verwendet werden. Die Nukleotide sind dabei chemisch mit einem reversiblen Terminator modifiziert [88], sodass die Gegenstrangsynthese in jedem Zyklus nach Einbau eines einzelnen Nukleotids abbricht. Durch Fluoreszenzmessung wird dann für jedes

Cluster erfasst, welches Nukleotid eingebaut wurde. Die zuvor durchgeführte Brückenamplifikation sorgt in diesem Schritt dafür, dass die für die einzelnen Cluster resultierende Fluoreszenzintensität ausreichend hoch ist. Anschließend erfolgt die Abspaltung des reversiblen Terminators, sodass nach einem Waschen der Sequenzierzelle eine erneute Spülung mit den modifizierten Nukleotiden erfolgen kann und der Einbau des nachfolgenden Nukleotids des Komplementärstrangs erfolgt [88]. Durch die parallele Erfassung bis zu mehrerer Milliarden Cluster auf einer Sequenzierzelle [90] können gesamte Transkriptome mehrerer Proben in einem Ansatz sequenziert werden.

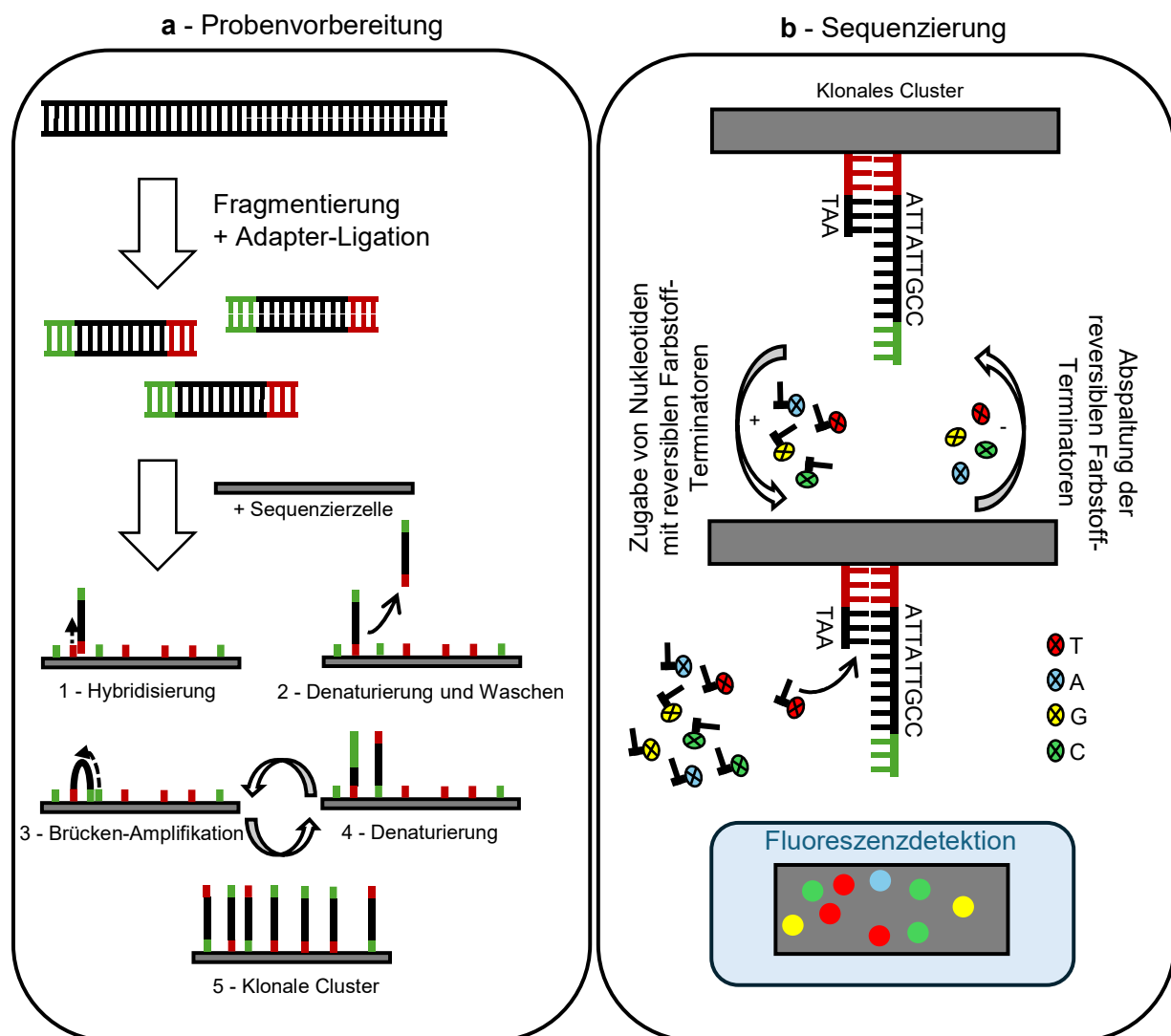


Abbildung 2: Prinzip der Gesamttranskriptomsequenzierung mittels der Illumina-Technologie

a - Zur Vorbereitung der Proben wird die cDNA fragmentiert und mit Sequenzieradaptoren ligiert. Durch Brücken-Amplifikation erfolgt die Bildung klonaler Cluster auf der Oberfläche einer Sequenzierzelle.

b - Die Sequenzierzelle wird mit mit reversiblen Farbstoff-Terminatoren gekoppelten Nukleotiden gespült. Es erfolgt der Einbau des zum Gegenstrang komplementären Nukleotids. Mittels Fluoreszenzdetektion kann für jedes Cluster das eingebaute Nukleotid (gekoppelt mit unterschiedlichen Farbstoffen) erfasst werden. Anschließend werden die Farbstoffe und Terminatoren abgespalten, sodass die Gegenstrangsynthese mit dem nächsten komplementären Nukleotid fortgesetzt werden kann.

Die Analyse so erhaltener Gesamttranskriptomsequenzdaten ist sehr aufwendig: Dabei müssen die einzelnen sequenzierten Fragmente (bezeichnet als „Reads“) zunächst auf ihre Qualität hin überprüft und gefiltert werden, dann mit dem Genom bzw. Transkriptom des untersuchten Organismus/der untersuchten Organismen aligniert und bestimmten Regionen zugeordnet und abschließend gezählt werden [91]. Aus den Daten einer Gesamttranskriptomsequenzierung können sowohl Informationen über Sequenzvariationen in Transkripten als auch Informationen über die Menge jedes einzelnen Transkripts in der Probe abgeleitet werden. Nach geeigneter Normalisierung können die Transkriptmengen zwischen unterschiedlichen Proben verglichen und differentiell exprimierte Gene identifiziert werden [91]. Da für jeden einzelnen Analyseschritt von der Probenvorbereitung bis zur differentiellen Expressionsanalyse verschiedene Methoden und Ansätze zur Verfügung stehen und zugleich aufgrund der Vielfalt möglicher Fragestellungen kein allgemeiner Konsens zur besten Vorgehensweise besteht [91,92], ist die Auswertung von Gesamttranskriptomsequenzdaten nicht trivial. Eine Absicherung der Analyseergebnisse kann durch die Kombination mehrerer alternativer geeigneter Analysealgorithmen [91] sowie eine unabhängige Reproduktion, etwa durch Anwendung eines unabhängigen Genexpressionsquantifizierungsverfahrens in einem unabhängigen Probensatz [93], erreicht werden.

Auf Grund des hohen finanziellen, labortechnischen und analytischen Aufwands sowie aufgrund der für die Analysen benötigten großen RNA-Mengen ist das Verfahren für den routinemäßigen Einsatz in der forensischen Fallarbeit nicht geeignet. Gesamttranskriptomanalysen werden jedoch eingesetzt, um in Forschungsstudien unter bestimmten forensisch relevanten Bedingungen differentielle Genexpression zu untersuchen und somit für forensisch relevante Fragestellungen geeignete Marker Kandidaten zu identifizieren. So konnten zum Beispiel stabile und schnell degradierende Transkripte als Kandidaten zur Schätzung des Spurenalters [34] sowie mit dem Lebensalter korreliert exprimierte Transkripte als Kandidaten für eine RNA-basierte Lebensaltersschätzung eines Spurenverursachers [33] mittels Gesamttranskriptomsequenzierung identifiziert werden.

1.4.7 Gezielte Sequenzierung (MPS)

Bei der gezielten Sequenzierung wird die Anwendung von MPS-Verfahren auf eine Auswahl von Zielmolekülen beschränkt. Die Technologie der Sequenzierung gleicht den bei der Gesamttranskriptomsequenzierung verwendeten Verfahren, wobei jedoch in der Regel kleinere Sequenziergeräte (sogenannte „Tischgeräte“, engl. „*Benchtop-Sequencer*“ [90]) zum Einsatz kommen. Neben Tisch-Sequenzierern der Firma Illumina finden dabei vor allem im Fachgebiet der forensischen Molekularbiologie auch Geräte der Firma Thermo Fisher Scientific, welche die *Ion-Torrent*-Technologie einsetzen, Anwendung [94]. Da diese Technologie auch bei der gezielten Sequenzierung im Rahmen

der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, soll nachfolgend eine detaillierte Erläuterung der gezielten Sequenzierung unter Verwendung der *Ion-Torrent*-Technologie erfolgen. Es ist jedoch anzumerken, dass beide oben genannten Sequenzieretechnologien für beide Anwendungen (Gesamtgenom- bzw. Gesamttranskriptomsequenzierung und gezielte Sequenzierung) eingesetzt werden können.

Bei der gezielten Sequenzierung erfolgt die Selektion und Anreicherung der Zielmoleküle zumeist mittels PCR-basierter Verfahren, wobei bis zu eintausend Zielmoleküle in einem Ansatz vereint werden können [95]. Anschließend müssen die Zielmoleküle, ähnlich wie bei dem oben beschriebenen Verfahren, zur Verstärkung des Signals vervielfältigt werden. Bei der *Ion-Torrent*-Technologie wird diese klonale Amplifikation in einer Emulsions-PCR an Mikrokugeln erreicht (Abbildung 3a) [88,96]: In einer Wasser-Öl-Emulsion entstehen Mikroreaktionsräume, die so klein sind, dass darin jeweils eine mit Sequenzieradaptoren kovalent verbundenen Kugel (Durchmesser von $\sim 2 \mu\text{m}$ ⁶) und ein Zielmolekül vorliegen. Die Zielmoleküle, die im vorherigen PCR-Schritt mit komplementären Adaptersequenzen gekoppelt wurden, können mit den an die Kugeln gebundenen Adaptern hybridisieren. Anschließend wird eine PCR-Amplifikation in jedem Mikroreaktionsraum durchgeführt, bei der die kovalent an die Kugeln gebundenen Adapter als universelle Primer fungieren, sodass die an den Primern synthetisierten DNA-Stränge an der Kugeloberfläche immobilisiert sind [96]. Auf diese Art werden Kugeln generiert, an deren Oberfläche jeweils einer große Zahl von Zielmolekülen mit identischer Sequenz pro Kugel gebunden ist [88]. Diese Kugeln werden anschließend in Reaktionsvertiefungen auf einem Sequenzierchip vereinzelt (Abbildung 3b), wobei mehrere Millionen Vertiefungen parallel auf einem Chip angeordnet sind. Anschließend erfolgt die Sequenzierung durch Synthese des Komplementärstrangs: Die Sequenziervertiefungen werden in vorgegebener Reihenfolge mit Lösungen von je einem der vier verschiedenen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) gespült. Sofern das jeweilige dNTP in den Komplementärstrang eingebaut wird, erfolgt die Reaktion unter Freisetzung eines Protons, wodurch sich der pH-Wert in der Reaktionsvertiefung verändert. Die pH-Wert-Veränderung ist dabei proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide und kann direkt von einem Sensor am Boden der Reaktionsvertiefung gemessen werden [96]. Anschließend werden die Reaktionsvertiefungen gewaschen und es erfolgt die Flutung mit dem nächsten dNTP, bis zur vollständigen Synthese und damit Sequenzierung des Komplementärstrangs (Abbildung 3b). Die *Ion-Torrent*-Technologie kommt somit im Gegensatz zur Illumina-Technologie ohne modifizierte Nukleotide und ohne komplexe optische Messungen aus [96].

⁶In neueren Veröffentlichungen und Dokumenten der Herstellerfirma Thermo Fisher Scientific werden keine exakten Angaben zur Größe der Kugeln gemacht. Die Angabe von $2 \mu\text{m}$ ist einer der ersten Beschreibungen der Methode aus dem Jahr 2011 entnommen [96]; es ist denkbar, dass seit dem Anpassungen der Kugelgröße vorgenommen worden sind, wobei jedoch davon ausgegangen werden kann, dass die aktuell verwendeten Kugeln noch immer in einer ähnlichen Größenordnung liegen.

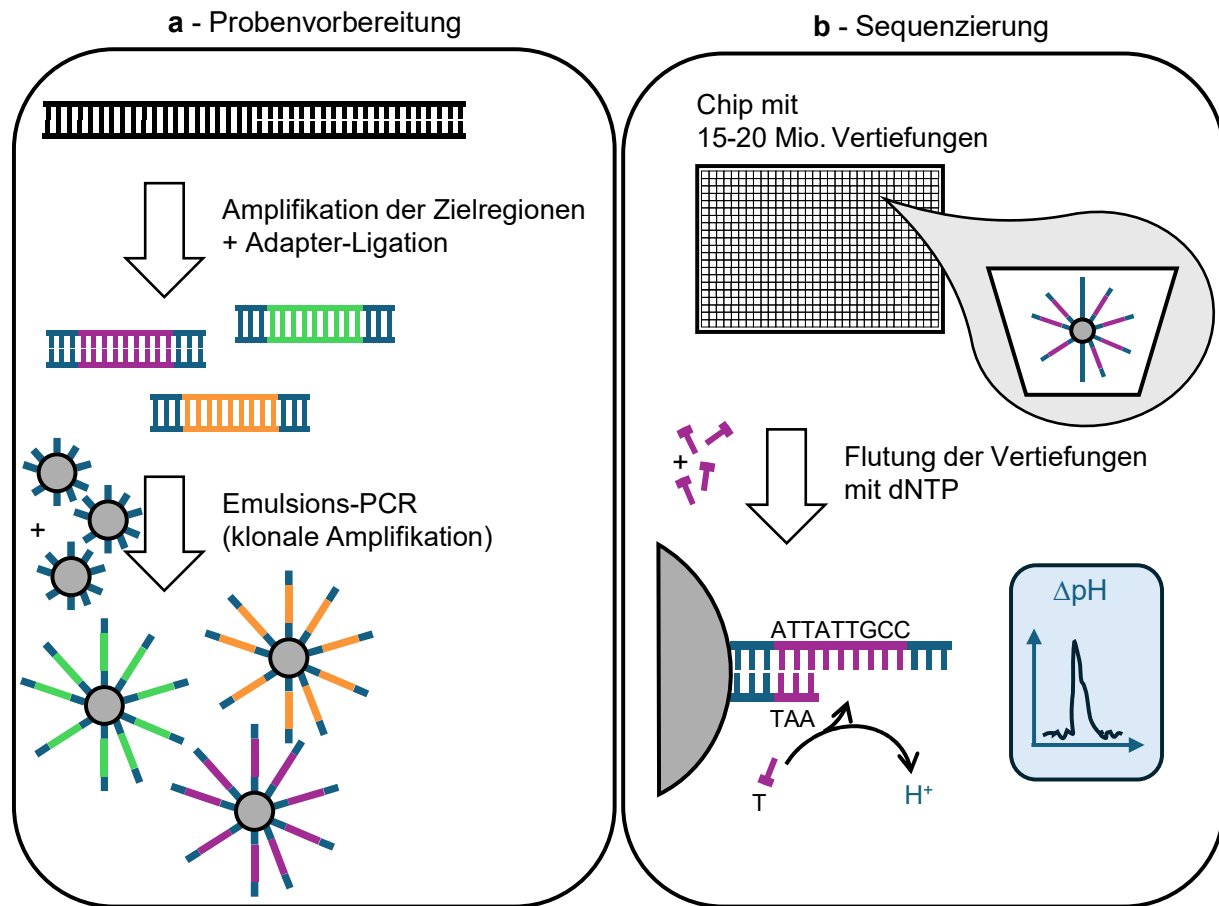


Abbildung 3: Prinzip der gezielten Sequenzierung mit der Ion-Torrent-Technologie

a – Zur Vorbereitung der Proben werden Zielregionen mittels PCR selektiert und angereichert. Anschließend werden die einzelnen Zielmoleküle in einer Wasser-Öl-Emulsion klonal an Mikrokugeln amplifiziert, sodass Kugeln mit einer Vielzahl identischer daran gebundener Zielmoleküle generiert werden.

b – Die im Schritt **a** generierten Kugeln werden in Reaktionsvertiefungen auf einem Sequenzierchip vereinzelt. Die Sequenziervertiefungen werden in vorgegebener Reihenfolge mit Lösungen von je einem der vier verschiedenen Nukleotide gespült (hier abgebildet: Desoxythymidintriphosphat). Sofern das Nukleotid in den Komplementärstrang eingebaut wird, erfolgt die Reaktion unter Freisetzung eines Protons, was als Veränderung des pH-Werts durch einen Sensor am Boden der Reaktionsvertiefung erfasst wird.

Grundsätzlich sind Sequenzierverfahren als quantitative Verfahren anzusehen, wobei die Verteilung der Reads auf die Transkripte die relativen Mengen der Transkripte in der Probe widerspiegelt. Gezielte Sequenzierverfahren werden somit als geeignet angesehen, die Lücke der quantitativen Genexpressionsmessverfahren zwischen qPCR (technisch verhältnismäßig einfach, geringe Multiplexierbarkeit) und Gesamttranskriptomsequenzierung (technisch hochgradig aufwendig, Umfang der Analysen für gezielte Fragestellungen höher als notwendig) zu schließen [95]. Es ist jedoch festzustellen, dass Genexpression mittels gezielter Sequenzierung nur begrenzt quantitativ erfasst werden kann, da vor der Sequenzierung eine Anreicherung ausgewählter Zielmoleküle mittels PCR stattfindet. Die Verteilung der Sequenzierreads spiegelt also lediglich die relativen Mengen der

Amplifikate wider, die aufgrund unterschiedlicher PCR-Effizienzen von den tatsächlichen relativen Mengen der Ausgangsmoleküle abweichen können. Um der systematischen Verzerrung durch die PCR bei der Zielmolekül-Quantifizierung mittels gezielter Sequenzierung Rechnung zu tragen, wurde der Einsatz „einzigartiger, molekularer Identifikatoren“ (engl: *Unique Molecular Identifiers*, UMIs) vorgeschlagen [97]: Bei diesem Verfahren wird jedes Zielmolekül vor PCR-Amplifikation mit einer individuellen, zufälligen Barcode-Sequenz gekoppelt (wobei Individualität durch die Länge der zufälligen Sequenzen erreicht wird). Nach PCR-Amplifikation kann so für jedes Zielmolekül festgestellt werden, ob die Sequenzierreads auf PCR-Amplifikation ein und desselben Ausgangsmoleküls (identischer UMI) oder auf unterschiedliche Ausgangsmoleküle (unterschiedliche UMIs) und somit höhere Mengen des Ausgangsmoleküls in der ursprünglichen Probe zurückzuführen sind (Abbildung 4).

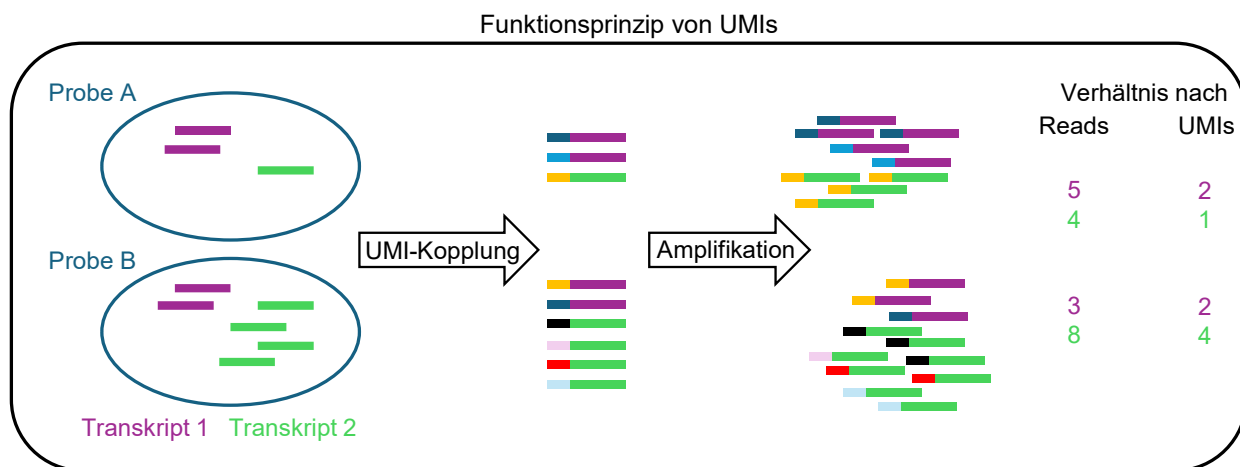


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von UMIs

Vor der PCR-Amplifikation werden Zielmoleküle mit einzigartigen Barcodes (UMIs) gekoppelt. Nach der PCR-Amplifikation spiegelt das Verhältnis der Sequenzierreads das Mengenverhältnis der ursprünglich in der Probe vorhandenen Zielmoleküle ggf. nur mit einer durch die PCR hervorgerufenen Verzerrung wider. Zählt man jedoch für jedes Zielmolekül die Anzahl der unterschiedlichen UMIs, so ergibt sich ein weniger verzerrtes Mengenverhältnis.

In der forensischen Molekularbiologie wurden gezielte Sequenzierverfahren zum ersten Mal von Zubakov et al. [98] für die Detektion körperflüssigkeitsspezifisch exprimierter Transkripte verwendet. Der Einsatz dieser Technologie bringt einige Vorteile für die RNA-basierte Körperflüssigkeits- bzw. Organgewebsidentifikation, da zum einen mehr Marker in einem Ansatz untersucht werden können [99,100] und zum anderen Sequenzinformation (Einzelnukleotidpolymorphismen (engl.: *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in den transkribierten Bereichen) zur eindeutigen Zuordnung von Körperflüssigkeiten und Spurenverursachern in Mischspuren genutzt werden kann [101]. Weitere veröffentlichte Arbeiten, in denen der Einsatz gezielter Sequenzierung zur Genexpressionsquantifizierung für die Untersuchung anderer forensisch relevanter Fragestellungen erfolgte, sind hier zum Zeitpunkt der Niederschrift nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit (Manuskript

3 [102]) sowie ein weiteres, bereits eingereichtes Manuskript zur RNA-basierten Lebensaltersschätzung (aufbauend auf [33], s. Abschnitt „Weitere Publikationen“: Hänggi et al.: „Assessing Transcriptomic Signatures of Aging: Testing an mRNA Marker Panel for Forensic Age Estimation of Blood Samples“) demonstrieren jedoch das Potential dieser Methode für die forensische RNA-Analyse.

1.4.9 Native Sequenzierung gesamter Transkriptlängen

Eine Sonderform der Sequenzierung stellt die native Sequenzierung vollständiger Transkripte dar, welche teilweise als Sequenziermethode „der dritten Generation“ bezeichnet wird. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Sequenzierverfahren erfolgt die Sequenzierung hier nicht durch Synthese eines Komplementärstrangs, sondern durch ein direktes Auslesen der nativen Sequenz eines Zielmoleküls. Die derzeit größte Bekanntheit erlangte dabei das von der Firma Oxford Nanopore entwickelte und vertriebene Verfahren: Bei diesem kommen kleine, in einer synthetischen Membran eingebettete Proteinkanäle („Nanoporen“) zum Einsatz, an die ein elektrisches Feld angelegt wird. Einzelne, einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle, die zusammen mit einem Ionenstrom durch die Nanoporen hindurchlaufen, verursachen in Abhängigkeit von ihrer Sequenz Veränderungen in dem begleitenden Einstrom von Ionen, welche gemessen und in eine Nukleinsäuresequenz übersetzt werden können [103]. Dabei erzeugen auch modifizierte Nukleobasen (wie zum Beispiel Methyl-Cytosin) andere Signale als nicht-modifizierte Basen, sodass sogar Methylierungsmuster direkt erfasst werden können [104].

Die Nanoporen-Technologie ermöglicht im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verfahren die Sequenzierung von Transkripten in ihrer vollen Länge. Dies vereinfacht die eindeutige Zuordnung der sequenzierten Transkripte und ermöglicht zudem die Identifizierung von Transkript-Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen können [105]. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens für die RNA-Sequenzierung besteht darin, dass mit der Nanoporen-Sequenzierung native RNA-Moleküle sequenziert werden können, wodurch der häufig mit systematischer Verzerrung einhergehende Schritt der reversen Transkription (vgl. Abschnitt „

Reverse **Transkription**“) umgangen werden kann [105]. Für die forensische Anwendung von besonderem Interesse sind auch die geringe Größe und die vergleichsweise geringen Anschaffungskosten der Sequenziergeräte, weshalb das Potential dieser Sequenziermethode für einen direkten Einsatz an einem Tatort diskutiert wird [106]. Neben der Sequenzierung gesamter Transkriptome kann die Nanoporen-Sequenzierung auch gezielt eingesetzt werden, wobei die Anreicherung von Zielmolekülen entweder über vorgeschaltete PCR-Amplifikation oder durch selektive Sequenzierung (Abbruch des Sequenziervorgangs sobald die sich in einer Pore befindliche Sequenz als „Nicht-Zielsequenz“ erkannt wird) erfolgen kann [107].

Nachteile der Methode bestehen bislang in der verhältnismäßig hohen Fehlerrate sowie den hohen benötigten Einsatzmengen an RNA, welche in forensischem Spurenmaterial häufig nicht vorliegen [106,108]. Es besteht jedoch Anlass zur Annahme, dass die stetige technische Weiterentwicklung zu einer Reduktion dieser Schwierigkeiten führen wird [106].

Erste Arbeiten zeigen bereits die Möglichkeiten jedoch auch die Schwierigkeiten der Nanoporen-Sequenzierung für forensische DNA-Analysen (STRs, SNPs und Methylierungsmuster) auf [108,109]. Während kürzlich erschienene Übersichtsarbeiten das Potential der Nanoporen-Sequenzierung für die forensische RNA-Analyse in der Theorie darstellen [106,107], sind hier zum Zeitpunkt der Niederschrift bislang keine publizierten, experimentellen Studien zu den Einsatzmöglichkeiten der Nanoporen-RNA-Sequenzierung für forensische Fragestellungen und Probentypen bekannt.

1.5 Chronobiologische Grundlagen

1.5.1 Circadiane und diurnale Rhythmen

Viele biologische Prozesse unterliegen periodischen Schwankungen, wobei Periodenlängen über ein ganzes Jahr (z.B. der Winterschlaf einiger Tierarten), einen Monat (z.B. der menschliche weibliche Monatszyklus), einen Tag (z.B. der Schlaf-Wach-Rhythmus vieler Tierarten und des Menschen) oder auch anderen Zeitspannen auftreten können.

Prozesse mit tageszeitabhängigen Schwankungen, sogenannte „diurnale Rhythmen“ [110] werden bei nahezu allen lebenden Organismen beobachtet. Beim Menschen unterliegen zum Beispiel der Schlaf-Wach-Rhythmus und die Körpertemperatur tageszeitlichen Schwankungen [111]. Tage sind in natürlicher Umgebung durch die An- oder Abwesenheit von Licht (Hell-/Dunkel-Rhythmik) geprägt, doch auch andere externe Faktoren wie die Aufnahme von Nahrung oder die Umgebungstemperatur unterliegen häufig bestimmten zeitlichen Mustern und können somit als externe Signale für die Tageszeit, sogenannte „Zeitgeber“ [110], fungieren. Diurnal rhythmische Prozesse sind mit diesen externen Zeitgebern synchronisiert. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass einige dieser Prozesse aufrechterhalten werden, wenn die externen Zeitgeber ausbleiben (z.B. unter konstanten Umgebungsbedingungen in konstanter Dunkelheit), also endogen gesteuert sein müssen [111]. Derartige endogen kontrollierte Rhythmen mit einer Periodizität von etwa einem Tag werden als „circadiane Rhythmen“⁷ (lat.: circa – um ... herum, dies – Tag) bezeichnet [110].

⁷In einigen wissenschaftlichen Arbeiten wird die Bezeichnung „circadianer Rhythmus“ für alle Rhythmen mit einer Periodenlänge von etwa einem Tag verwendet, während andere Arbeiten strenger zwischen circadianen Rhythmen (endogene Kontrolle bzw. Aufrechterhaltung der Rhythmizität unter konstanten Umgebungsbedingungen nachgewiesen) und in Abgrenzung dazu diurnalen Rhythmen (Rhythmizität unter natürlichen Umgebungsbedingungen beobachtet, endogene Kontrolle bzw. Aufrechterhaltung der Rhythmizität unter konstanten Bedingungen jedoch nicht gegeben oder nicht nachgewiesen) unterscheiden [110]. In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe gemäß letzterer Definition verwendet und die Bezeichnung „circadiane

1.5.2 Die zentrale Steuerung der circadianen Rhythmik

Die endogene Steuerung der menschlichen circadianen Rhythmik, die häufig auch als „innere Uhr“ bezeichnet wird, ist ein komplexes regulatorisches Netzwerk, das aus einer zentralen und mehreren peripheren „Uhren“ besteht [112].

Der zentrale „Schrittmacher“ der inneren Uhr ist in einem als suprachiasmatischer Nukleus bezeichneten Areal des Hypothalamus lokalisiert, während periphere Uhren in nahezu allen Geweben (wie der Leber, den Muskeln, dem Fettgewebe oder dem Blut) vorliegen.

Die zentrale Uhr erhält Tageszeitinformation durch den Empfang von Lichtsignalen über die Retina als externer Zeitgeber [113]. Periphere Uhren werden über verschiedenen Signalwege wie zum Beispiel das Ausschütten von Hormonen, die Regulation der Körpertemperatur oder auch neuronale Signale mit der zentralen Uhr synchronisiert. Die peripheren Uhren können jedoch auch in Reaktion auf andere externe Zeitgeber wie zum Beispiel der Aufnahme von Nahrung angepasst werden. In der Regel liegen die peripheren und die zentrale Uhr in Synchronität zueinander und zur externen Tageszeit vor. Bestimmte Bedingungen wie zum Beispiel ein *Jet-Lag* können jedoch Desynchronität hervorrufen, was häufig mit einer Störung üblicherweise rhythmischer biologischer Prozesse einhergeht [112,113].

1.5.3 Die molekulare Grundlage circadianer Rhythmik

Auf zellulärer Ebene wird die circadiane Rhythmik sowohl der zentralen als auch der peripheren Uhren durch eine regulatorische Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife gesteuert, in deren Zentrum eine als „Uhren-Gene“ bezeichnete Gruppe von Genen steht:

Die zentrale regulatorische Rückkopplungsschleife bilden die Aktivatoren CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) bzw. dessen nah Verwandter NPAS2 (*Neuronal PAS domain protein 2*) und BMAL1 (*brain and muscle ARNT-like 1*) und die Repressoren PER1-3 (*Period 1-3*) und CRY1-2 (*Cryptochrome 1-2*), (s. Abbildung 5, [112]). Die Proteine CLOCK und BMAL1/NPAS2 bilden einen Heterodimer, welches als Transkriptionsfaktor die Expression mehrerer Gene aktiviert. Dazu gehören auch die Gene *PER1-3* und *CRY1-2*, deren Proteinprodukte im Cytoplasma ebenfalls dimerisieren und so in den Nukleus transferiert werden, wo sie mit CLOCK und BMAL1/NPAS2 interagieren und deren transkriptionsaktivierenden Eigenschaften unterbinden. Daraufhin wird auch die Aktivierung der Expression von *PER1-3* und *CRY1-2* unterbunden. Der E3-Ubiquitin-Ligase vermittelte Abbau der PER1-3- und CRY1-2-Proteine sorgt dafür, dass die transkriptionsaktivierende Eigenschaft des CLOCK-BMAL1/NPAS2-Komplexes nicht weiter unterbunden wird, woraufhin die Rückkopplungsschleife in einen neuen Zyklus eintritt [112,114,115].

Rhythmik“ somit nur dann genutzt, wenn nachgewiesenermaßen eine endogene Kontrolle der Rhythmizität besteht.

Neben der zentralen Rückkopplungsschleife existieren weitere Mechanismen, welche die Stabilität der circadianen Rhythmik unterstützen. Dazu gehören REV-ERB α /REV-ERB β (auch bezeichnet als NR1D1/NR1D2 (*nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1/2*)), die als Transkriptions-Repressoren von *BMAL1* fungieren und ROR α , β und γ (*retinoic acid receptor-related Orphan receptor* α , β und γ), welche die Expression von *BMAL1* aktivieren. Sowohl die Expression von REV-ERB α /REV-ERB β als auch die von ROR α , β und γ wird von dem CLOCK-BMAL1/NPAS2-Komplex aktiviert bzw. durch PER/CRY inaktiviert, woraus eine oszillierende Aktivierung der Expression von *BMAL1* resultiert [114,116]. Weiterhin wird durch den CLOCK-BMAL1-Komplex die Expression einer Vielzahl von Genen, die als Uhren-kontrollierte Gene (engl.: *clock-controlled genes*, CCGs) bezeichnet werden, reguliert. Diese Gene können je nach Gewebe in unterschiedlichen Signalwegen und Funktionen involviert sein. In Abhängigkeit von Studienbedingungen, Organismus und untersuchtem Gewebe werden etwa 3 bis 20 % aller untersuchten Transkripte als diurnal oszillierend beschrieben [114,117–119].

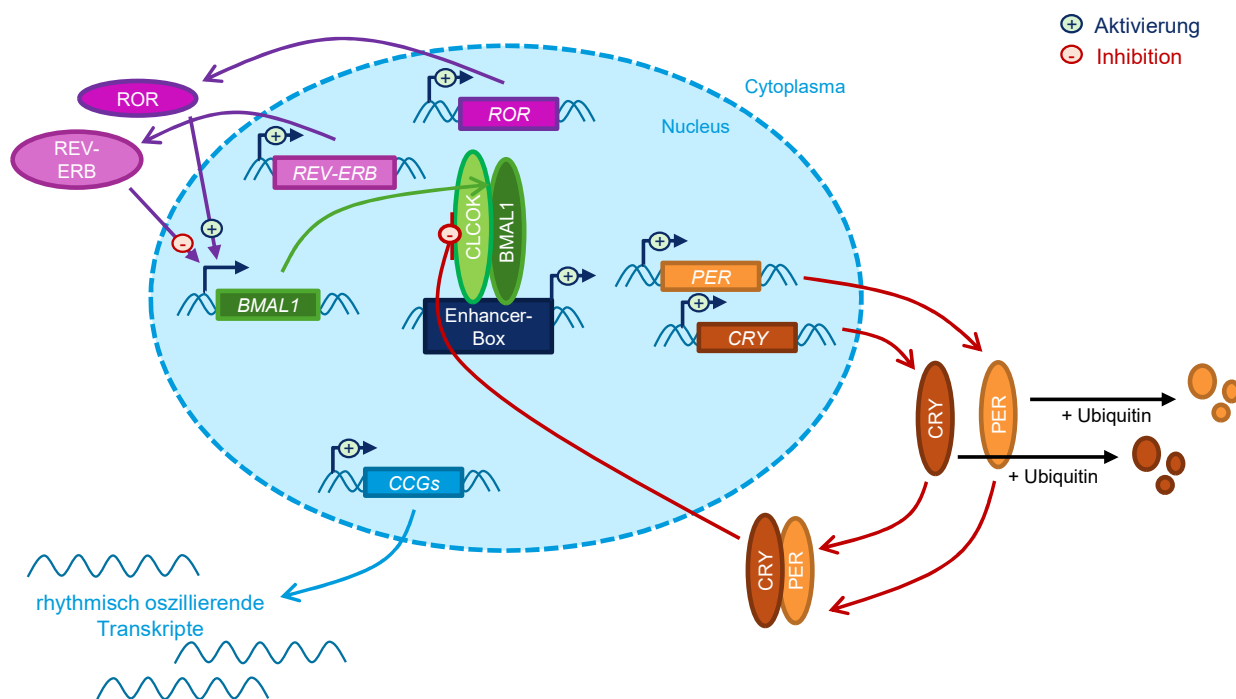


Abbildung 5: Schematische Darstellung der regulatorischen Uhren-Gen-Rückkopplungs-Schleife

Die Abbildung stellt schematisch die wichtigsten Komponenten der zentralen Rückkopplungsschleife bestehend aus Aktivatoren (grün) und Repressoren (orange), sowie der stabilisierenden Rückkopplungsschleife (violett) dar. Durch diese Rückkopplungsschleifen wird die rhythmisch oszillierende Expression der Uhren-kontrollierten Gene (CCGs) reguliert. Darstellung abgewandelt aus [112].

1.5.4 Bedeutung diurnaler Rhythmen für die medizinische Forschung und Anwendung

Die Erforschung diurnal rhythmischer Prozesse ist von großer Bedeutung für die Humanmedizin. Viele Krankheitsbilder stehen direkt oder indirekt im Zusammenhang mit der inneren Uhr: So können zum Beispiel pathologische Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus, wie das verzögerte Schlafphase-

Syndrom durch Mutationen in Uhren-Genen ausgelöst werden [120,121]. Ein direkter Zusammenhang konnte auch zwischen circadianen Störungen und pathologischen Veränderungen des Stoffwechsels, der eng an die inneren Uhren gekoppelt ist, festgestellt werden [122]: Ein verschobener Rhythmus der Nahrungsaufnahmezeiten zum Beispiel (wie häufig zu beobachten bei Schichtarbeitern) geht mit einem erhöhten Risiko für metabolische Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes einher [122]. Auch die Aktivität des Immunsystems unterliegt diurnalen Schwankungen. So konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Effektivität der Immunantwort bei der Abwehr von Pathogenen unter anderem von der Tageszeit der Infektion abhängt [120,123,124]. Weiterhin spielen circadiane/diurnale Rhythmen eine Bedeutung bei Krankheitsbildern wie kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs, neurologischen Erkrankungen und psychischen Krankheitsbildern [114,120,125].

Die Beziehung zwischen der inneren Uhr und assoziierten Krankheitsbildern ist bidirektional, wobei die Disruption diurnaler Rhythmen das Risiko für bestimmte Krankheitsbilder erhöht, andere Erkrankungen eine Störung der diurnalen Rhythmik verursachen und in vielen Fällen ein komplexes Zusammenspiel beider Prozesse anzunehmen ist [114,126].

Chronobiologische Erkenntnisse sind auch für die Therapien vieler Krankheitsbilder von Bedeutung. So kann die Effizienz bestimmter Medikamente durch die Einnahme zu bestimmten Tageszeiten gesteigert werden oder die Therapie bestimmter Krankheitsbilder durch das Aufrechterhalten stabiler diurnaler Rhythmen unterstützt werden [125,127]. Zum Beispiel zeigte eine Untersuchung, dass die Verträglichkeit von Chemotherapeutika wie Oxaliplatin und 5-Fluorouracil–Leucovorin durch die Gabe zu definierten Tageszeiten verbessert wird [128].

1.6 Bedeutung diurnaler Rhythmen für die forensische Forschung und Anwendung

Die geschilderten Erkenntnisse aus der Chronobiologie legen nahe, dass in menschlichen Körperflüssigkeiten und Geweben Tageszeitinformation enthalten ist. In der forensischen Fallarbeit kann Tageszeitinformation von essenzieller Bedeutung für die evidenzbasierte Rekonstruktion eines (Tathergangs-)Geschehens sein. Während der polizeilichen Ermittlungsarbeit kann Tageszeitinformation „investigativ“ [129] genutzt werden, um zum Beispiel nähere Informationen darüber zu erhalten, zu welcher Tageszeit eine Tat stattgefunden hat (sofern eine bestimmte biologische Spur sicher der Tat zuzuordnen ist) bzw. ob eine bestimmte biologische Spur für das Tatgeschehen von Bedeutung ist (sofern der Tageszeitpunkt des Tatgeschehens bekannt ist). Zudem kann die Tageszeitinformation auch „evaluativ“ [129] von Bedeutung sein, wenn zum Beispiel geprüft werden soll, ob eine bestimmte Person zur Tatzeit am Tatort gewesen sein kann oder ob eine einer bestimmten Person zuzuordnende Spur zu einer anderen als der bekannten Tatzeit entstanden ist. Für diesen Anwendungsfall wurde von Lech et al. [130] der Begriff „*molecular alibi testing*“ (dt.: molekulare Überprüfung des Alibis) geprägt.

Die Möglichkeit der Untersuchung chronobiologischer Marker zur Feststellung der Tageszeit in forensischen Szenarien wurde zum ersten Mal im Jahr 1994 von Mikami et al. [131] evaluiert: In dieser Studie konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen der Todeszeit und den Melatonin-Konzentrationen in Epiphyse, Serum- und Urin-Proben verstorbener Personen feststellen. Melatonin, gemeinsam mit Kortisol, einem zweiten gut charakterisierten, circadian oszillierend ausgeschütteten Hormon, ist auch in der ersten Forschungsarbeit zur Schätzung der Spurendepositionstageszeit aus dem Jahr 2010 als Biomarker untersucht worden [132]. Dabei konnten mit der Tageszeit oszillierende Konzentrationen beider Hormone in Blutproben nachgewiesen werden; es zeigte sich jedoch, dass die Konzentration von Kortisol in getrockneten Blutspuren über die Zeit nicht stabil ist [132]. Zudem konnte eine Disruption der circadianen Rhythmik von Melatonin und/oder Kortisol unter verschiedenen Einflussfaktoren (z.B. Licht [133], Stress [134]) beobachtet werden, weshalb die Identifikation weiterer Tageszeit-Biomarker von Interesse war [130].

Kimura et al. stellten fest, dass das Verhältnis der Transkriptmengen der bekannten Uhren-Gene *mPER2* und *mBMAL1* in verschiedenen Mausgeweben mit dem Zeitpunkt des Versterbens korreliert, während in menschlichen Geweben (Niere, Leber und Herz, entnommen im Rahmen von Autopsien) vor allem das Mengenverhältnis der Transkripte von *hREV-ERBα* (alternative Bezeichnung: *hNR1D1*) und *hBMAL1* als Indikator für den Versterbenszeitpunkt festzustellen war [135]. Diese Beobachtung wurde im Jahr 2023 in einem umfangreichen Kollektiv von 318 im Rahmen von Autopsien entnommenen Herzwegewebebeurproben bestätigt [136]. Neben den beschriebenen Uhrengen-mRNAs zeigten auch miRNA-Marker (miR-142-p und miR-541) in einer Machbarkeitsstudie aus dem Jahr 2012 signifikante Expressionsunterschiede zwischen Proben von Glaskörperflüssigkeit von am Tag und in der Nacht verstorbenen Personen [137].

Während die Expression derselben miRNA-Kandidaten keinen Zusammenhang mit dem Entnahmetageszeitpunkt von Blutproben zeigte [138], konnten Lech et al. 2016 unter 21 untersuchten Kandidaten elf mRNA-Marker identifizieren, deren Expression in Blutproben von zwölf männlichen Probanden mit der Tageszeit der Entnahme korreliert [130]. Auf Basis der Expression dieser mRNA-Marker (allein oder in Kombination mit den hormonellen Markern Melatonin und Kortisol) konnten die Autoren ein multinomiales logistisches Regression einsetzendes Schätzmodell entwickeln, mit Hilfe dessen die Proben mit AUC-Werten (*Area Under the Curve*, dt.: „Fläche unter der Kurve“) von 0,75 bis 0,95 korrekt einer der drei Tageszeitkategorien „Nacht/früher Morgen“ (23:00 Uhr – 06:59 Uhr), „Morgen/Mittag“ (07:00 Uhr – 14:59 Uhr) oder „Nachmittag/Nacht“ (15:00 Uhr bis 22:59 Uhr) zugeordnet werden konnten. Das Modell, in dem Transkript- und Hormon-Mengen berücksichtigt wurden, erzielte dabei genauere Schätzungen als die Modelle, in denen Transkript- oder Hormonmengen jeweils allein berücksichtigt worden waren [130]. Eine weitere Verbesserung des Schätzmodells (mit AUC-Werten von 0,85 – 0,96) erreichten die Autoren in einer Folgestudie durch die

kombinierte Analyse und Modellierung von Hormonen, mRNA und Metaboliten [139]. Seitdem wurden lediglich zwei weitere Studien zur mRNA-basierten Schätzung des Tagesdepositionszeitpunkts von Blutspuren veröffentlicht [140,141]. (Darüber hinaus veröffentlichte Studien zur forensischen Depositionszeitpunktsschätzung anderer Körperflüssigkeiten als Blut sind hier zum Zeitpunkt der Niederschrift nicht bekannt.) Kirk et al. evaluierten erstmals die Expression von mRNA-Kandidaten zur Tageszeitpunktsschätzung in getrockneten (und damit forensisch relevanten) Blutspuren. Unter zehn untersuchten Kandidaten konnten die Autoren jedoch lediglich ein Transkript identifizieren (*PER3*), dessen Menge, zumindest bei weiblichen Probandinnen, signifikant mit der Tageszeit korreliert [140]. Einschränkend ist dabei jedoch der geringe Probenumfang (je vier weibliche und vier männliche Probanden) zu nennen. Die Autoren heben hervor, dass besser geeignete Kandidaten im Rahmen von Gesamttranskriptomsequenzierungen identifiziert werden könnten [140]. Zuletzt haben Cheng et al. [141] die Expression von sieben mRNA-Kandidaten in getrockneten Blutspuren untersucht, von denen vier (*THRA*, *SREBF1*, *MKNK2* und *STAT3*) als signifikant rhythmisch eingestuft wurden. Auf Basis der Expression dieser mRNA-Marker haben die Autoren verschiedene statistische Modelle zur Tageszeitpunktsschätzung entwickelt und verglichen. Die besten Ergebnisse lieferte dabei der *k-Nearest-Neighbour-Algorithmus* (dt.: „k-Nächster-Nachbar“), mit dem ein RMSE (*root mean squared error*, dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme) von 5,98 Stunden und ein mittlerer absoluter Schätzfehler von 3,92 Stunden erzielt wurde.

Allen drei Studien [130,140,141] ist gemein, dass (eingeschränkt durch die Verwendung von qPCR zur Genexpressionsquantifizierung) nur wenige, vorselektierte Markerkandidaten untersucht wurden. Zusammengenommen ergeben die 21 [130], zehn [140] bzw. sieben [141] untersuchten Kandidaten insgesamt 24 unterschiedliche mRNA-Marker, die bislang auf ihre Eignung zur forensischen Tageszeitschätzung experimentell geprüft worden sind (darunter neun ausschließlich in flüssigem Blut [130]). Die Auswahl der Kandidaten erfolgte zudem auf Basis publizierter Studien, die häufig unter stark kontrollierten Bedingungen, sogenannten „*constant routine*“ (dt.: konstante Routinen), durchgeführt werden und somit die Bedingungen, unter denen forensisch relevante Aktivitäten typischerweise stattfinden, nur begrenzt abbilden.

Daraus ergibt sich, dass die für die forensische Anwendung am besten geeigneten, d.h. unter forensisch realistischen Bedingungen am stärksten mit der Tageszeit korrelierenden RNA-Marker, möglicherweise bislang nicht identifiziert oder nur unzureichend charakterisiert worden sind. Es erscheint somit plausibel, dass neue, in einem unvoreingenommenen Ansatz identifizierte Markerkandidaten die Depositionszeitpunktsschätzungen forensisch relevanter biologischer Spuren verbessern können.

2. Ziele dieser Arbeit

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu erforschen, ob eine auf der Messung der differentiellen und mit der Tageszeit schwankenden Expression von mRNA-Markern basierende Methode zur Schätzung des Depositionstageszeitpunkts forensisch relevanter Blut- und Speichelspuren entwickelt werden kann.

Dazu sollten wesentliche Limitationen bisheriger Arbeiten auf diesem Gebiet durch einen unvoreingenommenen Marker-Identifizierungsansatz mittels Gesamttranskriptomsequenzierung vermieden werden. Auf diese Weise identifizierte Marker sollten anschließend in einem unabhängigen Probensatz mit einer unabhängigen Messmethode validiert werden. Unter Verwendung eines ausreichend großen und forensisch relevante Bedingungen abbildenden Probenkollektivs sollten sodann verschiedene statistische Modelle zur Schätzung der Tageszeit basierend auf Genexpressionsmessdaten etabliert und miteinander verglichen werden. Um eine ausreichend hohe Markerzahl für die Bildung robuster Modelle berücksichtigen zu können, sollte für diesen Schritt mittels gezielter RNA-Sequenzierung als das am besten geeignete Genexpressionsquantifizierungsverfahren erfolgen.

Da zur Erreichung dieses Projektziels der Einsatz moderner und in der forensischen Molekularbiologie bislang kaum etablierter Analysemethoden, nämlich der Gesamttranskriptomsequenzierung und der gezielten RNA-Sequenzierung, erforderlich war, bestand ein weiteres Projektziel darin, zu einem verbesserten Verständnis dieser Analysemethoden und ihrer Einsatzmöglichkeiten im Gebiet der forensischen Molekularbiologie beizutragen.

3. Publikationen/Manuskripte dieser Arbeit

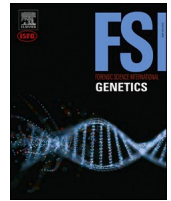
3.1 Publikation 1: Identifizierung von RNA-Markern zur Schätzung der Depositionstageszeit einer Blutspur

Einleitung

Der Zeitpunkt der Entstehung einer biologischen (Tatort-)Spur stellt einen wichtigen Spurenkontextualisierungsaspekt dar, dessen Kenntnis zu einer objektiveren Rekonstruktion forensisch relevanter (Tat-)Abläufe beitragen kann. In der humanbiologischen Forschung wurde die Erkenntnis gewonnen, dass die „innere Uhr“ des menschlichen Körpers in den peripheren Geweben durch mit der Tageszeit rhythmisch oszillierende Genexpression reguliert wird [112,113]. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Tageszeitinformation auch in von Tatorten gesichertem, biologischen Spurenmaterial enthalten sein kann. Erste forensisch orientierte Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass eine diurnal rhythmische Oszillation verschiedener, mit der inneren Uhr assoziierter Transkripte in peripherem, sowohl flüssigem als auch getrocknetem Blut nachweisbar ist [130,140,141]. Die Selektion der bislang in ihrer Anzahl begrenzten untersuchten Marker erfolgte auf Basis publizierter humanbiologischer und medizinischer Studien. Da diese Studien jedoch häufig unter stark kontrollierten [142] – und somit die an einem Tatort zu erwartenden Umstände nur sehr bedingt widerspiegelnden Bedingungen – durchgeführt wurden, ist anzunehmen, dass für eine forensische Depositionstageszeitbestimmung am besten geeignete Marker bislang nicht untersucht wurden.

Ziel der nachfolgend aufgeführten Publikation war es daher, geeignete Marker in einem unvoreingenommenen Ansatz zu identifizieren. Dazu sollte für zu verschiedenen Tageszeiten entnommene Proben eine Sequenzierung des gesamten Transkriptoms erfolgen und anhand des resultierenden Datensatzes diejenigen RNA-Marker selektiert werden, die die stärksten und stabilsten Expressionsunterschiede über den Tag aufweisen.

Biologische Studien legen nahe, dass sich die mit der Tageszeit oszillierende Expression von Transkripten zwischen verschiedenen Geweben unterscheidet [117]. Aus diesem Grund sollte die Selektion geeigneter Marker zunächst auf die beiden häufig auftretenden, forensisch relevanten und verhältnismäßig einfach zu gewinnenden biologischen Körperflüssigkeiten Blut und Speichel beschränkt werden. Aufgrund der großen Unterschiede, die bei der Sequenzierung der beiden unterschiedlichen Probenarten zu beobachten waren, wurden die Ergebnisse separat analysiert und veröffentlicht. Es folgt zunächst die Darstellung der Ergebnisse aus der Körperflüssigkeit Blut (Publikation 1) und im Anschluss die Darstellung der Ergebnisse für die Körperflüssigkeit Speichel (Publikation 2).



TrACES of time: Transcriptomic analyses for the contextualization of evidential stains – Identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain deposition

A. Gosch^a, A. Bhardwaj^b, C. Courts^{a,*}

^a Institute of Legal Medicine, Medical Faculty, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

^b Institute of Clinical Molecular Biology, University of Kiel, Kiel, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Time of deposition
Diurnal gene expression
Forensic RNA analysis
Trace contextualization

ABSTRACT

Obtaining forensically relevant information beyond who deposited a biological stain on how and under which circumstances it was deposited is a question of increasing importance in forensic molecular biology. In the past few years, several studies have been produced on the potential of gene expression analysis to deliver relevant contextualizing information, e.g. on nature and condition of a stain as well as aspects of stain deposition timing. However, previous attempts to predict the time-of-day of sample deposition were all based on and thus limited by previously described diurnal oscillators. Herein, we newly approached this goal by applying current sequencing technologies and statistical methods to identify novel candidate markers for forensic time-of-day predictions from whole transcriptome analyses. To this purpose, we collected whole blood samples from ten individuals at eight different time points throughout the day, performed whole transcriptome sequencing and applied biostatistical algorithms to identify 81 mRNA markers with significantly differential expression as candidates to predict the time of day. In addition, we performed qPCR analysis to assess the characteristics of a subset of 13 candidate predictors in dried and aged blood stains. While we demonstrated the general possibility of using the selected candidate markers to predict time-of-day of sample deposition, we also observed notable variation between different donors and storage conditions, highlighting the relevance of employing accurate quantification methods in combination with robust normalization procedures. This study's results are foundational and may be built upon when developing a targeted assay for time-of-day predictions from forensic blood samples in the future.

1. Introduction

In forensic molecular biology, analytic methods and techniques are routinely applied to identify the donor(s) of forensically relevant biological traces. However, knowing who deposited a biological trace will oftentimes be insufficient to reconstruct the true course of events having unfolded at a crime scene. Thus, in recent years, methodologies to obtain further knowledge regarding the circumstances of biological trace deposition have increasingly been investigated.

The transcriptome of the cells in biological material and fluids is highly dynamic and comprises a complex body of information on their origin, composition and condition. Hence, forensic transcriptomic analyses have become increasingly relevant over the past few years [1]. The identification of body fluids and/or organ tissues via the analysis of

differentially and tissue-/fluid-type specifically expressed transcripts is applied as a routine analysis procedure in forensic genetic laboratories worldwide [2]. At the same time, several research projects explore the potential of transcriptomic analyses to help answer further questions of forensic relevance [1], e.g. as to the age of a stain (i.e. time since deposition) [3–5] or the post-mortem-interval (PMI) [6,7].

Analogous to approaches that assess the time elapsed *since* deposition, the time-of-day *at* deposition also represents relevant contextual information which might further support an evidence-based reconstruction of the course of events that had occurred at a crime scene. For example, knowing whether an offender's blood trace was left at a scene of crime in the morning rather than late in the afternoon or at night might reduce the number of suspects to individuals with access to the scene of crime within that time frame and thus help to direct and

* Corresponding author.

E-mail address: forensische.genetik@gmail.com (C. Courts).

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102915>

Received 26 January 2023; Received in revised form 20 July 2023; Accepted 1 August 2023

Available online 3 August 2023

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

prioritize investigations.

Mechanisms regulating an organism's "inner clock" are evolutionary conserved across species and have been subject of biological research for several decades [8]. In mammals, the circadian cycle of the "inner clock" is maintained by a cell-autonomous feedback-loop producing robust 24 h rhythms in peripheral tissues. These peripheral clocks are regulated in a hierarchical manner by a "master clock", a set of neurons located in the supra-chiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. The "master clock" synchronizes the peripheral clocks to each other as well as to the external "solar" day (e.g. by retrieving "light" information from the retina) via the secretion of hormones, other metabolic cues or systemic adjustments (e.g. body temperature) [9]. The circadian rhythms in peripheral tissues are coordinated by an activator/repressor feedback loop involving four central clock proteins CLOCK, BMAL1, PER and CRY [9]. This clock complex regulates the transcription of "clock-controlled" genes resulting in a number of cellular mechanisms and organ-specific functions showing circadian oscillations [10]. These circadian oscillations are "self-sustained", meaning that while being synchronized to external stimuli, they have been shown to continue cycling in the absence of any such time cues under laboratory conditions [8]. Per this definition, a "diurnal" rhythm (i.e. a cyclic pattern with a period of 24 h) can only be labelled "circadian" once it has been experimentally shown to continue cycling in the absence of external cues and thus does not merely represent a reaction to rhythmic environmental changes [8]. Experiments studying circadian rhythmicity are thus commonly performed under "constant routine" laboratory conditions, which aim at reducing the impact of any external time cues by keeping factors such as light and temperature constant and distributing sleep and food uptake evenly [11]. In a "constant routine" study performed with mice, researchers observed that 43% of all protein-coding genes exhibited circadian oscillations, most of them in a tissue-specific manner, thus highlighting the critical role of these regulatory mechanisms [12]. More recently, the topic of chronobiology has also received attention in biomedical research, where it has been discovered that several diseases such as sleep disorders, metabolic diseases as well as certain types of cancer are associated with a disruption of chronobiological mechanisms, or that several medications can be more potent when administered at a certain circadian time (cf. e.g. [13–15] for review of recent findings and current knowledge).

Knowledge of these principles of chronobiology has first been tested for application in a forensic setting in a study from 1994 with the aim to estimate the time-of-day of death by quantifying levels of melatonin in human corpses [16]. The same hormonal biomarker, melatonin, in addition to a second well-studied hormonal marker with circadian oscillation, cortisol, was also first utilized to predict¹ the time of day of stain deposition in a study in 2010 [22]. However, besides providing only limited time-of-day resolution with large intervals, the hormonal biomarkers analyzed in this study are known to be affected by external and internal factors such as light or certain diseases [19,22]. Additionally, the authors observed that while melatonin levels seemed to remain

stable in stored blood stains (within the tested storage period of four weeks), cortisol levels decreased with storage time in dried blood stains [22]. Due to the limitations of assaying hormonal biomarkers, the authors decided to include a different type and a larger number of rhythmic biomarkers in their analysis. In a study in 2016, they tested the diurnal expression of 21 candidate mRNA markers and in a time prediction model applying multinomial logistic regression showed that including three mRNA markers combined with the hormonal biomarkers improved prediction performance compared to predictions based on hormonal biomarkers alone. The model trained to differentiate between the three broad categories "morning/noon", "afternoon/evening" and "night/early morning" produced AUCs (Area Under the Curve) ranging from 0.88 to 0.95. A prediction model based on six mRNA markers alone did not outperform the model combining hormonal and mRNA predictors [19]. However, in their study, the authors tested 21 mRNA markers which had been selected based on previously published findings [19]. It is conceivable that the number of markers in their model is too limited and that more suitable markers for time-of-day predictions for forensic stains might have been missed by their approach. More recently, Kirk et al. [23] performed a small scale study to assess whether patterns of diurnal rhythmicity were detectable in dried blood stains. Out of ten diurnal markers (selected from literature), Kirk et al. found only one (PER3) to exhibit significantly differential gene expression at different times of the day in blood stains deposited by female subjects. The authors conclude their study by suggesting that whole transcriptome sequencing of blood samples obtained at different times of a day might identify more suitable candidate time-of-day prediction markers [23].

Herein, we thus intend to newly approach the goal of forensic time-of-day predictions from a broader perspective. To this purpose, in a first step we performed unbiased whole-transcriptome sequencing of a sample set collected from individuals having spent their day under uncontrolled, forensically relevant conditions. As circadian oscillations of RNA markers have previously been described as tissue-specific [12], we focus our efforts on the identification of suitable predictors from human whole blood. In a second step, we assessed whether these diurnal oscillators are generally suitable for time-of-day predictions in forensic stain types by assessing their robustness in dried and aged blood stains.

2. Material and Methods

2.1. Marker identification (Whole transcriptome sequencing)

2.1.1. Sample donors and sampling procedures

Blood samples were obtained from ten healthy volunteers (five males, five females; median age: 26.5 years, range: 19–31 years). Donors with any known conditions or reporting to take medication potentially effecting regular sleep-wake cycles were excluded from the study (Exclusion criteria: Irregular sleep-wake-rhythms (e.g. jet-lag, shift-work), diagnosed sleeping disorders, extreme chronotypes (scores of ≤ 30 or ≥ 70 in the German version of the Horne-Östberg-Morningness-Eveningness-Questionnaire D-MEQ [24] pregnancy or lactation, diseases of inner organs or the hematopoietic system (current or within the last five years), use of medication such as hormone preparations (excl. birth control pills), immunosuppressants, antidepressants and blood thinners (current or within the last year)).

Collection was performed at eight specified time points (8AM, 11AM, 2PM, 5PM, 8PM, 11PM, 2AM, 5AM) over the course of an entire day. Donors refrained from the intake of alcohol and other drugs for a minimum of 24 h prior to the collection of the first sample as well as on the entire day of sample collection and did not sleep between the first (8AM) and last time point of sample collection (5AM), but otherwise pursued regular every-day activities. Donors self-collected blood samples via fingerprick, with 28 G SafetyLancets (MyLife, Ningbo Medsun Medical Co., Zhenhai, Ningbo, China, Ref. 7100031) and untreated "neutral" Minivettes (Sarstedt, Nürmbrecht, Germany, Cat. No. 17.2111.100) to

¹ Please note: The word "predict" in its original sense refers to obtaining information on how likely something is going to happen *in the future* and thus it has been advised to avoid this term when referring to events that happened *in the past* [17] (as would apply here: stain deposition has already happened at a certain time-of-day when statistical calculations are performed). However, in a broader sense, the term "predict" is also used to describe the process of obtaining information on an unknown value of a variable from the known value of (an)other variable(s). It is commonly used in publications analyzing circadian time/time-of-day of samples previously taken/deposited [18,19] and other characteristics/aspects, such as human appearance [20] or cellular origin [21] that have to be considered as already determined and hence not as future emergences. To avoid confusion when referring to these previous works, we have decided to also use the term "predict" in its broader sense, but point out to readers that usage of the term in this work does not imply reference to a future event.

ensure collection of constant sample volumes of 100 μ l (cf. Supp. Fig. 1 for a detailed description of the sampling procedure). To preserve the transcriptome in its state at the time of sampling, samples were immediately added to 200 μ l Tempus™ RNA Blood stabilization solution (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. 4342792) and stored frozen until further processing.

2.1.2. RNA isolation and quantification

Total RNA was extracted using the “Preserved Blood RNA Purification Kit I (for use with Tempus Blood RNA tubes)” (Norgen, Thorold, Canada, Cat. No. 43400) according to a modified version of the manufacturer’s instructions in which the amount of Tempus Blood RNA Tube Diluent was downscaled to a sample volume of 100 μ l blood and 200 μ l Tempus™ RNA Blood stabilization solution. The RNA was finally eluted in a volume of 30 μ l Elution Solution and residual genomic DNA was

removed by treatment with the TURBO DNase free kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. AM1907). RNA yields were quantified fluorometrically using the Qubit RNA HS Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. Q32855) on a Qubit 2.0 device (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and RNA Integrity Numbers (RIN) were determined with the RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA, Cat. No. 5067–1513) on a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). RNA concentrations ranged from 12.8 to 32.9 ng/ μ l (average: 21.7 ng/ μ l) and RIN values from 6.4 to 9.4 (average: 8.3).

2.1.3. Library preparation and whole transcriptome sequencing

Library preparation and whole transcriptome sequencing were performed at the Competence Centre for Genomic Analyses in Kiel, Germany. Library preparation including rRNA removal was performed applying

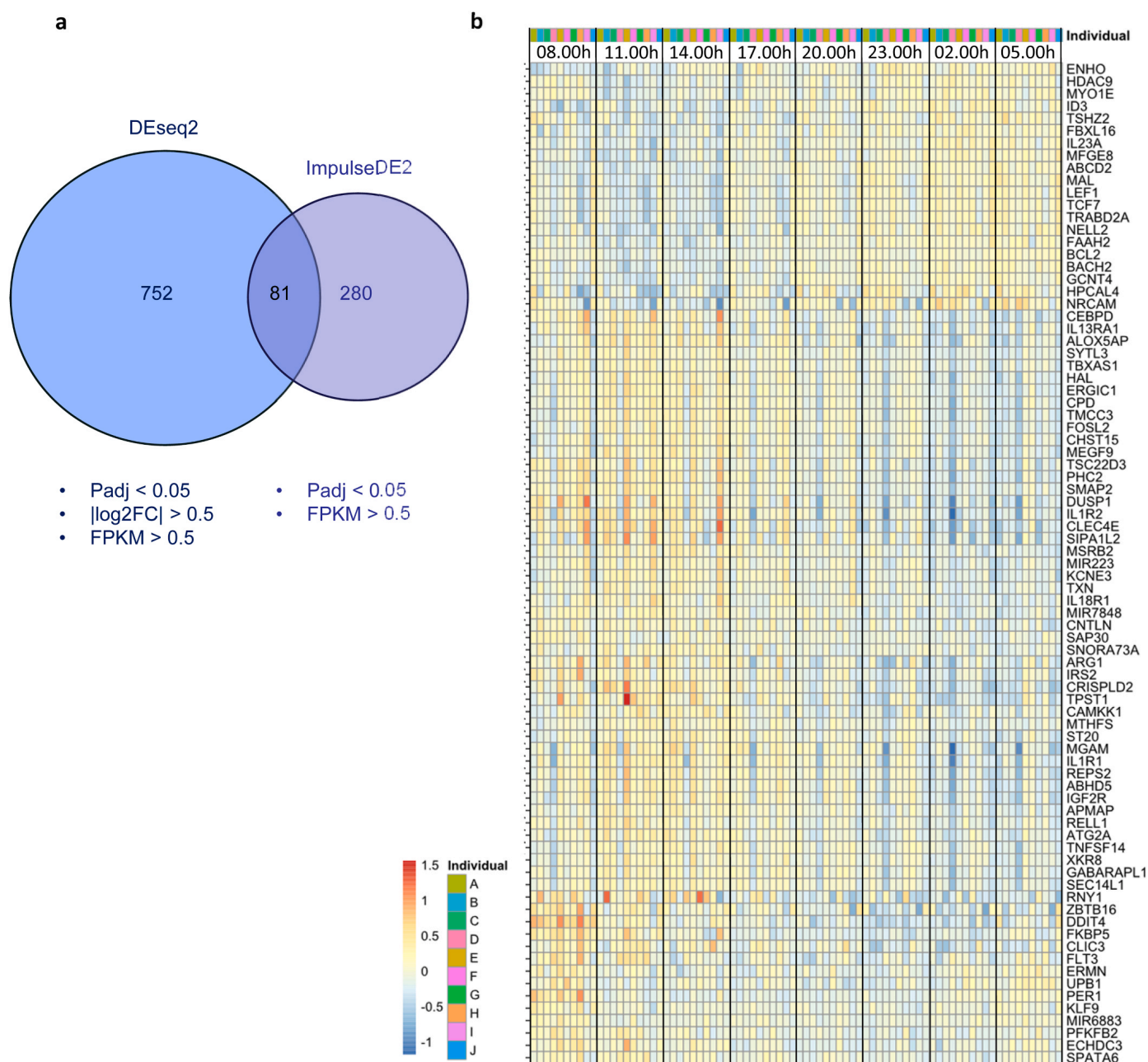


Fig. 1. Selection of candidate time of day prediction markers. a: VennDiagram showing the number of markers identified as significantly differentially expressed by each biostatistical algorithm and the application of filtering criteria. b: Heatmap showing rlog-transformed gene expression change per sample compared to the total expression mean over all 80 samples for each of the 81 differentially expressed candidate genes (male donors: A,B,D,G,H; female donors: C,E,F, I,J).

the Stranded total RNA with RiboZero Plus protocol (Illumina, California, USA, Cat. No.: 20037135). Libraries were then sequenced on a NovaSeq S4 instrument (2×100bp, 30 Mio. Reads/Sample).

2.1.4. Bioinformatic processing of sequencing data

FastQC v0.11.9 [25] was used to analyze the quality score of the RNASeq sequencing reads. Poor-quality and adapter bases were trimmed from the sequencing reads by the Trim Galore pipeline (v0.6.7) [26] which employs Cutadapt v3.4 [27] to remove adapter bases. Filtered high quality paired end reads were aligned against the reference genome (GRCh38) using STAR method v2.6.1d [28] under default parameters. Gene counts were estimated with featureCounts v1.5.2 [29].

Raw and processed sequencing data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [30] and are accessible through GEO series accession number GSE223613 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE223613>).

2.1.5. Biostatistical analysis

All biostatistical analysis steps were performed in R (version 3.5.0 for ImpulseDE2 analysis and version 4.1.1 for all other analyses).

2.1.5.1. Identification of differentially expressed genes. We first sought to identify markers exhibiting significant expression differences over the course of the day. For this purpose, we applied two different biostatistical analysis pipelines for the identification of differentially expressed RNA: DEseq2 [31] and ImpulseDE2 [32].

DEseq2 is a static differential expression algorithm, which identifies differentially expressed genes by pairwise comparison of gene expression under different conditions. DEseq2 was chosen as it is a commonly used and well established analysis pipeline which showed good and consistent performance in comparative evaluations on static [33] as well as on time-course datasets [34]. Differential expression analysis was performed using the DEseq2 R package (version 1.34.0). A DEseq2 object was generated from the read count matrix obtained in 2.1.4, a metafile providing sample information (sampled individual and condition (i.e., sampling time)) and the experimental design provided as *design* = ~Individual + Condition. Differential gene expression analysis was performed by calling the *DEseq* function and results (including p-values, adjusted p-values (Benjamini-Hochberg-(BH)-correction for multiple testing) and estimated log₂FoldChanges for pairwise comparisons) were obtained by calling the *results* function. RNA markers showing values of $p_{adj} < 0.05$ and $|\log_2FC| > 0.5$ for at least one pairwise comparison were considered significantly differentially expressed.

ImpulseDE2 uses an Impulse-model to identify permanent or transient changes in gene expression in longitudinal data [32] and was chosen due to its robust performance [34]. ImpulseDE2 analysis was performed using the *ImpulseDE2* R package (version 1.6.1) selecting the CASE-ONLY analysis settings [32]. To account for the cyclic nature of the time of the day ImpulseDE2 analysis was run in eight iterations, each starting at a different timepoint throughout the day. RNA markers producing values of $p_{adj} < 0.05$ for at least one of these analyses were considered significantly differentially expressed.

2.1.5.2. Setting a low expression gene filter threshold. For the envisioned time-of-day prediction model, candidate predictors will have to be detectable in a reliable manner even in low template/low quality forensic stains so we removed “low expression” genes, likely to be undetectable in forensic type stains, from our set of candidate predictors. To our knowledge, a consensus approach on how to set such a threshold does not exist. Thus we followed a procedure suggested by Hebenstreit et al. [35], according to which plotting a distribution of observed log₂(Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads (RPKM)) values results in a bimodal distribution, in which the peak of lower RPKM values corresponds to “low expression” genes and the peak of higher RPKM values represents “high expression” genes. We thus

calculated FPKM (Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments) normalized read counts using the *FPKM* function from the DEseq2 R package and chose to apply a threshold of 0.5 FPKM (approximately representing the antimode to the bimodal distribution in our dataset (cf. Supp. Fig. 2) to filter out low expression genes. To avoid that this approach would filter out candidates with a high peak of gene expression at a single time point and very low expression values at any other time point (resulting in a low average FPKM), we closely inspected each marker identified as significantly differentially expressed by DEseq2 ($p_{adj} < 0.05$ and $|\log_2FC| > 0.5$) as well as ImpulseDE2 ($p_{adj} < 0.05$) with a mean FPKM < 0.5. However, we did not observe such expression patterns among the inspected markers and thus proceeded to set our low expression filter based on mean FPKM.

2.1.5.3. Functional analysis of differentially expressed genes. For functional analysis of differentially expressed genes, the R package clusterProfiler v4.2.2 [36] was used for gene ontology (GO) enrichment analysis with a threshold of adjusted p-value < 0.05.

2.1.5.4. Predicting the time of day. To predict the time of day based on gene expression data, we applied the TimeSignatR algorithm published by Braun et al. [18]. Briefly summarized, in this algorithm, the time of day is transformed to cartesian coordinates representing the angle corresponding to the hour hand of a 24 h-clock. The algorithm then fits a bivariate model to predict thus transformed time coordinates based on gene expression data. Model fitting makes use of elastic net regularization to obtain the most accurate model and at the same time reduce the number of predictors retained in the model [18]. The TimeSignatR algorithm can thus be used to assess how well time-of-day may be predicted based on gene expression data and additionally allows to identify a subset of markers for most robust time-of-day prediction.

Different data(sub)sets were used for training and testing the predictor: Training was performed on either the entire dataset or a random selection of seven out of ten individuals analyzed in this study (read count matrix described in 2.1.4) and testing was performed on either the remaining three individuals not used for training (read count matrix described in 2.1.4) or on the RNA-seq dataset described in [18] (blood samples obtained from 11 individuals under laboratory-controlled conditions, two-hourly samples resulting in a total of 153 samples). Processed RNA sequencing data were obtained from the NCBI GEO database [30] (accession no. GSE113883).

The TimeSignatR algorithm was performed as described in [18] with the original R code available at <https://github.com/-braunr/TimeSignatR>. Briefly, input datasets were first log-transformed (using the *rlog*-transformation provided within the DEseq2 package for our own dataset or log₂(TPM+1) for the dataset published in [18]) followed by within-subject renormalization (i.e. normalizing gene expression to the expression mean per gene per individual). As performed in [18], for the test set only, the expression per gene used for renormalization was calculated based on only two antipodal samples. The parameters alpha and lambda were chosen based on 10-fold cross-validation within each individual training set. A predictor was then trained for each training set which was subsequently tested on the corresponding test set. To assess the predictors' performances, *Area Under the Curve* (AUC) values and median absolute errors (med. abs. err.) were calculated as described in [18] from predictions obtained from the test set only.

When repeating analyses for a combination of training and test set, some run-to-run variation is expected due to random selection steps (during random subsampling of training and test set and cross-validation). Runs were thus repeated 15 times and performance measurements averaged across all runs.

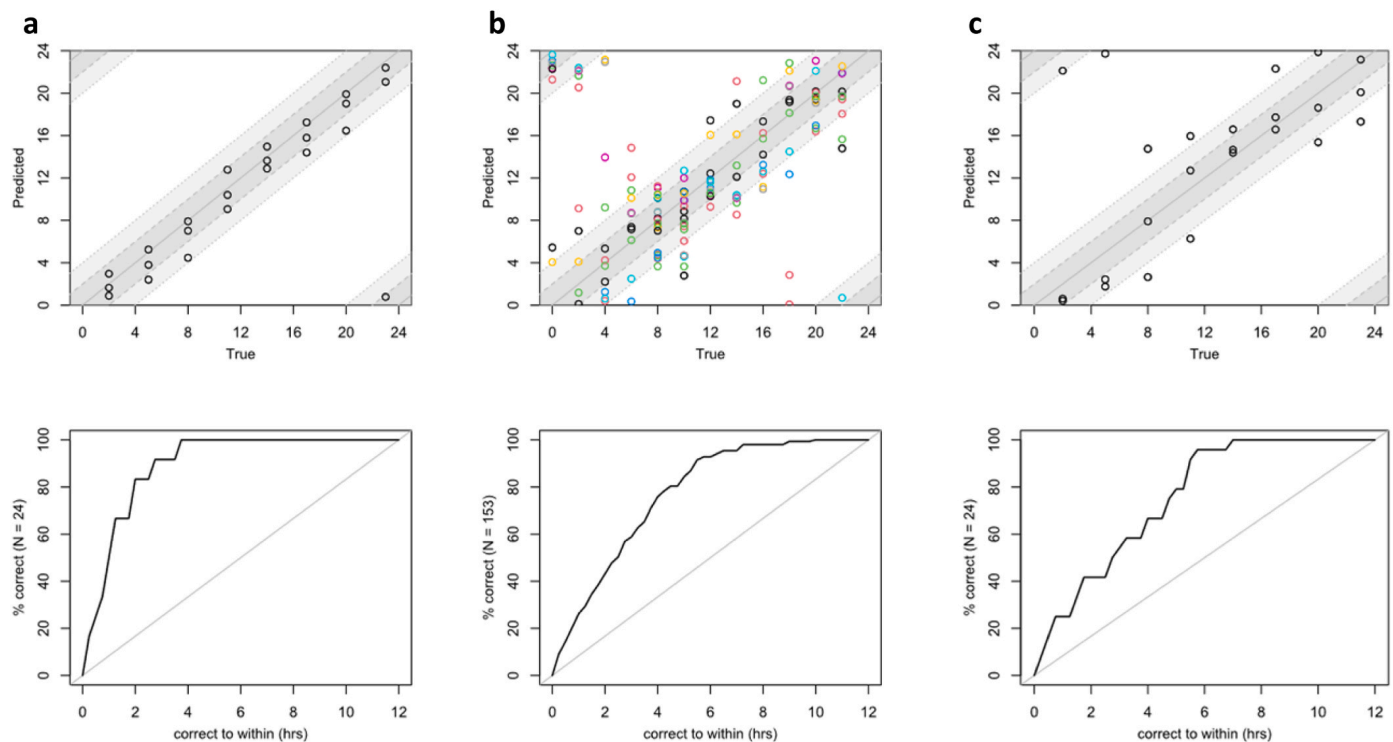


Fig. 2. Time of day Predictions obtained with the TimeSignalR algorithm. TimeSignalR predictions were repeated 15 times for each condition, results of a representative run are shown above. Figures represent predictions obtained for the respective training sets only. **Top row:** Predicted times plotted against true times; area shaded in dark grey represents predictions correct to within two hours of true time, area shaded in light grey represents predictions correct to within 4 h of true time. **Bottom row:** Cumulative distribute function for time of day predictions. **a:** Training set: Random subset of seven individuals (56 samples) from dataset obtained in this study – Test set: Random subset of three individuals (24 samples) from dataset obtained in this study. (AUC = 0.90, med. abs. error: 1.03 h) **b:** Training set: Entire dataset obtained in this study (10 individuals, 80 samples) – Test set: Entire dataset published in [18] (11 individuals, 153 samples) (AUC = 0.79, med. abs. error: 2.26 h) **c:** Training and Test dataset as in a, but within-subject-renormalization-step omitted. (AUC = 0.77, med. abs. error: 2.45 h).

2.2. Forensic suitability testing (quantitative PCR approach)

2.2.1. Sample donors and sampling procedures

Blood samples were obtained from eight healthy volunteers (four males, four females; median age: 29.5 years, range: 22–44 years). Exclusion and inclusion criteria and study requirements were as described in Section 2.1.1.

Collection was performed at four specified time points (8AM, 2PM, 8PM, 2AM) over the course of an entire day. Venous blood samples were drawn by trained medical staff in neutral monovettes (Sarstedt, Nürmberg, Germany, Cat. No. 05.1729.001). 150 µl of blood were immediately pipetted onto 4N6FLOQ™ Nylon Swabs (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. 4473979). Triplicate swab samples were prepared from each blood draw, from which one sample was frozen at – 80 °C directly and the other two were stored for 12 h or one week (storage conditions: Room temperature, dry, no direct exposure to sunlight, protected from contamination) prior to freezing.

2.2.2. RNA isolation, quantification and reverse transcription

Total RNA was extracted using the mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. AM1560/AM1561) according to manufacturer's instructions and RNA was finally eluted in 60 µl nuclease-free water. Genomic DNA removal and RNA quantification were performed as described in 2.1.2. 240 ng of RNA were reverse transcribed with the High Capacity cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. 4368814) in 60 µl reactions. For each sample, reverse transcription reactions were performed in duplicates and a single RT-negative-control (containing RNA sample and reverse transcription master mix but no Reverse Transcriptase enzyme) was included.

2.2.3. Quantitative PCR (qPCR) using Taqman® Array Cards

The subset of markers to be included in this part of the study was selected based on TimeSignalR results (cf. Section 3.1.3, markers never included in the TimeSignalR predictor were excluded) and additionally chosen to cover a range of expression patterns (i.e., markers having the point of minimum/maximum expression at different time points of the day) and FPKM values (cf. Supp. Table 9).

qPCR of selected targets (13 candidates for time-of-day prediction (DDIT4, CRISPLD2, FKBP5, MGAM, NRCAM, SMAP2, ZBTB16, PER1, TMCC3, IGF2R, NELL2, MAL, FOSL2) and 11 reference gene candidates for normalization (TRAP1, FPGS, DECR1, PPIB, MRFP1, HGS, OTUD5, USP19, HNRNPK, KIDINS220, GAPDH)) was performed using 384 well Taqman® Gene Expression Custom Array cards (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. 4342249). Custom Taqman Array cards had been designed via the manufacturer's online Custom Array Configurator on the manufacturer's website (Supp. Table 1). cDNA specific assays were chosen whenever available. qPCR were performed in duplicate per target per sample.

The qPCR reaction mix was set up by combining 55 µl cDNA with 55 µl Taqman™ Fast Advanced Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. 4444557). Array Cards were loaded as per manufacturer's instructions and analyzed on a QuantStudio™ 7 Flex Instrument with a Taqman Array Card block. Reaction settings and measurements were performed as per manufacturer's instructions. To facilitate reliable and unequivocal interpretation of the qPCR results reported herein, information that is rated 'essential' according to the MIQE guidelines [37] is reported where applicable and summarized in Supp. Table 2 (adapted from [38]).

2.2.4. Raw-data quality check

Amplification curves were checked in the QuantStudio™ Real-Time

Table 1

TimeSignatR analysis - Summary of Results. Summary of results when performing TimeSignatR predictions on different training and test sets (15 runs per combination). Datasets: WTS-data = whole transcriptome sequencing data described in part I of this study, published data: dataset published in [17]. WSN = Within-subject-renormalization, AUC = Area under the Curve, MAE = median absolute error, #pred. = number of markers included in prediction model.

Trainset	WTS-data, 7 individuals, 56 samples			WTS-data, 10 individuals, 80 samples			WTS-data, 7 individuals, 56 samples, no WSN		
Testset	WTS-data, 3 individuals, 24 samples			published data, 11 individuals, 153 samples			WTS-data, 3 individuals, 24 samples, no WSN		
Run	AUC	MAE	#pred.	AUC	MAE	#pred.	AUC	MAE	#pred.
1	0.9	1:03 h	42	0.77	2:24 h	57	0.73	3:35 h	39
2	0.94	0:52 h	55	0.79	2:26 h	43	0.78	2:28 h	47
3	0.86	1:00 h	44	0.79	2:17 h	42	0.77	2:45 h	71
4	0.95	0:44 h	74	0.79	2:24 h	42	0.79	1:54 h	27
5	0.84	1:45 h	44	0.76	2:23 h	57	0.74	2:48 h	38
6	0.94	0:35 h	24	0.79	2:26 h	43	0.78	2:05 h	79
7	0.91	0:51 h	28	0.77	2:30 h	50	0.76	2:08 h	22
8	0.92	1:10 h	34	0.77	2:22 h	57	0.74	2:26 h	20
9	0.91	1:01 h	33	0.77	2:30 h	50	0.78	2:35 h	34
10	0.93	0:30 h	38	0.77	2:30 h	50	0.73	2:21 h	27
11	0.83	1:04 h	46	0.78	2:28 h	46	0.79	2:10 h	34
12	0.84	1:13 h	49	0.79	2:21 h	41	0.75	3:08 h	73
13	0.92	0:57 h	46	0.78	2:29 h	46	0.8	2:12 h	72
14	0.93	0:45 h	51	0.77	2:18 h	57	0.84	1:47 h	78
15	0.93	0:45 h	38	0.8	2:17 h	41	0.83	1:55 h	77
Average	0.90	1:07 h	43	0.78	2:24 h	48	0.77	2:25 h	49

Table 2

Statistical evaluation of pairwise comparison of gene expression at peak and valley time points. Results of statistical analysis of the gene expression differences at peak and valley time points. Peak and valley time points represent the time points of maximum and minimum gene expression as observed in the whole transcriptome sequencing dataset (part I of this study). For each gene, we tested whether gene expression was significantly higher at the peak time point compared to the valley time point under each of the three considered storage conditions in samples collected from 8 different individuals. P-values were calculated using a one-tailed, paired t-test for normally distributed data and a paired samples Wilcoxon test for non-normally distributed data. The effect size is given as the Cohen's d value for normally distributed data and the Pearson correlation coefficient for non-normally distributed data. Comparisons for which normal distribution was not assumed are indicated in *curly letters*. Multiple testing correction for 39 pairwise comparisons was performed using the Benjamini-Hochberg-(BH)-procedure. Statistical significance was assumed for all pairwise comparisons with p-value < BH-critical value (highlighted in green).

	Gene	CRISPLD2	DDIT4	FKBP5	FOSL2	IGF2R	MAL	MGAM	NELL2	NRCAM	PER1	SMAP2	TMCC3	ZBTB16
Storage	Peak	14.00h	08.00h	08.00h	14.00h	14.00h	02.00h	14.00h	02.00h	02.00h	08.00h	08.00h	14.00h	08.00h
	Valley	02.00h	20.00h	20.00h	02.00h	02.00h	14.00h	02.00h	14.00h	14.00h	20.00h	02.00h	02.00h	02.00h
0h	p-value	0.00058	0.00093	0.00012	0.00101	0.02102	0.0001	0.00961	0.00161	0.00681	0.0032	0.0001	0.00066	0.00008
	Effect size	-1.86	-1.72	-2.44	-1.69	-0.88	-2.52	-1.07	-1.55	-1.16	-1.36	-2.51	-1.82	-2.58
	BH-Critical Value	0.01154	0.01538	0.00769	0.01667	0.04359	0.00385	0.03974	0.02051	0.03718	0.02692	0.00513	0.0141	0.00256
	Sig.	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE
12h	p-value	0.006	0.00157	0.00201	0	0.00275	0.411	0.00059	0.015	0.00451	0.00586	0.00227	0.00056	0.00056
	Effect size	-1.19	-1.56	-1.49	-4.8	-1.4	0.08	-1.86	-0.96	-1.26	0.89	-1.45	-1.88	-1.88
	BH-Critical Value	0.0359	0.01923	0.02308	0.00128	0.02564	0.04744	0.01282	0.04231	0.03333	0.03462	0.02436	0.00897	0.01026
	Sig.	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE
1w	p-value	0.00344	0.097	0.00357	0.00684	0.00354	0.779	0.0001	0.271	0.434	0.01225	0.0037	0.00185	0.00133
	Effect size	-1.34	0.51	-1.33	-1.16	-1.33	-0.1	-2.49	0.23	-0.06	-1.01	-1.32	-1.51	-1.61
	BH-Critical Value	0.02821	0.04487	0.03077	0.03846	0.02949	0.05	0.00641	0.04615	0.04872	0.04103	0.03205	0.02179	0.01795
	Sig.	TRUE	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE

PCR Software v1.7.2. No amplification was observed in RT-negative-controls except for the marker HNRNPK, which showed signs of slight amplification in the last few cycles for a few samples and was thus excluded from further analysis. Raw amplification data was subsequently exported for curve analysis.

2.2.5. Curve analysis and efficiency correction

Amplification efficiencies and Cq values were obtained for each individual amplification curve by the curve analysis algorithm "Real-time PCR Miner" [39].

This algorithm uses a four-parameter logistic model as well as a three-parameter simple exponent model to fit parts of the amplification curve and thereby determine amplification efficiency and Cq value. The algorithm was chosen based on its high performance in comparative evaluations of curve analysis algorithms [40,41]. Due to the gene's relatively low expression, the Real-time PCR miner algorithm failed to fit the exponential phase for a total of 59/384 individual amplification curves for the marker NRCAM (as well as 2/384 amplification curves of the marker NELL2 and 1/384 amplification curves of the marker TRAP1). However, as for each sample a minimum of two replicate measurements did not fail during curve analysis and consistent results were obtained from these remaining two to three replicates, the

corresponding samples were not omitted from further analysis. After obtaining Cq values for each individual amplification curve, outliers (deviating >1 cycle from the mean of all replicates) were excluded from further analysis and Cq values from replicate measurements (Reverse Transcription duplicates and PCR duplicates resulting in quadruplicate Cq values per sample) were averaged.

Averaged Cq values were subsequently imported into the GenEx software v7.1.1.118 (MultiD Analyses AB) and efficiency correction was performed using the mean efficiency per target obtained from Real-time PCR Miner analysis. Mean amplification efficiencies per target are summarized in Supp. Table 3.

2.2.6. Choice of reference genes and normalization

11 reference gene candidates were chosen based on a combination of previously published data [42,43] and expression stability [44] measured in the whole-transcriptome sequencing dataset described in part I of this study (cf. Supp. Fig. 3 for a detailed description of the choice of reference gene candidates). Of these, the most suitable reference genes for normalization were finally chosen based on NormiRazor [45] which combines the results of three established algorithms to determine and rank the stability of reference gene candidates, geNorm [46], NormFinder [47] and BestKeeper [48], and additionally uses these

Table 3

Results of repeated measurements ANOVA assessing the impact of storage condition on normalized Cq values. Results of repeated measurements ANOVA assessing the impact of storage condition (fresh vs. 12 h vs. 1w) on normalized Cq values of target genes in samples from 8 individuals. For comparisons not meeting the assumption of sphericity, Greenhouse-Geisser (GG)- or Huynh-Feldt (HF)-corrected p values are reported (p-values < 0.05 are shown in red). Partial Eta-Squared values are given as effect size estimates.

Gene	Mean Cq value			Sphericity		rep.-measures ANOVA			Post-hoc tests (p-value)		
	fresh	12h	1week	p-value Mauchly-test	GG-Epsilon	Correction	p-value	Effect size	fresh-12h	fresh-1w	12h-1w
CRISPLD2	0.28	0.52	0.48	8.86E-04	0.73	GG	3.0E-05	0.35	3.1E-07	1.3E-03	3.4E-01
DDIT4	0.61	-2.43	-3.54	8.33E-04	0.73	GG	4.6E-39	0.99	1.5E-32	2.3E-31	5.5E-20
FKBP5	0.07	0.44	0.78	5.30E-02	0.85	none	9.2E-18	0.79	5.2E-09	3.6E-14	3.6E-14
FOSL2	-0.53	-2.45	-2.57	5.00E-01	0.96	none	1.4E-42	0.96	2.7E-25	2.3E-26	1.0E-01
IGF2R	-2.51	-2.03	-2.58	2.24E-04	0.70	GG	5.1E-12	0.68	5.6E-16	2.4E-01	5.5E-11
MAL	1.14	0.69	0.51	3.00E-06	0.64	GG	5.2E-10	0.64	1.1E-15	9.5E-10	2.1E-02
MGAM	-0.48	-0.39	-0.76	8.90E-05	0.68	GG	1.2E-02	0.16	1.8E-03	2.0E-01	7.1E-03
NELL2	3.43	3.03	3.00	1.00E-06	0.63	GG	1.9E-10	0.66	3.1E-18	5.5E-09	5.6E-01
NRCAM	5.71	4.97	4.53	1.13E-04	0.69	GG	1.6E-15	0.79	7.6E-17	4.2E-14	4.0E-05
PER1	2.11	-0.02	-0.30	5.08E-01	0.96	none	5.3E-46	0.97	2.7E-27	1.6E-26	9.9E-05
SMAP2	-2.64	-2.62	-2.38	8.26E-01	0.99	none	7.3E-13	0.59	6.8E-01	4.6E-09	1.7E-09
TMCC3	1.61	0.25	1.13	9.86E-03	0.79	HF	3.7E-22	0.85	7.0E-23	1.0E-06	9.7E-12
ZBTB16	1.89	1.84	1.71	5.90E-03	0.78	HF	5.6E-03	0.17	3.6E-01	9.5E-03	4.1E-03

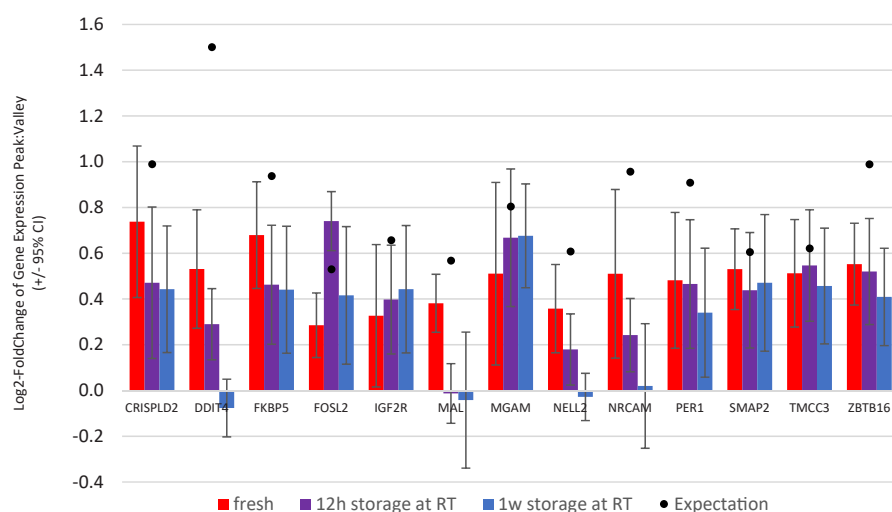


Fig. 3. Pairwise comparisons of gene expression at peak and valley time points. Log2FoldChanges ($-\Delta\Delta Cq$) values of gene expression at peak and valley time point for each of the 13 target markers (mean $\pm$ 95% CI of eight measurements per target and per storage conditions). Peak and valley time points represent the time points of maximum and minimum gene expression as observed in the whole transcriptome sequencing dataset (part I of this study). Log2FoldChanges values observed in the whole transcriptome sequencing dataset between peak and valley time points are indicated as "Expectation".

tools to assess and rank combinations of two or three candidates, thus allowing to identify the most stable combination of reference genes across the analyzed experimental conditions. NormiRazor analysis showed that the combination of HGS, KIDINS220 and PPIB was the most suitable combination of three stable markers for normalization (Supp. Table 4). Target marker Cq values were thus normalized by subtracting the arithmetic mean of Cq values of the three reference genes HGS, KIDINS220 and PPIB from the target Cq values in each individual sample.

2.2.7. Statistical evaluation

Statistical hypothesis testing was performed in IBM SPSS (Version 28.0.1.1(15)). To test whether genes were significantly higher expressed on peak compared to valley time points, we performed a one-tailed, paired t-test (for comparisons where normal distributions could be assumed) or a paired-samples Wilcoxon test (where the assumption of normality was not met), respectively. Normal distribution of differences in normalized Cq values between peak and valley time points was tested using a Shapiro-Wilk-test (normality assumed for $p > 0.05$). Multiple testing correction for 39 multiple comparisons (comparing gene expression at peak and valley time points for 13 genes under three conditions) was performed manually in Microsoft Excel using the Benjamini-Hochberg (BH) procedure at a false discovery rate (FDR) of 0.05. To test the impact of storage condition on normalized Cq values, we performed a repeated measurements ANOVA considering three levels "fresh", "12 h" and "1 week" of the factor "storage condition". The

assumption of normality was tested using the Shapiro-Wilk test. Even though the assumption of normality was not met for all distributions (p-values slightly below 0.05) results are shown for the repeated-measurements ANOVA for all comparisons, as the test procedure is known to be robust against slight deviations from the assumption of normality and similar results were observed when a corresponding non-parametric test (Friedman-test) was performed (data not shown). The assumption of sphericity was tested using the Mauchly-Test. When the assumption of sphericity was not met ($p < 0.05$), results are reported after Huynh-Feldt correction (for Greenhouse-Geisser Epsilon > 0.75) or Greenhouse-Geisser correction (for Greenhouse-Geisser Epsilon < 0.75). Multiple testing correction was performed manually in Microsoft Excel using the BH procedure at a FDR of 0.05.

Time-of-day predictions using TimeSignatR were performed as described in 2.1.5.4. The TimeSignatR algorithm was trained on the entire whole transcriptome sequencing dataset from part I of this study (with alpha set to 0, further reduction of the marker set was not aimed for) and tested on each of the three qPCR datasets (fresh stains, stains stored for 12 h or for one week) separately. Input data (ΔCq values) were already on a log₂-scale and thus not further log-transformed. Within-subject normalization was performed separately for each of the three test datasets.

3. Results and Discussion – Part I: Whole Transcriptome Analysis

3.1. Whole transcriptome sequencing of fingerprick blood samples yields high quality transcriptomic data

A total of 3952.58 million (raw) reads were obtained from 80 samples. After trimming of adapter bases and low-quality sequences, 3891.51 million reads were considered as high-quality reads and used for the mapping in STAR aligner. As a result, we observed a high percentage of uniquely mapped reads (88% average) in all the samples. Details of mapping statistics are provided in Supp. Table 5.

3.1.1. Identification of differentially expressed genes and application of filtering thresholds

As a first step towards the identification of RNA markers for time-of-day prediction, we sought to identify markers showing significant expression differences over the course of the day. Over the past years, a large variety of biostatistical algorithms, tools and software packages have been developed for the identification of differentially expressed RNA markers from different types of datasets, whose applicability depends on the question of interest, the experimental design chosen to answer this question as well as the technique chosen to detect and quantify RNA expression [49,50]. Differential expression algorithms may be sub-classified into static and time-course (dynamic) analysis procedures [51]. Static analysis tools have been developed for the identification of differentially expressed genes between different conditions (e.g., a population with a certain disease and a healthy control population.) While it has been shown that some of these algorithms may successfully be applied for the identification of differentially expressed genes in time-course data [34], time course information and overall time trends are only taken into consideration when applying dynamic analysis approaches specifically developed for the analysis of time-course data [34,51]. A number of static differential expression analysis approaches have been established as complete analysis pipelines including procedures for filtering and normalization of input data (e.g. DESeq2 [31], edgeR [52]). Several of these tools have been compared and benchmarked in extensive studies (e.g. [53–55]) and best-practice guidelines for their application have been formulated [56]. In contrast, differential expression analysis approaches for time course data are often less well established and commonly lack comparative evaluations for applications to different datasets [34,57,58]. Among the differential expression tools for time-course data, only a small subset of gene-by-gene differential expression algorithms has been specifically developed for application to periodical time-course data (summarized in [58]). A comparative evaluation of these algorithms has recently been performed by Mei et al. [59]). However, due to inherent limitations (either being limited to the detection of symmetric waveforms such as JTK_CYCLE [59], being unable to handle data from multiple individuals such as ARSER [60] or requiring extensive training of a deep neural network such as Bio_CYCLE [59]), these approaches were not selected for the identification of robustly differentially expressed RNA candidates in this study.

Despite the fact that a number of authors have performed comparative evaluations of differential expression algorithms for different datasets, a general consensus on a single best-performing differential expression algorithm does not exist. Several scientists thus recommend to compare and combine results from more than one differential gene expression algorithm to obtain more reliable results [33,51,54–56].

Based on these considerations, two different biostatistical analysis pipelines for the identification of differentially expressed RNA markers with little to no assumption regarding the shape of a marker's diurnal oscillation were applied in this study: DESeq2 [31] and ImpulseDE2 [32] with settings and filtering criteria as described in 2.1.5.1 and 2.1.5.2 of the methods section. Applying a different biostatistical algorithm or selecting different filtering criteria would most likely result in a different

set of markers due to the different assumptions underlying each individual algorithm [56].

DESeq2 analysis resulted in a total of 1982 markers being identified as significantly differentially expressed ($p_{adj} < 0.05$, $|\log_2 FC| > 0.5$) between at least two different time points, 833 of which were above our low expression threshold of 0.5 FPKM. For DESeq2 analysis, the different time points were considered on a nominal scale, and thus the distance in time between different sampling groups was not taken into account. Nonetheless, we generally observed a larger number of significantly differentially expressed genes for comparisons between time points that were farther apart (e.g., 14.00 h and 02.00 h) as for closer time points (e.g., 02.00 h and 05.00 h) (cf. Supp. Fig. 4). ImpulseDE2 analysis resulted in a total of 411 markers with significant differential expression ($p_{adj} < 0.05$) over time, 361 of which lay above our low expression threshold of 0.5 FPKM. The majority of markers (290 out of 411) was identified as regulated with time in more than one of the eight analyses (each analysis representing a different starting time), a total of 30 markers appeared as differentially expressed in all eight analyses (cf. Supp. Table 6). The mode of regulation (up- or downregulation, transient or transition pattern) differed between analysis groups as expected for a periodic regulation of gene expression with time. For this reason, the mode of regulation was not deemed relevant for the purpose of this study and markers were considered to be regulated with time if they were identified as differentially expressed in at least one of the eight analyses.

Gene Ontology enrichment analysis of significantly differentially expressed genes showed that GO terms enriched with the input genes were generally associated with the functionality and regulation of the immune system (Supp. Fig 5, Supp. Table 7).

A total of 81 RNA markers exhibited significantly differential expression with time-of-day in the intersection of DESeq2 and ImpulseDE2 analysis (Fig. 1a). Therefore, these 81 markers were considered to be the most promising candidates for time-of-day prediction. Fig. 1b depicts the changing gene expression of these 81 candidates over the course of one day in the whole transcriptome sequencing dataset. According to their expression pattern, markers can roughly be split up into two groups, with genes in the first group reaching their expression maximum in the night/early morning and genes in the second group peaking later in the morning/around midday.

Previous biological and biomedical research has already identified a number of transcripts showing circadian/diurnal rhythmicity in human whole blood [61–63]. However, experiments performed to study the “inner clock” are often performed under “free-running” conditions to ensure that the study does indeed pick up internally regulated transcriptomic changes and not merely responses to rhythmic environmental cues and changes [8,11]. For this purpose, study participants are recruited to specific laboratories, where external influences such as light, temperature, food uptake and activity are strictly controlled and samples are taken during periods of extended wakefulness and under constant conditions [18,61–63]. While useful in the biomedical context, these study protocols do not reflect the conditions any individual involved in a forensically relevant activity can be assumed to act under. Previous studies demonstrated that circadian oscillations may be less pronounced or even completely masked given certain external stimuli (expected to be present under less controlled, more realistic conditions) [11,64]. We therefore deemed it appropriate to identify markers most strongly associated with the external time of day in an experiment specifically set up to represent more realistic and thus forensically relevant conditions. One needs to be critically aware, that when samples are taken under non-constant-routine conditions, aspects such as timing of physical activity, sleep or food uptake might relevantly impact the expression pattern of circadian markers. Crucial care thus needs to be taken to make sure that the selected markers show reproducible expression differences across study participants and can be reproduced in a larger number of individuals (cf. Section 3.1.3, 3. II and 4). Indeed, for the purpose of reliably predicting the time of day of sample

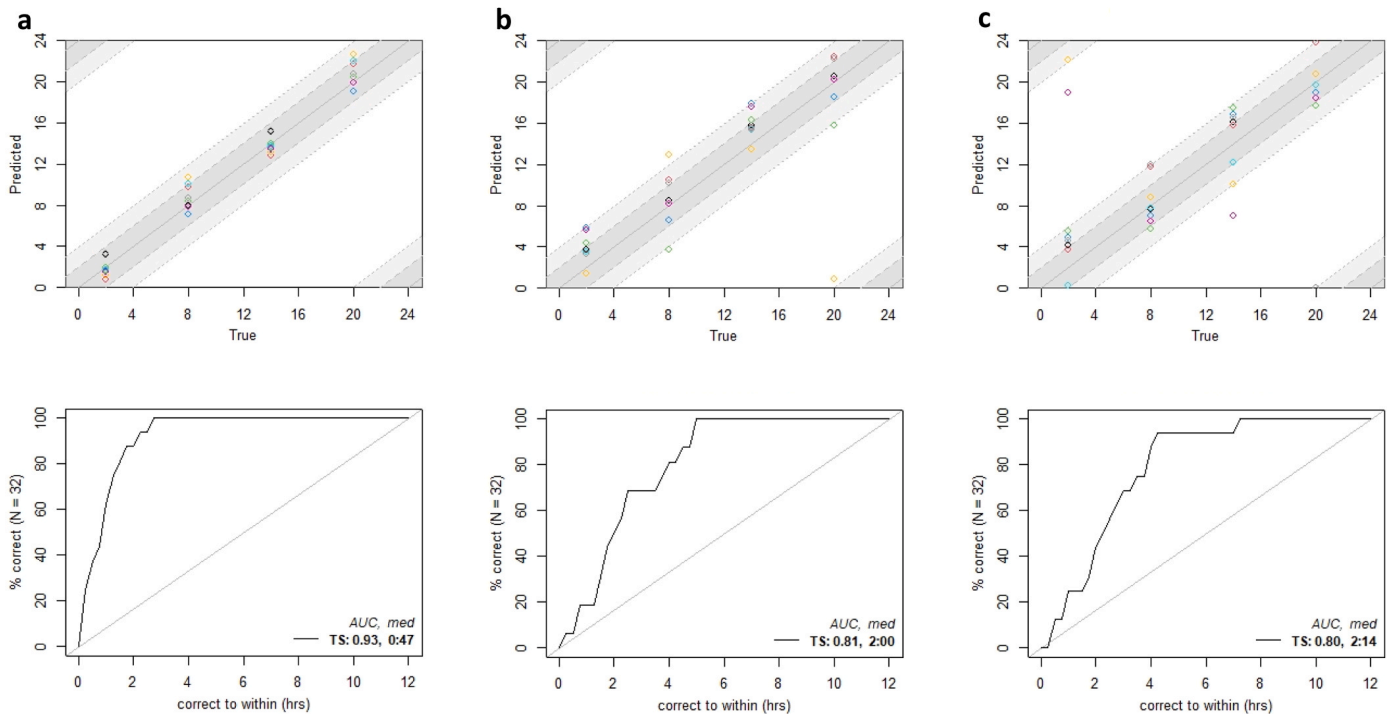


Fig. 4. Time of day Predictions obtained with the TimeSignalR algorithm on qPCR measurements. Predictions of a TimeSignalR predictor trained on gene expression measurements from the whole transcriptome sequencing data set (part I of this study) for 13 mRNA markers and tested on qPCR data. **Top row:** Predicted times plotted against true times; area shaded in dark grey represents predictions correct to within two hours of true time, area shaded in light grey represents predictions correct to within 4 h of true time; data point colours represented sampled individuals. **Bottom row:** Cumulative distribute function for time of day predictions. AUC = Area under the Curve, med = median absolute error. **a:** Tested on gene expression measurements from fresh blood stains (8 individuals, 32 samples) **b:** Tested on gene expression measurements from blood stains stored for 12 h at room temperature (8 individuals, 32 samples) **c:** Tested on gene expression measurements from blood stains stored for 1 week at room temperature (8 individuals, 32 samples).

deposition, both internally controlled circadian oscillations as well as responses to external stimuli might be considered suitable as long as they are robust and reproducible for a large part of the population and as long as they do not only become apparent under extremely controlled environmental conditions.

When defining “forensically relevant sampling conditions”, it is debatable whether or not study participants should be allowed to sleep between time points of sample collection. For our study, we have decided that study participants should stay awake even for samples taken at night time, as we assumed that when partaking in a criminal activity at night time (e.g. burglary, robbery, sexual assault), individuals are more likely to have stayed awake prior to this event. However, this will not be true in every imaginable scenario of criminal activity (e.g. for victims being surprised by a night-time robbery). The current strategy thus only allows to draw conclusions for individuals having been awake prior to blood sample deposition; the behaviour of selected markers for samples taken from individuals awaking from sleep will have to be evaluated in a separate study.

For the analysis of biological rhythms, it is generally recommended to collect samples from at least two complete cycles [65]. If this is not feasible for the study conditions at hand (as was the case for sampling conditions in our study), a larger number of individuals needs to be sampled instead [65]. For practical reasons, the number of samples that can be analyzed via whole transcriptome sequencing is limited. Any biomarkers identified from this study will thus have to undergo subsequent validation in an independent set of samples from a larger number of individuals (cf. Section 3.1.3, 3. II and 4).

For the purpose of our study, we have recruited equal numbers of male and female study participants, however, due to the limited number of individuals when considering both sexes separately, we have not attempted to assess whether any markers can be identified as significantly differentially expressed in male or female participants only. Data

on the question of sex-related differences in expression of diurnally rhythmic RNA markers is as-of-yet limited, but significant differences in gene expression among male and female participants have recently been observed for a subset of analyzed diurnal mRNA markers in a study by Kirk et al. [23]. Markers significantly differentially expressed in only one sex but not the other or expression patterns significantly shifted for one sex compared to the other might thus be missed by our marker selection approach.

Additionally, due to the limited sample size, individuals with realistic but less common conditions (such as extreme chronotypes, shift-workers or diseases known to affect the circadian biorhythm) needed to be excluded from our dataset intended to represent the “average” forensically relevant individual. The behavior of diurnal oscillators and whether it is even possible to predict time-of-day for an individual under these more “extreme” conditions, will have to be assessed in future studies.

Of the markers identified as significantly differentially expressed in our study, a large proportion (64 of the 81 selected candidate predictors) has been described as circadian or diurnal oscillators in one or more previous studies (cf. Supp. Table 8 for a detailed overview). Accordingly, functional analysis of differentially expressed markers showed that markers were significantly involved in immune-regulatory processes while previous biomedical studies have shown that several immune-related processes such as the number of circulating hematopoietic cells or cytokines show circadian oscillations in activity (reviewed for example in [66]). These findings are not surprising, as it was expected that a subset of previously known diurnal oscillators are strongly associated with time-of-day.

However, a number of previously described diurnal oscillators were not observed as differentially expressed and meeting the filtering criteria in our dataset. The transcriptome is highly complex and the number of markers identified as diurnally rhythmic in a certain dataset depends on

which conditions samples were collected on but also on subsequent sample processing as well as algorithms used to identify and filter marker sets. This is also reflected in the large heterogeneity between markers in Supp. Table 8.

Surprisingly, from the set of 14 “classical clock genes” as designated by Laing et al. [67] (Dataset A in Supp. Table 8) only a single marker was included in our final set of 81 candidate predictors. Notably, upon closer inspection we observed that 12 out of the 14 “classical clock genes” were identified as significantly differentially expressed by DEseq2 ($p_{adj} < 0.05$) in our dataset, but 9 of these 12 markers were excluded from our list of candidate predictors due to the magnitude of expression change over the day ($|\log_2 FC| < 0.5$, data not shown). Interestingly, Hughey et al. [68] similarly observed that only two core clock genes were selected as predictors when developing an algorithm to predict circadian time from gene expression. The authors assumed, that even though not being part of the core clock mechanisms, their selected predictors were most likely directly regulated by the core clock. These observations suggest that oscillations regulated by the core clock (or other external stimuli) might be more suitable predictors in human whole blood than the core clock genes themselves.

3.1.2. Assessment of the potential to predict the time of day

To assess the potential of time-of-day prediction based on the expression of the 81 selected candidate RNA markers, we applied a previously published algorithm for predicting the time of day from transcriptomic data named TimeSignalR [18]. It should be noted that the size of our dataset does not allow for the development and validation of a reliable time-of-day prediction algorithm (such a prediction algorithm will have to be developed and tested based on an independent, larger dataset, optimally based on data from targeted expression measurements). The application of a previously published prediction algorithm may thus not be understood as an assessment of how accurately time-of-day can be predicted from gene expression signature but rather as an assessment of whether the chosen markers’ expression patterns do contain time-of-day information which can be understood as a validation of our marker selection approach.

TimeSignalR was first trained on a subset of seven randomly chosen individuals from the dataset sequenced in this study and the predictor’s performance was subsequently tested on the remaining three individuals. Repeating the algorithm for a total of 15 times, we obtained a mean AUC value of 0.9 and an average median absolute error of 1:07 h (cf. Table 1, Fig. 2a), thus indicating that the time of sample collection can be predicted with high accuracy from gene expression data and the set of selected candidate predictors is well suited for this task. Prediction algorithms generally tend to perform better on samples they have initially been trained on and thus to gain insight on how well a predictor can predict the state of a new sample, it needs to be tested on an independent sample set. In this case, the individuals in the testing set had not been used for training the algorithm, and thus the test set may be considered independent. However, due to the limited number of samples in the test set (24 samples from three individuals) and the fact that they were sequenced and normalized in the same batch as the samples in the training set, the prediction performance metrics reported in Table 1/ Fig. 2a still have to be treated with some caution. We thus aimed to test the predictor on a second, truly independent dataset. However, as indicated in Section 3.1.2, none of the previously published studies on the identification of rhythmic gene expression markers in human whole blood (for which transcriptomic data was publically available) was performed under conditions we considered realistic in a forensic context [18,61–63]. It thus needs to be highlighted that the study participants’ conditions in [18] (constant routine protocol for the entire sampling period) differ from the conditions in our study protocol. When training the algorithm on the entire transcriptome dataset obtained in this study and testing it on the dataset from [18], we obtained a mean AUC value of 0.78 and an average median absolute error of 2:24 h (Table 1/ Fig. 2b). (The decreased variability across the 15 runs compared to the first set of

predictions is attributable to the fact that the training and test set were identical in all 15 repetitions, whereas different individuals were included in the training and test set in the previous part of the analysis.) Prediction accuracies were worse than observed in the first part of our analysis, but the trained predictor still performed significantly better than a random predictor (which would result in an AUC close to 0.5). Thus, we concluded that the selected markers were indeed suitable for predicting time-of-day based on their expression values. Furthermore, the major part of this time-of-day associated expression signature seems to be preserved even under less forensically relevant conditions (while the specific impact of these conditions on the expression of individual markers would have to be elucidated in a separate study).

Lastly, we tested whether TimeSignalR would still provide sufficiently accurate predictions when omitting the within-subject-renormalization (WSN) step. This step has been included by the developers of the algorithm to allow for predictions across platforms and measurement techniques [18]. However, as this procedure requires the availability of at least two samples per individual, it is not applicable in a forensic setting where one usually does not expect to find samples deposited several hours apart. We thus repeated our first analysis, but this time omitted the WSN for both the training and the test set and obtained a mean AUC value of 0.77 and an average median absolute error of 2:25 h (Table 1/ Fig. 2c). While still being significantly better than a predictor purely based on chance, the difference in accuracy compared to predictions without WSN indicates that while relative expression changes of a gene across the day seem to be reproducible for individuals included in this study, there are interindividual differences in absolute expression values that need to be accounted for.

Due to its reduced performance when omitting the WSN step, the TimeSignalR algorithm is possibly not the optimal algorithm to be applied for time-of-day prediction in a forensic assay to be developed in the future. However, other algorithms developed to predict “circadian time” in the context of biomedical studies are not directly applicable to forensic stain types, either. Both ZeitZeiger and the PLSR-based algorithm showed best prediction performances when predictors were trained to use more than one sample per individual (similar to the WSN-step in TimeSignalR) [67,68]. Predictors for single samples achieved lower prediction accuracies and additionally have only been used on samples previously co-normalized with samples in the training set [68] or normalized with a normalization strategy requiring expression measurement on the entire transcriptome (and not only the 100 targets of interest) [67]. When omitting the within-subject renormalization step in TimeSignalR, we correspondingly observed reduced prediction accuracies, however, the predictive performance metrics (AUC, med. abs. error) were similar to or even better than the ones Braun et al. observed when applying the single-sample PLSR or the ZeitZeiger algorithm to the datasets included in their study [18]. It is thus conceivable, that an adapted version of the TimeSignalR algorithm might be applicable for time-of-day prediction from single forensic stains. However, the optimal time-of-day prediction algorithm to be used on data from a targeted gene expression assay will have to be determined in a future study. The results obtained with previously published prediction algorithms indicate that a proper normalization strategy will be highly relevant for the development of an algorithm to predict time-of-day from single forensic type samples.

The predictor trained in the TimeSignalR algorithm does not include the entire set of 81 markers identified in 3.1.2. Instead, it used elastic net regularization to select a subset of predictors resulting in the smallest prediction error while at the same time reducing the number of markers selected for prediction. Across the different training sets, the TimeSignalR algorithm included an average of 43–49 markers (Table 1; Supp. Table 9 provides an overview of how often the individual markers were included across 15 runs of training the predictor on each of the three training sets). Notably, this is consistent with the number of markers Braun et al. [18] needed in their study on time of day prediction from blood samples taken under medically relevant conditions. In two recent

publications on circadian time prediction from samples of whole blood, prediction models containing 100 [67] and 15 [68] markers were developed respectively. These numbers allow for an estimation of number of markers that will have to be included in a targeted assay for forensic time-of-day prediction.

3.2. Results and Discussion – Part II: Assessing the suitability of selected predictors in a forensically relevant setting in a targeted analysis approach

In a next step, we aimed to assess whether diurnal gene expression is sufficiently stable to reliably be detected in forensically relevant stain types (i.e., dried stains, sampled days or weeks after deposition). Quantitative PCR is currently considered the gold standard analysis method for quantifying the expression of a selected set of target genes. However, due to the limited multiplex capacity of qPCR, we chose a subset of markers identified in part I of this study to be analyzed in a qPCR-based approach. The gene expression of selected markers was quantified in blood samples collected from eight individuals at four different time points considering three different post-deposition treatments: I) fresh stains (stabilized right after deposition) to assess whether the pattern of diurnal gene expression detected in the whole transcriptome sequencing dataset can reproducibly be detected via qPCR analysis in an independent sample set, II) stains left to dry at room temperature for 12 h to assess whether gene expression continues to cycle after blood stain deposition (in which case a shift in time point of maximum expression would be observed in stains stored for 12 h) and III) stains left to dry at room temperature for 1 week to assess whether the differences in gene expression with time of day are sufficiently stable to be detected even after a forensically relevant storage period. To address these questions, we identified each marker's time point of maximum expression (peak) and minimum expression (valley) over the course of the day and the $\log_2$ FoldChange in gene expression as observed in the whole transcriptome sequencing dataset. If a peak/valley of gene expression was observed at a time point not sampled in part II of this study, the time point of second highest/lowest gene expression was considered instead. We then calculated the $\log_2$ FoldChange in gene expression (i.e. $-\Delta\Delta C_q$ values) between the peak and valley time points for each marker in the qPCR dataset. The results are presented in Fig. 3 and Table 2. The gene expression changes of each marker over the entire day are additionally represented in Supp. Table 10.

3.2.1. Assessing the reproducibility of trends observed in the whole transcriptome dataset in an independent sample set

Analysis of freshly collected blood samples showed that all 13 markers showed gene expression oscillations similar to those observed in the whole transcriptome sequencing dataset (Supp. Table 10) and gene expression was significantly higher at the assumed peak time points compared to the corresponding valley time points (Fig. 3, Table 2). Thus, even though the observed changes in gene expression over the course of the day were notably small, they proved to be reproducible in an independent sample set (collected from a different set of individuals and assayed with a different technology).

3.2.2. Assessing the impact of storage time on the expression of selected diurnal markers

When comparing the freshly deposited stains to blood stains stored for 12 h or one week, we observed very similar patterns of gene expression over the day and statistically significantly higher gene expression at peak compared to valley time points under each of the three storage conditions for 9 out of 13 markers (Fig. 3, Table 2, Supp. Table 10). This is consistent with previous studies on forensic mRNA analysis having repeatedly demonstrated that mRNA is generally distinctly more stable than originally assumed and thus can be detected and analyzed from minute amounts and months to even years old biological stains [3,69–72]. However, for the four markers DDIT4, MAL, NELL2 and NRCAM the diurnal oscillations observed in freshly

deposited stains were not detectable in stains stored for 12 h and/or 1 week (Table 2). It appears conceivable that individual markers are up- or downregulated post deposition, possibly during the process of blood coagulation. While we are not aware of data directly demonstrating the regulation of these markers in the blood coagulation process, DDIT4, for instance, is known to be upregulated under conditions of cellular energy stress and hypoxia [73] which is a possible explanation for its post-depositional regulation. Also, several reports on thanatotranscriptional activity are available that provide evidence on active transcription after organismal or cellular death [74–76].

The findings from this experiment demonstrate that diurnal gene expression may be detected from dried and stored blood stains and may thus be considered generally suitable for developing an assay to predict time of deposition. Nonetheless, post-depositional regulation has to be assessed for each potential predictor individually.

After having tested the impact of storage time on the detectability of intraindividual diurnal gene expression differences, we next assessed whether storage time generally affected the measured gene expression of the 13 markers targeted by qPCR analysis. A repeated measurements ANOVA showed that storage condition had a statistically significant impact on normalized C_q values for each of the 13 tested markers (Table 3). For the majority of markers, smaller differences were observed between markers stored for 12 h and one week compared to the differences observed between fresh and 12 h old or fresh and one week old stains (Table 3). While individual marker stability will need to be evaluated in more detail in a future study including a larger number of markers, longer storage periods and different storage conditions, these findings highlight the necessity of a highly robust normalization procedure to be employed in such approaches. Additionally, the impact of storage time will have to be considered when developing a time-of-day prediction model (potentially by including a quality cut-off below which the model is not applicable or by including a measure of “stain condition” in the model process).

Besides being sufficiently stable to be detectable after deposition of blood stains, diurnal oscillations in marker expression also need to be “preserved” in their state and stop to change once the blood left the living body. When comparing stains stored for 12 h compared to freshly deposited stains, we did not observe an inversion of time points of highest/lowest gene expression (Fig. 3, Supp. Table 10), as might have been the case if diurnal oscillations would continue to cycle in a relevant manner after deposition of a blood stain. The transcriptome of the dried blood stain thus better represents the time of sample deposition than the time of sample collection. This is in accordance with previous studies demonstrating that the transcriptome of a dried blood spot is generally well correlated with its liquid counterpart [77]. Taken together, these findings indicate that the transcriptome of a dried blood stain may be considered to represent its state at the time point of deposition with sufficient accuracy (except for individually post-depositionally regulated markers) to be used for predicting the time point of sample deposition.

3.2.3. Predicting time-of-day of deposition based on expression of selected markers measured by qPCR

Lastly, we assessed how different stain storage conditions impact the potential to predict time of sample deposition. For this purpose, we trained a TimeSignalR predictor on whole transcriptome sequencing data (part I of this study) including gene expression data only for the 13 markers assessed in part II of this study. We then tested the predictor on the expression values obtained by qPCR considering each of the three storage conditions separately. In accordance with previous observations, the predictor performed well for fresh blood samples (Fig. 4a, AUC = 0.93, med. abs. error = 0:47 h), but reduced prediction accuracies were observed for samples left to dry and stored for either 12 h or 1 week at room temperature (Fig. 4b and c, AUC = 0.81 and 0.80, med. abs. error = 2:00 h and 2:14 h respectively). It thus can be concluded that post-depositional regulation and/or degradation impacts prediction

accuracies (leading to an AUC loss of 0.12–0.13 and an increase in med. abs. error of 1:13–1:27 h for a prediction algorithm based on the subset of 13 candidate predictors), but the prediction accuracies observed for 12-hour- and one-week-old samples indicate that relevant time-of-day information is preserved in dried blood stains.

These findings are based on a subset of 13 mRNA predictors. It may reasonably be assumed that prediction accuracies can relevantly be improved by developing a targeted assay detecting and quantifying a larger number of predictors, however, the post-depositional stability will have to be evaluated for each marker individually.

Finally, it needs to be emphasized that the intraindividual differences in marker expression of candidate predictors are notably small (especially compared to expression differences between different tissue/cell types allowing for body fluid/organ tissue identification). When developing a targeted assay to quantify these differences, methods sufficiently accurate to reproducibly detect relatively small differences in gene expression and reliable and robust normalization procedures should be employed. Commonly, target markers would be normalized to markers proven to be stably expressed across conditions of interest. However, for the purpose of obtaining a measurement stably and robustly correlating with time of day, normalizing markers with contrasting oscillations as suggested by [23] might prove to be a viable option.

4. Conclusion and future prospects

In the present study, we were first to perform whole transcriptome sequencing and apply a combination biostatistical algorithms to identify a set of RNA markers differentially expressed across a 24 h-day for the purpose of assessing the time of day of bloodstain deposition in a forensic context. A subset of these markers proved suitable to predict the time of sample collection based on whole transcriptome sequencing gene expression data using the previously published prediction algorithm TimeSignatR. In a proof-of-principle experiment including a subset of identified predictors, we observed intraindividual diurnal oscillations to be preserved in stains stored at room temperature for up to one week. Taken together, the findings from this study demonstrate the general potential of assaying transcriptomic data for predicting time of deposition of forensically relevant blood stains, while at the same time revealing relevant limitations needing to be taken into account. While the validity of our markerset has currently been demonstrated only for a limited set of conditions (i.e. healthy individuals with non-extreme chronotypes or sleep-wake conditions, individuals having stayed awake into the night (for samples collected at night time) and fresh blood samples), and thus further extensive validation is required, the study's results may be considered foundational for the development of a forensic time-of-day prediction assay in the future.

A next step towards achieving this goal will be the development of a targeted assay, quantifying gene expression of a limited but sufficiently large number of time-of-day predictors and including the establishment of a robust normalization strategy. Based on gene expression measurements in this targeted assay, a prediction algorithm suitable to predict time of day from expression measurements in single stains will need to be developed. Both laboratory assay and prediction algorithms will then need to be extensively validated to assess prediction accuracy as well as limitations associated with donor (e.g., individuals with extreme chronotypes, shift-workers) and stain (storage time and environmental conditions) characteristics.

Future studies might also assess whether the addition of oscillating biomarkers other than RNA (metabolites [78] or hormones [19,79]) might increase the accuracy of time-of-day predictions from bloodstains. However, as any additional analysis method would require additional sample material (which is often limited in forensic cases), whereas RNA can be co-extracted together with DNA in forensically established workflows [69,80], the costs (required sample amounts) and benefits (potential increase in prediction accuracies) would have to be

investigated and weighed.

Statement on compliance with ethical standards

All sample donors provided written informed consent. The study protocols were reviewed and approved by the ethics committee of the University Hospital Schleswig-Holstein (part I) and the ethics committee of the University Hospital Cologne (part II).

Role of the funding source

The funders of the study had no role in study design, data collection, analysis and interpretation, or writing of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

Data Availability

Raw and processed sequencing data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [30] and are accessible through GEO series accession number GSE223613 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE223613>).

Acknowledgments

First and foremost, we would like to thank all anonymous sample donors for taking part in this study! We also thank David Ast and Sabrina Ahrens for their support in blood sample collection. Additionally, we thank Prof. Dr. Ute Warnecke-Eberz and Michi Heitmann for kindly providing access to a QuantStudio 7 Flex system as well as their great support in Array Card preparation and instrument handling.

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for funding this project (CO-992/10-1).

This work was additionally supported by the DFG Research Infrastructure NGS_CC (project 407495230) as part of the Next Generation Sequencing Competence Network (project 423957469). NGS was carried out at the Competence Centre for Genomic Analysis (Kiel).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.fsigen.2023.102915](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102915).

References

- [1] C. Haas, J. Neubauer, A.P. Salzmänn, E. Hanson, J. Ballantyne, Forensic transcriptome analysis using massively parallel sequencing, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 52 (2021), 102486, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102486>.
- [2] T. Sijen, S. Harbison, On the identification of body fluids and tissues: a crucial link in the investigation and solution of crime, *Genes* 12 (2021) 1728, <https://doi.org/10.3390/genes12111728>.
- [3] A.P. Salzmänn, G. Russo, S. Kreutzer, C. Haas, Degradation of human mRNA transcripts over time as an indicator of the time since deposition (TsD) in biological crime scene traces, *Forensic Sci. Int. Genet.* 53 (2021), 102524, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102524>.
- [4] S. Alshehhi, P.R. Hadrill, Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers, *Forensic Sci. Int.* 298 (2019) 58–63, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.046>.
- [5] A.P. Salzmänn, N. Arora, G. Russo, S. Kreutzer, L. Snipen, C. Haas, Assessing time dependent changes in microbial composition of biological crime scene traces using microbial RNA markers, *Forensic Sci. Int. Genet.* 53 (2021), 102537, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102537>.
- [6] S. Scrivano, M. Sanavio, P. Tozzo, L. Caenazzo, Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: A review of current evidence, *Int. J. Leg. Med.* 133 (2019) 1629–1640, <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02125-x>.
- [7] Y.-H. Lv, Z.-Q. Wang, Q. Lei, J.-H. Zhao, Z.-F. Yang, Research progress in the estimation of postmortem interval (PMI) using non-coding RNA (ncRNA) markers, *Med. Sci. Law* 258024211064404 (2021), <https://doi.org/10.1177/00258024211064404>.

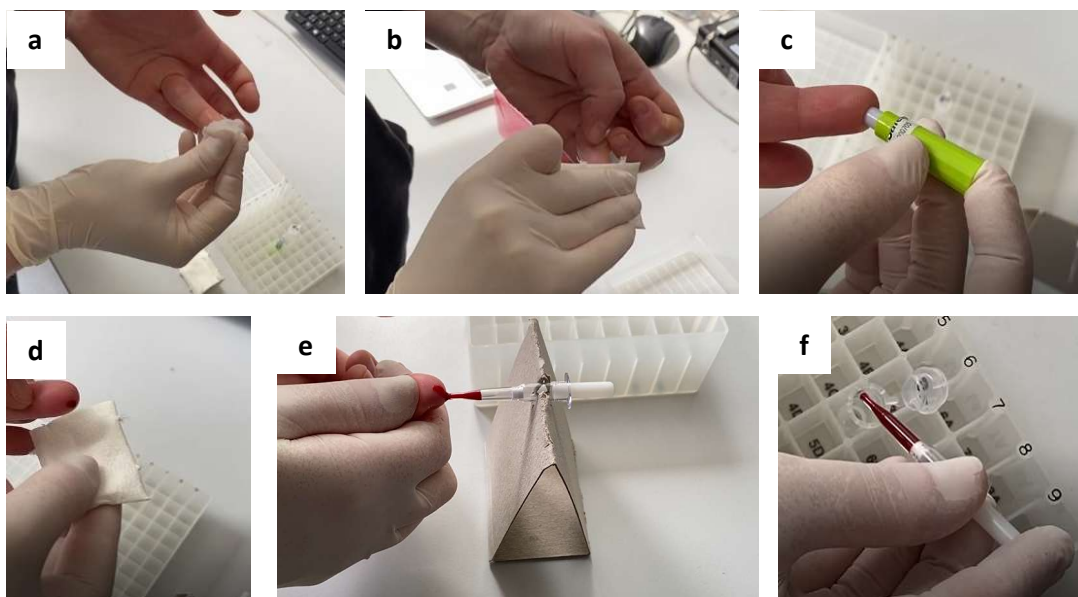
- [8] M. Vitaterna, J.S. Takahashi, F.W. Turek, Overview of circadian rhythms, *Alcohol Res. Health* 25 (2001) 85–95.
- [9] C.L. Partch, C.B. Green, J.S. Takahashi, Molecular architecture of the mammalian circadian clock, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 90–99, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.002>.
- [10] A.J. Brown, J.S. Pendergast, S. Yamazaki, Peripheral circadian oscillators, *Yale J. Biol. Med.* 92 (2019) 327–335.
- [11] J.F. Duffy, D.-J. Dijk, Getting through to circadian oscillators: why use constant routines? *J. Biol. Rhythms* 17 (2002) 4–13, <https://doi.org/10.1177/0748730002129002294>.
- [12] R. Zhang, N.F. Lahens, H.I. Ballance, M.E. Hughes, J.B. Hogenesch, A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014) 16219–16224, <https://doi.org/10.1073/pnas.1408886111>.
- [13] F. Rijo-Ferreira, J.S. Takahashi, Genomics of circadian rhythms in health and disease, *Genome Med.* 11 (2019), 82, <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0704-0>.
- [14] H. McKenna, G.T.J. van der Horst, I. Reiss, D. Martin, Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine, *Crit. Care* 22 (2018), 124, <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2041-x>.
- [15] N.F.W. Zaki, M. Yousif, A.S. BaHammam, D.W. Spence, V.K. Bharti, P. Subramanian, S.R. Pandi-Perumal, Chronotherapeutics: recognizing the importance of timing factors in the treatment of disease and sleep disorders, *Clin. Neuropharmacol.* 42 (2019) 80–87, <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000341>.
- [16] H. Mikami, K. Terazawa, T. Takatori, S. Tokudome, T. Tsukamoto, K. Haga, Estimation of time of death by quantification of melatonin in corpses, *Int. J. Leg. Med.* 107 (1994) 42–51, <https://doi.org/10.1007/BF01247274>.
- [17] a)A. Biedermann, Letter to the Editor: Commentary on "Is it possible to predict the origin of epithelial cells? - A comparison of secondary transition of skin epithelial cells versus vaginal mucous membrane cells by direct contact.
b)M.M. Bouzga et al. *Science & Justice* 60 2020 201 203 doi: 10.1016/j.scijus.2020.04.005.
- [18] R. Braun, W.L. Kath, M. Iwanaszko, E. Kula-Eversole, S.M. Abbott, K.J. Reid, P. C. Zee, R. Allada, Universal method for robust detection of circadian state from gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (2018) E9247–E9256, <https://doi.org/10.1073/pnas.1800314115>.
- [19] K. Lech, F. Liu, K. Ackermann, V.L. Revell, O. Lao, D.J. Skene, M. Kayser, Evaluation of mRNA markers for estimating blood deposition time: towards alibi testing from human forensic stains with rhythmic biomarkers, *Forensic Sci. Int. Genet.* 21 (2016) 119–125, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.008>.
- [20] K. Breslin, B. Wills, A. Ralf, M. Ventayol Garcia, M. Kukla-Bartoszek, E. Pospiech, A. Freire-Aradas, C. Xavier, S. Ingold, M. de La Puente, K.J. van der Gaag, N. Herrick, C. Haas, W. Parson, C. Phillips, T. Sijen, W. Branicki, S. Walsh, M. Kayser, HIRIS-Plex-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 (2019), 102152, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102152>.
- [21] G. Dörum, S. Ingold, E. Hanson, J. Ballantyne, L. Snipen, C. Haas, Predicting the origin of stains from next generation sequencing mRNA data, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 37–48, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.001>.
- [22] K. Ackermann, K.N. Ballantyne, M. Kayser, Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction, *Int. J. Leg. Med.* 124 (2010) 387–395, <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0457-1>.
- [23] D. Kirk, R. Allen, Exploration of rhythmic patterns of gene expression to estimate the time of day a bloodstain was created, *Res. Rep. Forensic Med. Sci.* (2021) 1–11.
- [24] B. Griefahn, C. Künemund, P. Brode, P. Mehnert, Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg, *Somnologie* 5 2001 71 80.
- [25] S. Andrews, FastQC: A Qual. Control Tool. High. Throughput Seq. Data 2010. (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).
- [26] F. Krueger Trim, Galore: a wrapper Tool. Cutadapt FastQC 2012. (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/).
- [27] M. Martin, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, *EMBnet J.* 17 (2011), <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- [28] A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics* 29 (2013) 15–21, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- [29] Y. Liao, G.K. Smyth, W. Shi, featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics* 30 (2014) 923–930, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
- [30] R. Edgar, M. Domrachev, A.E. Lash, Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 207–210, <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>.
- [31] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (2014), 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- [32] D.S. Fischer, F.J. Theis, N. Yosef, Impulse model-based differential expression analysis of time course sequencing data, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018), e119, <https://doi.org/10.1093/nar/gky675>.
- [33] J. Costa-Silva, D. Domingues, F.M. Lopes, RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool, *PLoS One* 12 (2017), e0190152, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>.
- [34] D. Spies, P.F. Renz, T.A. Beyer, C. Ciaudo, Comparative analysis of differential gene expression tools for RNA sequencing time course data, *Brief. Bioinform.* 20 (2019) 288–298, <https://doi.org/10.1093/bib/bbx115>.
- [35] D. Hebenstreit, M. Fang, M. Gu, V. Charoensawan, A. van Oudenaarden, S. A. Teichmann, RNA sequencing reveals two major classes of gene expression levels in metazoan cells, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011), 497, <https://doi.org/10.1038/msb.2011.28>.
- [36] G. Yu, L.-G. Wang, Y. Han, Q.-Y. He, clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters, *OMICS* 16 (2012) 284–287, <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.
- [37] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- [38] S.A. Bustin, J.-F. Beaulieu, J. Huggett, R. Jaggi, F.S.B. Kibenge, P.A. Olsvik, L. C. Penning, S. Toegel, MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments, *BMC Mol. Biol.* 11 (2010) 74, <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-74>.
- [39] Sheng Zhao and Russell D. Fernald, Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction.
- [40] J. Tellinghuisen, A.-N. Spiess, Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency, *Anal. Biochem.* 449 (2014) 76–82, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.020>.
- [41] J.M. Ruijter, M.W. Pfaffl, S. Zhao, A.N. Spiess, G. Bogg, J. Blom, R.G. Rutledge, D. Sisti, A. Lievens, K. de Preter, S. Derveaux, J. Hellemans, J. Vandesompele, Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications, *Methods* 59 (2013) 32–46, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.08.011>.
- [42] B.S. Stamova, M. Apperson, W.L. Walker, Y. Tian, H. Xu, P. Adamczyk, X. Zhan, D.-Z. Liu, B.P. Ander, I.H. Liao, J.P. Gregg, R.J. Turner, G. Jickling, L. Lit, F.R. Sharp, Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood, *BMC Med. Genom.* 2 (2009), 49, <https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-49>.
- [43] B.W. Hounkpe, F. Chenou, F. de Lima, E.V. de Paula, HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) D947–D955, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa609>.
- [44] K.C.G. Dos Santos, I. Desgagné-Penix, H. Germain, Custom selected reference genes outperform pre-defined reference genes in transcriptomic analysis, *BMC Genom.* 21 (2020), 35, <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6426-2>.
- [45] S. Grabia, U. Smyczynska, K. Pagacz, W. Fendler, NormiRazor: tool applying GPU-accelerated computing for determination of internal references in microRNA transcription studies, *BMC Bioinform.* 21 (2020), 425, <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03743-8>.
- [46] J. Vandesompele, K. de Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. van Roy, A. de Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by, *Genome Biol.* 3 (2002).
- [47] C.L. Andersen, J.L. Jensen, T.F. Ørntoft, Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets, *Cancer Res.* 64 (2004) 5245–5250, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- [48] M.W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians, Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper-excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 509–515, <https://doi.org/10.1023/b:biote.0000019559.84305.47>.
- [49] K.R. Kukurba, S.B. Montgomery, RNA sequencing and analysis, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015 (2015) 951–969, <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>.
- [50] C. Soneson, M. Delorenzi, A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data, *BMC Bioinform.* 14 (2013).
- [51] D. Spies, C. Ciaudo, Dynamics in transcriptomics: advancements in RNA-seq time course and downstream analysis, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13 (2015) 469–477, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.08.004>.
- [52] M.D. Robinson, D.J. McCarthy, G.K. Smyth, edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics* 26 (2010) 139–140, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- [53] V.M. Kvam, P. Liu, Y. Si, A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data, *Am. J. Bot.* 99 (2012) 248–256, <https://doi.org/10.3732/ajb.1100340>.
- [54] Z.H. Zhang, D.J. Jhaveri, V.M. Marshall, D.C. Bauer, J. Edson, R.K. Narayanan, G. J. Robinson, A.E. Lundberg, P.F. Bartlett, N.R. Wray, Q.-Y. Zhao, A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-seq data, *PLoS One* 9 (2014), e103207, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103207>.
- [55] L.A. Corchete, E.A. Rojas, D. Alonso-López, J. de Las Rivas, N.C. Gutiérrez, F. J. Burguillo, Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis, *Sci. Rep.* 10 (2020), 19737, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76881-x>.
- [56] A. Conesa, P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, M.W. Szczesniak, D.J. Gaffney, L.L. Elo, X. Zhang, A. Mortazavi, A survey of best practices for RNA-seq data analysis, *Genome Biol.* 17 (2016), 13, <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>.
- [57] A.M. Conard, N. Goodman, Y. Hu, N. Perrimon, R. Singh, C. Lawrence, E. Larschan, TIMEOR: a web-based tool to uncover temporal regulatory mechanisms from

- multi-omics data, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) W641–W653, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab384>.
- [58] V.-K.S. Oh, R.W. Li, Temporal dynamic methods for bulk RNA-Seq time series data, *Genes* 12 (2021), <https://doi.org/10.3390/genes12030352>.
- [59] W. Mei, Z. Jiang, Y. Chen, L. Chen, A. Sancar, Y. Jiang, Genome-wide circadian rhythm detection methods: systematic evaluations and practical guidelines, *Brief. Bioinform.* 22 (2021), <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa135>.
- [60] R. Yang, Z. Su, Analyzing circadian expression data by harmonic regression based on autoregressive spectral estimation, *Bioinformatics* 26 (2010) i168–i174, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq189>.
- [61] C.S. Möller-Levet, S.N. Archer, G. Bucca, E.E. Laing, A. Slak, R. Kabiljo, J.C.Y. Lo, N. Santhi, M. von Schantz, C.P. Smith, D.-J. Dijk, Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) E1132–E1141, <https://doi.org/10.1073/pnas.1217154110>.
- [62] S.N. Archer, E.E. Laing, C.S. Möller-Levet, D.R. van der Veen, G. Bucca, A.S. Lazar, N. Santhi, A. Slak, R. Kabiljo, M. von Schantz, C.P. Smith, D.-J. Dijk, Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014) E682–E691, <https://doi.org/10.1073/pnas.1316335111>.
- [63] E. Arnardottir, E. Nikonova, K.R. Shockey, A. Pdelezhnikov, R.C. Anafi, K. Q. Tanis, G. Maislin, D.J. Stone, J.J. Renger, C.J. Winrow, A.I. Pack, Blood-gene expression reveals reduced circadian rhythmicity in individuals p resistant to sleep deprivation, *Sleep* 37 (2014) 1589–1600.
- [64] D.-J. Dijk, J.F. Duffy, Novel approaches for assessing circadian rhythmicity in humans: a review, *J. Biol. Rhythms* 35 (2020) 421–438, <https://doi.org/10.1177/0748730420940483>.
- [65] M.E. Hughes, K.C. Abruzzi, R. Allada, R. Anafi, A.B. Arpat, G. Asher, P. Baldi, C. de Bekker, D. Bell-Pedersen, J. Blau, S. Brown, M.F. Ceriani, Z. Chen, J.C. Chiu, J. Cox, A.M. Crowell, J.P. DeBruyne, D.-J. Dijk, L. DiTacchio, F.J. Doyle, G.E. Duffield, J. C. Dunlap, K. Eckel-Mahan, K.A. Esser, G.A. FitzGerald, D.B. Forger, L.J. Francey, Y.-H. Fu, F. Gachon, D. Gatfield, P. de Goede, S.S. Golden, C. Green, J. Harer, S. Harmer, J. Haspel, M.H. Hastings, H. Herzog, E.D. Herzog, C. Hoffmann, C. Hong, J.J. Hughey, J.M. Hurley, H.O. de La Iglesia, C. Johnson, S.A. Kay, N. Koike, K. Kornacker, A. Kramer, K. Lamia, T. Leise, S.A. Lewis, J. Li, X. Li, A.C. Liu, J. J. Loros, T.A. Martino, J.S. Menet, M. Merrow, A.J. Millar, T. Mockler, F. Naef, E. Nagoshi, M.N. Nitabach, M. Olmedo, D.A. Nusinow, L.J. Ptáček, D. Rand, A. B. Reddy, M.S. Robles, T. Roenneberg, M. Rosbash, M.D. Ruben, S.S.C. Rund, A. Sancar, P. Sassone-Corsi, A. Sehgal, S. Sherrill-Mix, D.J. Skene, K.-F. Storch, J. S. Takahashi, H.R. Ueda, H. Wang, C. Weitz, P.O. Westermarck, H. Wijnen, Y. Xu, G. Wu, S.-H. Yoo, M. Young, E.E. Zhang, T. Zielinski, J.B. Hogenesch, Guidelines for genome-scale analysis of biological rhythms, *J. Biol. Rhythms* 32 (2017) 380–393, <https://doi.org/10.1177/0748730417728663>.
- [66] C. Scheiermann, Y. Kunitaki, P. Frenette, Circadian control of the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 190–198.
- [67] E.E. Laing, C.S. Möller-Levet, N. Poh, N. Santhi, S.N. Archer, D.-J. Dijk, Blood transcriptome based biomarkers for human circadian phase, *Elife* 6 (2017), <https://doi.org/10.7554/eLife.20214.001>.
- [68] J.J. Hughey, Machine learning identifies a compact gene set for monitoring the circadian clock in human blood, *Genome Med* 9 (2017), 19, <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0406-4>.
- [69] A. Lindenbergh, M. de Pagter, G. Ramdayal, M. Visser, D. Zubakov, M. Kayser, T. Sijen, A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 565–577, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.01.009>.
- [70] A.P. Salzmänn, M. Bamberg, C. Courts, G. Dørum, A. Gosch, T. Hadrys, G. Hadzic, M. Neis, P.M. Schneider, T. Sijen, M. den, van Berge, P. Wiegand, C. Haas, mRNA profiling of mock casework samples: results of a FoRNaP collaborative exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 50 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102409>.
- [71] D. Zubakov, M. Kokshoorn, A. Kloosterman, M. Kayser, New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains, *Int. J. Leg. Med.* 123 (2009) 71–74, <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0249-z>.
- [72] M. Sirker, P.M. Schneider, I. Gomes, A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions, *Int. J. Leg. Med.* 130 (2016) 1431–1438, <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1373-9>.
- [73] A. Sofer, K. Lei, C.M. Johannessen, L.W. Ellisen, Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 5834–5845, <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005>.
- [74] A.E. Pozhitkov, R. Neme, T. Domazet-Lošo, B.G. Leroux, S. Soni, D. Tautz, P. A. Noble, Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death, *Open Biol.* 7 (2017), <https://doi.org/10.1098/rsob.160267>.
- [75] G.T. Javan, E. Hanson, S.J. Finley, S.D. Visonà, A. Osculati, J. Ballantyne, Identification of cadaveric liver tissues using thanatotranscriptome biomarkers, *Sci. Rep.* 10 (2020), 6639, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63727-9>.
- [76] L.G. Antiga, L. Sibbens, Y. Abakkouy, R. Decorte, W. van den Bogaert, W. van de Voorde, B. Bekaert, Cell survival and DNA damage repair are promoted in the human blood thanatotranscriptome shortly after death, *Sci. Rep.* 11 (2021), 16585, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96095-z>.
- [77] M.J. Reust, M.H. Lee, J. Xiang, W. Zhang, D. Xu, T. Batson, T. Zhang, J.A. Downs, K.M. Dupnik, Dried blood spot RNA transcriptomes correlate with transcriptomes derived from whole blood RNA, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98 (2018) 1541–1546, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0653>.
- [78] B. Marcheva, K.M. Ramsey, C.B. Peek, A. Affinati, E. Maury, J. Bass, Circadian clocks and metabolism, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2013) 127–155, https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_6.
- [79] K. Lech, F. Liu, S.K. Davies, K. Ackermann, J.E. Ang, B. Middleton, V.L. Revell, F. J. Raynaud, I. Hoveijn, R.A. Hut, D.J. Skene, M. Kayser, Investigation of metabolites for estimating blood deposition time, *Int. J. Leg. Med.* 132 (2018) 25–32, <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1638-y>.
- [80] S. Wang, G. Shanthan, M.M. Bouzga, H.M. Thi Dinh, C. Haas, A.E. Fonnellop, Evaluating the performance of five up-to-date DNA/RNA co-extraction methods for forensic application, *Forensic Sci. Int.* (2021), 110996, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110996>.

Publikation 1

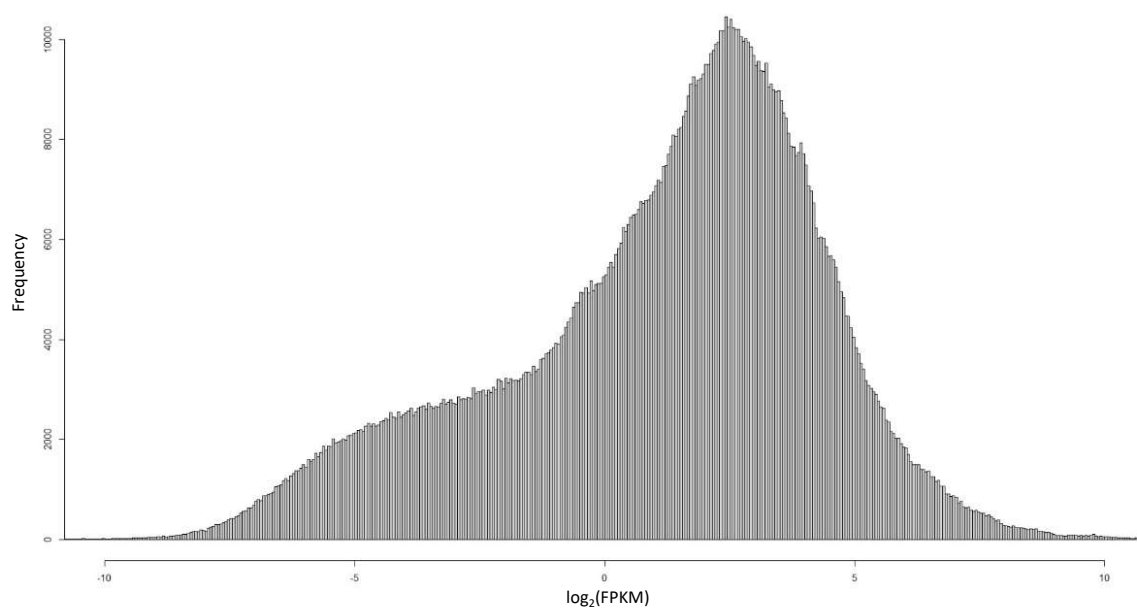
**TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains –
identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain deposition**

Supplementary Material



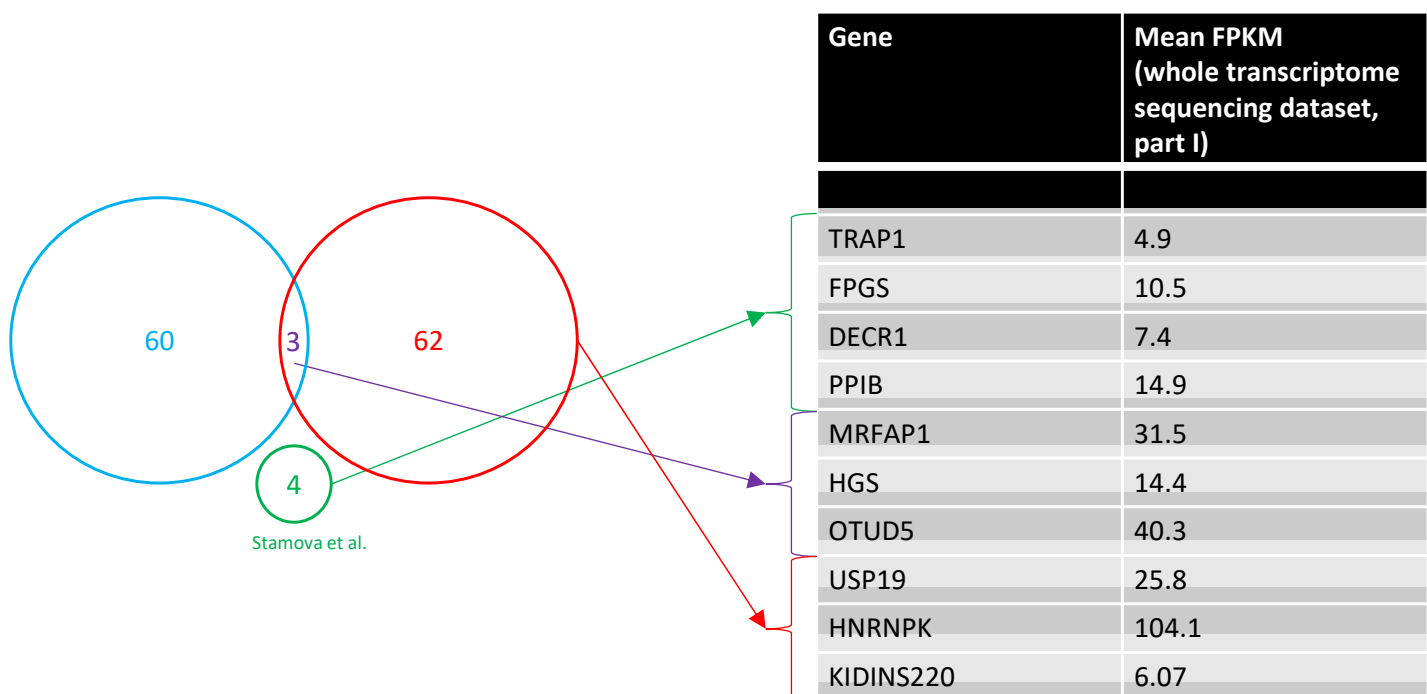
Supplementary Figure 1: Sampling procedure in study part I.

Study participants were instructed to obtain blood samples as follows: Fingertips were disinfected with disinfectant wipes for 15s (a) and left to air-dry for another 15s. Fingertips were then wiped dry with a sterile cotton pad (b). 28G safety lancets were used to prick the fingertip (c) and the first drop of blood was wiped off of with a second sterile cotton pad (d). 100 µl of blood were collected in neutral Minivettes (e). If the blood stopped flowing before the total volume of 100 µl was reached, a second fingertip was pricked as shown in (a-d). Participants then added the blood volume of 100 µl to a provided sample tube containing 200 µl of stabilizing reagent (f) followed by intensive shaking of the sample tube for 30s. Samples were immediately stored frozen in study participants' freezer and transported to the research facility within 24h on dry ice where they were stored at -80°C until further processing.



Supplementary Figure 2: Histogram of read count distribution

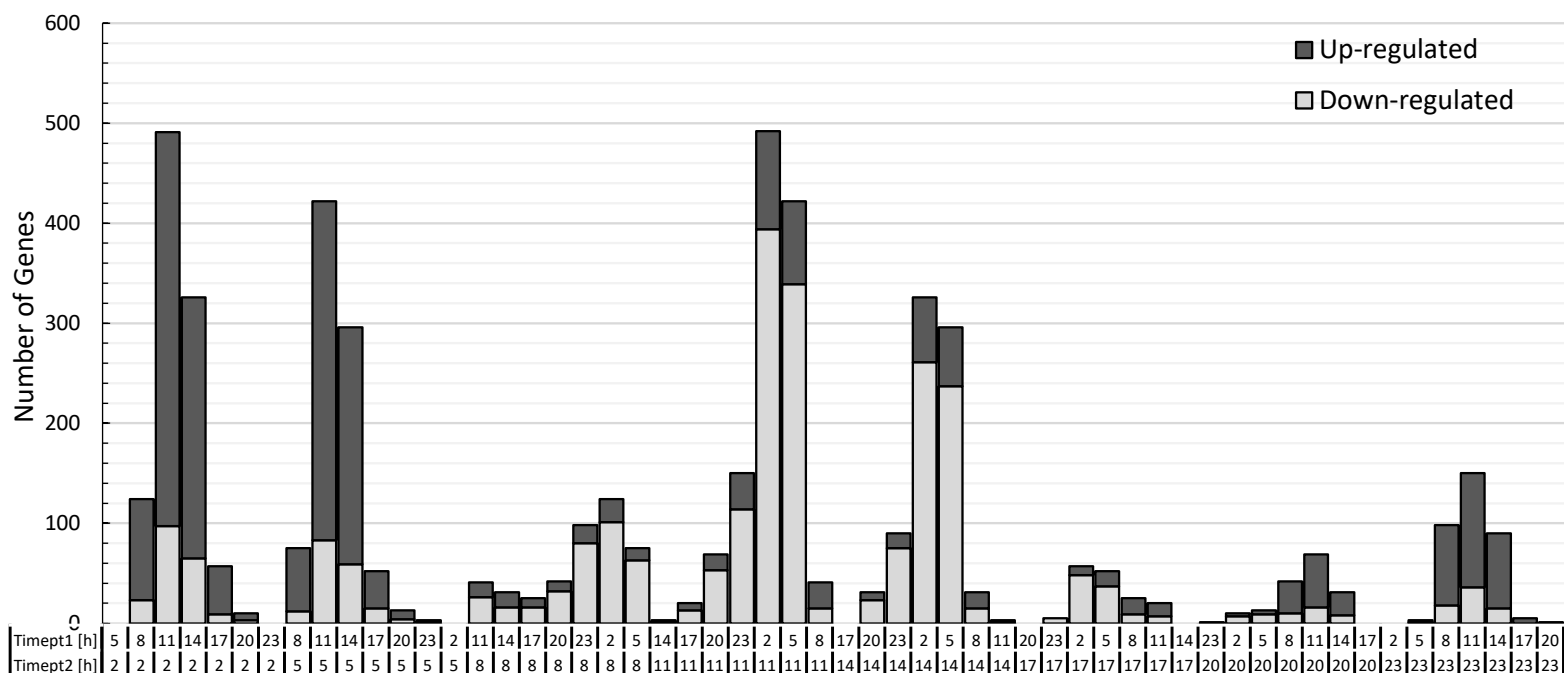
Histogram showing the frequency of observed $\log_2(\text{FPKM})$ values observed in the whole transcriptome sequencing dataset (80 samples).

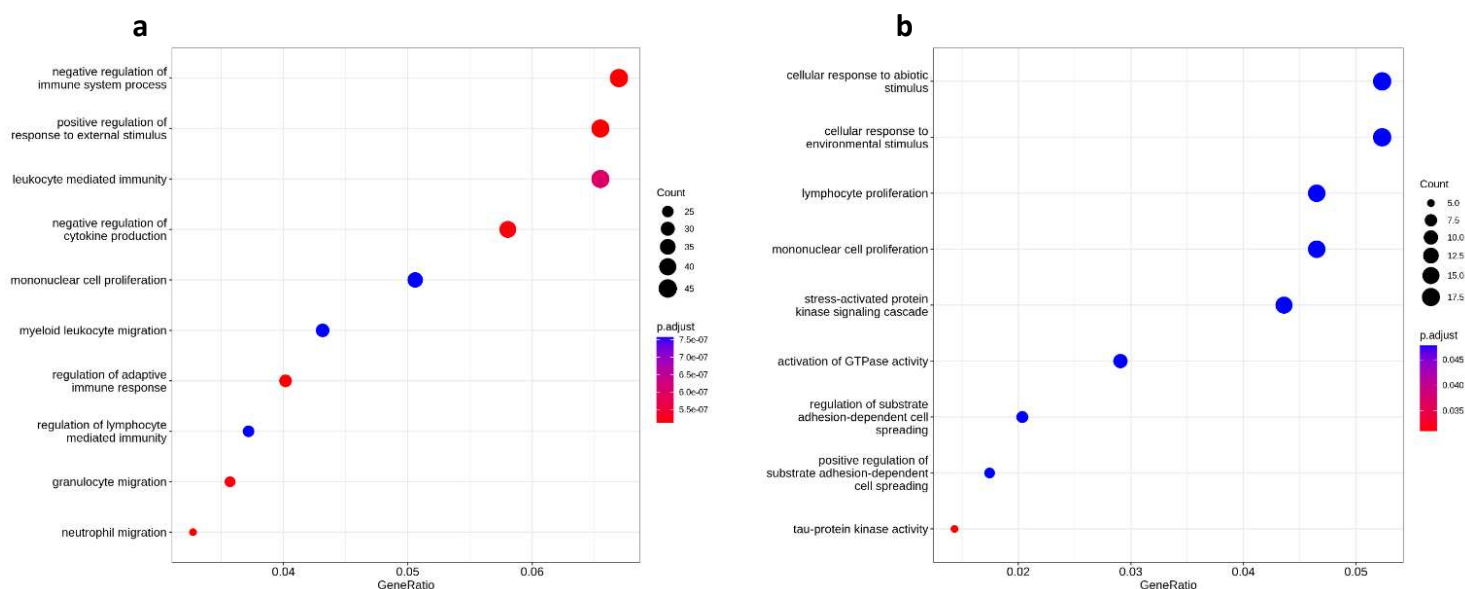


Supplementary Figure 3: Choosing reference gene candidates for qPCR normalization

Reference gene candidates were chosen based on a combination of previously published data and stability measurements in our own whole-transcriptome sequencing dataset. Stamova et al. [42] analyzed a dataset of whole blood from 526 individuals, including a large age range and diseased as well as healthy individuals. They reported a combination of four genes to be stably expressed in their dataset. Hounkpe et al. [43] a database (Housekeeping and Reference Transcript (HRT) Atlas that can be used to browse for stably expressed genes in different tissues. According to the criteria used in this database, a total of 63 transcripts can be identified as stably expressed based on a dataset containing a total of 407 human whole blood samples. However, as none of these publically available ressource specifically considered the time of day as an experimental conditions, we additionally used the algorithm described in [44] to identify the most stably expressed genes. Our final set of reference candidates thus comprised the four markers described by Stamova et al. [42] the top three stably expressed genes in the whole transcriptome sequencing dataset (part I of this study) as well as three genes that were stably expressed in the whole transcriptome sequencing dataset and also included in the HRT Atlas list.

*The manufacturer requires the inclusion of either GAPDH or 18S-rRNA on each Taqman Array card.





Supplementary Figure 5: Functional Gene ontology Analysis

a Gene ontology analysis for 833 markers identified as differentially expressed after DEseq2 analysis (graphical representation of the top 10 enriched GO terms). **b** Gene ontology analysis for 361 markers identified as differentially expressed after ImpulseDE2 analysis. The color of the dots represents the adjusted P-value; the size of the dots represents the number of markers in the given GO term.

Zusammenfassung und Überleitung zu Publikation 2 und Manuskript 3

Die vorliegende Publikation [143] beschreibt die Gesamttranskriptomsequenzierung von 80 Proben aus menschlichem Blut, die von zehn verschiedenen Probanden (fünf männlich, fünf weiblich, Altersmedian: 26,5 Jahre) zu acht verschiedenen Tageszeiten entnommen worden waren.

Von denselben Probanden waren zeitgleich Proben von Speichel entnommen worden. Während die Gesamttranskriptomsequenzierung der Blutproben homogene und für eine differentielle Genexpressionsanalyse gut geeignete Sequenzdaten erbrachte (s.u.), waren die aus Speichelproben generierten Sequenzdaten sehr heterogen und für eine solche Analyse nicht geeignet. Ein sehr ähnliches Ergebnis wurde in dem Kooperationsprojekt „RNAge“ (unter eigener Beteiligung, vgl. Abschnitt „Weitere Publikationen“) beobachtet. Die Ursache für diese Qualitätsunterschiede sollte in einer tiefer gehenden Analyse näher beleuchtet werden. Die Erkenntnisse aus dieser Untersuchung und mögliche Lösungsansätze für zukünftige Studien werden der zweiten in dieser Arbeit enthaltenen Publikation dargestellt (s. „3.2 Publikation 2: Schwierigkeiten bei der Gesamttranskriptomsequenzierung zur Biomarkeridentifizierung in Speichel“).

Für den Gesamttranskriptomsequenzdatensatz aus Blutproben erfolgte die Identifizierung der am stärksten oszillierenden und am stabilsten mit der Tageszeit korrelierenden (und somit am besten für eine Tageszeitschätzung geeigneten) Marker Kandidaten durch eine Kombination verschiedener statistischer Modellierungsansätze: Mit dem gut etablierten und robusten Modell DESeq2 [144] wurden zunächst Marker identifiziert, die in ihrer Expression signifikante Unterschiede zwischen den in Kategorien unterteilten Tageszeiten zeigen. Mit dem ImpulseDE2-Modell [145] wurde zudem die Kontinuität der Tageszeit berücksichtigt und Marker identifiziert, deren Expression sich im zeitlichen Verlauf eines Tages verändert. Die in beiden Modellierungsansätzen als signifikant differentiell exprimiert identifizierten Gene wurden als die meistversprechenden Kandidatenmarker selektiert, wobei Marker mit insgesamt niedrigem Expressionsniveau sowie Marker mit zwar signifikanten, aber sehr geringen Genexpressionsunterschieden in einem weiteren Schritt ausgeschlossen wurden. Mit diesem Ansatz wurden insgesamt 81 RNA-Marker als Kandidaten für eine forensische Tageszeitschätzung ausgewählt.

Unter Verwendung des in der humanmedizinischen Forschung etablierten Tageszeitschätzmodells „TimeSignatR“ konnte gezeigt werden, dass die selektierten Marker geeignet sind, die Tageszeit der Entnahme unabhängiger, unbekannter Proben zu schätzen. Nach Training des Modells mittels des in dieser Studie untersuchten Gesamttranskriptomsequenzdatensatzes konnte die Tageszeit der Entnahme für einen unabhängigen, publizierten Gesamttranskriptomsequenzdatensatz (153 Blutproben von elf Probanden) mit einem medianen absoluten Fehler von 2,26 Stunden geschätzt werden.

Zur Prüfung des gewählten Markeridentifizierungsansatzes wurden anschließend 13 ausgewählte Marker in einem unabhängigen Datensatz (acht verschiedene Probanden, vier weiblich, vier männlich, Altersmedian 29,5 Jahre; Blutentnahme zu vier verschiedenen Tageszeiten) mit einem unabhängigen Genexpressionsmesserverfahren (qPCR) untersucht. Die mittels Gesamttranskriptomsequenzierung festgestellten Genexpressionsunterschiede konnten in frischem (flüssigem) Blut für alle 13 Marker mittels qPCR reproduziert werden. Weiterhin wurde die Genexpression der selektierten Marker in für zwölf Stunden und für eine Woche gelagerten Blutproben (von denselben Probanden) untersucht. Dabei konnte die relevante Erkenntnis gewonnen werden, dass das Genexpressionsmuster der zwölf Stunden alten Proben dem Genexpressionsmuster der frischen Blutproben entspricht (also die Expressionsmaxima der jeweiligen Gene zur selben Zeit beobachtet wurden und nicht um zwölf Stunden verschoben waren). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich die diurnal rhythmische Oszillation der Genexpression nach Entnahme des Bluts nicht in relevantem Maße fortsetzt, sodass das Genexpressionsmuster in einer Blutspur tatsächlich die Tageszeit der Entnahme widerspiegelt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass auf eine rhythmische Oszillation hinweisende Expressionsunterschiede für die Mehrheit der untersuchten Marker (neun von 13) auch nach Trocknung für eine Woche zu beobachten waren, wohingegen die Messwerte einzelner Marker durch die Trocknung in relevantem Maße nivelliert wurden, sodass für diese Marker nach einer Woche keine Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Tageszeiten mehr zu beobachten waren. Der zweite Studienteil belegt somit grundsätzlich die Eignung des durchgeführten Markeridentifizierungsansatzes, zeigt jedoch auch die Notwendigkeit der Ergebnisvalidierung in einem unabhängigen Datensatz und mit einem unabhängigen Messverfahren auf.

Um aus den so identifizierten Marker-Kandidaten ein für die Anwendung in der forensischen Fallarbeit geeignetes Verfahren zu entwickeln, ist die Etablierung eines gezielten Messverfahrens, die Entwicklung eines statistischen Modells zur Tageszeitschätzung auf Basis von Genexpressions-Messwerten sowie die Validierung von Messverfahren und Schätzmodell anhand eines umfangreichen, forensisch relevante Bedingungen widerspiegelnden Datensatzes notwendig. Die Umsetzung dieser Schritte sollte im zweiten Teil dieser Arbeit, dargelegt in Manuskript 3 erfolgen (s. „3.3 Manuskript 3: Entwicklung einer Methode zur Schätzung der Depositionstageszeit einer Blutspur mittels gezielter RNA-Sequenzierung“).

3.2 Publikation 2: Schwierigkeiten bei der Gesamttranskriptomsequenzierung zur Biomarkeridentifizierung in Speichel



Spitting in the wind?—The challenges of RNA sequencing for biomarker discovery from saliva

Annica Gosch¹ · Regine Banemann² · Guro Dørum³ · Cordula Haas³ · Thorsten Hadrys⁴ · Nadescha Haenggi³ · Galina Kulstein² · Jacqueline Neubauer³ · Cornelius Courts¹

Received: 31 July 2023 / Accepted: 25 September 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Forensic trace contextualization, i.e., assessing information beyond who deposited a biological stain, has become an issue of great and steadily growing importance in forensic genetic casework and research. The human transcriptome encodes a wide variety of information and thus has received increasing interest for the identification of biomarkers for different aspects of forensic trace contextualization over the past years. Massively parallel sequencing of reverse-transcribed RNA (“RNA sequencing”) has emerged as the gold standard technology to characterize the transcriptome in its entirety and identify RNA markers showing significant expression differences not only between different forensically relevant body fluids but also within a single body fluid between forensically relevant conditions of interest. Here, we analyze the quality and composition of four RNA sequencing datasets (whole transcriptome as well as miRNA sequencing) from two different research projects (the RNAge project and the TrACES project), aiming at identifying contextualizing forensic biomarker from the forensically relevant body fluid saliva. We describe and characterize challenges of RNA sequencing of saliva samples arising from the presence of oral bacteria, the heterogeneity of sample composition, and the confounding factor of degradation. Based on these observations, we formulate recommendations that might help to improve RNA biomarker discovery from the challenging but forensically relevant body fluid saliva.

Keywords Forensic RNA analysis · Saliva · Massive parallel sequencing

Introduction

The main aim of forensic molecular biological analysis is the individualization of a trace, i.e., unequivocally linking a biological trace to its donor, which is commonly performed via DNA-based STR profiling. Apart from and complementary to that, the contextualization of traces has become an issue of great and steadily growing importance. If the donor of a trace is not contested in a criminal court case, it can be

crucial in the reconstruction of the course of events to contextualize the trace, meaning to explain, based on physical evidence, by which activity, how long ago, at which time of day, as part of which body fluid or organ tissue, etc., and the trace in question has been deposited.

Because of the high and complex information content of the transcriptome [1] represented by its differential and dynamically changing composition, the analysis of RNA readily lends itself to the assessment of several forensic contextual aspects. Among these, the identification of body fluids via gene expression analysis [2] is routinely applied in forensic casework in different laboratories [3]. Besides, several research projects assess the potential of transcriptomic analysis for assessing further aspects of forensic relevance, such as time since trace deposition [4], post-mortem interval estimation [5], wound age [6], the biological age of the donor [7], and time of day of deposition [8]. Since 2009, also microRNA (miRNA), a small, non-coding regulatory type of RNA, about 18–25 nt in length, is being investigated in the context of its forensic potential [9] and ongoing research into

✉ Cornelius Courts
cornelius.courts@uk-koeln.de

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

² Federal Criminal Police Office, Forensic Science Institute, Wiesbaden, Germany

³ Zurich Institute of Forensic Medicine, University of Zurich, Zurich, Switzerland

⁴ State Criminal Police Office, Forensic Science Institute, Munich, Germany

a wide array of forensic applications of miRNA analysis has covered a lot of ground up to this point [10, 11].

Frequently, the selection of mRNA and miRNA candidates whose differential expression and/or degradation state [12] informs on a particular aspect of forensic interest will be performed by perusing (not necessarily forensic) literature and testing previously identified markers for their informative value in the setup of interest (for example performed in [8, 13]). However, previously published markers may not always be ideal or even available to answer the question of forensic interest at hand, and thus, traditional statistical and machine learning algorithms based upon raw data generated by massively parallel sequencing (MPS) of whole transcriptomes [14] and miRNomes [15] are increasingly being used for unsupervised marker identification.

Saliva is a body fluid regularly encountered in several criminal contexts with cases of sexual assault (e.g., licked, bitten, or spat on body parts, oral rape) being of particular impact. Therefore, the reliable and sensitive detection, identification, and contextualization of saliva in (mixed) trace material is very desirable and can be crucial in the assessment of the trace's weight of evidence. Consequently, analysis of salivary RNA from forensic samples is well represented in the literature [16–20], with a particular focus on body fluid identification. Additionally, saliva is often included in marker identification studies for other trace contextualization aspects [4, 21].

Within this article, the authors—a European consortium of forensic RNA researchers working on different aspects of RNA-based trace contextualization—present RNA sequencing data from different sets of salivary samples and experimental setups and discuss the challenges associated with whole transcriptome sequencing of saliva samples.

Material and methods

Evaluations are based on four different RNA sequencing datasets from saliva samples obtained in two different forensic genetic research projects: RNA-based Age Estimation (RNAgE) and Transcriptomic Analysis for the Contextualization of Evidential Stains (TrACES). Both research projects have the aim of identifying RNA markers for a forensically relevant aspect of trace contextualization. The first project aimed at correlating the transcriptome with the sample donor's age (hereafter referred to as “RNAgE” project), while the second project explored potential correlations of the transcriptome with the time of day of sample collection (hereafter referred to as “TrACES” project). In both research projects, donors provided samples of blood as well as saliva. Results for the transcriptomic analysis of blood samples are reported separately for the “RNAgE” (manuscript under preparation) and the “TrACES” [22] projects.

In both projects, salivary transcriptomes were analyzed using both whole transcriptome (WT) and microRNA

(miRNA) sequencing, resulting in a total of four datasets (Table 1).

Details on sample collection and sample processing are provided in Bioinformatic processing of datasets was performed as described in Table 2.

Table 1. All protocols were performed according to the manufacturers' instructions.

Bioinformatic processing of datasets was performed as described in Table 2.

Results

In two different research projects, RNA sequencing was performed to identify biomarkers (human RNA transcripts or human miRNA) showing differential expression either between individuals of different ages (“RNAgE” project) or between samples deposited at different times of the day (“TrACES” project). An evaluation of the distribution of sequencing reads in the four different datasets from human saliva samples showed that only a low percentage of reads mapped to the actual RNA species of interest (Fig. 1). The percentage of human on-target reads was lowest in the “RNAgE-WT” dataset (average: 0.1%, range: 0.007–1.1%) and highest in the “TrACES-miRNA” dataset (average: 38.4%, range: 3.8–86.2%). For a better understanding of the reasons for these low on-target read count percentages, we performed an in-depth analysis of the read distribution of the four sequencing datasets (Fig. 1, Supplementary Tables 1 and 2).

Non-human RNA

Taxonomic classification of reads revealed that the largest proportion of reads in both WT datasets is of bacterial origin (Fig. 1). Sequences from a diverse set of microbial species were detected (Supp. File 1 and 2), most of which are commonly encountered in the human oral cavity [39]. The percentage of bacterial reads was consistently > 75% in the “RNAgE-WT” dataset and thus accounted for the majority of reads in every sample of this dataset. The “TrACES-WT” dataset contained lower percentages of bacterial reads (average: 58%, range: 3–97%) with large variability between individuals as well as between samples from the same individual taken at different time points of the day (Supp. Table 1).

In both miRNA datasets, the percentage of microbial reads was lower compared to the whole transcriptome sequencing dataset from the corresponding research project (average < 30% in both datasets, Supp. Table 2).

Human RNA

In the “RNAgE-WT” dataset, the majority of human reads were attributed to ribosomal RNA (rRNA) (average:

Table 1 Sample collection and processing information for the four different saliva sample sets

Sample set abbreviation	RNAge—WT	TrACES—WT	RNAge—miRNA	TrACES—miRNA
Aspect of contextualization	Donor age	Time of day	Donor age	Time of day
Targeted RNA type	Total RNA (excluding rRNA)	Total RNA (excluding rRNA)	miRNA	miRNA
Number of Samples and Individuals	67 individuals (39 females, 28 males; 8–77 years); 1 sample per individual	3 individuals (2 males, 1 female, 25–31 years), 8 samples per individual (8 time points: 8 AM, 11 AM, 2 PM, 5 PM, 8 PM, 11 PM, 2 AM, 5 AM); 24 samples in total	85 individuals (56 females, 29 males; 0–96 years); 1 sample per individual	10 individuals (5 males, 5 females; 19–31 years), 8 samples per individual (8 time points: 8 AM, 11 AM, 2 PM, 5 PM, 8 PM, 11 PM, 2 AM, 5 AM); 80 samples in total**
Sample collection	Cotton swab (Forensix sample collection system, ThermoFisher Scientific) soaked in liquid saliva* (after spitting)	Buccal mucosa collected on a cotton swab (Sarstedt)*	Cotton swab (Forensix sample collection system, ThermoFisher Scientific) soaked in liquid saliva* (after spitting)	Buccal mucosa collected on a cotton swab (Sarstedt)*
Sample stabilization/storage	Dried and stored at RT for up to 11 days	Stabilized in DNA/RNA shield stabilization solution (Zymo Research) and stored at –80 °C	Dried and stored at RT for up to 11 days	Stabilized in DNA/RNA shield stabilization solution (Zymo Research) and stored at –80 °C
RNA extraction	ReliaPrep RNA Miniprep System, (Promega)	mirVana miRNA extraction kit (total RNA protocol), (Thermo Fisher Scientific)	miRNeasy mini Kit (QIAGEN)	mirVana miRNA extraction kit (total RNA protocol), (Thermo Fisher Scientific)
DNase treatment	TURBO DNase free Kit, Thermo Fisher Scientific	TURBO DNase free Kit, Thermo Fisher Scientific	TURBO DNase free Kit, Thermo Fisher Scientific	TURBO DNase free Kit, Thermo Fisher Scientific
RNA quantification	QuantiFluor RNA System, HS assay, (Promega)	QuantiFluor RNA System, HS assay, (Promega)	QuantiFluor RNA System, HS assay, (Promega)	QuantiFluor RNA System, HS assay, (Promega)
Quality control	Not assessed	RNA Pico Chip Kit on a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies)	Not assessed	RNA Pico Chip Kit on a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies)
Library preparation	TRIO RNA Seq Library Preparation Kit, no rRNA depletion (Tecan)	Stranded total RNA with Ribo-Zero Plus protocol, Ribo-Zero Plus rRNA depletion kit (Illumina), performed at the Competence Centre for Genomic Analyses in Kiel, Germany	NEBNext multiplex small RNA library Prep Set for Illumina (NEB)	NextFlex Small RNA library preparation kit (Bioo Scientific) performed at the Competence Centre for Genomic Analyses in Kiel, Germany
Sequencing	NovaSeq 6000 platform, Illumina, S1 flowcell (100 nt, single end, 15 Mio. Reads/sample), performed at the Functional Genomics Center Zurich (FGCZ), Switzerland	NovaSeq 6000 platform, Illumina, S4 flowcell, (2x50 bp, paired-end, 30 Mio. Reads/sample), performed at the Competence Centre for Genomic Analyses in Kiel, Germany	NextSeq 500 platform, Illumina, High output flowcell, (75 nt, single end, 13 Mio. Reads/sample), performed at the Functional Genomics Center Zurich (FGCZ), Switzerland	NovaSeq 6000 platform, Illumina, S1 flowcell, (2x50 bp, paired-end, 16 Mio. Reads/sample), performed at the Competence Centre for Genomic Analyses in Kiel, Germany

*Donors refrained from eating and drinking (except water) for ½ h prior to sampling

**In the TrACES – miRNA dataset, library preparation failed for two samples, thus only 78 out of 80 samples were submitted to sequencing

Table 2 Bioinformatic processing information of RNA sequencing data for the four different saliva sample sets. All processing steps for the WT datasets were performed on the free public European Galaxy server UseGalaxy.eu [23]

Sample set abbreviation	RNAGe—WT	TrACES—WT	RNAGe—miRNA	TrACES—miRNA
Preprocessing	Trimmomatic (Adapter trimming, Removal of 5 bases from the start of the read, keeping reads of a minimal length of 20 nt and a minimum average quality of 10) [24]	Trim Galore! (Adapter trimming, Removal of 1 base from the start of the read, removal of low-quality ends from reads, keeping reads of a minimal length of 20 nt) [25]	sRNAbench (default settings for the NEBnext protocol) [26, 27]	sRNAbench (default settings for the Bioo Scientific Nextflex (v2,v3) protocol), processing of forward strand reads (R1) only [26, 27]
Mapping	STAR mapping algorithm, single-end reads, using the GenCode primary assembly reference genome and primary assembly comprehensive gene annotation (GRCh38, p13, Release 43) [28, 29]	STAR mapping algorithm, paired-end reads, using the GenCode primary assembly reference genome and primary assembly comprehensive gene annotation (GRCh38, p13, Release 43) [28, 29]	sRNAbench (default settings for the NEBnext protocol, annotation reference database: miRBase release 22.1, species: <i>Homo sapiens</i>) [26, 27, 30]	sRNAbench (default settings for the Bioo Scientific Nextflex (v2,v3) protocol, annotation reference database: miRBase release 22.1, species: <i>Homo sapiens</i>), processing of R1 reads only [26, 27, 30]
Assessment of ribosomal RNA (rRNA) content	SortMeRNA on trimmed reads, rRNA databases: 2.1b-rfam-5 s-database-id98 2.1b-silva-arc-23 s-id98 2.1b-silva-euk-28 s-id98 2.1b-silva-bac-23 s-id98 2.1b-silva-euk-18 s-id95 2.1b-silva-bac-16 s-id90 2.1b-rfam-5.8 s-database-id98 2.1b-silva-arc-16 s-id9 [31–33]*	SortMeRNA on trimmed reads, rRNA databases: 2.1b-rfam-5 s-database-id98 2.1b-silva-arc-23 s-id98 2.1b-silva-euk-28 s-id98 2.1b-silva-bac-23 s-id98 2.1b-silva-euk-18 s-id95 2.1b-silva-bac-16 s-id90 2.1b-rfam-5.8 s-database-id98 2.1b-silva-arc-16 s-id9 [31–33]*	sRNAbench (default settings for the NEBnext protocol) [26, 27]	sRNAbench (default settings for the Bioo Scientific Nextflex (v2,v3) protocol), processing of R1 reads only [26, 27]
Assessment of bacterial RNA content	Kraken2 on trimmed reads, Bracken, KrakenTools, Krona [34–38]	Kraken2 on trimmed reads, Bracken, KrakenTools, Krona [34–38]	sRNAblast on unassigned reads from sRNAbench analysis [26, 27]	sRNAblast on unassigned reads from sRNAbench analysis [26, 27]
Assessment of on-target read counts	“reads per gene” output from the STAR mapping algorithm [28]	“reads per gene” output from the STAR mapping algorithm [28]	sRNAbench (default settings for the NEBnext protocol), SA read counts provided in the mature_sense_SA output file [26, 27]	sRNAbench (default settings for the Bioo Scientific Nextflex (v2,v3) protocol), SA read counts provided in the mature_sense_SA output file [26, 27]

*Reads mapping to human mitochondrial rRNA (ENSG00000210082.2 and ENSG00000211459.2) were additionally counted as rRNA reads and excluded from the on-target read count table

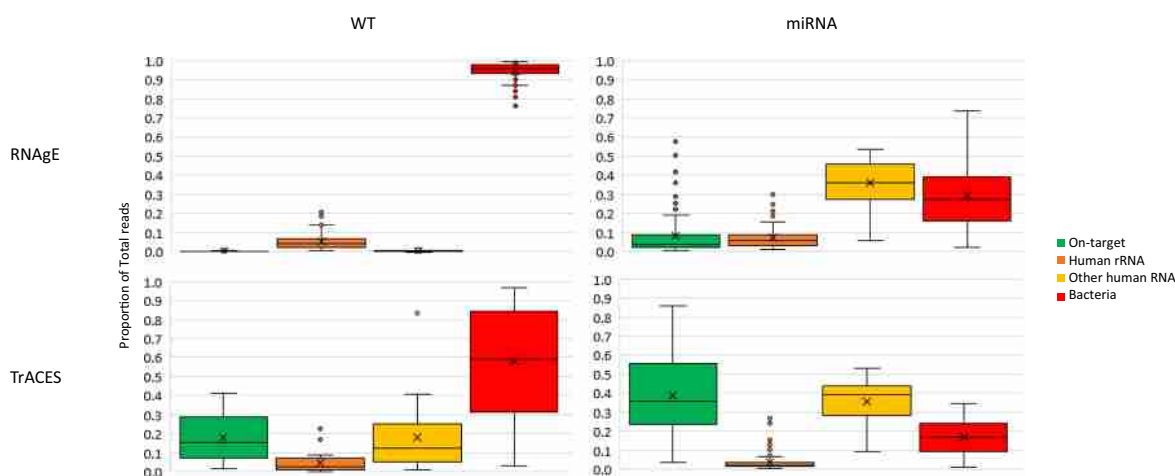


Fig. 1 Distribution of sequencing reads in four RNA sequencing datasets from saliva samples. Boxplots indicate the distribution of the proportion of sequencing reads over $n=67$, 24, 85, 78 (RNAge-WT, TrACES-WT, RNAge-miRNA, and TrACES-miRNA datasets respectively) samples. The boxplots indicate the median and interquartile ranges (IQR), whiskers indicate the minimum and maximum values (within $1.5 \times \text{IQR}$), and outliers ($> 1.5 \times \text{IQR}$) are indicated by individual dots. Additionally, the average value is marked by a cross. WT, whole transcriptome. “On-target” reads are defined as reads

mapping to exonic regions of genes in the WT datasets (cf. Supp. Table 1) and reads mapping to miRbase (sense) in the miRNA datasets (cf. Supp. Table 2). “Other human RNA” reads are assigned to the human transcriptome but did not map to the target RNA type or human rRNA (i.e., ambiguously mapped reads, multi-mapping reads, intronic and intergenic reads for the WT datasets), and reads assigned to RNA types other than miRNA and rRNA (e.g., small nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), mRNA, long-non coding RNA (lncRNA) in miRNA datasets)

94.1%, Fig. 1, Supp. Table 1). Thus, among the already low proportion of reads mapping to the human transcriptome, the proportion of reads mapping to regions of interest (i.e., genes) was also low (average: 2.5%, Supp. Table 1). In comparison, the percentage of reads mapping to rRNA was considerably reduced in the “TrACES” dataset (average: 11%, Supp. Table 1). In the “RNAge” dataset, most of the ribosomal reads were from mitochondrial rRNA (average mitochondrial to nuclear rRNA ratio: 12.7, range: 1.5–83.0), whereas in the “TrACES” dataset, a higher proportion of nuclear rRNA reads was observed (average ratio: 0.1, range: 0.02–0.3, Supp. Table 1). In the “TrACES” dataset, the percentage of human reads mapping to regions of interest was on average 48.4% (Supp. Table 1). Besides the reads mapping to genes, a relevant proportion (average: 27%) also mapped to intronic or intergenic regions of the transcriptome (assigned as “no Feature” by the STAR mapping algorithm, Supp. Table 1).

In the miRNA sequencing datasets, rRNAs made up a relatively small proportion of the total reads of human origin (average of 13.6% and 4.7% in the “RNAge” and “TrACES” datasets respectively, Supp. Table 2). However, significant proportions of human reads were attributed to other (small) RNA species, resulting in average “on target”-miRNA reads of 13.7 and 46.9% of total human reads in the “RNAge” and “TrACES” datasets, respectively (Supp. Table 2).

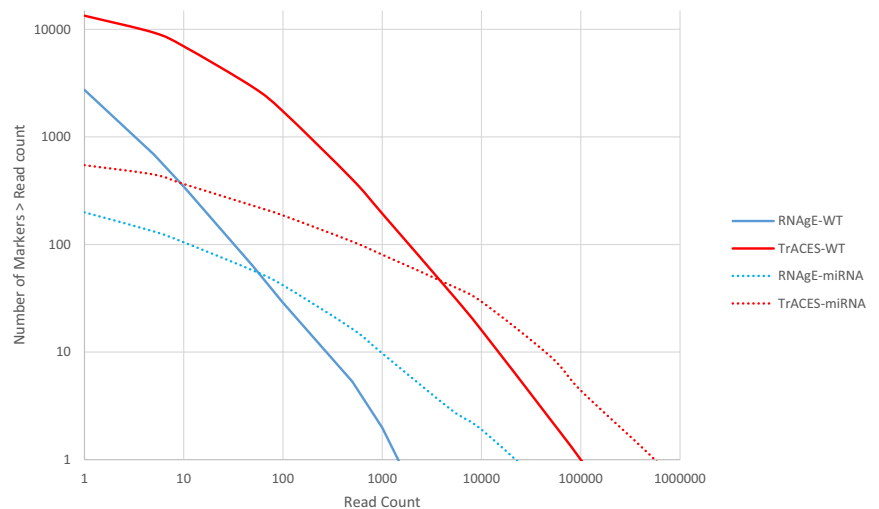
“Useful reads” for biomarker discovery

To apply algorithms for the identification of biomarkers using differential gene expression analysis, potential RNA markers must be reliably detected and quantified. Thus, markers with very low read counts are commonly excluded from datasets prior to the application of differential gene expression algorithms [40].

The number of RNA markers detected above a certain read count in each of the four sequencing datasets is plotted in Fig. 2. (Note: Data is shown as raw read counts in Fig. 2. For the purpose of performing differential gene expression analysis within datasets, these read counts would have to be normalized. However, as in this step we were interested in the number of markers whose expression can reliably be quantified (i.e., can be differentiated from noise), raw read counts were considered here.)

It is evident that in each of the four datasets, the number of RNA markers that can be reliably quantified (and thus may be eligible for biostatistical analyses for marker discovery) is very limited. In the “RNAge-WT” dataset, an average of 29 markers (range: 0–264) exceeded an absolute read count threshold of 100. In the “TrACES-WT” dataset, a higher number of markers reached this threshold (average: 1731, range: 130–4020); however, this number remains low compared to a whole transcriptome

Fig. 2 Number of markers above a read count in each of the four RNA sequencing datasets. The plot indicates average values over $n=67, 24, 85, s78$ (RNAgE-WT, TrACES-WT, RNAgE-miRNA, and TrACES-miRNA datasets respectively) samples



sequencing dataset of human whole blood that had been processed in a similar way in the “TrACES” project (average: 10,669, range: 8602–16,483 in a total of 80 samples from ten individuals, data not shown).

The number of miRNA markers reaching an absolute read count threshold of 100 was 42 (4–156) and 186 (49–273) in the “RNAgE” and “TrACES” datasets, respectively.

Discussion

We analyzed four different RNA sequencing datasets from saliva samples originating from two different research projects. In each of these datasets, data analysis proved to be challenging due to a large heterogeneity between samples and consistently low percentages of read counts aligning with the RNA targets of interest. Nevertheless, differences were observed between datasets that were analyzed under different conditions, indicating that some of the challenges associated with RNA sequencing of saliva samples may be addressed by adjusting the analysis procedures. It needs to be emphasized that this study was not designed to systematically assess how individual aspects within each of the different workflows impacted the total outcome. Nonetheless, the observations reported herein allow for some conclusions that merit consideration for future biomarker discovery studies for forensic (and non-forensic) purposes.

Based on the in-depth analysis of four RNA sequencing datasets (whole transcriptome and miRNome) from two different forensic research projects, we identified three factors contributing to the challenges of RNA sequencing from saliva samples.

Non-human RNA content

Whole transcriptome analyses showed that a large proportion of the RNA present in the salivary samples was of bacterial origin, which is consistent with previous studies [41–43]. For example, Ostheim et al. describe that the bacterial RNA content in human saliva is on average 1145 times higher than the human RNA content (based on 18S/16S rRNA ratio measurements) [42].

In comparison to the “RNAgE-WT” dataset, the bacterial RNA content was reduced in the “TrACES” dataset. The stabilization of buccal mucosa samples right after collection (possibly preventing bacterial growth), as well as the use of the Ribo-Zero Plus rRNA depletion kit (depleting not only human but also gram-negative (*Escherichia coli*) and gram-positive (*Bacillus subtilis*) bacterial 5S, 16S, and 23S rRNA sequences), might have contributed to the reduction of bacterial reads in this dataset.

As bacteria are naturally present in human saliva, it is hardly possible to select and sequence only the human component of the salivary transcriptome. Biomedical studies often analyze cell-free saliva (obtained by centrifugation) rather than whole saliva, as it has been shown to contain a lower proportion of bacterial RNA than whole saliva [43]. However, this approach would not be applicable to forensic saliva stains as these are usually dried (e.g., on surfaces at a crime scene) hindering a clear separation into cellular and cell-free fractions.

In another previous study, the authors observed higher percentages of reads mapping to the human transcriptome when enriching for poly-A-tailed RNAs (rather than depleting rRNAs), as polyadenylation of mRNAs is unique to eukaryotic cells [44]. However, the authors also remark that this approach restricts biomarker discovery to polyadenylated mRNA, whereas non-polyadenylated transcripts

(such as non-coding RNAs) will not be detectable [44]. Additionally, it has been experimentally proven that more comprehensive and reliable results can be obtained from low-quality/degraded samples with rRNA-depletion-based library preparation methods as compared to oligo(dT)-enrichment-based methods [45], which is why this approach is usually recommended for samples expected to show degradation to some extent (cf. “[Heterogeneity of sample composition](#)”).

Thus, the presence of oral bacteria in saliva has to be accepted and needs to be accounted for when processing salivary samples: Based on our observations, we recommend adjusting the sequencing depth to account for the high percentage of reads expected to map to bacterial rather than human RNA. Additionally, an adjustment of bioinformatics processing workflows was recommended by Kaczor-Urbaniowicz et al. Reads mapping to bacterial genomes should be filtered out in a first bioinformatics processing step, prior to analyzing the reads mapping to the human transcriptome [46].

Alternatively, the oral microbiome could represent a target for the discovery of (forensic) biomarkers: In biomedical studies, the composition of the oral microbiome has been associated with a number of oral as well as non-oral diseases (including periodontitis, cardiovascular disease, and pneumonia, e.g., summarized in [47, 48]). In a forensic context, microbial signatures have very early been suggested for analysis in addition to human transcripts for the differentiation of forensically relevant body fluids [49–51]. More recently, it has also been shown that changes in the composition of microbial transcripts could be used as a biomarker to analyze time since deposition of forensically relevant body fluids (including saliva) [41]. Hence, the salivary microbiome could be eligible for biomarker discovery for forensic trace contextualization by considering not only its composition on a species-level but also individual differentially expressed bacterial transcripts.

A second alternative solution would be to target the miRNome rather than the whole transcriptome. miRNAs are small, regulatory RNAs present only in eukaryotes and thus naturally absent from bacterial transcriptomes [52]. Indeed, in both research projects, the percentage of reads assigned to the human transcriptome was higher in the miRNA sequencing datasets as compared to the WT sequencing datasets.

Nonetheless, bacterial reads were still present in the majority of the samples. In both library preparation procedures performed in this study, small RNAs are enriched by selecting RNA molecules of a defined fragment length (corresponding to the combined length of small RNAs of interest and adjoined adapters). Thus, fragmented bacterial RNA of the same length will also be included in the resulting small RNA sequencing libraries.

As described for whole transcriptome sequencing of saliva samples, the issue of bacterial reads in miRNA sequencing can be addressed and might (at least partially) be resolved by the choice of sample preparation protocol, adjustment of sequencing depth to account for off-target reads as well as modified bioinformatic processing protocols [46].

Complexity of the human transcriptome

In the “RNAge” WT dataset, the majority of reads mapping to the human transcriptome was determined to be rRNA. rRNAs are known to make up a considerable proportion ($\geq 80\%$) of the human transcriptome [45, 53].

Therefore, it is common to perform some sort of enrichment of target RNA species (either enrichment of poly-A-tailed (mostly) mRNA (“poly-A-enrichment”) or selective depletion of rRNA (“rRNA depletion”)) [54]. When deciding on an RNA sequencing strategy for the “RNAge” project, it was taken into consideration that for the TRIO RNA Seq Library Preparation kit, the rRNA depletion step had previously been observed to have a negative influence on the sequencing quality and on downstream analyses [55]. Additionally, studies suggest that rRNAs may carry age-relevant information [56, 57]. Thus, the rRNA depletion step was omitted in the “RNAge” project. Therefore, it may plausibly be assumed that the relevant reduction of rRNA reads in the “TrACES” dataset as compared to the “RNAge” dataset can be explained by the inclusion of the rRNA depletion step during library preparation of samples in this study.

Notably, we observed a large proportion of rRNA reads mapping to mitochondrial RNA in the “RNAge” dataset. As mitochondria have evolutionary originated from incorporated prokaryotes [58], it may be hypothesized that a proportion of these reads was of true bacterial origin and incorrectly mapped to the human mitochondrial rRNA (mt-rRNA). However, as the absolute reads mapped to mt-rRNA reads did not relevantly decrease when STAR mapping was performed on reads not aligned to rRNA in the SortMeRNA step (data not shown), a true human mitochondrial origin is more likely. In single-cell-RNA sequencing, high proportions of mitochondrial reads are considered indicative of damaged cells (and corresponding cells are usually excluded from analysis) [59, 60]. Our observations might thus suggest a high proportion of damaged cells in human saliva (which is to be expected). However, to the best of our knowledge, no other studies report similarly high proportions of mt-rRNA in whole transcriptome sequencing datasets from saliva (available studies either performed rRNA depletion or did not specifically report rRNA read proportions [43, 46, 61, 62]). The association between high mt-rRNA reads and cell

damage in whole transcriptome sequencing datasets thus remains speculative and would have to be experimentally assessed in future studies.

Besides exonic reads, relevant percentages of reads mapping to intronic and intergenic regions were observed in both WT datasets. It has previously been reported that high percentages of intronic and intergenic reads (e.g., representing non-coding transcripts or nascent mRNAs) are commonly seen in rRNA-depleted whole transcriptome sequencing libraries (as opposed to poly-A-enriched sequencing libraries in which all transcripts lacking poly-A-tails would be excluded) [63, 64]. In comparison to poly-A-enriched libraries, rRNA depleted libraries capture information encoded in the entirety of the transcriptome and therefore require a higher sequencing depth to achieve a similar exonic coverage [63].

Compared to the WT datasets, miRNA sequencing resulted in higher percentages of on-target read counts. The higher proportion of human reads mapping to miRNAs in the “TrACES” dataset compared to the “RNAge” dataset might be attributed to the differences in sampling procedures (liquid saliva dried on cotton swabs vs. stabilized buccal swabs). Sullivan et al. observed significant differences in miRNome compositions between whole saliva samples stored with and without RNA stabilizer (with significantly higher miRNA read counts for samples stored in stabilizer). Moreover, they found differences attributable to the collection method (with significantly higher miRNA read counts for samples collected by swabbing compared to samples collected by expectoration), and highlight the relevance of consistent sample collection and storage procedures within studies [65].

Besides, the higher proportion of miRNAs reads in the “TrACES” dataset might also be caused by the use of a different library preparation procedure. Comparative evaluations of small RNA library preparation procedures have repeatedly reported higher proportions of miRNA reads and larger numbers of miRNAs detected when using the Bioo Scientific NextFlex Small RNA-Seq library preparation kit as compared to the NEBNext Small RNA Library Prep Kit [66, 67].

miRNA sequencing libraries also showed a large complexity comprising a variety of different RNA types including mRNAs, rRNAs, lncRNAs, snRNAs, snoRNAs, and other small RNAs (not specifically targeted by the miRNA mapping algorithm applied in this study [26, 27]). Types of small RNA other than miRNA, e.g., PIWI-interacting RNA (piRNA), snRNA, and snoRNA have already been reported as biomarkers in previous forensic studies [68, 69] and could be possibly included in future marker identification studies as well.

Heterogeneity of sample composition

The transcriptomic composition in the datasets from two different studies showed a large heterogeneity, both between

as well as within studies. Differences between sample sets partially arise from different technologies (as discussed above) but can also be attributable to the different sample types (liquid saliva samples in the “RNAge” and buccal swab samples in the “TrACES” dataset):

In forensic as well as biomedical studies, both liquid saliva and swabbed samples of the buccal mucosa (“buccal swabs”) are used to study the body fluid “saliva.” However, the two sample types have been shown to possess a markedly different biological composition [70]. Liquid saliva is a complex mixture of fluids secreted from various glands in the oral cavity. It is composed of > 99% water with a pH between 6 and 7 under normal conditions, and contains a large variety of electrolytes as well as macromolecules, such as mucins, enzymes, and immunoglobulins [71]. The cellular content of liquid saliva is low and mainly consists of leukocytes, erythrocytes, and epithelial cells shed from the oral mucosa [72]. A study analyzing microscopy slides with saliva observed that 47.3% (± 6.2) of the cells found in liquid saliva from adult study participants were of epithelial origin, compared to 83.4% (± 6.8) in the same participants’ buccal swabs [70]. As cellular heterogeneity impacts heterogeneity in the transcriptome, it is not recommended to mix liquid saliva and buccal swab samples in biomarker discovery studies.

In forensic casework, salivary samples may be recovered in a variety of different contexts, deriving from kissing, licking, spitting, drooling, chewing, biting, or speaking. Both liquid saliva and buccal swabs may represent only a subset of these forensically relevant salivary sample types [73] and it thus remains open for discussion which sample type is best suited for forensic biomarker discovery studies.

By microscopic evaluation, both liquid saliva and buccal swab samples showed large inter-individual differences in cell type composition (with liquid saliva showing a higher variability than buccal swabs) [70]. This is consistent with larger inter- as well as intra-individual variability observed in the datasets presented in this study.

Apart from the previously described cellular RNA, cell-free RNA (cfRNA) has been reported to contribute to the transcriptome of human saliva [74, 75]. cfRNAs may originate from dead or damaged cells [69, 71], but have also been shown to reside within exosomes secreted by cells in human saliva [76]. For miRNAs, it has even been suggested that exosomes are the main source of this RNA species in human saliva [75].

The heterogeneity of the salivary transcriptome’s composition is further increased by degradation. Previous studies have reported both full-length and partially degraded RNA molecules in human saliva [76, 77]. Studies analyzing the time-wise stability of the transcriptome in different body fluids observed that the salivary transcriptome showed low integrity even right after sample deposition, and salivary transcripts degraded more rapidly compared to other body fluids (blood, semen, and vaginal

secretions) [4, 12, 78]. Conditions in the oral cavity (warmth, moisture, presence of ribonucleases) are assumed to promote salivary RNA degradation, but it has also been shown that exogenously introduced mRNA degrades more rapidly under these conditions than endogenous salivary RNA, suggesting that the salivary RNA might be (partially) protected [77].

Previous studies have measured the extent of overall as well as transcript-wise degradation based on the assessment of the sequencing coverage along the transcript, with degraded transcripts showing increased coverage at their 3' ends [79]. However, this approach enables quantification of the extent of degradation only for sequencing libraries that have been prepared using the poly-A-enrichment strategy, as it selects the 3'-fragments of transcripts, whereas a 3' bias is not expected to be observed for degraded samples after selective depletion of rRNAs [80].

While we are thus unable to exactly quantify and compare the amount of degradation in the samples analyzed in this study, it may reasonably be assumed based on observations from previous studies that RNA from human saliva is degraded to a certain extent, and that the stochastic phenomenon of degradation increases heterogeneity within sample sets.

Due to their short length, miRNAs are assumed to be less prone to degradation, and previous studies have indeed observed these small RNAs to be more stable than mRNA transcripts [81–83]. Hence, despite our lack of knowledge of the true extent of miRNA degradation in our datasets, there is sufficient ground to assume that the increased quality and on-target read counts in our miRNA compared to the WT datasets may partly be attributable to the lower impact of degradation on miRNAs as compared to longer transcripts.

Conclusion

In summary, our analysis of four different RNA sequencing datasets from two different forensic research projects indicates that biomarker discovery from saliva samples through RNA sequencing is challenging. This can be attributed to a multitude of factors that decrease the proportion of sequencing reads suitable for biomarker discovery, and at the same time increase between-sample heterogeneity. This includes the presence of oral bacteria, the heterogeneity of cellular and cell-free RNA, and the confounding factor of degradation.

It is important to note that our study was not explicitly designed to assess the impact of individual impact of factors such as sample collection procedures, stabilization reagent, or library preparation methods. As a result specific recommendations for an optimal sample processing protocol cannot be given based on our observations. However, our results in combination with discussed outcomes of previous studies may be helpful to inform decisions and designs for future biomarker discovery studies.

To address the issue of low read counts for the RNAs of interest, we recommend adjusting the sequencing depth or undertaking measures to enrich for the RNA type of interest. This may include the control for microbial growth by sample stabilization after collection, selective depletion of (bacterial and) human rRNA, or selective enrichment of poly-A-tailed RNA.

Besides human mRNA, other biomarkers may be more suitable for saliva samples: The high bacterial load might be exploited in metagenomic/metatranscriptomic analyses. Alternatively, small RNAs, which are less prone to degradation and whose sequencing results are less impacted by the presence of bacteria, might also be promising targets for biomarker discovery studies.

In conclusion, careful experimental planning that should account for the challenges associated with the important, but difficult-to-tackle body fluid “saliva,” and adjusting for individual research aims, will be necessary to successfully parse the salivary transcriptome for biomarkers that can potentially contextualize forensically relevant saliva stains.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00414-023-03100-3>.

Acknowledgements We would like to thank all anonymous sample donors for taking part in this study!

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for funding part of this project (CO-992/10–1, “TrACES” study). This part of the study work was additionally supported by the DFG Research Infrastructure NGS_CC (project 407495230) as part of the Next Generation Sequencing Competence Network (project 423957469).

We also thank the European Union Internal Security Fund for supporting part of this project (Grant Agreement Number IZ25-5793–2019-44, “RNAgE” study).

Declarations

In the “RNAgE” project, all sample donors provided written informed consent. The study protocols were reviewed and approved by the CEBES review board at the University of Zurich (case number 2021-11e).

In the “TrACES” project, all sample donors provided written informed consent. The study protocols were reviewed and approved by the ethics committee of the University Hospital Schleswig-Holstein.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Role of the funding source The funders of the study had no role in the study design, data collection, analysis, interpretation, or writing of the manuscript.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated

otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Frith MC, Pheasant M, Mattick JS (2005) The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur J Hum Genet* 13:894–897. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201459>
- Lynch C, Fleming R (2020) RNA -based approaches for body fluid identification in forensic science. *WIREs Forensic Sci*. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1407>
- Salzmann AP, Bamberg M, Courts C, Dørum G, Gosch A, Hadrys T, Hadzic G, Neis M, Schneider PM, Sijen T, den van Berge M, Wiegand P, Haas C (2021) mRNA profiling of mock casework samples: results of a FoRNAP collaborative exercise. *Forensic Sci Int Genet* 50. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102409>
- Salzmann AP, Russo G, Kreutzer S, Haas C (2021) Degradation of human mRNA transcripts over time as an indicator of the time since deposition (TsD) in biological crime scene traces. *Forensic Sci Int Genet* 53:102524. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102524>
- Scrivano S, Sanavio M, Tozzo P, Caenazzo L (2019) Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: a review of current evidence. *Int J Legal Med* 133:1629–1640. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02125-x>
- Hassan Gaballah M, Fukuta M, Maeno Y, Seko-Nakamura Y, Monma-Ohtaki J, Shibata Y, Kato H, Aoki Y, Takamiya M (2016) Simultaneous time course analysis of multiple markers based on DNA microarray in incised wound in skeletal muscle for wound aging. *Forensic Sci Int* 266:357–368. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.06.027>
- Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, Choi Y, van Meurs JBJ, van IJcken WFJ, Uitterlinden AG, Hofman A, Broer L, van Duijn CM, Lewin J, Kayser M (2016) Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Sci. Int. Genet.* 24:33–43. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.014>
- Lech K, Liu F, Ackermann K, Revell VL, Lao O, Skene DJ, Kayser M (2016) Evaluation of mRNA markers for estimating blood deposition time: towards alibi testing from human forensic stains with rhythmic biomarkers. *Forensic Sci Int Genet* 21:119–125. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.008>
- Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J (2009) Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* 387:303–314. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.037>
- Glynn CL (2020) Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA* 26(1):1–9. <https://doi.org/10.1261/rna.072173.119>
- Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I (2020) MicroRNAs: an update of applications in forensic science. *Diagnostics (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010032>
- Lin MH, Jones DF, Fleming R (2015) Transcriptomic analysis of degraded forensic body fluids. *Forensic Sci Int Genet* 17:35–42
- Alshehhi S, Haddrill PR (2019) Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. *Forensic Sci Int* 298:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.046>
- Haas C, Neubauer J, Salzmann AP, Hanson E, Ballantyne J (2021) Forensic transcriptome analysis using massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 52:102486. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102486>
- Dørum G, Ingold S, Hanson E, Ballantyne J, Russo G, Aluri S, Snipen L, Haas C (2019) Predicting the origin of stains from whole miRNome massively parallel sequencing data. *Forensic Sci Int Genet* 40:131–139. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.02.015>
- Dørum G, Ingold S, Hanson E, Ballantyne J, Snipen L, Haas C (2018) Predicting the origin of stains from next generation sequencing mRNA data. *Forensic Sci Int Genet* 34:37–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.001>
- Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Banemann R, Berti A, Borges E, Carracedo A, Carvalho M, Courts C, de Cock G, Dötsch M, Flynn S, Gomes I, Hollard C, Hjort B, Hoff-Olsen P, Hrbíková K, Lindenbergh A, Ludes B, Maroñas O, McCallum N, Moore D, Morling N, Niederstätter H, Noel F, Parson W, Popielarz C, Rapone C, Roeder AD, Ruiz Y, Sauer E, Schneider PM, Sijen T, Court DS, Sviežená B, Turanská M, Vidaki A, Zatkálková L, Ballantyne J (2013) RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains—results of a third collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 7:230–239. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.10.011>
- Lindenbergh A, de Pagter M, Ramdayal G, Visser M, Zubakov D, Kayser M, Sijen T (2012) A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci Int Genet* 6:565–577. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.01.009>
- Sauer E, Reinke A-K, Courts C (2016) Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet* 22:89–99. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.01.018>
- Sakurada K, Watanabe K, Akutsu T (2020) Current methods for body fluid identification related to sexual crime: focusing on saliva, semen, and vaginal fluid, diagnostics (Basel) 10. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090693>
- DíezLópez C, Kayser M, Vidaki A (2021) Estimating the time since deposition of saliva stains with a targeted bacterial DNA approach: a proof-of-principle study. *Front Microbiol* 12:647933. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.647933>
- Gosch A, Bhardwaj A, Courts C (2023) TrACES of time: transcriptomic analyses for the contextualization of evidential stains – identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain deposition. *Forensic Sci Int: Genet* 102915. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102915>
- The Galaxy Community (2022) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res.* 50:W345–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Krüger F (n.d.) Trim Galore. <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>. Accessed 8 Sept 2023
- Aparicio-Puerta E, Lebrón R, Rueda A, Gómez-Martín C, Giannoukakis S, Jaspez D, Medina JM, Zubkovic A, Jurak I, Fromm B, Marchal JA, Oliver J, Hackenberg M (2019) sRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. *Nucleic Acids Res.* 47:W530–W535. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz415>
- Aparicio-Puerta E, Gómez-Martín C, Giannoukakis S, Medina JM, Scheepbouwer C, García-Moreno A, Carmona-Saez P, Fromm B, Pegtel M, Keller A, Marchal JA, Hackenberg M (2022) sRNAbench and sRNAtoolbox 2022 update: accurate miRNA and snRNA profiling for model and non-model organisms. *Nucleic Acids Res.* 50(2022):W710–W717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac363>

28. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
29. Frankish A, Diekhans M, Jungreis I, Lagarde J, Loveland JE, Mudge JM, Sisu C, Wright JC, Armstrong J, Barnes I, Berry A, Bignell A, Boix C, Carbonell Sala S, Cunningham F, Di Domenico T, Donaldson S, Fiddes IT, GarcíaGirón C, Gonzalez JM, Grego T, Hardy M, Hourlier T, Howe KL, Hunt T, Izuogu OG, Johnson R, Martin FJ, Martínez L, Mohanan S, Muir P, Navarro FCP, Parker A, Pei B, Pozo F, Riera FC, Ruffier M, Schmitt BM, Stapleton E, Suner M-M, Sycheva I, Uszczynska-Ratajczak B, Wolf MY, Xu J, Yang YT, Yates A, Zerbino D, Zhang Y, Choudhary JS, Gerstein M, Guigó R, Hubbard TJP, Kellis M, Paten B, Tress ML, Flicek P (2021) GENCODE 2021. *Nucleic Acids Res.* 49:D916–D923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1087>
30. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39:D152–D157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
31. Kopylova E, Noé L, Touzet H (2012) SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28:3211–3217. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611>
32. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
33. Burge SW, Daub J, Eberhardt R, Tate J, Barquist L, Nawrocki EP, Eddy SR, Gardner PP, Bateman A (2013) Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res* 41:D226–32. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1005>
34. Wood DE, Salzberg SL (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol* 15. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
35. Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, Salzberg SL (2017) Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science* 3:e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
36. Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
37. Cuccuru G, Orsini M, Pinna A, Sbardellati A, Soranzo N, Travaligione A, Uva P, Zanetti G, Fotia G (2014) Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics* 30:1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu135>
38. Lu J, Rincon N, Wood DE, Breitwieser FP, Pockrandt C, Langmead B, Salzberg SL, Steinegger M (2022) Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc* 17:2815–2839. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y>
39. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, Lakshmanan A, Wade WG (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192:5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
40. Koch CM, Chiu SF, Akbarpour M, Bharat A, Ridge KM, Bartom ET, Winter DR (2018) A beginner's guide to analysis of RNA sequencing data. *Am J Respir Cell Mol Biol* 59:145–157. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0430TR>
41. Salzmann AP, Arora N, Russo G, Kreutzer S, Snipen L, Haas C (2021) Assessing time dependent changes in microbial composition of biological crime scene traces using microbial RNA markers. *Forensic Sci Int Genet* 53:102537. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102537>
42. Ostheim P, Tichý A, Sirak I, Davidkova M, Stastna MM, Kultova G, Paunesku T, Woloschak G, Majewski M, Port M, Abend M (2020) Overcoming challenges in human saliva gene expression measurements. *Sci Rep* 10:11147. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67825-6>
43. Spielmann N, Ilsley D, Gu J, Lea K, Brockman J, Heater S, Setterquist R, Wong DTW (2012) The human salivary RNA transcriptome revealed by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 58:1314–1321. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.176941>
44. Yen E, Kaneko-Tarui T, Maron JL (2020) Technical considerations and protocol optimization for neonatal salivary biomarker discovery and analysis. *Front Pediatr* 8:618553. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.618553>
45. Adiconis X, Borges-Rivera D, Satija R, DeLuca DS, Busby MA, Berlin AM, Sivachenko A, Thompson DA, Wysoker A, Fennell T, Gnirke A, Pochet N, Regev A, Levin JZ (2013) Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples. *Nat Methods* 10:623–629. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2483>
46. Kaczor-Urbanowicz KE, Kim Y, Li F, Galeev T, Kitchen RR, Gerstein M, Koyano K, Jeong S-H, Wang X, Elashoff D, Kang SY, Kim SM, Kim K, Kim S, Chia D, Xiao X, Rozowsky J, Wong DTW (2018) Novel approaches for bioinformatic analysis of salivary RNA sequencing data for development. *Bioinformatics* 34:1–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx504>
47. Krishnan K, Chen T, Paster BJ (2017) A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis* 23:276–286. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>
48. Verma D, Garg PK, Dubey AK (2018) Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* 200:525–540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
49. Fleming RI, Harbison S (2010) The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. *Forensic Sci Int Genet* 4:311–315. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.11.008>
50. Nakanishi H, Kido A, Ohmori T, Takada A, Hara M, Adachi N, Saito K (2009) A novel method for the identification of saliva by detecting oral streptococci using PCR. *Forensic Sci Int* 183:20–23. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.10.003>
51. Donaldson AE, Taylor MC, Cordiner SJ, Lamont IL (2010) Using oral microbial DNA analysis to identify expired blood-spatter. *Int J Legal Med* 124:569–576. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0426-8>
52. Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
53. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat Rev Microbiol* 10:618–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2852>
54. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C (2014) Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Exp Cell Res* 322:12–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.008>
55. Salzmann AP, Russo G, Aluri S, Haas C (2019) Transcription and microbial profiling of body fluids using a massively parallel sequencing approach. *Forensic Sci Int Genet* 43:102149. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102149>
56. Wang M, Lemos B (2019) Ribosomal DNA harbors an evolutionarily conserved clock of biological aging. *Genome Res* 29:325–333. <https://doi.org/10.1101/gr.241745.118>
57. Ganley ARD, Kobayashi T (2014) Ribosomal DNA and cellular senescence: new evidence supporting the connection between rDNA and aging. *FEMS Yeast Res* 14:49–59. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12133>
58. Taanman J-W (n.d.) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, *Biochem. Pharmacol*
59. Galow A-M, Kussauer S, Wolfien M, Brunner RM, Goldammer T, David R, Hoeflich A (2021) Quality control in scRNA-Seq can discriminate pacemaker cells: the mtRNA bias. *Cell Mol Life Sci* 78:6585–6592. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03916-5>

60. Ilicic T, Kim JK, Kolodziejczyk AA, Bagger FO, McCarthy DJ, Marioni JC, Teichmann SA (2016) Classification of low quality cells from single-cell RNA-seq data. *Genome Biol* 17:29. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0888-1>
61. Mias GI, Singh VV, Rogers LRK, Xue S, Zheng M, Domanskyi S, Kanada M, Piermarocchi C, He J (2021) Longitudinal saliva omics responses to immune perturbation: a case study. *Sci Rep* 11:710. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80605-6>
62. Li F, Kaczor-Urbanowicz KE, Sun J, Majem B, Lo H-C, Kim Y, Koyano K, Rao SL, Kang SY, Kim SM, Kim K-M, Kim S, Chia D, Elashoff D, Grogan TR, Xiao X, Wong DTW (2018) Characterization of human salivary extracellular RNA by next-generation sequencing. *Clin Chem* 64:1085–1095. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.285072>
63. Zhao S, Zhang Y, Gamini R, Zhang B, von Schack D (2018) Evaluation of two main RNA-seq approaches for gene quantification in clinical RNA sequencing: PolyA+ selection versus rRNA depletion. *Sci Rep* 8:4781. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23226-4>
64. Morlan JD, Qu K, Sinicropi DV (2012) Selective depletion of rRNA enables whole transcriptome profiling of archival fixed tissue. *PLoS ONE* 7:e42882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042882>
65. Sullivan R, Montgomery A, Scipioni A, Jhaveri P, Schmidt AT, Hicks SD (2022) Confounding factors impacting microRNA expression in human saliva: methodological and biological considerations. *Genes (Basel)* 13. <https://doi.org/10.3390/genes13101874>
66. Coenen-Stass AML, Magen I, Brooks T, Ben-Dov IZ, Greensmith L, Hornstein E, Fratta P (2018) Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA Biol* 15:1133–1145. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1514236>
67. Yeri A, Courtright A, Reiman R, Carlson E, Beecroft T, Janss A, Siniard A, Richholt R, Balak C, Rozowsky J, Kitchen R, Hutchins E, Winarta J, McCoy R, Anastasi M, Kim S, Huentelman M, van Keuren-Jensen K (2017) Total extracellular small RNA profiles from plasma, saliva, and urine of healthy subjects. *Sci Rep* 7:44061. <https://doi.org/10.1038/srep44061>
68. Wang S, Wang Z, Tao R, Wang M, Liu J, He G, Yang Y, Xie M, Zou X, Hou Y (2019) Expression profile analysis of piwi-interacting RNA in forensically relevant biological fluids. *Forensic Sci Int Genet* 42:171–180. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.07.015>
69. Liu Z, Wang Q, Wang N, Zang Y, Wu R, Sun H (2022) A comprehensive characterization of small RNA profiles by massively parallel sequencing in six forensic body fluids/tissue. *Genes (Basel)* 13. <https://doi.org/10.3390/genes13091530>
70. Theda C, Hwang SH, Czajko A, Loke YJ, Leong P, Craig JM (2018) Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Sci Rep* 8:6944. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25311-0>
71. Humphrey SP, Williamson RT (2001) A review of saliva: normal composition, flow, and function 85:162–169
72. Aps JK, van den Maagdenberg K, Delanghe JR, Martens LC (2002) Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and its relation to gingivitis. *Clin Chim Acta* 321:35–41. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00062-1](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00062-1)
73. Ambroa-Conde A, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Phillips C, Casares de Cal MA, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, de La Puente M, Ruiz-Ramírez J, Lareu MV, Freire-Aradas A (2022) Epigenetic age estimation in saliva and in buccal cells. *Forensic Sci Int Genet* 61:102770. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102770>
74. Fábryová H, Celec P (2014) On the origin and diagnostic use of salivary RNA. *Oral Dis* 20:146–152. <https://doi.org/10.1111/odi.12098>
75. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG (2012) The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE* 7:e30679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030679>
76. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT (2010) Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS ONE* 5:e8577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008577>
77. Park NJ, Li Y, Yu T, Brinkman BMN, Wong DT (2006) Characterization of RNA in saliva. *Clin Chem* 52:988–994. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.063206>
78. Weinbrecht KD, Fu J, Payton M, Allen R (2017) Time-dependent loss of mRNA transcripts from forensic stains. *RRFMS* 7:1–12. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S125782>
79. Wang L, Nie J, Sicotte H, Li Y, Eckel-Passow JE, Dasari S, Vedell PT, Barman P, Wang L, Weinshiboum R, Jen J, Huang H, Kohli M, Kocher J-PA (2016) Measure transcript integrity using RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 17:58. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0922-z>
80. Sigurgeirsson B, Emanuelsson O, Lundsberg J (2014) Sequencing degraded RNA addressed by 3' tag counting. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091851.g001>
81. Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, Miller CJ, West CML (2012) Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *Br J Cancer* 107:684–694. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.294>
82. Bamberg M, Bruder M, Dierig L, Kunz SN, Schmidt M, Wiegand P (2022) Best of both: a simultaneous analysis of mRNA and miRNA markers for body fluid identification. *Forensic Sci Int: Genet* 102707. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102707>
83. Mayes C, Houston R, Seashols-Williams S, LaRue B, Hughes-Stamm S (2019) The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. *Leg Med (Tokyo)* 38:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2019.03.007>

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

Publikation 2

Spitting in the wind?—The challenges of RNA sequencing for biomarker discovery from saliva

Supplementary Material

Zusammenfassung

In den beiden unabhängigen, parallel durchgeführten Forschungsprojekten „TrACES of Time“ (mit dem Ziel der Etablierung einer forensischen Methode zur Schätzung der Depositionstageszeit biologischer Spuren auf Basis differentieller Genexpression) und „RNAgE“ (mit dem Ziel der Etablierung einer forensischen Methode zur Lebensaltersschätzung eines Spurenverursachers auf Basis differentieller Genexpression) wurde beobachtet, dass die Gesamttranskriptomsequenzierung von Blutproben sehr homogene und für eine differentielle Genexpressionsanalyse geeignete Sequenzdaten erbrachte, wohingegen für die Körperflüssigkeit Speichel heterogene und für solche Analysen nicht geeignete Sequenzdaten erhalten wurden. In der hier dargestellten Publikation 2 wurden Ursachen für diese Beobachtung anhand von Gesamttranskriptomsequenzdaten aus beiden Forschungsprojekten näher untersucht.

Bei dieser Analyse konnten die nachfolgend aufgelisteten Schwierigkeiten für die Gesamttranskriptomsequenzierung aus Speichel festgestellt werden: Der größte Anteil der in den Proben enthaltenen Nukleinsäuren stammt aus bakteriellen und nicht aus menschlichen Zellen, sodass die meisten menschlichen Transkripte nicht ausreichend häufig sequenziert wurden, um ihre relative Menge zuverlässig bestimmen zu können. Unter den menschlichen Transkripten war zudem ein hoher Anteil von ribosomaler RNA zu beobachten. Des Weiteren wurde zwischen den Proben in beiden Datensätzen (selbst zwischen Proben von einem Individuum im „TrACES of Time“-Datensatz) eine große Heterogenität beobachtet, welche auf die sehr variable Zusammensetzung der Körperflüssigkeit Speichel sowie auf die durch die Bedingungen im Mundraum geförderte Degradation der RNA zurückgeführt werden kann.

In beiden Forschungsprojekten waren wegen der zu erwartenden, höheren Degradationsresistenz zudem Sequenzierungen kleiner RNAs (wie z.B. miRNAs) durchgeführt worden. Diese Sequenzierungsexperimente erbrachten im Einklang mit der Erwartung vergleichsweise bessere Ergebnisse als die Gesamttranskriptomsequenzierungen, dennoch konnten die Datensätze aufgrund hoher Heterogenität und geringer Anteile von Sequenzierreads für Sequenzen von Interesse für differentielle Genexpressionsanalysen nicht oder nur sehr bedingt für geeignet befunden werden.

Da die Studien nicht mit dem Ziel eines systematischen Vergleichs verschiedener Analyseschritte durchgeführt worden waren, konnten Unterschiede zwischen den Datensätzen aus den beiden Projekten nur begrenzt auf einzelne Faktoren zurückgeführt werden. Dennoch ließen sich in Zusammenschau mit weiteren publizierten Studien einige Empfehlungen für zukünftige Untersuchungen des Speichel-Transkriptoms mittels MPS ableiten: Dem hohen Anteil bakterieller

Transkripte kann durch eine Vorbearbeitung der Proben (z.B. Verhinderung bakteriellen Wachstums durch Stabilisatoren) oder durch eine Anpassung der Sequenzierprotokolle (z.B. Selektion humaner Transkripte durch „poly-A-Anreicherung“, Depletion von rRNA und bakteriellen Transkripten und/oder Erhöhung der Sequenziertiefe, um eine ausreichende Abdeckung der weniger abundanten humanen Transkripte zu erreichen) begegnet werden. Zudem kann der Fokus auf andere Zieltranskripte als mRNA (zum Beispiel kleine RNA, bakterielle RNA) für die Körperflüssigkeit Speichel zielführend sein.

3.3 Manuskript 3: Entwicklung einer Methode zur Schätzung der Depositionstageszeit einer Blutspur mittels gezielter RNA-Sequenzierung

TrACES of Time: Towards estimating time-of-day of bloodstain deposition by targeted RNA sequencing

Annica Gosch¹, Sebastian Sendel², Amke Caliebe², Cornelius Courts¹

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

²Institute of Medical Informatics and Statistics, Kiel University and University-Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

Abstract

Background: In forensic molecular biology, the main task consists of identifying individuals who contributed to biological traces recovered from (potential) crime scenes. However, to support evidence-based reconstruction of the course of activities having taken place at the scene, contextualising information regarding how and when a biological trace was deposited is oftentimes required.

Results: Here we present the development of a forensic molecular biological analysis procedure for the prediction of the time-of-day at which a bloodstain has been deposited by targeted quantification of selected mRNA markers. Time-of-day candidate prediction markers with diurnally rhythmic expression have previously been identified by whole transcriptome sequencing. Here, we build on our previous findings by establishing a targeted cDNA sequencing protocol on an Ion S5 massively parallel sequencing device for the targeted gene expression quantification of 74 time-of-day candidate prediction markers. Based on expression measurements of these markers in 408 blood samples (from 51 individuals deposited at eight time points over a day), we establish and compare different statistical methods to predict time of deposition. The most suitable model employing penalised regression achieved a root mean squared error of 3 hours and 44 minutes with 78 % of predictions being correct within +/- 4 h (evaluated by five-fold cross-validation).

Conclusions: Our study provides the first prediction model for time-of-day of bloodstain deposition based on targeted RNA sequencing and thus represents an important step towards forensic trace deposition timing. It thereby relevantly contributes to the growing knowledge on Transcriptomic Analyses for the Contextualisation of Evidential Stains (TrACES).

Keywords

Forensic RNA Analysis, trace contextualisation, targeted RNA sequencing, time-of-day, gene expression

Content

1. Background

2. Results

2.1 Development and evaluation of statical models for time-of-day prediction

2.2 Model evaluation: donor properties

2.3 Model evaluation: sample properties

2.3.1 Aged samples

2.3.2 Diluted samples

2.4 Body fluid identification (BFI)

3. Discussion

3.1 Targeted sequencing for gene expression quantification

3.2 Statistical model performance

3.3 Considerations for applications to casework

3.4 Evaluation of selected markers

3.5 Current limitations and future perspectives

4. Conclusion

5. Material and Methods

5.1 Sample collection and preparation

5.1.1 Study participants

5.1.2 Collection of blood samples

5.1.3 RNA isolation and quantification

5.2 Targeted gene expression quantification

5.2.1 Marker selection and panel design

5.2.2 Library preparation using the QIAseq Targeted RNA panel

5.2.3 Targeted Sequencing on an Ion S5 benchtop sequencer

5.2.4 Bioinformatic processing of sequencing data

5.3 Statistical Analysis

5.3.1 Read count normalisation

5.3.2 Initial evaluation of marker suitability

5.3.3 Modelling time-of-day

5.3.4 Assessing model performance

5.3.5 Prediction algorithms

5.3.6 Relationship between prediction errors (PR) and per category prediction probabilities (SVM)

5.3.7 Within-subject renormalisation

5.3.8 Extending the prediction model to include individual characteristics

5.3.9 Assessing the impact of individual characteristics on prediction error

5.4 Assessing the impact of sample conditions

5.4.1 Storage duration

5.4.2 Sample dilution

6. Supplementary Materials

7. Declarations

7.1 Ethics approval and consent to participate

7.2 Consent for publication

7.3 Availability of data and materials

7.4 Competing interests

7.5 Funding

7.6 Authors' contributions

7.7 Acknowledgements

8. References

1. Background

The main task for forensic molecular biology is to identify individuals who contributed to biological traces recovered from (potential) crime scenes. However, to objectively reconstruct the course of events and activities having taken place at the scene, contextualising information regarding how and when a biological trace was deposited is oftentimes required but can typically not be gathered from standard forensic genetic procedures.

Due to its adaptive and dynamic nature, the transcriptome (i.e. the entirety of RNA molecules expressed in the cells contained in biological material/fluids) is frequently targeted to obtain such contextualising information [1]. Several forensic genetic laboratories routinely analyse differentially and tissue/fluid specifically expressed transcripts to assess the cellular compositions of biological traces [2, 3]. Beyond this, the potential of transcriptomic analyses to support the investigation of other aspects of forensic relevance is explored in several current research projects, e.g. focusing on transcriptomic changes after wound infliction to estimate the wound age [4, 5], changes occurring after death of an organism to estimate the post-mortem interval [6, 7] or ageing-related changes suitable for the estimation of the biological age of a trace donor [8].

A question of particular forensic relevance is the time of trace deposition. Information about this time may help to determine when a certain criminal activity has taken place but also helps to assess which traces recovered at a crime scene are actually relevant for the reconstruction of a specific event. Such insights may be helpful both in the *investigative* (i.e. to prioritise investigative leads) as well as in the *evaluative* (i.e. to assess the plausibility of how events unfolded according to the hypotheses of the prosecution and/or the defence within a criminal trial) stage [9]. Scientific studies targeting the transcriptome have approached the question of trace deposition timing in two different ways: First, by estimating the *time* elapsed *since* the trace has been deposited, for instance by measuring the integrity of one or several specific RNAs ('differential degradation') [10, 11], and second by quantifying RNA markers with diurnally oscillating expression to estimate the *time-of-day* of stain deposition [12].

Estimating the time-of-day of stain deposition using rhythmically expressed RNA markers was first attempted by Lech et al. [12, 13]. In 2014, they analysed two different microRNA (miRNA) markers which had previously been reported to show significant expression differences in vitreous humour from deceased individuals depending on the time-of-day the individual died. They did not observe significant expression differences for these two markers between venous blood samples collected from twelve male individuals at different timepoints over the day [13]. When looking at mRNA markers in the same blood samples, however, Lech et al. observed significantly rhythmic expression for eleven out of 21 analysed markers. Based on gene expression measurements from these selected mRNA markers (alone or in combination with two hormonal biomarkers melatonin and cortisol), they built statistical models allowing for a distinction of three time-of-day categories (night/early morning, morning/noon and afternoon/evening) with AUCs between 0.75 and 0.95 [12]. Since then, two research groups have further explored the potential of rhythmic mRNA marker analysis for predicting the time-of-day of bloodstain deposition: Kirk et al. [14] assessed expression patterns of ten preselected candidate mRNA markers in dried blood spots collected from ten individuals, but observed no significant differences between time points of sample deposition, except for a single marker. The authors acknowledged the possibility of more suitable markers being identified in future approaches, possibly by whole transcriptome sequencing. Most recently, Cheng et al. [15] assessed the expression patterns of seven preselected mRNA markers in dried bloodstains from eight individuals and reported significant differences between time-of-day of sample collection for four mRNA markers. The authors devised and compared several statistical models to predict time-of-day of sample collection based on expression

measurements of these four mRNA markers and achieved an RMSE of 5.98 h and a mean absolute prediction error of 3.92 hours for their best performing model using the k-nearest neighbour algorithm. In these three studies, partly overlapping sets of 21, ten and seven candidate mRNA markers (constituting 24 different mRNA markers) were evaluated. Given the low number of markers assessed in each study (limited by the use of quantitative PCR (qPCR) for gene expression quantification) and a potential bias of the marker selection processes (markers selected from previously published research with study conditions mostly not reflecting realistic, forensic casework-like settings), we deemed it possible that some potentially well-performing time-of-day prediction candidate markers might not have been investigated yet. In our research project “TrACES” (Transcriptomic Analyses for the Contextualisation of Evidential Stains) [16], we thus intended to approach these limitations by identifying suitable time-of-day prediction markers in a completely independent approach sequencing the entire transcriptome of blood samples deposited at different timepoints of a day. Based on a dataset of 80 samples from ten different individuals spending their day in an uncontrolled (i.e. forensically relevant) manner, we identified 81 RNA markers exhibiting diurnally rhythmic expression oscillations.

In the present study, building on our previous findings, we assessed the performance of these newly identified candidates in the prediction of bloodstain deposition time. The development of a targeted RNA sequencing approach applicable to bloodstains commonly encountered in forensic settings enabled us to simultaneously quantify the expression of 69 candidate predictors in a well-curated sample set of 408 dried blood samples collected from 51 individuals at eight different time points of the day. The markers with significantly rhythmic expression were then used to construct and compare different statistical models for predicting the time-of-day of blood stain deposition and different factors impacting model performance were evaluated.

2. Results

In the present study, we analysed a total of 408 blood samples obtained from 51 healthy individuals deposited at eight different time points of the day (8 AM, 11 AM, 2 PM, 5 PM, 8 PM, 11 PM, 2 AM and 5 AM). In each sample, gene expression of candidate time-of-day prediction markers was quantified by targeted RNA sequencing and expression measurements were normalised with two alternative approaches (based on total reads in a sample (CPM-normalisation) and based on reference genes (Refall-normalisation)).

Originally, a total of 84 time-of-day candidate prediction markers were analysed in this study. Initial evaluation of marker suitability considering expression level, amplification performance, significance of expression differences between timepoints as well as correlation between markers led to the exclusion of a total of 15 candidate markers from each normalised dataset (cf. 5.2 and 5.3), resulting in two datasets with normalised expression data for 69 time-of-day candidate prediction markers, each.

2.1 Development and evaluation of statical models for time-of-day prediction

We developed prediction models for time-of-day of sample deposition based on gene expression measurements by four different statistical approaches, including machine learning methods (Penalised Regression (PR), Random Forest (RF), Support Vector Machine (SVM) and a previously published approach named TimeSignatR [17]). Time was either modelled as a categorical (dividing a day into eight categories) or as a continuous variable (cf. 5.3.3). To be able to apply the prediction models to the continuous and cyclic variable time-of-day, time was treated as the angle of the hour hand of a 24-hour clock and subsequently trigonometrically transformed to a sine and a cosine component, which were then modelled separately (Figure 1).

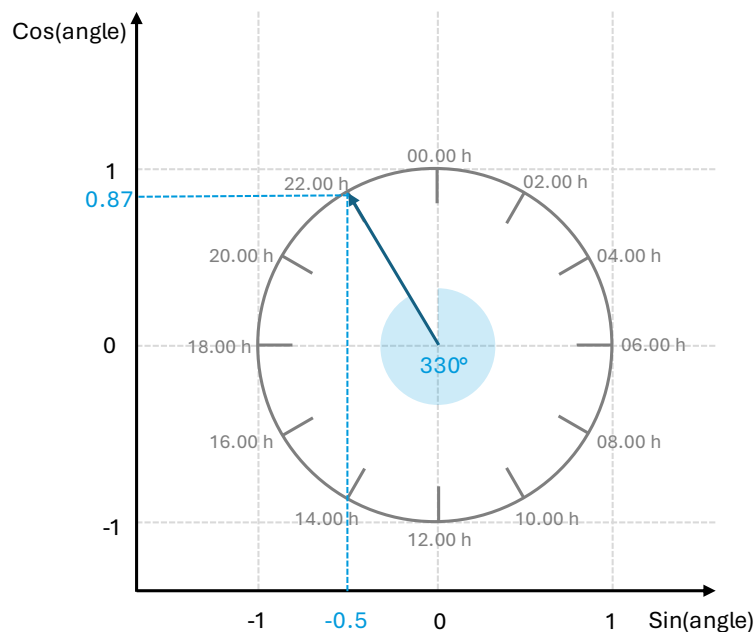


Figure 1: Visualisation of the trigonometric transformation of time-of-day for continuous modelling Time is considered as the angle of the hour hand on a 24-hour-clock (represented by a unit circle, shown in grey). The sine and the cosine component of the time-of-day are plotted on the x- and the y-axis, respectively. In the example depicted in this plot (shown in blue), the time is set to 22.00 h, represented by an angle of 330° on a 24-hour-clock (blue area). The arrowhead corresponds to a value of -0.5 on the x-axis (= $\sin(330^\circ)$) and 0.87 on the y-axis (= $\cos(330^\circ)$).

Table 1 shows the root mean squared error (RMSE) as estimated by five-fold cross-validation for six different statistical approaches (for both the CPM- and the Refall-normalised dataset, modelling time as either categorical or continuous). Additional performance metrics are presented in Suppl. Table 1. All models performed significantly better than a random chance predictor.

Table 1: Comparison of model performance (RMSE) for six modelling approaches in each normalised dataset

Normalised dataset			CPM						Refall					
Time modelled			continuously				categorically		continuously				categorically	
Prediction model			TS	PR	RF	SVM	RF	SVM	TS	PR	RF	SVM	RF	SVM
No. of samples														
RMSE/h	Overall	408	3.76	3.79	4.05	3.73	4.66	4.03	3.71	3.73	3.91	3.71	4.59	4.13
	02.00h	51	3.34	3.42	4.02	3.43	4.70	4.05	3.22	3.28	4.06	3.60	4.30	4.24
	05.00h	51	3.06	3.16	4.48	3.84	4.52	3.92	3.13	3.26	4.25	3.44	4.60	3.76
	08.00h	51	2.32	2.36	2.54	1.95	2.66	2.45	2.47	2.55	2.52	1.87	3.17	1.68
	11.00h	51	3.15	3.20	3.65	3.02	4.37	4.01	3.20	3.33	3.68	3.01	4.49	3.00
	14.00h	51	4.01	4.21	3.77	3.74	4.43	4.09	4.18	4.09	3.45	3.53	4.56	4.35
	17.00h	51	4.54	4.61	4.87	4.44	5.08	4.79	4.57	4.35	4.16	4.44	5.04	5.31
	20.00h	51	4.54	4.27	4.47	4.43	5.64	4.37	4.13	4.18	4.58	4.56	5.25	5.04
	23.00h	51	4.49	4.51	4.15	4.33	5.30	4.20	4.26	4.36	4.18	4.47	4.97	4.45

The RMSE estimated by five-fold cross-validation for four different statistical models (Penalised Regression (PR), Random Forest (RF), Support Vector Machine (SVM) and TimeSignatR (TS)) is presented for the entire dataset (n=408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours) for all time points (overall) as well as for samples collected at each timepoint separately (51 samples per timepoint). Raw gene expression measurements were normalised to total read counts per sample (CPM) or the expression of selected reference genes (Refall). The best result per normalised dataset is indicated in bold. The last column indicates prediction performance achieved if a random predictor (RP) was used.

In a direct comparison between the categorical models and their continuous counterparts (SVM and RF), both categorical classifiers resulted in higher RMSE compared to the continuous model (Table 1). Therefore, the continuous modelling approach was considered more suitable.

When looking at the individual predictions for the four different continuous models, similar results were obtained for the PR model and the TimeSignatR algorithm, which was expectable as TimeSignatR is also based on penalised regression. In both datasets, individual predictions obtained by the PR/TimeSignatR model were more similar to the SVM results than results obtained by the RF algorithm (Suppl. Figure 1).

For both normalisation procedures, the best overall performance was observed for SVM and PR/TimeSignatR. A closer analysis of the performance metrics per sample deposition time point (Table 1, Suppl. Table 1) showed that Penalised Regression and TimeSignatR produced the most consistent results across all time points, whereas the greatest differences were observed for the RF models.

Due to this greater consistency and the better general comprehensibility and explainability of PR compared to SVMs, PR was determined to be the overall most suitable model (with TimeSignatR and PR being considered equivalent, PR was chosen as the more general approach).

In accordance with expectations based on preliminary testing (Suppl. File 1), similar results were obtained for both normalisation procedures (Table 1, Suppl. Table 1). Refall-normalisation can be achieved with quantification values from all reference genes and the target gene of interest and normalised values are hence independent of all other markers in the same sequencing panel whereas CPM normalisation requires calculation of the total read count for all markers in the same panel. Therefore, all further evaluations were solely based on the Refall-normalised dataset. Individual predictions for all 408 samples after five-fold cross-validation for the final PR model are presented in Figure 2a.

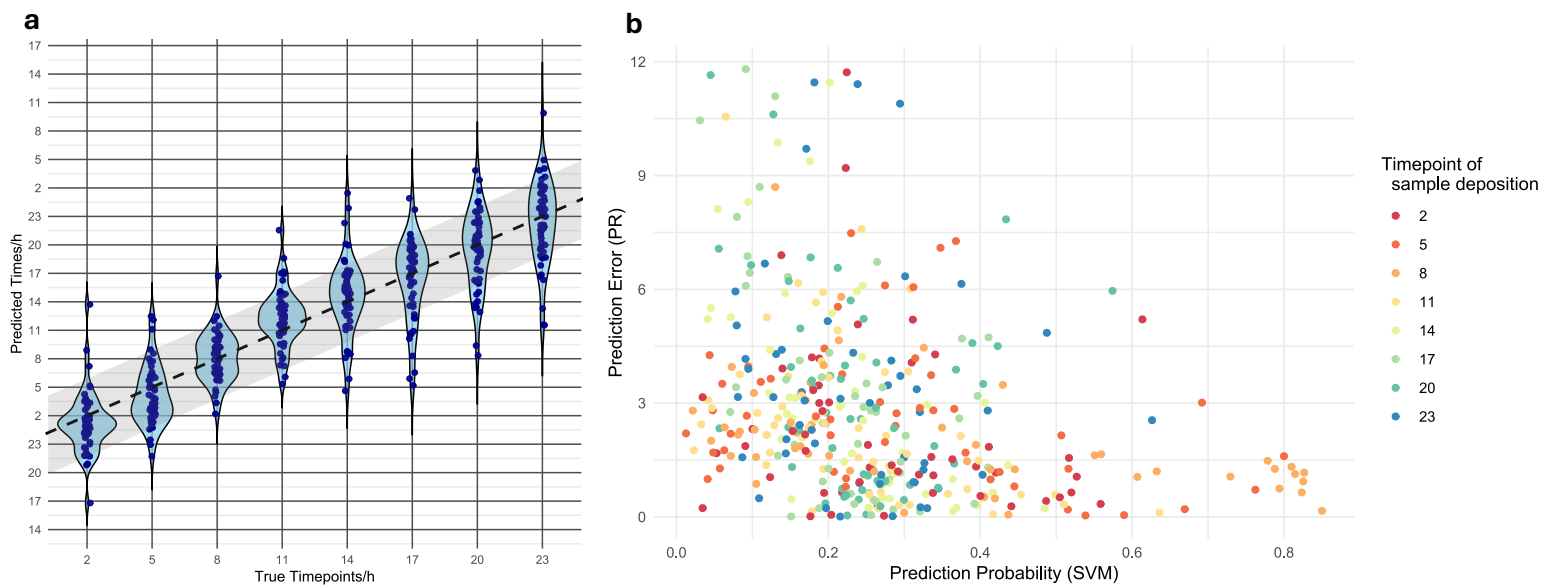


Figure 2: Predictions obtained from the final model (PR)

a – Violin plot showing the individual predictions (dark blue) and the kernel density plots (light blue) obtained for the individual samples ($n = 408$ samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours) in the respective test set of five-fold cross-validation with the final PR model (Refall-normalised data). The area of predictions correct within ± 4 hours is shaded in light grey and $x = y$ -values are shown as a dashed line in black. Note that in order to be able to depict full violin plots per sample deposition time point, the y-axis was stretched over more than one day.

b – Scatterplot showing the relationship between the absolute prediction errors (obtained for the final continuous PR model (on the Refall-normalised dataset)) and the probabilities for the corresponding category (obtained from the categorical SVM model (Refall-normalised dataset)) for $n = 408$ samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours. Colours indicate the true sample deposition time point.

In contrast to continuous regression models, the output of a categorical classifier contains prediction probabilities for each predicted category as a measure of uncertainty of the individual prediction. Hence, in a next step, we aimed to evaluate whether probabilities obtained for the best performing categorical model (SVM) can be used to obtain information about the reliability of individual predictions obtained from the continuous PR model. Figure 2b shows that for very high categorical probabilities (> 0.7), prediction errors were consistently low (< 2 hours) and the highest prediction errors (> 10 hours) were associated with low categorical prediction probabilities (< 0.3). However, there was also a large proportion of samples with low prediction errors despite showing a low probability. Overall, the prediction error and categorical prediction probability were significantly correlated with a Spearman's rank correlation ρ of -0.396 ($p_{\text{Spearman}} < 2.2 \times 10^{-16}$). Additional but limited informative value may thus be gained from considering the distribution of categorical prediction probabilities (estimated from the categorical SVM model) in combination with the predicted timepoint (obtained from the continuous PR model). Continuous predictions obtained from the PR model in combination

with categorical probabilities as estimated by the categorical SVM model for each individual sample are presented in Supp. Table 2.

Notably, it was observed that all algorithms provided the most accurate results for samples deposited at 8 AM and generally more accurate results for samples deposited late at night or in the morning, whereas predictions for samples deposited in the afternoon/evening were less accurate (Table 1, Figure 2a).

Model coefficients assigned to the 69 candidate time-of-day prediction markers in the final most suitable prediction model (PR) are shown in Table 2. Higher absolute values indicate a higher importance of the respective marker in the model. The sine component of the model was composed of 28 and the cosine component of 33 markers. Several markers were relevant only in the sine or the cosine component of the model, whereas only 15 markers were not included in either model component.

Table 2: Coefficients for each marker in the final most suitable model (PR)

	Model component			Model component	
	Sinus	Cosinus		Sinus	Cosinus
ABCD2	0.000	-0.191	IL1R1	-0.710	0.000
ABHD5	0.000	0.000	IL1R2	0.000	0.000
ALOX5AP	-0.005	0.000	KLF9	0.158	-0.293
APMAP	-0.129	0.161	LEF1	0.000	0.000
ARG1	0.962	-0.280	MAL	0.029	0.084
AVIL	-4.415	0.000	MFGE8	0.000	0.000
BACH2	0.000	0.000	MGAM	-0.068	0.000
BCL2	0.267	0.487	MKNK2	0.000	0.000
CAMKK1	1.406	-1.551	MSRB2	-0.021	0.000
CHST15	0.000	0.000	MTHFS	0.000	0.000
CLEC4E	0.063	0.090	MYO1E	1.066	2.749
CLIC3	-0.402	-1.185	NELL2	-0.015	0.000
CNTLN	-0.165	-0.193	NR1D1	-0.361	0.017
CPD	-0.049	0.000	NR1D2	0.000	0.079
CRISPLD2	0.084	0.000	NRCAM	1.266	0.000
DAAM2	0.000	-1.506	PER1	0.000	0.101
ECHDC3	0.000	0.029	PER2	4.937	0.000
ENHO	0.000	12.293	PER3	2.763	-0.463
ERGIC1	0.000	-0.246	PFKFB2	-0.048	0.297
ERMN	0.000	0.211	PHC2	0.000	0.000
FAAH2	0.914	2.043	SAP30	0.000	0.000
FBXL16	1.425	2.792	SEC14L1	0.012	0.051
FKBP5	0.250	-0.045	SIPA1L2	0.000	0.000
FLT3	0.000	0.000	SMAP2	0.069	0.000
FOSL2	-0.012	0.000	SPATA6	0.168	0.000
GABARAPL1	0.000	0.000	SYTL3	-0.085	0.000
GCNT4	-0.665	0.000	TCF7	0.000	0.224
HAL	-0.179	0.000	TMCC3	0.000	-0.465
HDAC9	-0.541	0.294	TPST1	0.000	-1.239
HNRNPDL	0.000	0.000	TRABD2A	-0.416	-0.469
HPCAL4	0.000	0.936	TSC22D3	0.011	-0.049
ID3	-0.779	-0.114	UPB1	4.083	-2.867
IGF2R	-0.105	0.000	XKR8	0.000	0.551
IL13RA1	0.847	0.000	ZBTB16	-0.888	-0.299
IL18R1	0.000	0.000			

Coefficients were extracted for a PR model trained on the entire Refall-normalised dataset (n = 408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours). Markers excluded from the respective model (coefficient = 0) are highlighted in grey, the top ten most relevant markers in each model are highlighted in orange.

2.2 Model evaluation: donor properties

In a previous study analysing whole transcriptome sequencing data [16], we observed that time-of-day prediction accuracies were improved when accounting for interindividual differences in gene expression by normalising expression measurements across all samples from one individual (as implemented in the original TimeSignatR algorithm [17]). A similar improvement was observed in this study: When training the PR model on gene expression measurements renormalised within each subject (after Refall-normalisation), we obtained an RMSE of 2.62 h estimated by five-fold cross-validation, representing a reduction of RMSE by approximately 67 minutes compared to the model without within-subject renormalisation (Figure 3). This demonstrates that prediction accuracies are relevantly impacted by interindividual differences.

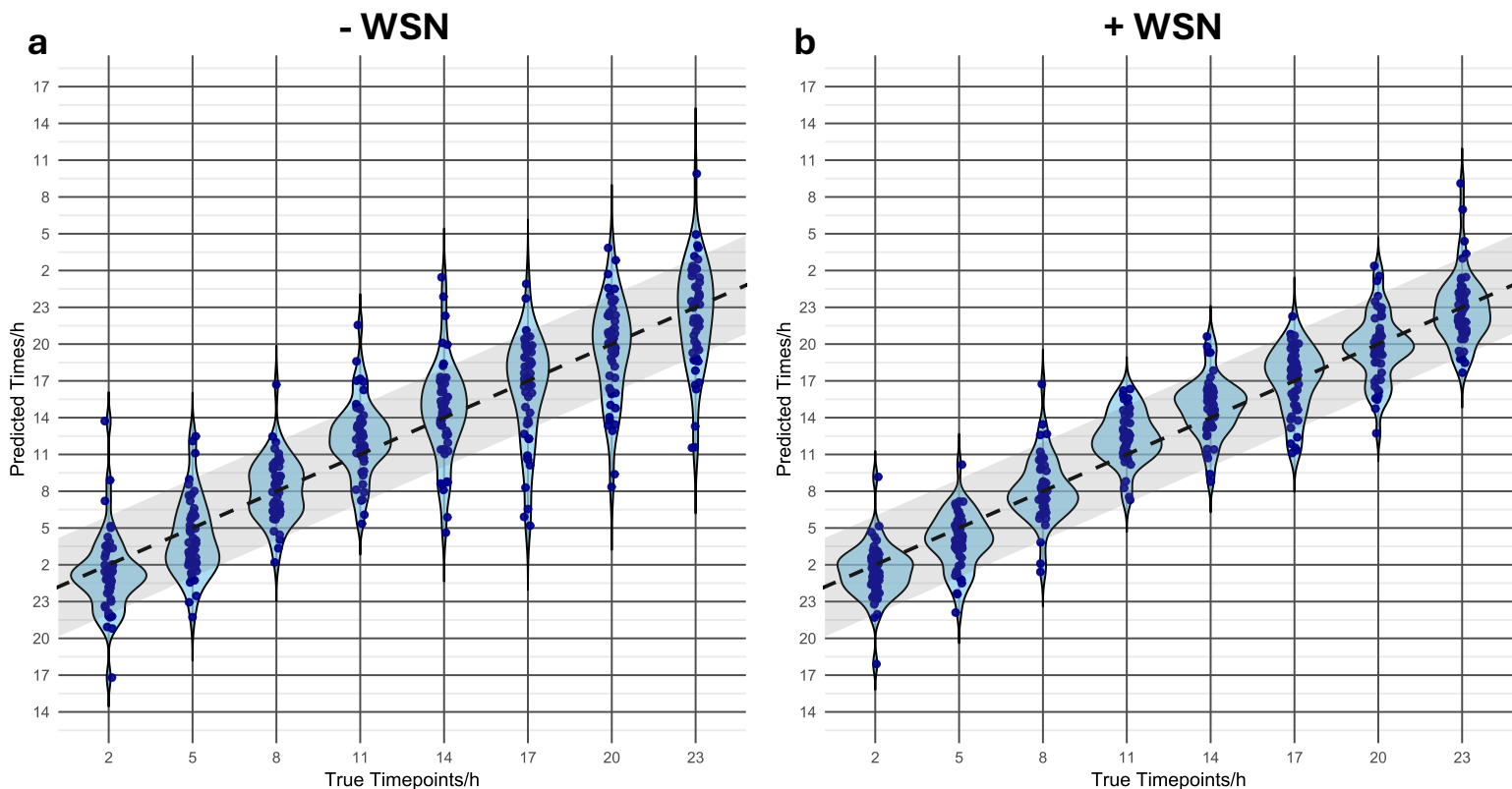


Figure 3: Violin plots for time-of-day predictions without (-WSN) and with within-subject renormalisation (+WSN)

a – Violin plot showing the individual predictions (dark blue) and the kernel density plots (light blue) obtained for the individual samples (n = 408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours) in the respective test set using five-fold cross-validation with the final PR model (Refall-normalised data without WSN). The area of predictions correct within +/- 4 hours is shaded in light grey and x=y-values are shown as a dashed line in black.

b – Violin plot showing the individual predictions (dark blue) and the kernel density plots (light blue) obtained for the individual samples (n = 408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours) in the respective test set using five-fold cross-validation with a PR model (Refall-normalised data with WSN). The area of predictions correct within +/- 4 hours is shaded in light grey and x=y-values are shown as a dashed line in black.

Note that in order to be able to depict full violin plots per sample deposition time point, the y-axis was stretched over more than one day.

Certain information about stain donor characteristics, such as age and sex, may be obtained by routinely performed forensic molecular biological analysis methods. Therefore, we tested whether including this information in our prediction model would increase model performance. However, including donor age and sex information did not lead to a relevant increase in prediction accuracy: Using five-fold cross-validation, we obtained an RMSE of 3 hours and 39 minutes (representing a decrease by five minutes compared to the model not considering donor information). In accordance with these results, we did not observe significant differences between prediction errors obtained for male and female or differently aged individuals ($p_{\text{LMM}} > 0.05$ for both age and sex).

Additionally, we assessed the impact on prediction accuracy of other donor characteristics and activities on which information was available for participants in this study. As this study was not set-up to systematically investigate the impact of these donor characteristics and donor activities on prediction accuracy, most characteristics were represented only a few times in our dataset. Thus, the investigations described below have to be considered exploratory in nature: Suppl. Figure 2 represents the observed prediction errors for our final PR model in relation to donor age, sex, chronotype and time of the year of sample deposition as well as individual intake of caffeine or medication and napping behaviour prior to sample deposition. In accordance with previous observations, no differences in prediction error were observed between male and female participants (Suppl. Figure 2a) or between participants from different age groups (Suppl. Figure 2b). No differences in prediction error became apparent for individuals with different chronotypes (Suppl. Figure 2c). Visual inspection seemed to suggest slightly lower prediction errors for samples collected in spring as compared to winter and autumn (Suppl. Figure 2d), however, both factors did not significantly impact prediction error ($p_{\text{LMM}} > 0.5$). Several individuals stated having consumed caffeine within the last three hours prior to sample deposition. Prediction errors did not seem to differ between samples with and without prior caffeine consumption (Suppl. Figure 2e, $p_{\text{LMM}} > 0.5$). Study participants were instructed to refrain from consuming alcohol on the day of study participation. A single study participant notwithstanding reported having consumed a single glass of wine in the evening. A low prediction error of 1.1 hours was computed for the sample deposited after alcohol consumption (Suppl. Figure 2f), but this single observation does not warrant any conclusions about the general impact of alcohol consumption. Additionally, despite being instructed to stay awake for the day of study participation, seven participants reported having taken naps prior to depositing the 2AM or 5AM samples. Prediction errors did not seem to be increased for samples collected after napping (Suppl. Figure 2f), yet again due to the low number of occurrences, no general conclusions about the impact of napping can be drawn. Lastly, comparable prediction errors were observed for individuals taking certain medication (Suppl. Figure 2g). As before, the variability of medication taken by study participants in combination with the low number of participants taking each individual medication precludes valid general conclusions.

In a last approach, we assessed how well true and predicted timepoints of sample deposition aligned for each individual over the entire day. In this approach, we noted that individuals could be broadly divided into three groups: individuals for which true and predicted timepoints generally aligned well, individuals for which there are larger deviations only for a certain period of the day and individuals for which true and predicted time generally did not align well. Plots showing true and predicted times for each of the three groups (hereafter named “consistent match group”, “intermittent match group” and “mismatch group”) are shown in Suppl. Figure 3a-c.

A rational assumption would be that prediction errors in the “mismatch group” most likely arise from general donor characteristics whereas prediction errors in the “intermittent match group” are more

likely to have arisen from individual activities. We thus explored whether donors with certain characteristics or having performed certain activities were more likely to be categorised in the “intermittent match group” or the “mismatch group”. As most observations were consistent with previous descriptions, we report only a selection of observations that we consider worth noticing: Both study participants > 50 years of age were not in the “consistent match group”, however, only one of them was categorised into the “mismatch group”. Only one of the participants with extreme chronotypes (definite morning (n = 4) or definite evening (n = 1)) was included in the “mismatch group” (the others were part of the “consistent match group” (n = 2) or the “intermittent match group” (n = 2)). All nine participants who reported the intake of medication on the day of study participation (excluding vitamins and oral contraceptives) were either in the “mismatch” or the “intermittent match group”, yet the time periods for which the largest prediction errors were observed did not necessarily correspond to the time of medication intake (Suppl. Table 3). Notably, for the individual with the highest average prediction error (v027: mean absolute error of 5.4 hours) no exceptional individual characteristic possibly explaining these deviations could be identified (male individual, 29 years, intermediate chronotype, no medication, no extraordinary food consumption or physical activity on the day of sample deposition).

2.3 Model evaluation: sample properties

2.3.1 Aged samples

The impact of storage duration was assessed by directly comparing predictions obtained for sample aliquots obtained from the same individual at the same deposition time point and stored for either 48 hours or 16 days (prior to being kept at -80 °C until further processing). A strong correlation was observed between predictions obtained for the 48 h and 16 d old samples, for both the sine (Pearson’s correlation coefficient of 0.90, $p_{\text{Pearson}} < 2,2 \times 10^{-16}$) and the cosine (Pearson’s correlation coefficient of 0.92, $p_{\text{Pearson}} < 2,2 \times 10^{-16}$) component of time-of-day. Differences in predicted times were < 3 hours for 87 % of samples (Figure 4). For samples stored for 48 h, an RMSE of 4.07 h was obtained. Samples stored for 16 d resulted in an RMSE of 4.33 h, indicating an increase by approximately 16 minutes.

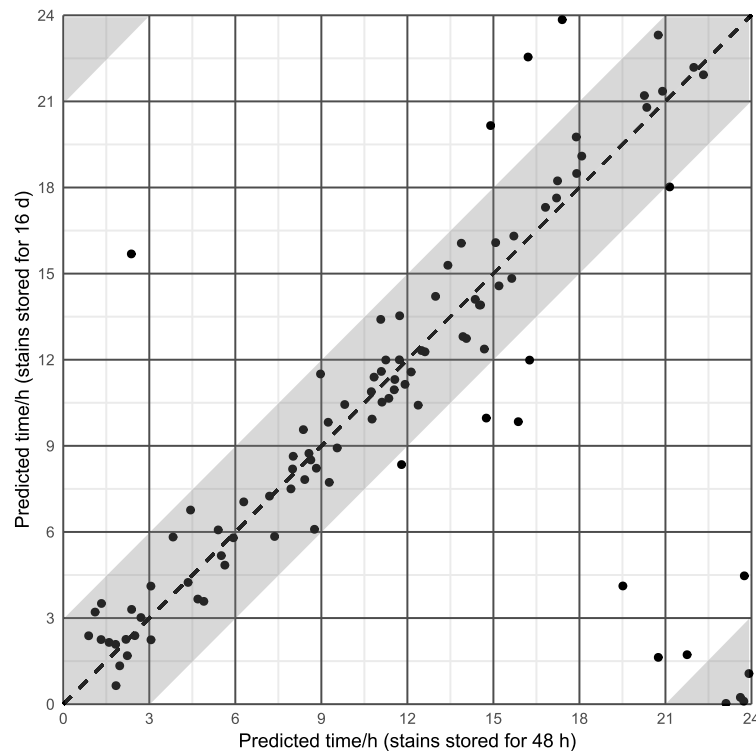


Figure 4: Predictions obtained for 48 h and 16 day old samples

Scatterplot showing the relationship between predictions obtained for stains stored for 48 hours (x-axis) and 16 days (y-axis) for $n = 100$ samples obtained from 25 individuals deposited at four different timepoints. The area of predictions close to each other within ± 3 hours is shaded in light grey and $x = y$ -values are shown as a dashed line in black.

2.3.2 Diluted samples

The impact of sample dilution was assessed by directly comparing predictions obtained for sequencing libraries prepared from RNA extracts with different RNA input amounts. A significant correlation was observed between predictions obtained for input amounts of 25 and 5 ng, for both the sine (Pearson's correlation coefficient of 0.73, $p_{\text{Pearson}} = 0.007$) and the cosine (Pearson's correlation coefficient of 0.92, $p_{\text{Pearson}} = 0.00002$) component of time-of-day, while the correlation between input amounts of 25 and 0.5 ng RNA was not significant, for neither the sine (Pearson's correlation coefficient of 0.55, $p_{\text{Pearson}} = 0.06$) nor the cosine (Pearson's correlation coefficient of 0.49, $p_{\text{Pearson}} = 0.1$) component of time-of-day. Predicted times for diluted and undiluted samples are shown in Figure 5. The RMSE increased with sample dilution, ranging from 3.58 h for samples with 25 ng RNA input, 3.74 h for samples with 5 ng RNA input, to 4.55 h for samples with 0.5 ng RNA input.

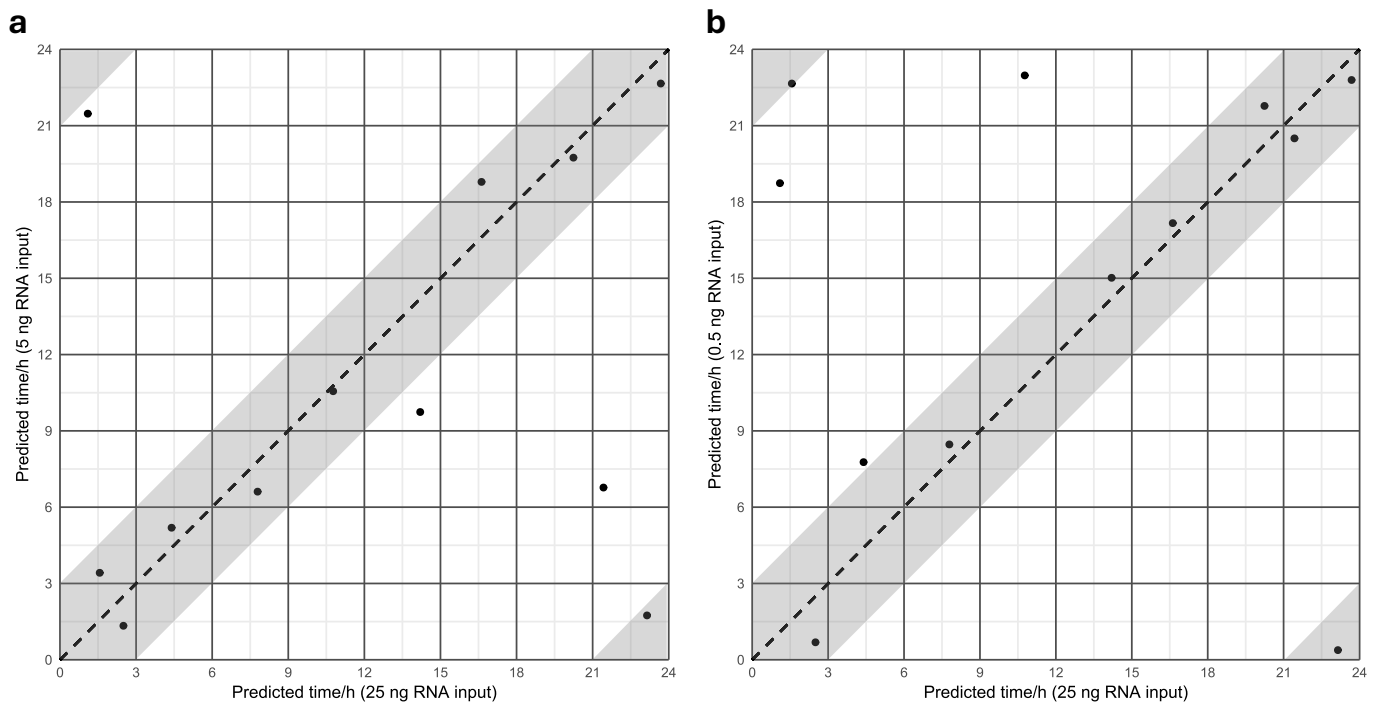


Figure 5: Predictions obtained for samples with optimal and sub-optimal RNA input amounts

Scatterplot showing the relationship between predictions obtained for stains sequenced with optimal sample input amounts (25 ng) and suboptimal input amounts (**a**: 5 ng, **b**: 0.5 ng). The area of predictions close to each other within ± 3 hours is shaded in light grey and $x = y$ -values are shown as a dashed line in black.

2.4 Body fluid identification (BFI)

To enable the identification of body fluid(s) present in the analysed crime scene stain, primers for the amplification of BFI markers were included in the primer panel. Suppl. Figure 4 shows the Refall-normalised expression of all 23 BFI markers in our sample set of 408 blood samples collected from 51 individuals and dried for 48 hours. In all 408 samples, all three blood markers (*ANK1*, *CD3G* and *SPTB*) were detected. On average, 99.6 % (range: 99.0-100 %) of Refall-normalised BFI marker reads were mapped to one of the three blood markers. As described by Hanson et al. [18], the low percentage of reads mapping to non-blood markers may be attributable to “system noise” or low-level co-expression of these markers and thus does not indicate the presence of a body fluid other than blood.

3. Discussion

3.1 Targeted sequencing for gene expression quantification

In this work, we describe the development of a targeted cDNA sequencing assay to quantify the expression of time-of-day candidate prediction markers. Targeted sequencing has been shown to facilitate multiplex analysis of over 400 markers in a single assay [19], which represents a decisive improvement compared to alternative methods for gene expression quantification such as qPCR, and has greatly advanced research in forensic body fluid identification [20–22]. As differences in gene expression between different forensically relevant body fluids/organ tissues are relatively large, the expression quantification does not need to be overly accurate [23, 24] and hence no extensive approaches to assess the gene expression quantification accuracy of targeted sequencing assays have been reported in the forensic literature so far. However, other currently investigated trace contextualisation aspects (such as time-of-day of trace deposition) are associated with more subtle differences in gene expression and thus require more accurate quantification methods. In a previously reported method assessment experiment, we observed that inter- as well as intraindividual differences in gene expression in blood samples from different deposition time points can more accurately be resolved when Unique Molecular Identifiers (UMIs) are included in the library preparation process [25]. While this newly established analysis technique proved to provide sufficiently accurate results for the purpose of our study, we did observe a clear lack of standards for performing and reporting such analyses resulting in little concordance among previous studies: While some studies describing the use of QIAGEN's UMI-based targeted RNA sequencing protocol employed normalisation to “housekeeping genes” [26, 27] (as recommended by the manufacturer [28]), others used normalisation procedures established for whole transcriptome sequencing data [29] or did not report this information at all [30]. Information on sequencing depth has, to the best of our knowledge, never been provided.

In this study, and given the forensic scope of our approach, we have thus undertaken great effort to establish procedures ensuring the generation of robust and reproducible gene expression quantification results by optimising the sequencing depth and evaluating different read count normalisation procedures (Suppl. Files 1 and 2). Nonetheless, the cross-platform reproducibility of absolute quantification results of our analysis procedure remains to be evaluated in future work. As has previously been observed in the context of forensic DNA methylation measurements [31, 32], an adaptation of the prediction model to the measurement platform might be necessary.

3.2 Statistical model performance

Our final most suitable model based on penalised regression produced predictions with an RMSE of 3 hours and 44 minutes (and a mean absolute error of 2 hours and 49 minutes with 78 % of predictions being correct to within +/- 4 h, evaluated by five-fold cross-validation).

Previous studies have evaluated the possibility of predicting time of deposition in forensic blood stains based on RNA expression patterns [12, 15]. Lech et al. [12] were first to establish a prediction model based on gene expression measurements. They used a multinomial logistic regression model to obtain prediction for three broad time-of-day categories. In a sample set of 216 samples from twelve male individuals and performing leave-one-out-cross-validation (LOOCV), they obtained AUC values of 0.75-0.93 for a model including six mRNA markers and 0.88-0.95 for a model including three mRNA markers and the two hormonal markers melatonin and cortisol (quantified by radioimmunoassay analysis [33]). A direct comparison of performances of this model and our newly developed model is not straightforward, as Lech et al. used categorical models and only provided summary statistics of their

cross-validation. From these, it can be deduced that 71.2 % and 76.4 % of samples were predicted correctly (i.e. assigned to the correct time-of-day category) using the mRNA and combined mRNA-hormones model, respectively. Considering the accuracy within ± 4 hours as the most comparable performance metric (as it treats a time span of 8 hours as “correct”, corresponding to the three categories of Lech et al. [12]), a comparable but slightly higher accuracy (78 %) was obtained for the most suitable model in our study. The multinomial model (as used by Lech et al. [12]) performed worse in our study (cf. 5.3.5). However, the fact that no completely identical performance metric was obtainable, the use of liquid blood with a preserving reagent by Lech et al. [12, 34] in contrast to dried blood spots in our study, the more controlled study conditions in [12] and the reduced independence of training and test set for LOOCV (indeed, an increased accuracy of 82.4 % of predictions correct within ± 4 hours was observed for our prediction model, when using LOOCV instead of five-fold cross-validation), hinders a direct comparability of model performances.

More recently, Cheng et al. [15] used a k-nearest-neighbour algorithm on expression measurements of four mRNA markers in a total of 64 samples (collected at 8 timepoints from different individuals) and obtained an RMSE of 5.98 h when training the model on 80 % of their data and testing it on the remaining 20 %. The RMSE were smaller for all models in our study, but due to the small number of samples in the test set (20 % of 64 samples) in [15] and questionable independence between training and test set (samples from the same individual were part of the training as well as the test set), the comparability of this performance metric is limited.

Taken together, while it is not possible to quantify the contribution of each individual methodical aspect (marker selection process, number of markers included, forensically relevant sample set, analysis method or prediction model), our study provides a relevant progression compared to previous approaches.

Notably, it was observed that all algorithms evaluated in this study provided more accurate results for samples deposited late at night or early in the morning, whereas results for samples deposited in the afternoon/evening were less accurate. Interestingly, Lech et al. had also observed the best performance metrics for their night/early morning category (23.00 h - 06.59 h) [12]. This might possibly be caused by more defined expression peaks of markers at night/early morning hours compared to other time-of-day periods and/or more heterogeneous activities/behaviours of study participants in the afternoon/evening.

3.3 Considerations for applications to casework

Overall, the prediction accuracies obtained in this study demonstrate that time-of-day information is indeed incorporated in and can be recovered from forensic casework type blood traces. Notably, we observed pronounced inter-individual differences resulting in very accurate predictions for some individuals and markedly reduced accuracies (close to random predictions) for others. Consequently, the method in its current state cannot reliably be used to prove beyond doubt that a forensically relevant blood trace definitively has or has not been deposited at a certain time-of-day and should not be used in the evaluative stage of a criminal trial. Notwithstanding, the information that a forensically relevant blood trace is more likely to have been deposited at a certain time-of-day (while other deposition times may not be excluded but may be considered (much) less likely) may constitute valuable information in the investigative phase.

The above-described overall performance metrics summarise how the final chosen model performed for the samples collected and analysed in this study. However, when applying the developed model to

an unknown sample in forensic casework, the forensic expert is more interested in getting an estimate of the uncertainty of the individual prediction at hand. Overall model performance metrics as estimated from five-fold cross-validation maybe considered a good approximation of the uncertainty associated with the prediction for an unknown sample as long as the unknown sample is sufficiently similar to the type of samples tested. This approach is commonly used for example when estimating the age of an unknown sample donor based on age-dependent methylation patterns [31, 35].

In addition to the overall model performance metrics, we found that the distribution of prediction probabilities obtained from a separately trained categorical SVM model provides supplementary information that may to a certain extent allow for an estimation of the uncertainty associated with a prediction. Notwithstanding, as categorical probabilities (especially probabilities assigned to samples collected in the afternoon/evening) often showed similarly high (and thus altogether low) values for several subsequent categories, the informative value especially of low prediction probabilities is rather limited.

Lastly, to get a good understanding of how well the developed model will perform on unknown samples e.g. encountered in forensic casework, a comprehensive understanding of additional factors influencing prediction accuracy is necessary (cf. section 3.5).

To be suitable for forensic casework, we aimed to develop a measurement method and corresponding prediction approach that can be applied to a single sample from an unknown individual, which will typically be encountered in casework scenarios. We did observe that knowing the individual, who deposited the sample, and normalising the gene expression over a set of samples collected from the same individual significantly improved prediction accuracy (Figure 3). For certain cases, especially at the time of court trial (i.e. in the evaluative stage), the person having deposited a crime-relevant blood trace is typically known. For these cases, time of deposition estimation might be improved by collecting reference samples at different timepoints and normalising gene expression over all samples obtained from the person of interest. The validity of such an approach (especially if reference samples are collected much later than the crime scene stain) would have to be evaluated in a separate study.

3.4 Evaluation of selected markers

An analysis of the model coefficients for each marker showed that some markers were relevant in only the sine or the cosine component of the model whereas others were relevant in both (Table 2). This observation makes sense in the context of trigonometric transformation of the variable time-of-day: Markers with expression peaks at either midnight or noon are expected to relevantly contribute to the cosine model but might show similar expression in the morning and evening and thus show model coefficients close to 0 in the sine model. Markers with expression peaks at time points lying between the four time points corresponding to maximum/minimum values in the sine and cosine model (namely 12 PM, 6 AM, 12 AM and 6 PM) can be expected to be important in both the sine and the cosine model. These expectations could be confirmed for the markers *PER2* and *PER3*: These genes had previously been reported to exhibit peak expression in the morning hours [36]. Indeed, for both markers we observed high, positive coefficients for the sine model and a smaller, negative (*PER3*) coefficient or a coefficient of 0 (*PER2*) for the cosine model. Similarly, the marker with the largest positive coefficient for the cosine model (*ENHO*, coefficient in the sine model: 0) had shown the highest expression values at 11 PM in our whole transcriptome sequencing dataset [16] and the marker with the largest negative coefficient for the cosine model (*UPB1*, coefficient in the sine model: 4.083) had previously shown the highest expression values at 8 AM in the morning [16].

Considering the top ten most important markers in both the sine and the cosine model, all markers except *ENHO* have previously been observed to exhibit diurnally rhythmic expression in human blood (cf. [16], Suppl. Table 8). *PER2* and *PER3* are well characterised core clock genes [37] (with *PER3* being the only high ranking marker in our model that had also been included in the model built by Lech et al. [12]). To the best of our knowledge, no direct function in the human body's inner clock has been described for any of the other high-ranking markers, yet. However, several markers play a role in biological functions or pathways previously shown to be regulated by the body's clock (e.g. innate and adaptive immune response [38] or metabolic functions [39]).

A better understanding of the biological function of the markers identified as important in our time-of-day prediction model will be of general interest; yet it is not a pre-requisite for the inclusion of these markers in a model used in forensic applications.

3.5 Current limitations and future perspectives

The individuals participating in this study were chosen to represent an “average” of a healthy population. A detailed analysis of prediction performance for individual study participants showed that accuracies differed between individuals and were generally improved when accounting for interindividual differences in gene expression levels. Therefore, it can be concluded that knowledge of individual characteristics impacting prediction accuracies may help to build improved models in the future.

The regulation of the human body's inner clock is highly complex. At the cellular level, the inner clock is constituted by a network of core clock genes which regulate the expression of downstream genes (“clock-controlled genes”) involved in different biological processes [40, 41]. Both the core clock genes as well as downstream pathways may be impacted by endogenous individual characteristics as well as exogenous factors, further increasing the complexity [41, 42]. A similarly complex biological phenomenon that has been extensively studied for application in forensic casework is the process of human aging. First studies to develop methods for predicting the age of the individual having deposited a forensically relevant biological trace focussed on the identification of markers (mostly differentially methylated DNA markers) and the establishment of prediction models for defined populations of healthy individuals [31, 35, 43–45]. These models have already been put to use as investigative tools in forensic casework. In several subsequent studies, researchers are now aiming to arrive at a better understanding of how individual endogenous characteristics such as sex and ethnicity as well as exogenous factors such as lifestyle and acquired diseases impact prediction accuracies and how these can be accounted for to improve general model performance [31, 46]. Thus, similar to the complex phenomenon of aging, the entirety of endogenous and exogenous factors impacting trace deposition timing exceeds the scope of a single study and further research to assess the impact of and possibility to account for these factors is required.

Apart from sample donors' characteristics, the properties of the samples itself need to be taken into consideration when assessing the robustness of a prediction model. Blood traces analysed in forensic settings are commonly small in volume, dried and their integrity can be compromised by any number of detrimental environmental effects (such as exposure to light, moisture, microbial growth etc.).

While the transcriptome of a dried blood trace generally correlates with the transcriptome of liquid blood samples [47], the relative amount of individual markers can be altered by the process of drying and storage [11, 16]. Hence, the time-of-day prediction model in this study was built on gene expression measurements from blood traces that had been left to dry completely and all stored at room temperature for an identical time period (48 hours). The measurement results and prediction

accuracies from these dried but fresh stains correlated well with results from stains stored for a longer time period (16 days). This is in accordance with previous studies showing that the transcriptome in whole blood remains relatively stable once the blood has completely dried [10, 11]. However, only a limited storage period and realistic but relatively favourable storage conditions (room temperature, dry, exposure to daylight) were tested experimentally in this study. As previous studies suggest that moist storage conditions allowing for microbial or fungal growth may drastically reduce nucleic acid integrity [11, 48], the impact of sample integrity/storage conditions on prediction accuracy needs to be assessed in more detail in future studies.

Additionally, forensically relevant blood traces may be of limited sample volume. In this study, all analyses have been performed with an RNA input amount of 25 ng. This amount of RNA was recoverable from dried blood in a volume of 50 µl, which is regularly encountered in casework scenarios. For lower input amounts, we observed a decrease in prediction accuracy. While a certain amount of total RNA will have to be available for analysis to be able to estimate the relative amount of individual transcripts present, it also needs to be taken into consideration that the targeted sequencing protocol using UMIs includes three bead purification steps (cf. Suppl. File 3), each likely leading to a loss of a certain sample proportion. Consequently, improved library preparation protocols may help to reduce sample loss thereby increasing method sensitivity.

Lastly, it needs to be highlighted that transcripts with rhythmic expression differ between cell types and biological fluids/tissues [49]. Thus, predictions obtained from the model presented in this study may only be considered reliable when the biological trace analysed contains whole blood from a single individual without cellular contributions from any other body fluid (which may be assessed by forensic STR typing and analysis of the expression of BFI markers included in the marker panel (cf. section 2.4).

For the purpose of this study, we have focussed on the analysis of mRNA markers, as this is currently the best explored type of RNA, it can be co-extracted with DNA from forensic traces using established protocols [23, 50] and its analysis requires only slight modifications to analysis procedures typically used for DNA thus allowing for fairly straightforward implementation into forensic molecular biology laboratory workflows. In future studies, other types of RNA such as miRNA and circRNA (which are relevant candidates in forensic studies due to their increased resistance to degradation [51–53]) might be explored. Besides RNA, other biomolecules such as metabolites [54–56] and hormones [57, 58] have been described to convey time-of-day information. Furthermore, here we focussed on time-of-day of trace deposition as only one aspect of forensic trace deposition timing. Complementing this information with insights on *time since deposition*, which is currently investigated by others [11, 59, 60], might lead to a more complete picture of this highly relevant contextualising aspect.

4. Conclusion

Our study provides the first prediction model for time-of-day of bloodstain deposition based on targeted RNA sequencing, demonstrating that time-of-day information is encoded in and may be recovered from blood traces as recovered from crime scenes. While the prediction accuracies of the method in its current state limit its use in the evaluative stage of a criminal trial, the method may nonetheless provide valuable information in the investigative phase. A better understanding of confounding endogenous as well as exogenous factors may lead to improved method performances in the future. In addition, the data presented in this study lay the groundwork for a better understanding and more standardised use of targeted cDNA sequencing for the purpose of gene expression quantification of medium and large sized marker panels in forensic applications.

Taken together, our study provides a relevant contribution to the growing knowledge on forensic trace contextualisation and represents an important step towards forensic trace deposition timing.

5. Material and Methods

5.1 Sample collection and preparation

5.1.1 Study participants

Blood samples were obtained from 51 healthy volunteers (20 males, 31 females, median age: 26 years, range: 19-61 years). Volunteers with chronic or acute conditions known to affect regular sleep-wake cycles were excluded from the study (exclusion criteria: irregular sleep-wake-rhythms (e.g. jet-lag, shiftwork), diagnosed sleeping disorders, pregnancy or lactation, diseases of the hematopoietic system (current or within the last five years), use of medication known to interact with the diurnal rhythm (such as hormone preparations) and blood thinners (current or within the last year)). The study participants' chronotypes were assessed using the German version of the Horne-Ostberg-Morningness-Eveningness-Questionnaire D-MEQ [61]. Study participant characteristics are summarised in Suppl. Table 4.

5.1.2 Collection of blood samples

Collection of blood samples was performed at eight specified time points (8 AM, 11 AM, 2 PM, 5 PM, 8 PM, 11 PM, 2AM, 5 AM) over the course of an entire day. Donors were instructed to refrain from the intake of alcohol and other drugs on the entire day of sample collection and from sleeping between the first (8 AM) and last time point of sample collection (5 AM) but otherwise pursued regular everyday activities. For individual samples ($n = 10$), donors indicated having deposited samples up to 30 minutes before or after the specified time point (Suppl. Table 3); however, for the purpose of this study these were treated as having been deposited at the exact specified timepoint. Sample donors filled in a questionnaire on time of food consumption, intake of medication and performing intense physical activities on the day of sample collection.

Blood samples were self-collected by the volunteers via fingerprick with sterile lancets (28 G SafetyLancets (MyLife, Ningbo Medsun Medical Co., Zhenhai, Ningbo, China, Ref. 7100031) or 21 G Safety Lancets (Vivomed GmbH, Geislingen, Germany, Ref. 19170010)). 50 μ l fingerprick blood was collected with the help of untreated "neutral" Minivettes (Sarstedt, Nürmbrecht, Germany, Cat. No. 17.2111.050). (A detailed description of the sample collection procedures is provided in Supplementary Figure 1 of [16]).

Each donor collected two samples of 50 μ l per time point. The blood was immediately transferred to clean 2.0 ml plastic tubes (Safe-Lock Tubes, Forensic DNA Grade (Eppendorf, Hamburg, Germany, Catalogue number: 0030123620)) in which the samples were left to dry at room temperature by leaving tube caps open. Samples were picked up and transported to the research facility on the day following sample collection. For the period of transportation, tube caps were briefly closed (for a maximum period of 2.5 hours) and then further let dry with open caps at the research facility. Sample tubes were closed and samples transferred to -80°C for prolonged storage after a drying time of exactly 48 hours or 16 days (for one of the two samples collected per participant respectively). A detailed overview of all samples collected and the individual sample characteristics is provided in Suppl. Table 3.

Regarding individual characteristics and activities, it remains to be pointed out that all data presented in this study was self-reported by study participants. While all study participants (or at least one individual for groups of study participants) were encountered by a researcher in person and were generally considered as trustworthy, it cannot fully be ruled out that individual statements (e.g. regarding medication or adherence to the study protocol) were incomplete or erroneous.

5.1.3 RNA isolation and quantification

For all samples, total RNA was extracted using the mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No. AM1560/ AM1561). For sample lysis, samples were incubated in 450 µl Lysis/Binding Buffer complemented with 30 µl Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Ref.: 03115828001) at 56°C for 30 minutes. RNA was subsequently isolated from the lysate following manufacturer's instructions ("Total RNAs" protocol) and eluted in a final volume of 35 µl nuclease-free water (Invitrogen, Carlsbad, USA, Ref.: 10977035), which was added to the filter twice. Residual genomic DNA was removed using the TURBO DNase free kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AM1907) with 2 µl DNase per sample as per manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined fluorometrically using the Qubit RNA HS Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q32855) on a Qubit 2.0 device (Thermo Fisher Scientific).

5.2 Targeted gene expression quantification

Expression quantification of target genes was to be performed by targeted cDNA sequencing on an Ion S5 benchtop instrument. As the inclusion of Unique Molecular Identifiers (UMIs) had proven to significantly increase gene expression quantification accuracies in a small-scale experiment performed prior to this study [25], the QIAseq targeted RNA Panels kit (QIAGEN, Hilden, Germany, Cat. No. 333005) was chosen to be used in this study.

5.2.1 Marker selection and panel design

The targeted sequencing panel was constructed to include four types of markers: time-of-day candidate predictors, reference gene candidates, markers for body fluid identification and gDNA control markers. **Time-of-day candidate predictors** had previously been identified by whole transcriptome sequencing in [16]. Of the 81 candidate predictors identified in this study, five were small RNAs (*MIR6883*, *MIR223*, *MIR7848*, *RNY1*, *SNORA73A*). As these targets would have required a different approach for targeted sequencing, they were not included in this study. In addition to the remaining 76 candidate predictors identified by whole transcriptome sequencing, eight candidate predictors (*AVIL*, *DAAM2*, *HNRNPDL*, *MKNK2*, *NR1D1*, *NR1D2*, *PER2*, *PER3*) were included in this study that had not met all selection criteria in the previous whole transcriptome sequencing study, but have been described as rhythmically expressed in a relevant number of previously published studies/datasets (appearing in ≥ seven previous publications/datasets as summarised in Supplementary Table 8 in [16]). Nine **reference gene candidates** were included based on selection criteria described in [16], section 2.2.6. To be able to identify **body fluids** present in the sample, previously selected and validated mRNA markers for the identification of blood, saliva, semen, skin, vaginal secretions and menstrual blood [18] were included in the panel. Following a manufacturer's recommendation, six **gDNA controls** allowing to assess the presence of human genomic DNA (gDNA) in the samples were additionally included in the panel.

Taken together, the initial version of the primer panel contained primers for a total of 122 markers. After initial performance testing on 44 samples (data from 11 individuals taken at time points 8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM), a total of 10 candidate predictors were excluded due to low expression (*ST20*, *TSHZ2*), high expression (*DUSP1*) or lack of statistically significant expression differences (*CEBPD*, *DDIT4*, *IL23A*, *KCNE3*, *RELL1*, *TNFSF14*, *TXN*), (data not shown). All further samples were thus processed using a panel of 112 markers, including six gDNA control markers, nine reference gene candidates, 23 genes for the identification of body fluids present and 74 candidate genes for time-of-day prediction (Suppl. Table 5).

Primers for all selected markers were custom designed in cooperation with the QIAGEN Enterprise Genomic Solutions team to specifically amplify selected targets and minimise potential for primer-

primer interactions. A cDNA-specific design was possible for all but two targets (*LCE1C* and *GCNT4*) by choosing primer binding sites on two different exons. Interspersed intronic sequences were chosen to be of sufficient length for the corresponding amplicon resulting from genomic DNA to be produced less efficiently and additionally to be removed from the sample in the bead-based size selection step. The primer sequences are proprietary, but primers can be reordered from QIAGEN by reference to the panel design number CRHS-18209Z-112.

5.2.2 Library preparation using the QIAseq Targeted RNA panel

Targeted sequencing libraries were prepared from 25 ng total RNA per sample using the QIAseq Targeted RNA Panel (Cat. No. 333005, QIAGEN) according to the manufacturer's "QIAseq Targeted RNA panels for Ultra-Low Input and FFPE Samples v2" protocol, which is summarised in Suppl. File 3. For the dilution study, libraries from 12 samples from three randomly selected individuals (v030, v031, v071) at four timepoints (8 AM, 2 PM, 8 PM, 2 AM) were additionally prepared from 5 and 0.5 ng total RNA input.

For sequencing on an Ion GeneStudio S5 benchtop sequencer, libraries were indexed with the QIAseq Targeted RNA 96-Index HT L for Ion Torrent Kit (Cat. No. 333217, QIAGEN) in the Second Stage Universal Index PCR step. Final sequencing libraries were quantified via qPCR using the QIAseq Library Quant Assay Kit configured for Ion Torrent (Cat. No. 333314, QIAGEN) with ½ reaction volumes on a 7500 Fast Real-time PCR (Thermo Fisher Scientific) or a QuantStudio 5 instrument (Thermo Fisher Scientific).

A total of 532 sequencing libraries were prepared in this study. Excluding libraries prepared from diluted samples, final libraries had an average concentration of 39,970 pM with a relative standard deviation of 0.36. For only four out of 532 samples, library preparation failed initially and libraries needed to be prepared again. Hence, the overall library preparation process was considered robust and consistent.

5.2.3 Targeted Sequencing on an Ion S5 benchtop sequencer

Targeted sequencing was performed on an Ion GeneStudio S5 benchtop sequencer (Thermo Fisher Scientific). For this purpose, sequencing libraries were normalised to a concentration of 50 pM in nuclease-free water (libraries with concentrations < 50 pM were prepared again). Sequencing libraries with differing index primers were pooled for combined sequencing of 29-30 samples on one Ion 530 sequencing chip (Cat. No. A27764, Thermo Fisher Scientific). For UMI-based sequencing libraries, sufficient sequencing depth is necessary to accurately quantify the number of different UMIs per target marker present in each sample. Details regarding sequencing depth optimisation are provided in Suppl. File 2. Templating and sequencing were performed with the Ion S5™ Precision ID Chef & Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A33208) on an Ion Chef and an Ion GeneStudio S5 benchtop sequencer (both Thermo Fisher Scientific) respectively. Templating was performed with default settings and the "HID Ion S5 Chef Templating 02" protocol. Default sequencing settings were used with 500 flows per sequencing chip.

5.2.4 Bioinformatic processing of sequencing data

Raw data processing and demultiplexing was performed in the Ion Torrent Suite (v. 5.10.1) using default analysis settings without a reference library and IonXpress barcode settings. Demultiplexed raw sequencing files (.basecaller.bam-files) were exported and further processed using the "QIAseq Targeted RNA panels" workflow with "custom catalog #" targets on the GeneGlobe platform (QIAGEN). Briefly, during this workflow, sequencing reads are trimmed, quality filtered and separated into target and UMI sequence. Target sequences are then aligned to the GRCh38 reference genome using the STAR

RNA read mapper [62]. Target read counts are converted to UMI read counts by clustering target reads with identical UMI sequences [63]. Nearly identical UMI counts were obtained when processing raw data files with the “Quantify QIAseq RNA Workflow” on the CLC Genomics Workbench (Version 23.0.4, QIAGEN Aarhus A/S), (data not shown), thus the more streamlined GeneGlobe workflow was deemed suitable for the purpose of this project.

To obtain reliable UMI quantification results, we aimed for a minimum number of reads used for UMI counting of ~400.000 per sample (cf. Suppl. File 2). No relevant gDNA contamination was observed (counts in gDNA controls ≤ 1).

5.3 Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with the statistics software R [64]. All tests were two-side with a significance level of 0.05.

5.3.1 Read count normalisation

Gene expression quantification methods require normalisation procedures to account for technical variation in the various sample preparation steps. While robust normalisation procedures have been established and guidelines have been proposed for the analysis of qPCR data [65, 66], dPCR data [67], microarray experiments [68] as well as whole transcriptome sequencing approaches [69], to the best of our knowledge no such standards or guidelines have been established for the analysis of data from targeted sequencing of cDNA.

We thus decided to apply and compare six different normalisation procedures (which have been applied in previous studies employing targeted RNA sequencing or adapted from other technical approaches such as qPCR or whole transcriptome sequencing). A detailed description of these comparisons is provided in Suppl. File 1. Briefly summarised, all tested normalisation procedures were suitable to decrease variability between groups (i.e. samples collected at different timepoints) as compared to non-normalised data, while maintaining or increasing variability between groups and may thus be considered suitable normalisation procedures. While smaller differences were observed, all six normalisation procedures showed the same general trends. We therefore concluded that while the inclusion of a normalisation step is essential for accurate gene expression quantification, different normalisation approaches may lead to comparable results. Consequently, all downstream analyses were performed using two different normalisation procedures (chosen based on generalised η^2 -squared values, cf. Suppl. File 1).

CPM (Counts Per Million) normalisation: For each sample, the raw read count of each target gene was divided by the total read count of all targeted genes and multiplied by one million. CPM thus represent the number of counts expected to be observed for the respective target gene if each library was sequenced to a total of exactly one million reads.

"Refall" normalisation: For each sample, the raw read count of each target gene was divided by the average read counts of all reference gene candidates in that same sample. (Normalisation to only a subset of reference gene candidates gave similar, but not better results (cf. Suppl. File 1)).

Raw and normalised read counts are provided in Suppl. Table 6.

5.3.2 Initial evaluation of marker suitability

Based on the results of the rarefaction analysis (Suppl. File 2), expression quantification of the markers *ATG2A* and *IRS2* was not considered reliable and the markers were excluded from any further analysis. For all remaining 72 time-of-day candidate markers, we checked for timepoint dependence of individual marker expression. First, we removed those markers which showed no significant difference

between the eight time points (Friedman Test, p -value > 0.05, Suppl. Table 7). Furthermore, we calculated a mixed linear model with expression as outcome, time point as fixed effect and individual as random effect and compared that to a linear model without the random effect and to a mixed linear model without the fixed effect (using the *lmer()* function from the R package „lme4“ [70]). The models were compared with the *anova* function and markers were excluded if either of these comparisons was not significant (Suppl. Table 7). This approach led to the removal of two markers from the CPM-normalised dataset (*IL18R1*, *GABARAPL1*), whereas no marker was removed from the Refall-normalised dataset. Afterwards, we calculated the Pearson correlations between all remaining time-of-day candidate prediction markers for each timepoint (Suppl. Fig. 5). For all marker pairs with Pearson correlation above 0.80 for all timepoints, we removed the marker with the higher p -value of the aforementioned Friedman test, leading to the removal of three markers from the Refall-normalised dataset (*REPS2*, *MEGF9*, *TBXAS1*) and one marker from the CPM-normalised dataset (*TRABD2A*). After these initial evaluation steps, a total of 69 markers remained in both the Refall- and the CPM-normalised dataset.

5.3.3 Modelling time-of-day

Due to the cyclic nature of time-of-day, commonly used and well-established regression models are not directly applicable to this variable. We thus employed two different approaches for modelling time-of-day:

- a) Following an approach described previously [17], we obtained variables that can be handled with common regression models by considering time as the angle of the hour hand of a 24-hour clock and subsequently trigonometrically transforming this angle to a sine and a cosine component (Figure 1). Separate regression models were then constructed for each component and the predictions obtained from the separate sine and cosine models were re-transformed to obtain an angle (corresponding to a specific time point on a 24-hour clock).
- b) Alternatively, time-of-day was modelled categorically with each sample deposition time considered as one category (resulting in a total of eight categories).

5.3.4 Assessing model performance

To predict time-of-day based on gene expression, different statistical approaches were applied, individually optimised as described below and compared with regards to root mean squared error (RMSE). Additionally, we calculated the accuracy per category (within ± 1.5 hours), accuracy within ± 4 hours (this range was chosen as it was considered “useful” for a typical forensic casework constellation, albeit being somewhat arbitrary) and the mean absolute error. A direct comparison of the continuous and the categorical modelling approaches of time of day is not straightforward as different performance metrics are better suitable to evaluate either categorical or continuous predictions. Due to the continuous nature of time-of-day, RMSE was considered as the most relevant performance metrics for comparative purposes in this case.

Model performance was assessed using five-fold cross-validation. For this purpose, the dataset was split into five groups. To ensure that training and test sets were truly independent, samples from one individual were kept in a single group, so that models would never be tested on samples from an individual from who another sample had been part of the training set. Groups were set up with a balanced distribution of participants’ age and sex. Samples in each group were subsequently split into eight subgroups so that each sample from a single individual was part of a different sub-group and the time-points were evenly distributed across sub-groups. Cross-validation was then performed by training a model on four of the five groups and obtaining predictions for the remaining group as test

set. This was repeated four times so that each sample was part of the test set once and all test set predictions were combined to calculate model performance metrics. To ensure comparability between models, identical groups and sub-groups (shown in Suppl. Table 3) were used for each of the prediction algorithms.

5.3.5 Prediction algorithms

Four different prediction algorithms were tested and compared: Random Forest (RF), Support Vector Machines (SVM), Penalised Regression (PR) and the previously published algorithm TimeSignatR (which is also based on penalised regression). These approaches are typically suitable for situations like the one at hand, where many influence variables are considered and the number of samples is relatively small. Other conceivable algorithms, such as multinomial regression, linear regression without penalisation, gradient boosting and neural networks, proved to perform poorly during preliminary testing (data not shown). This was to be expected, since without penalisation too many variables remain in the regression and neural networks usually require large sample sizes. Furthermore, we decided against the use of mixed models, as only a single sample per individual would usually be available for our use case.

RF and SVM were applied for both the continuous and the categorical parametrisations of time-of-day whereas PR and TimeSignatR were only applied to the continuous parametrisation. For the discrete version of the PR approach, the eight classes for the categorical outcome led to convergence issues and the TimeSignatR algorithm was explicitly designed only for continuous outcomes. Due to the sine and cosine representation of time of day in the continuous approach, two models, each for every component, have to be estimated independently. In the categorical parametrisation, in contrast, only a single model is estimated. Each algorithm was optimised individually as described below.

Random Forest (RF)

We used the R package *ranger* [71] for random forest modelling for the continuous and the categorical outcomes. Based on pretesting, the number of trees was set to 100. We ran separate cross-validations for different number of variables to possibly split at each node (parameter “mtry”) (for multiples of five). The best “mtry”-value was chosen based on the best RMSE for all time points of the respective cross-validation result.

Support Vector Machine (SVM)

SVMs were implemented by using the R package *e1071* [72]. We ran separate cross-validations for each choice of kernel function (linear, polynomial, radial, sigmoid). The best kernel function was chosen based on the best RMSE for all time points of the respective cross-validation result.

During each cross-validation step, the respective hyperparameters for the kernel functions were optimised by grid tuning, an inner cross-validation. Here, each of the remaining four groups from the training dataset served in turn as test set for the models trained by the other three groups across a grid of all relevant hyperparameters. Hyperparameters being used were cost (all kernel functions), epsilon (all kernel functions), gamma (polynomial, radial and sigmoid kernel), coef0 (polynomial and sigmoid kernel) and degree (polynomial kernel). The set of hyperparameters were chosen which yielded the model with the lowest error according to *e1071*’s *tune()*-function (classification error for categorical time-of-day, mean squared error for continuous time-of-day) across the inner cross-validation on the four training groups.

Penalised Regression (PR)

The R package *glmnet* [73] was used to implement the penalised regression approach. During the five-fold cross-validation, the hyperparameters alpha and lambda of each model were optimised by grid tuning. Within the respective training set, an additional five-fold cross-validation was applied on a grid of alpha and lambda values and the parameter set which minimised the mean cross-validated error (default measure of the *cv.glmnet()*-function) was chosen.

TimeSignatR

TimeSignatR was performed as described in [17] using adapted versions of the R scripts available from github.com/braunr/TimeSignatR (last access: 2025-01-31). Briefly summarised, a multi-response penalised regression model (*family: "mgaussian"*) was trained for the sine and cosine components of time-of-day as response variables using the *glmnet* R package [73] (v. 4.1-8). The model was trained on Refall-/CPM-normalised data omitting the within-subject renormalisation step included in [17]. For each model trained in five-fold cross-validation, hyperparameters alpha and lambda were individually optimised using grid-tuning and ten-fold cross-validation (within the respective training set).

5.3.6 Relationship between prediction errors (PR) and per category prediction probabilities (SVM)

To assess the informative value of per category prediction probabilities (obtained from the categorical SVM model), the relationship between prediction errors (absolute difference between true and predicted time of deposition) from the PR model and the prediction probabilities obtained for the corresponding category was evaluated. As QQplots generated with the *ggpubr* R package [74] suggested non-normal distribution of both variables, a Spearman's rank correlation test was calculated. Test results are indicated with the subscript "Spearman".

5.3.7 Within-subject renormalisation

Within-subject renormalisation was performed as described in [17]: For each gene, the mean Refall-normalised expression was calculated per individual, and the individual Refall-normalised expression values were then normalised to the per-subject mean, so that the within-subject renormalised values indicate the deviation from the individual expression mean over time. Model training and testing was then performed as described in section 5.3.4 and 5.3.5.

5.3.8 Extending the prediction model to include individual characteristics

It is to be expected that other variables also correlate with the diurnal rhythm. We therefore examined how the predictive quality of the models changes when age and sex of the subjects are included in the modelling in addition to gene expressions. Here, age was given as the age at sampling (in years) and sex as dichotomous variable. We used the same procedure as above to cross-validate the algorithms and generate the respective final PR models (section 5.3.4 and 5.3.5).

5.3.9 Assessing the impact of individual characteristics on prediction error

The impact of individual characteristics and activities on model prediction error was evaluated by mixed-effects models with prediction error as outcome and random intercepts for the individuals using the *lme4* [70] and *lmerTest* [75] packages in R. Age and sex were combined into a single model, but due to the exploratory nature of all further analyses, additional characteristics and activities were tested in separate models. Model assumptions including normal distribution of residuals and homogeneity of

variance between the levels of a predictor were assessed using functions provided in the *DHARMA* R package [76] and met for all models tested after $\log(x+1)$ transformation of the prediction error. Test results are indicated with the subscript “LMM”. Due to the absence of statistically significant results, multiple testing corrections were not performed.

5.4 Assessing the impact of sample conditions

5.4.1 Storage duration

Each study participants had deposited two blood samples per deposition timepoint. These were then stored at room temperature for exactly 48 hours and 16 days respectively. To estimate the impact of sample storage duration, samples from 25 randomly selected individuals (v001, v002, v009, v010, v011, v013, v015, v016, v017, v018, v021, v022, v031, v035, v039, v040, v045, v059, v063, v067, v069, v070, v071, v072 and v073) collected at four different timepoints (8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM) stored for 16 days at room temperature were extracted and analysed as described in sections 5.1.3 and 5.2.

For direct comparison, a PR model as described in section 5.3.5 was trained on data from 208 samples (eight timepoints) from the remaining 26 individuals and subsequently tested on 200 samples (four timepoints) from the above-described individuals, both after storage for 48 h and 16 d (100 samples each). The resulting predictions for the sine and cosine components of time-of-day were directly compared. As QQplots generated with the *ggpubr* R package [74] suggested normal distribution of both variables, a Pearson correlation test was performed using the *cor.test* function from the *stats* R package [64].

5.4.2 Sample dilution

To estimate the impact of reduced RNA input to library preparation, samples from three randomly selected individuals (v030, v031, v071), collected at four different timepoints (8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM) were additionally subjected to library preparation with sub-optimal input amounts of 5 ng and 0.5 ng (20 and 2 % of the optimal input amount respectively).

For direct comparison, a PR model as described in section 5.3.5 was trained on data from 384 samples (eight timepoints) from the remaining 48 individuals and subsequently tested on 12 samples (four timepoints) from the above-described individuals, with all three input amounts. The resulting predictions for the sine and cosine components of time-of-day for the 5 ng and 0.5 ng dilutions were directly compared to the undiluted samples. As QQplots generated with the *ggpubr* R package [74] suggested normal distribution of both variables, a Pearson correlation test was performed using the *cor.test* function from the *stats* R package [64].

6. Supplementary Materials

Suppl. File 1: Comparison of normalisation procedures for targeted RNA sequencing data

Suppl. File 2: Optimisation of sequencing depth

Suppl. File 3: Library preparation QIAseq targeted RNA sequencing with UMIs

Suppl. Figure 1: Pairwise correlation of the absolute prediction errors obtained for each of the four continuous prediction models

Suppl. Figure 2: Prediction error and predicted probability shown in relation to donor characteristics and activities

Suppl. Figure 3: Scatterplot showing true and predicted times for individuals according to match group

Suppl. Figure 4: Boxplot showing Refall-normalised expression of BFI markers in blood samples

Suppl. Figure 5: Correlation and selection of markers

Suppl. Table 1: Comparison of model performances for four modelling algorithms

Suppl. Table 2: Individual prediction results for the final model

Suppl. Table 3: Information on individual samples

Suppl. Table 4: Information on study participants

Suppl. Table 5: List of markers targeted with the final primer panel

Suppl. Table 6a: Raw read counts (for all samples sequenced in this study)

Suppl. Table 6b: Refall-normalised read counts (for all samples sequenced in this study)

Suppl. Table 6c: CPM-normalised read counts (for all fresh (dried for 48 h), undiluted samples sequenced in this study)

Suppl. Table 7a: Timepoint dependencies for the Refall-normalised data

Suppl. Table 7b: Timepoint dependencies for the CPM-normalised data

7. Declarations

7.1 Ethics approval and consent to participate

All sample donors provided written informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the ethics committee of the University Hospital Cologne.

7.2 Consent for publication

Not applicable.

7.3 Availability of data and materials

The raw sequencing data files generated for the current study are not publicly available due to the sensitive nature of the data but are available from the corresponding author for the sole purpose of replicating the procedures and results presented in the article and providing that the data transfer and storage is in agreement with European Union legislation on the general data protection regulation. All other data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

7.4 Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

7.5 Funding

The study was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Project number 453376443). The funders of the study had no role in study design, data collection, analysis and interpretation, or writing of the manuscript.

7.6 Authors' contributions

AG and CC conceptualised the project and acquired funding; AG collected samples and performed laboratory experiments; AG and SS analysed data and visualised results; CC and AC supervised data analysis and interpretation; AG wrote the initial manuscript draft; all authors reviewed, edited and approved the final manuscript.

7.7 Acknowledgements

We sincerely thank all anonymous sample donors for taking part in this study. Additionally, we would like to thank Christian Klug and the company QIAGEN for their great support during the establishment of the targeted cDNA sequencing assay and Maximilian Neis (University Hospital Cologne) for his introduction to the Ion S5 benchtop sequencing instrument.

8. References

1. Haas C, Neubauer J, Salzmänn AP, Hanson E, Ballantyne J. Forensic transcriptome analysis using massively parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*. 2021;52:102486. doi:10.1016/j.fsigen.2021.102486.
2. Sijen T, Harbison S. On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. *Genes (Basel)*. 2021;12:1728. doi:10.3390/genes12111728.
3. Salzmänn AP, Bamberg M, Courts C, Dørum G, Gosch A, Hadrys T, et al. mRNA profiling of mock casework samples: Results of a FoRNAP collaborative exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2021. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102409.
4. Ros AC, Bacci S, Luna A, Legaz I. Forensic Impact of the Omics Science Involved in the Wound: A Systematic Review. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:786798. doi:10.3389/fmed.2021.786798.
5. Li N, Du Q, Bai R, Sun J. Vitality and wound-age estimation in forensic pathology: review and future prospects. *Forensic Sci Res*. 2020;5:15–24. doi:10.1080/20961790.2018.1445441.
6. Wenzlow N, Mills D, Byrd J, Warren M, Long MT. Review of the current and potential use of biological and molecular methods for the estimation of the postmortem interval in animals and humans. *J Vet Diagn Invest*. 2023;35:97–108. doi:10.1177/10406387231153930.
7. Antiga LG, Sibbens L, Abakkouy Y, Decorte R, van den Bogaert W, van de Voorde W, Bekaert B. Cell survival and DNA damage repair are promoted in the human blood thanatotranscriptome shortly after death. *Sci Rep*. 2021;11:16585. doi:10.1038/s41598-021-96095-z.
8. Dørum G, Hänggi NV, Burri D, Marti Y, Banemann R, Kulstein G, et al. Selecting mRNA markers in blood for age estimation of the donor of a biological stain. *Forensic Sci Int Genet*. 2024;68:102976. doi:10.1016/j.fsigen.2023.102976.
9. Jackson G, Jones S, Booth G, Champod C, Evett IW. The nature of forensic science opinion--a possible framework to guide thinking and practice in investigations and in court proceedings. *Sci Justice*. 2006;46:33–44. doi:10.1016/s1355-0306(06)71565-9.
10. Weinbrecht KD, Fu J, Payton M, Allen R. Time-dependent loss of mRNA transcripts from forensic stains. *RRFMS*. 2017;Volume 7:1–12. doi:10.2147/RRFMS.S125782.
11. Salzmänn AP, Russo G, Kreutzer S, Haas C. Degradation of human mRNA transcripts over time as an indicator of the time since deposition (TsD) in biological crime scene traces. *Forensic Sci Int Genet*. 2021;53:102524. doi:10.1016/j.fsigen.2021.102524.
12. Lech K, Liu F, Ackermann K, Revell VL, Lao O, Skene DJ, Kayser M. Evaluation of mRNA markers for estimating blood deposition time: Towards alibi testing from human forensic stains with rhythmic biomarkers. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;21:119–25. doi:10.1016/j.fsigen.2015.12.008.
13. Lech K, Ackermann K, Wollstein A, Revell VL, Skene DJ, Kayser M. Assessing the suitability of miRNA-142-5p and miRNA-541 for bloodstain deposition timing. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;12:181–4. doi:10.1016/j.fsigen.2014.06.008.
14. Kirk D, Allen R. Exploration of Rhythmic Patterns of Gene Expression to Estimate the Time of Day a Bloodstain Was Created. *Research and Reports in Forensic Medical Science*. 2021:1–11. doi:10.2147/RRFMS.S327044.
15. Cheng F, Li W, Ji Z, Li J, Hu W, Zhao M, et al. Estimation of bloodstain deposition time within a 24-h day-night cycle with rhythmic mRNA based on a machine learning algorithm. *Forensic Science International: Genetics*. 2023:102910. doi:10.1016/j.fsigen.2023.102910.
16. Gosch A, Bhardwaj A, Courts C. TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains – identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain

- p>deposition. Forensic Science International: Genetics. 2023;102915. doi:10.1016/j.fsigen.2023.102915.
17. Braun R, Kath WL, Iwanaszko M, Kula-Eversole E, Abbott SM, Reid KJ, et al. Universal method for robust detection of circadian state from gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115:E9247-E9256. doi:10.1073/pnas.1800314115.
 18. Hanson E, Dørum G, Zamborlin M, Wang S, Gysi M, Ingold S, et al. Targeted S5 RNA sequencing assay for the identification and direct association of common body fluids with DNA donors in mixtures. *Int J Legal Med* 2022. doi:10.1007/s00414-022-02908-9.
 19. Crowgey EL, Mahajan N, Wong WH, Gopalakrishnapillai A, Barwe SP, Kolb EA, Druley TE. Error-corrected sequencing strategies enable comprehensive detection of leukemic mutations relevant for diagnosis and minimal residual disease monitoring. *BMC Med Genomics*. 2020;13:32. doi:10.1186/s12920-020-0671-8.
 20. Hanson E, Ballantyne J. Human Organ Tissue Identification by Targeted RNA Deep Sequencing to Aid the Investigation of Traumatic Injury. *Genes (Basel)* 2017. doi:10.3390/genes8110319.
 21. Dørum G, Ingold S, Hanson E, Ballantyne J, Snipen L, Haas C. Predicting the origin of stains from next generation sequencing mRNA data. *Forensic Sci Int Genet*. 2018;34:37–48. doi:10.1016/j.fsigen.2018.01.001.
 22. Ingold S, Dørum G, Hanson E, Ballantyne J, Haas C. Assigning forensic body fluids to donors in mixed body fluids by targeted RNA/DNA deep sequencing of coding region SNPs. *Int J Legal Med* 2020. doi:10.1007/s00414-020-02252-w.
 23. Lindenbergh A, Pagter M de, Ramdayal G, Visser M, Zubakov D, Kayser M, Sijen T. A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6:565–77. doi:10.1016/j.fsigen.2012.01.009.
 24. Lindenbergh A, van den Berge M, Oostra R-J, Cleypool C, Bruggink A, Kloosterman A, Sijen T. Development of a mRNA profiling multiplex for the inference of organ tissues. *Int J Legal Med*. 2013;127:891–900. doi:10.1007/s00414-013-0895-7.
 25. Gosch A, Courts C. Comparative Evaluation of Targeted RNA Sequencing Protocols for Gene Expression Quantification With and Without Unique Molecular Indices (UMIs). *bioRxiv* 2025. doi:10.1101/2025.01.27.635010.
 26. Bilal MY, Dambaeva S, Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A, Beaman KD. A Role for Iodide and Thyroglobulin in Modulating the Function of Human Immune Cells. *Front Immunol*. 2017;8:1573. doi:10.3389/fimmu.2017.01573.
 27. Sahay B, Bashant K, Nelson NLJ, Patsey RL, Gadila SK, Boohaker R, et al. Induction of Interleukin 10 by *Borrelia burgdorferi* Is Regulated by the Action of CD14-Dependent p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and cAMP-Mediated Chromatin Remodeling. *Infect Immun* 2018. doi:10.1128/IAI.00781-17.
 28. QIAGEN. QIAseq Targeted Panel Analysis Plugin User Manual 2018.
 29. Dobbs KR, Embury P, Vulule J, Odada PS, Rosa BA, Mitreva M, et al. Monocyte dysregulation and systemic inflammation during pediatric falciparum malaria. *JCI Insight* 2017. doi:10.1172/jci.insight.95352.
 30. Halim L, Romano M, McGregor R, Correa I, Pavlidis P, Grageda N, et al. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. *Cell Rep*. 2017;20:757–70. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.079.
 31. Naue J. Getting the chronological age out of DNA: using insights of age-dependent DNA methylation for forensic DNA applications. *Genes Genomics* 2023. doi:10.1007/s13258-023-01392-8.

32. Freire-Aradas A, Pośpiech E, Aliferi A, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Pisarek A, et al. A Comparison of Forensic Age Prediction Models Using Data From Four DNA Methylation Technologies. *Front Genet.* 2020;11:932. doi:10.3389/fgene.2020.00932.
33. Ackermann K, Plomp R, Lao O, Middleton B, Revell VL, Skene DJ, Kayser M. Effect of sleep deprivation on rhythms of clock gene expression and melatonin in humans. *Chronobiol Int.* 2013;30:901–9. doi:10.3109/07420528.2013.784773.
34. Lech K, Ackermann K, Revell VL, Lao O, Skene DJ, Kayser M. Dissecting Daily and Circadian Expression Rhythms of Clock-Controlled Genes in Human Blood. *J Biol Rhythms.* 2016;31:68–81. doi:10.1177/0748730415611761.
35. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Ż, Pałeczka A, et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;17:173–9. doi:10.1016/j.fsigen.2015.05.001.
36. Arnardottir E, Nikonova E, Shockley KR, Pdtelzhnikov A, Anafi RC, Tanis KQ, et al. Blood-Gene Expression Reveals Reduced Circadian Rhythmicity in Individuals p Resistant to Sleep Deprivation. *Sleep.* 2014;37:1589–600.
37. Cox KH, Takahashi JS. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *J Mol Endocrinol.* 2019;63:R93-R102. doi:10.1530/JME-19-0153.
38. Haspel JA, Anafi R, Brown MK, Cermakian N, Depner C, Desplats P, et al. Perfect timing: circadian rhythms, sleep, and immunity - an NIH workshop summary. *JCI Insight* 2020. doi:10.1172/jci.insight.131487.
39. BaHammam AS, Pirzada A. Timing Matters: The Interplay between Early Mealtime, Circadian Rhythms, Gene Expression, Circadian Hormones, and Metabolism-A Narrative Review. *Clocks & Sleep.* 2023;5:507–35. doi:10.3390/clockssleep5030034.
40. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of Circadian Rhythms. *J. basic appl. res. biomed.* 2020;6:82–9. doi:10.51152/jbarbiomed.v6i2.37.
41. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med.* 2019;11:82. doi:10.1186/s13073-019-0704-0.
42. Fagiani F, Di Marino D, Romagnoli A, Travelli C, Voltan D, Di Cesare Mannelli L, et al. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 2022. doi:10.1038/s41392-022-00899-y.
43. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 2014;15.
44. Naue J, Hoefsloot HCJ, Mook ORF, Rijlaarsdam-Hoekstra L, van der Zwalm MCH, Henneman P, et al. Chronological age prediction based on DNA methylation: Massive parallel sequencing and random forest regression. *Forensic Sci Int Genet.* 2017;31:19–28. doi:10.1016/j.fsigen.2017.07.015.
45. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, van de Voorde W, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics.* 2015;10:922–30. doi:10.1080/15592294.2015.1080413.
46. Koop BE, Reckert A, Becker J, Han Y, Wagner W, Ritz-Timme S. Epigenetic clocks may come out of rhythm-implications for the estimation of chronological age in forensic casework. *Int J Legal Med* 2020. doi:10.1007/s00414-020-02375-0.
47. McDade TW, M Ross K, L Fried R, Arevalo JMG, Ma J, Miller GE, Cole SW. Genome-Wide Profiling of RNA from Dried Blood Spots: Convergence with Bioinformatic Results Derived from Whole Venous Blood and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biodemography Soc Biol.* 2016;62:182–97. doi:10.1080/19485565.2016.1185600.

48. Sirker M, Schneider PM, Gomes I. A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *Int J Legal Med.* 2016;130:1431–8. doi:10.1007/s00414-016-1373-9.
49. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35:445–62. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153128.
50. Wang S, Shanthan G, Bouzga MM, Thi Dinh HM, Haas C, Fonnelløp AE. Evaluating the performance of five up-to-date DNA/RNA co-extraction methods for forensic application. *Forensic Sci Int.* 2021;110996. doi:10.1016/j.forsciint.2021.110996.
51. Bamberg M, Bruder M, Kunz SN, Wöhrle T, Wiegand P. Really the best of both? Application of an mRNA/miRNA multiplex assay to casework samples, animal samples, and a storage study. *Forensic Sci Int Genet.* 2024;74:103129. doi:10.1016/j.fsigen.2024.103129.
52. Glynn CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA.* 2020;26:1–9. doi:10.1261/rna.072173.119.
53. Zhang Y, Liu B, Shao C, Xu H, Xue A, Zhao Z, et al. Evaluation of the inclusion of circular RNAs in mRNA profiling in forensic body fluid identification. *Int J Legal Med.* 2018;132:43–52. doi:10.1007/s00414-017-1690-7.
54. Cheng F, Li W, Li J, Ji Z, Hu W, Zhao M, et al. Circadian metabolites for evaluating the timing of bloodstain deposition: A preliminary study. *Forensic Sci Int.* 2024;361:112102. doi:10.1016/j.forsciint.2024.112102.
55. Lech K, Liu F, Davies SK, Ackermann K, Ang JE, Middleton B, et al. Investigation of metabolites for estimating blood deposition time. *Int J Legal Med.* 2018;132:25–32. doi:10.1007/s00414-017-1638-y.
56. Minami Y, Kasukawa T, Kakazu Y, Iigo M, Sugimoto M, Ikeda S, et al. Measurement of internal body time by blood metabolites. *PNAS.* 2009;106:9890–5. doi:10.1073/pnas.0900617106.
57. Ackermann K, Ballantyne KN, Kayser M. Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: A prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *Int J Legal Med.* 2010;124:387–95. doi:10.1007/s00414-010-0457-1.
58. Mikami H, Terazawa K, Takatori T, Tokudome S, Tsukamoto T, Haga K. Estimation of time of death by quantification of melatonin in corpses. *Int J Legal Med.* 1994;107:42–51. doi:10.1007/BF01247274.
59. Fu J, Allen RW. A method to estimate the age of bloodstains using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet.* 2019;39:103–8. doi:10.1016/j.fsigen.2018.12.004.
60. Jin Z, Kaihui L, Ruijian W, Jingjing C, Xiaoyu X, Du Meng, et al. Transcriptomic changes and prediction of time since deposition of blood stains. *Forensic Sci Int.* 2024;111930. doi:10.1016/j.forsciint.2024.111930.
61. Griefahn B, Künemund C, Brode P, Mehnert P. Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg. *Somnologie.* 2001;5:71–80. doi:10.1046/j.1439-054X.2001.01149.x.
62. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29:15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
63. QIAGEN. QIAseq RNA amplicon read processing. <https://ngsdataanalysis3.qiagen.com/handbooks/QIAseq-RNA-read-processing.pdf>. Accessed 6 Oct 2024.
64. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.

65. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
66. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol.* 2019;37:761–74. doi:10.1016/j.tibtech.2018.12.002.
67. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem.* 2013;59:892–902. doi:10.1373/clinchem.2013.206375.
68. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 2001;29:365–71. doi:10.1038/ng1201-365.
69. Evans C, Hardin J, Stoeckel DM. Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Brief Bioinformatics.* 2018;19:776–92. doi:10.1093/bib/bbx008.
70. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Soft.* 2015. doi:10.18637/jss.v067.i01.
71. Wright MN, Ziegler A. ranger : A Fast Implementation of Random Forests for High Dimensional Data in C++ and R. *J. Stat. Soft.* 2017. doi:10.18637/jss.v077.i01.
72. Meyer D, Dimitriadou E, Hornik K, Weingessel A, Leisch f, Chang C-C, Lin C-C. Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071): R package version 1.7-14. 2023. <https://CRAN.R-project.org/package=e1071>.
73. Jerome Friedman, Trevor Hastie, Robert Tibshirani, Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software* 2010. doi:10.18637/jss.v033.i01.
74. Kassambara A. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots: R package version 0.6.0. 2023. <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>. Accessed 2 Dec 2024.
75. Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J. Stat. Soft.* 2017. doi:10.18637/jss.v082.i13.
76. Hartig F. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models: R package version 0.4.7. 2024. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>. Accessed 2 Dec 2024.

Manuskript 3

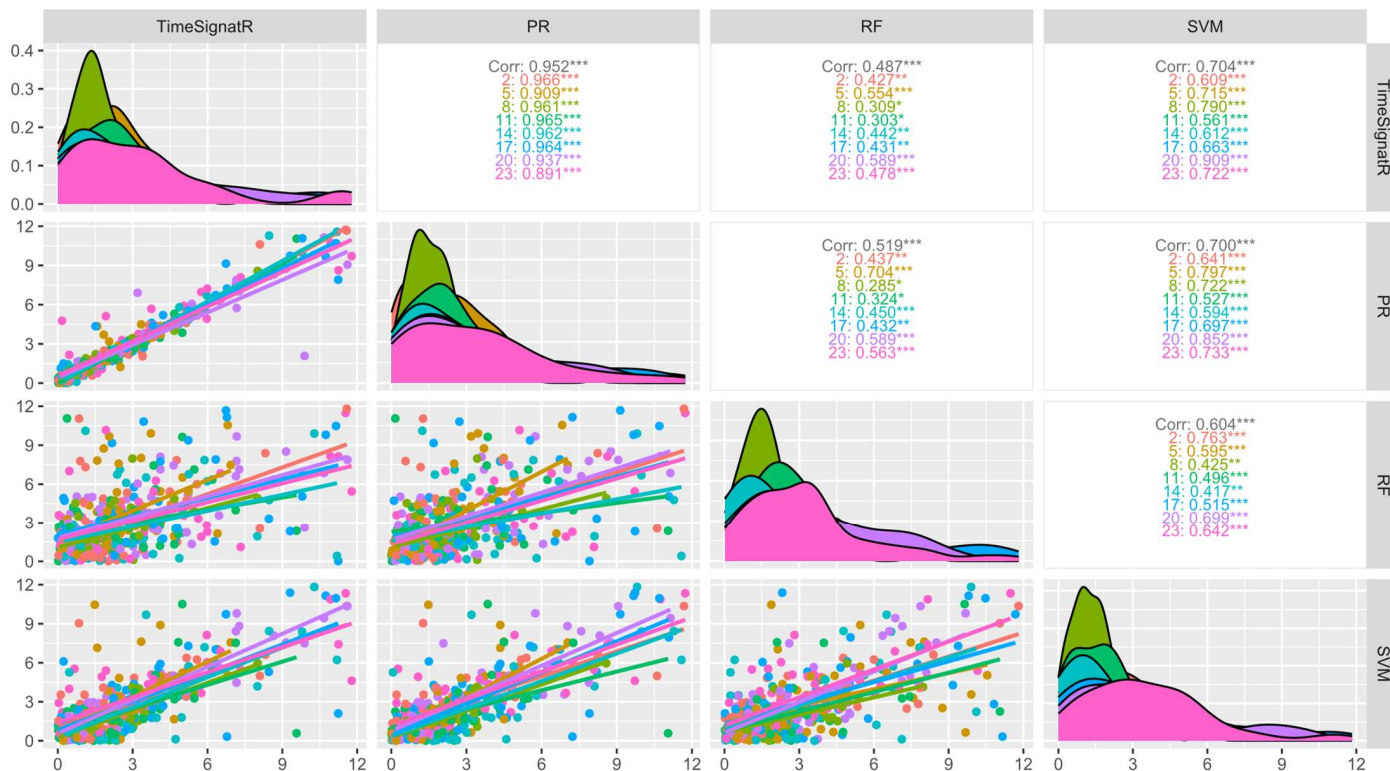
TrACES of Time: Towards estimating time-of-day of bloodstain deposition by targeted RNA sequencing

Supplementary Material

	TimeSignatR	PR	RF	SVM	
		Corr: 0.944*** 2: 0.949*** 5: 0.975*** 8: 0.945*** 11: 0.948*** 14: 0.950*** 17: 0.865*** 20: 0.940*** 23: 0.939***	Corr: 0.472*** 2: 0.430*** 5: 0.527*** 8: 0.393*** 11: 0.380*** 14: 0.540*** 17: 0.341*** 20: 0.329*** 23: 0.371**	Corr: 0.665*** 2: 0.622*** 5: 0.667*** 8: 0.728*** 11: 0.405*** 14: 0.630*** 17: 0.661*** 20: 0.843*** 23: 0.705***	TimeSignatR
			Corr: 0.507*** 2: 0.438*** 5: 0.525*** 8: 0.397*** 11: 0.382*** 14: 0.550*** 17: 0.483*** 20: 0.654*** 23: 0.458***	Corr: 0.676*** 2: 0.627*** 5: 0.641*** 8: 0.715*** 11: 0.395*** 14: 0.654*** 17: 0.800*** 20: 0.771*** 23: 0.729***	PR
				Corr: 0.613*** 2: 0.644*** 5: 0.700*** 8: 0.508*** 11: 0.379*** 14: 0.637*** 17: 0.524*** 20: 0.670*** 23: 0.585***	RF
					SVM

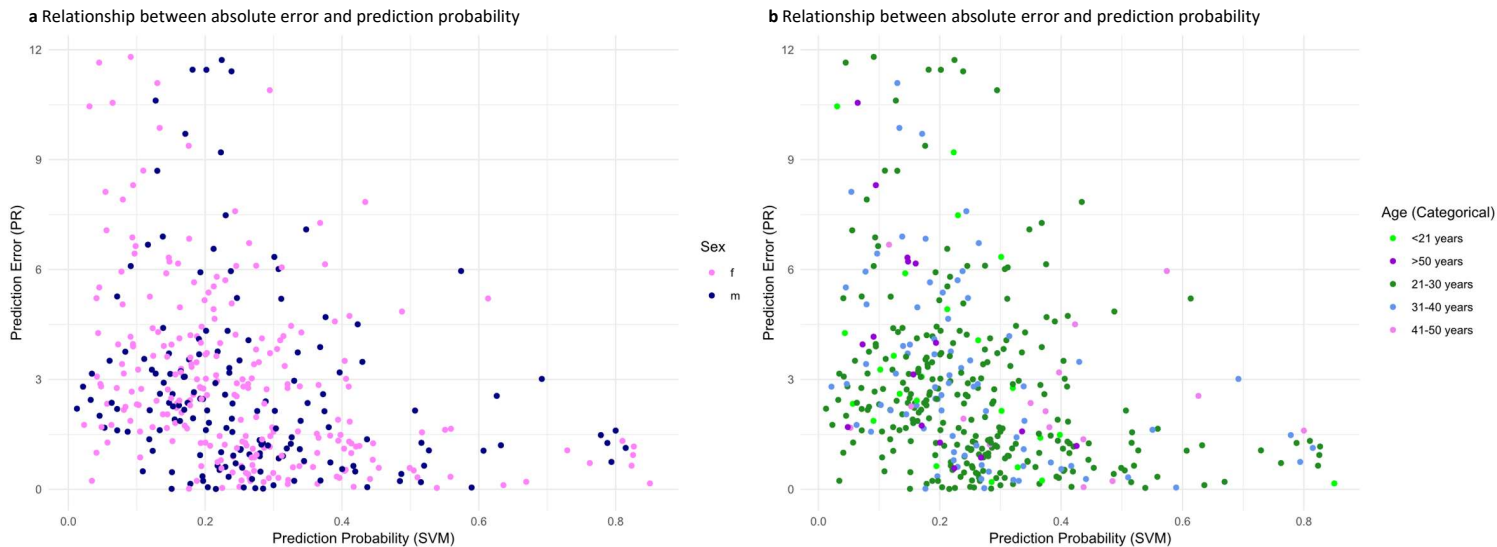
Lower panels show the pairwise comparison of individual prediction errors (x-axis: True time in hours, y-axis: prediction error in hours); upper panels show the Spearman correlation coefficient (overall and per deposition timepoint) and diagonal panels show the distribution of absolute prediction errors (x-axis: prediction error in hours, y-axis: density).

b Pairwise correlation of prediction models (CPM-normalised)



Suppl. Figure 1b: Pairwise correlation of the absolute prediction errors obtained for each of the four continuous prediction models obtained by five-fold cross-validation (n=408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours; CPM-normalised dataset).

Lower panels show the pairwise comparison of individual prediction errors (x-axis: True time in hours, y-axis: prediction error in hours); upper panels show the Spearman correlation coefficient (overall and per deposition timepoint) and diagonal panels show the distribution of absolute prediction errors (x-axis: prediction error in hours, y-axis: density).

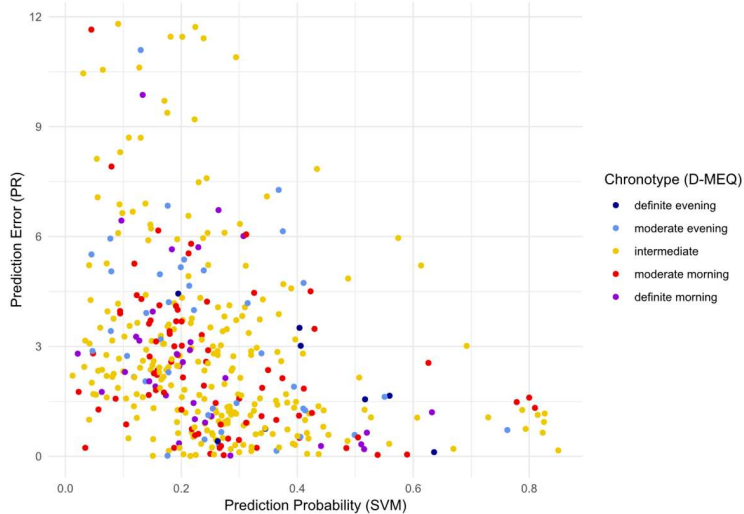


Suppl. Figure 2: Prediction error and predicted probability shown in relation to donor characteristics and activities:

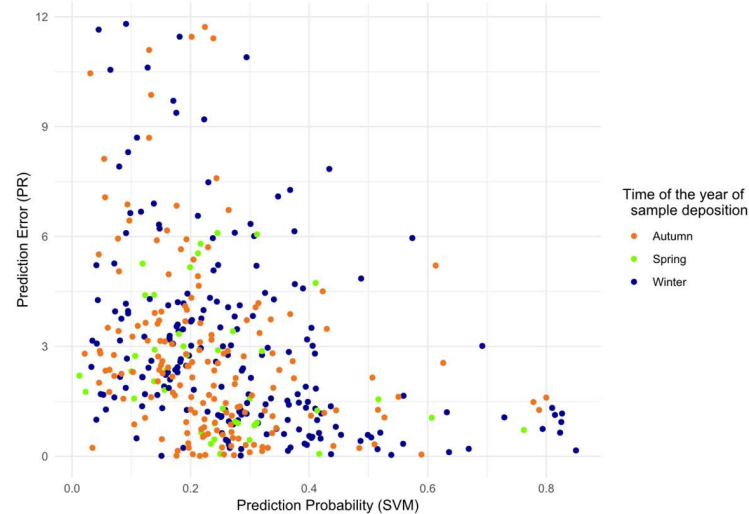
Predictions obtained for samples in the respective test set of five-fold cross-validation (n=408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours; Refall normalised dataset)

a: Donor sex, **b:** Donor age (categorical) , **c:** Donor chronotype (assessed using the D-MEQ questionnaire), **d:** Time of the year of sample deposition, **e:** Consumption of caffeine (within 3 hours prior to sample deposition) , **f:** Deviations from study protocol instructions (consumption of alcohol or napping within 3 hours prior to sample deposition) , **g:** Individuals taking medication (medication indicated in brackets (vitamins and oral contraceptives not included)).

c Relationship between absolute error and prediction probability



d Relationship between absolute error and prediction probability

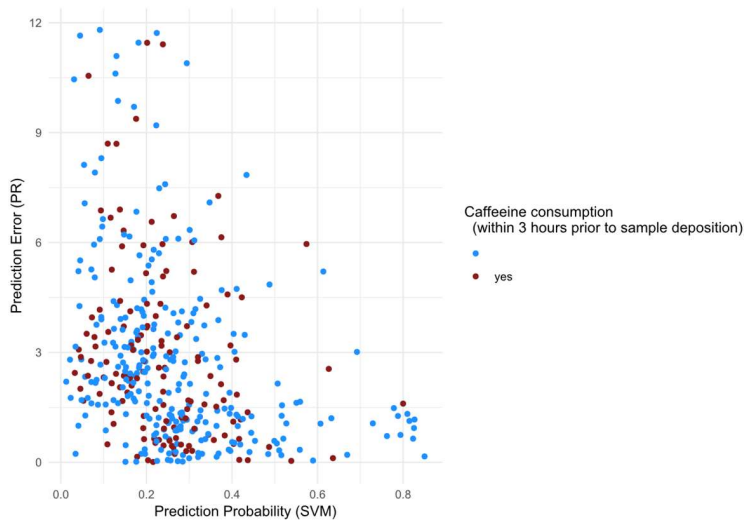


Suppl. Figure 2: Prediction error and predicted probability shown in relation to donor characteristics and activities:

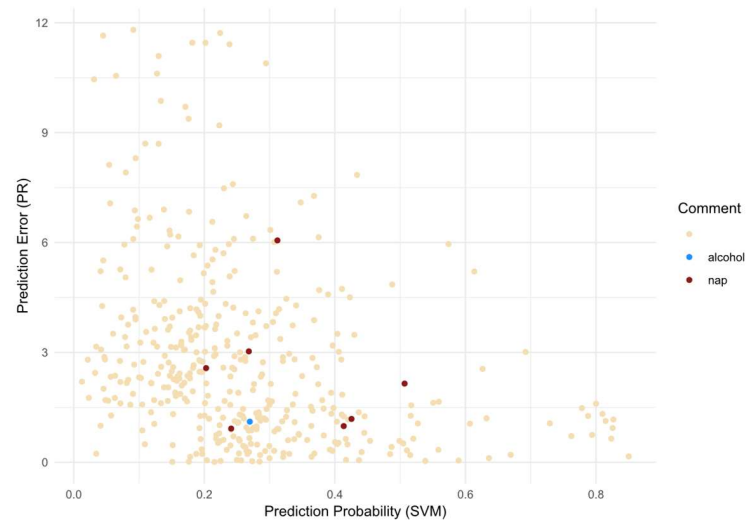
Predictions obtained for samples in the respective test set of five-fold cross-validation (n=408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours; Refall normalised dataset)

a: Donor sex, **b:** Donor age (categorical) , **c:** Donor chronotype (assessed using the D-MEQ questionnaire), **d:** Time of the year of sample deposition, **e:** Consumption of caffeine (within 3 hours prior to sample deposition) , **f:** Deviations from study protocol instructions (consumption of alcohol or napping within 3 hours prior to sample deposition) , **g:** Individuals taking medication (medication indicated in brackets (vitamins and oral contraceptives not included)).

e Relationship between absolute error and prediction probability



f Relationship between absolute error and prediction probability

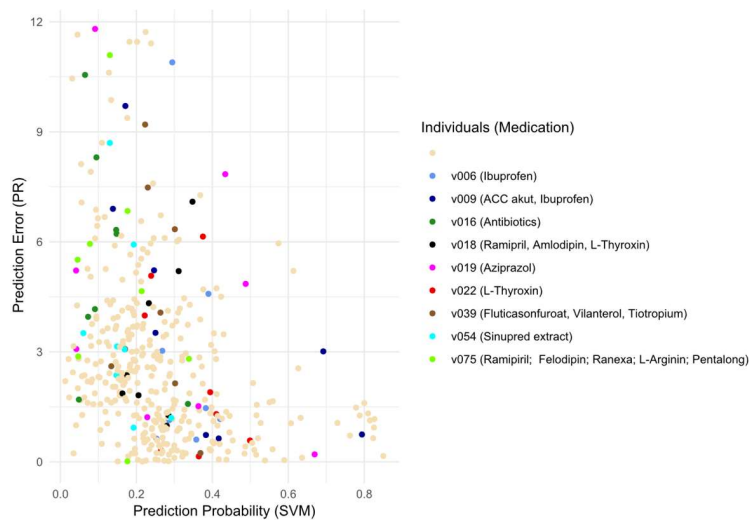


Suppl. Figure 2: Prediction error and predicted probability shown in relation to donor characteristics and activities:

Predictions obtained for samples in the respective test set of five-fold cross-validation (n=408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours; Refall normalised dataset)

a: Donor sex, **b:** Donor age (categorical) , **c:** Donor chronotype (assessed using the D-MEQ questionnaire), **d:** Time of the year of sample deposition, **e:** Consumption of caffeine (within 3 hours prior to sample deposition) , **f:** Deviations from study protocol instructions (consumption of alcohol or napping within 3 hours prior to sample deposition) , **g:** Individuals taking medication (medication indicated in brackets (vitamins and oral contraceptives not included)).

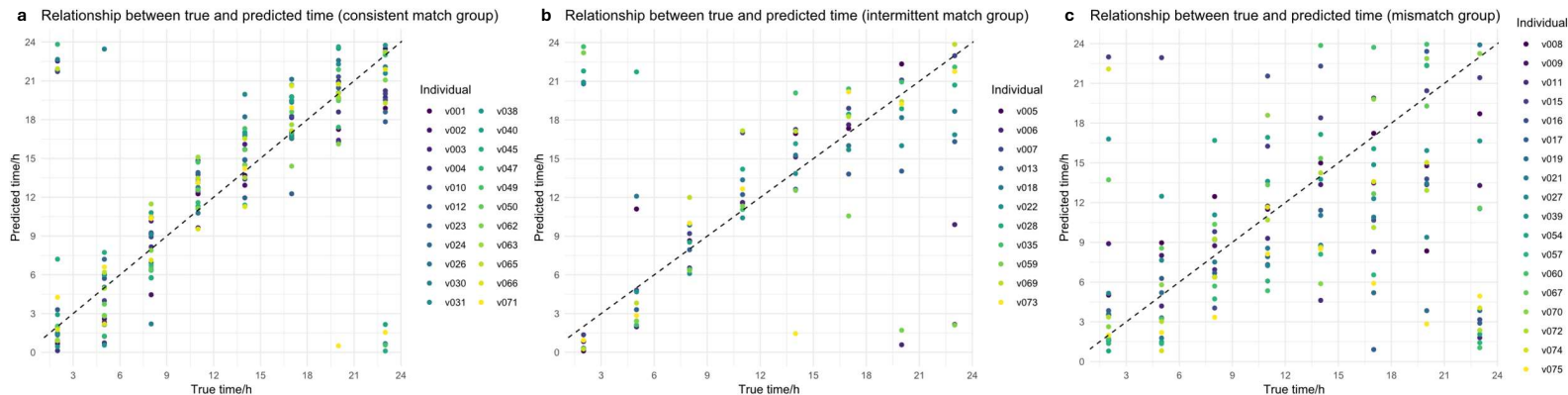
g Relationship between absolute error and prediction probability



Suppl. Figure 2: Prediction error and predicted probability shown in relation to donor characteristics and activities:

Predictions obtained for samples in the respective test set of five-fold cross-validation (n=408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours; Refall normalised dataset)

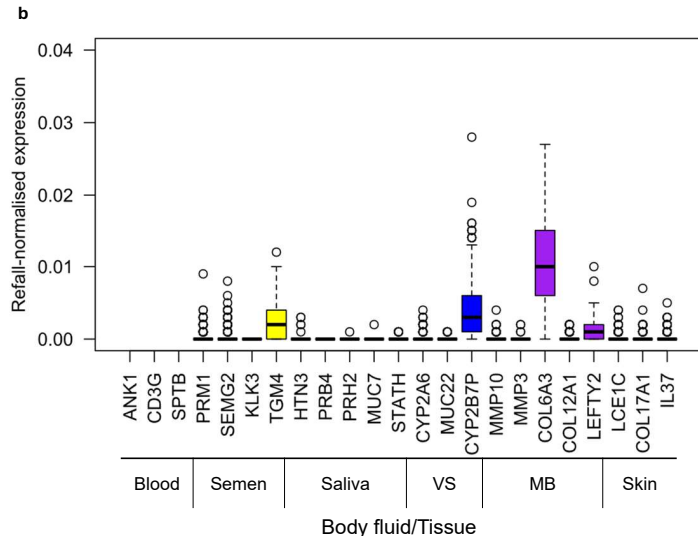
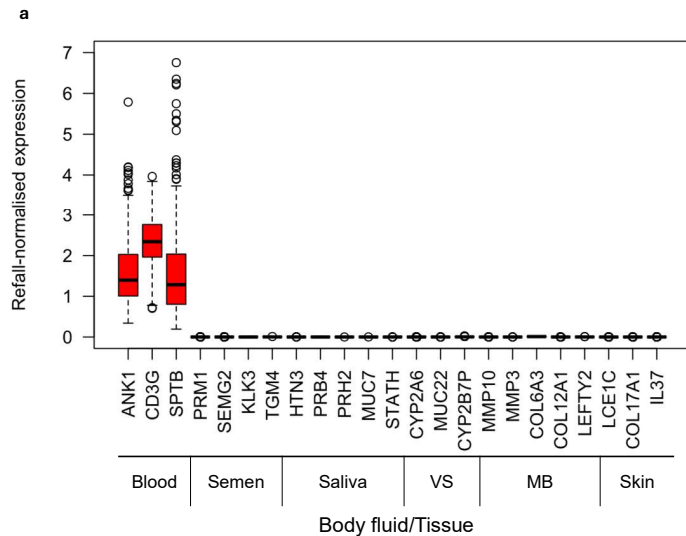
a: Donor sex, **b:** Donor age (categorical) , **c:** Donor chronotype (assessed using the D-MEQ questionnaire), **d:** Time of the year of sample deposition, **e:** Consumption of caffeine (within 3 hours prior to sample deposition) , **f:** Deviations from study protocol instructions (consumption of alcohol or napping within 3 hours prior to sample deposition) , **g:** Individuals taking medication (medication indicated in brackets (vitamins and oral contraceptives not included)).



Suppl. Figure 3: Scatterplot showing true and predicted times for individuals according to match group

Predictions obtained for samples in the respective test set of five-fold cross-validation (n=408 samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints, dried for 48 hours; Refall normalised dataset)

a: consistent match group (individuals showing no prediction error >6 hours and a maximum of four samples with a prediction error > 3 hours), **b:** intermittent match group (individuals with a single sample showing a prediction error > 6 hours and a maximum of three samples with a prediction error > 3 hours), **c:** mismatch group (individuals showing a single sample with a prediction error > 6 hours and a minimum of four samples with an error > 3 hours or two or more samples with a prediction error > 6 hours).

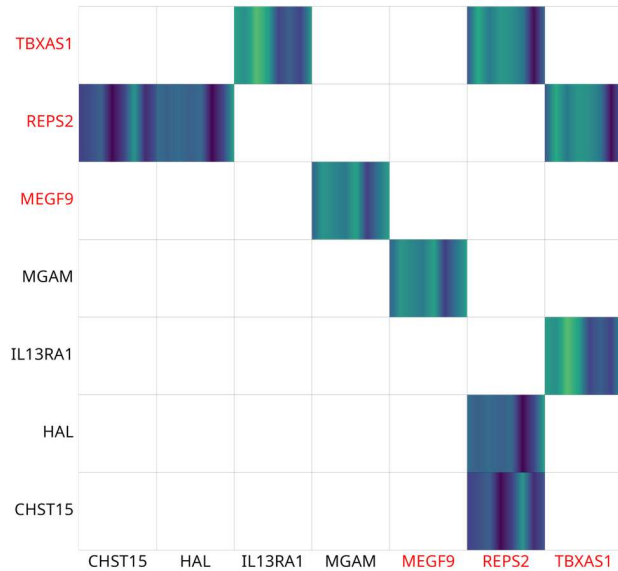


Suppl. Figure 4: Boxplot showing Refall-normalised expression of BFI markers in blood samples

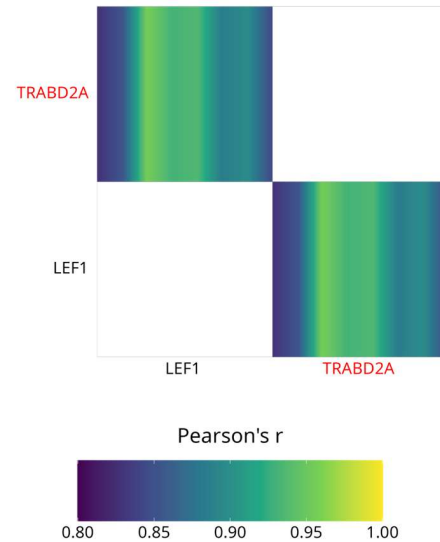
Boxplots show the distribution of average values (calculated from $n = 408$ samples from 51 different individuals collected at 8 different timepoints) for 23 BFI markers. Boxes indicate median and interquartile range (IQR) of this distribution, whiskers extend from the IQR to the largest/smallest value no further than $1.5 \times$ IQR. Data points beyond whiskers are plotted individually. Boxes for markers specific for the same body fluid are shown in the same color.

a: Plot with y-axis spanning from 0 to 7, **b:** Plot with y-axis spanning from 0 to 0.04 (for better visualisation of low-expressed markers).

a Correlated markers (Refall)



b Correlated markers (CPM)



Suppl. Figure 5: Correlation and selection of markers

Those markers are shown where all expressions of the 8 time points show a Pearson correlation $|r| > 0.8$ with those of another marker at the respective time point. The colour gradient marks the correlation across the eight timepoints from left to right. The genes for which no correlations above the threshold remain after removal are marked in red.

a: Refall-normalised dataset, **b:** CPM-normalised dataset.

Supplementary File 1: Comparison of normalisation procedures for targeted RNA sequencing data

1 – Normalisation procedures

Gene expression quantification methods require normalisation procedures to account for technical variation in the various sample preparation steps. While robust normalisation procedures have been established and guidelines have been proposed for the analysis of quantitative PCR data [1, 2], microarray experiments [3] as well as whole transcriptome sequencing approaches [4], no such standards or guidelines have been established for the analysis of data from targeted sequencing of cDNA.

We thus chose to apply and compare six different normalisation procedures (which have been applied in previous studies using targeted RNA sequencing or adapted from other technical approaches such as qPCR or whole transcriptome sequencing), summarised in SF1-Table 1.

SF1-Table 1: Description of normalisation procedures

Name/abbreviation of procedure	Description
"CPM" (Counts Per Million)	For each sample, the raw read count of each target gene was divided by the total read counts of all target genes and multiplied by one million. CPM thus represents the number of counts expected to be observed for the respective target gene if each library was sequenced to a total of exactly one million reads.
"Median"	For each sample, the raw read count of each target gene was divided by the median of the read counts of all targeted genes.
"Refall"	For each sample, the raw read count of each target gene was divided by the average read counts of all reference gene candidates (<i>DECR1</i> , <i>FPGS</i> , <i>HGS</i> , <i>KIDINS220</i> , <i>MRFAP1</i> , <i>OTDU5</i> , <i>PPIB</i> , <i>TRAP1</i> , <i>USP19</i>) in that same sample.
"Ref3-q"	For each sample, the raw read count of each target gene was divided by the average read counts of a subset of three reference gene candidates (<i>HGS</i> , <i>KIDINS220</i> , <i>PPIB</i>) in that same sample. These genes were chosen as they had been identified as the most stable candidates in the qPCR dataset in [5].
"Ref3-NR"	For each sample, the raw read count of each target gene was divided by the average read counts of a subset of three reference gene candidates (<i>HGS</i> , <i>KIDINS220</i> , <i>TRAP1</i>) in that same sample. These genes were chosen as they had been identified as the most stable combination of three reference gene candidates when applying NormiRazor [6] to our targeted RNA sequencing dataset.
"DEseq2-norm" ¹	This normalisation approach is implemented in the DEseq2 [7] R package and regularly applied to normalise whole transcriptome sequencing data. Briefly summarised, the function creates a 'pseudo-reference sample', to which, for each gene, the geometric mean across all samples is assigned as 'pseudo-read count'. For each gene in each sample, the ratio of the measured read count to this 'pseudo-read count' is calculated. All read counts in each sample are then scaled by a size factor, which is set to the median of the calculated ratios per sample [8].

¹Note: The normalisation approach implemented in the DEseq2 package is typically applied to whole transcriptome sequencing data and normalises over the entire dataset. It will therefore change if different samples are combined for normalisation. While this is unproblematic for whole transcriptome sequencing data, where biostatistical analyses are commonly performed on a fixed sample set, this would be an issue for the application envisioned here, where biostatistical models built on a fixed dataset are meant to be applied to single samples sequenced under identical conditions, but possibly much later. Hence, the DEseq2-norm approach and similar approaches are not well suited for our application, however, the DEseq2-norm approach was included in our initial testing for comparison purposes. All other normalisation procedures can be performed on raw data from individual samples and are thus dataset-independent.

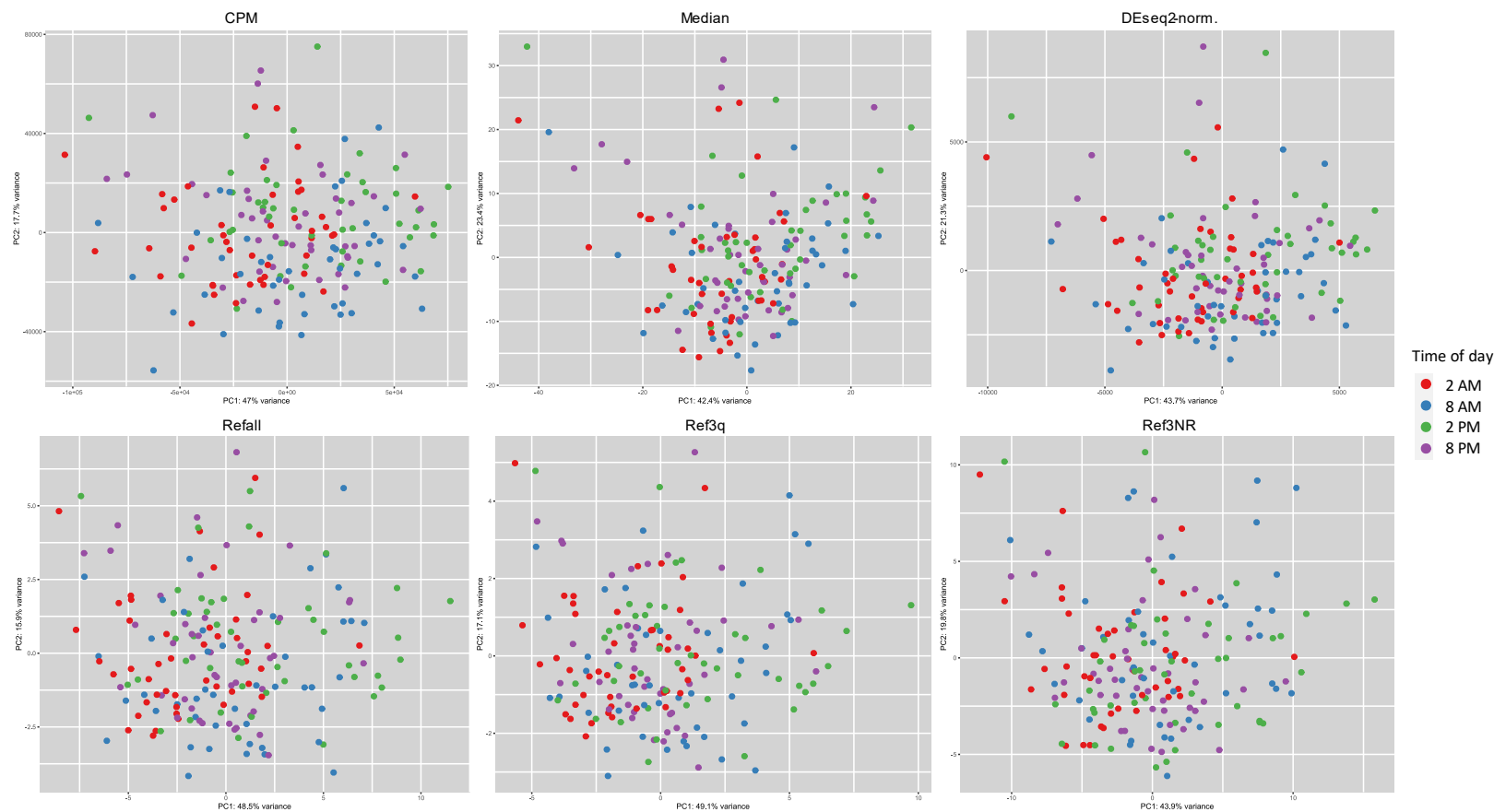
2 – Choice of reference genes

The reference gene candidates were chosen as described in [5], combining markers identified as stably expressed in human blood in previous studies [9, 10] as well as in our own whole transcriptome sequencing dataset [11]. Despite that, we observed that individual reference genes showed timepoint-dependent expression (Suppl. Table 7). However, as discussed by Kirk et al. [12], normalisation to reference genes with steady expression is strictly necessary only if the aim of the study is to accurately quantify the effect of a certain condition on gene expression, whereas for the aim of identifying patterns in gene expression suitable to predict time-of-day, even markers with cyclic expression patterns might be suitable for normalisation. Additionally, the above-described reference gene candidates were also chosen for their previously described expression stability across individuals and therefore may still be deemed suitable to normalise for interindividual differences in gene expression. We thus decided to include the reference gene-based normalisation approaches in our comparisons despite timepoint dependence of individual reference markers observed during initial marker suitability evaluation.

3 – Qualitative comparison of normalisation procedures

The comparison of normalisation procedures was performed on a subset of samples comprising a total of 180 samples from 45 individuals taken at four different time points (8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM, all stains dried and stored for 48 hours). Raw UMI counts from all 180 samples were normalised applying the six approaches described in SF1-Table 1.

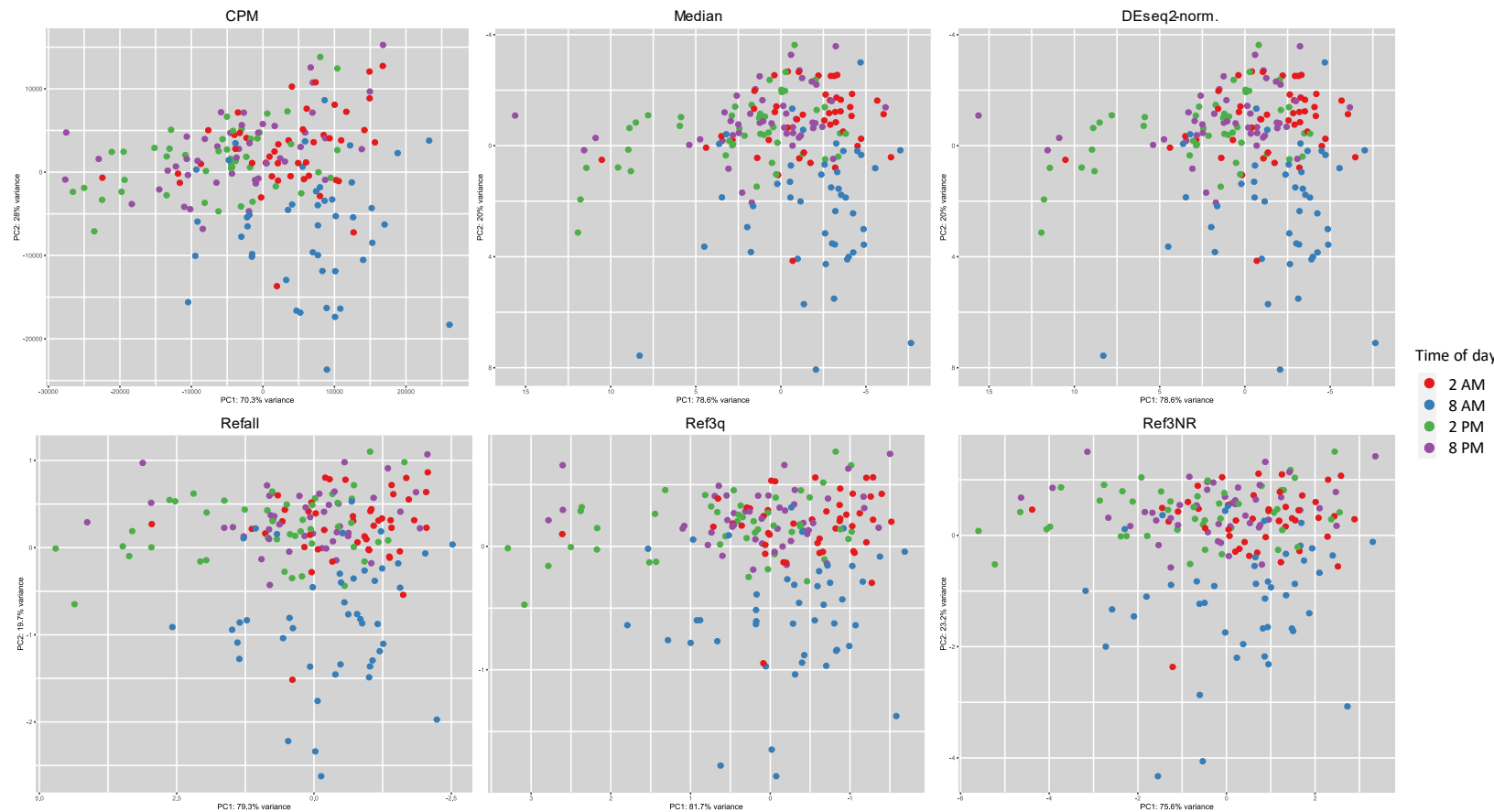
In a first step, we aimed to visually inspect general trends in the datasets. For this purpose, Principal Component Analysis (PCA) of each normalised dataset was performed and PCA plots generated using the "stats" (v. 4.1.1) and the "factoextra" (v. 1.0.7) packages in R [13, 14]. When considering all 69 potential time-of-day predictor candidates, clustering of datapoints according to time-of-day of sample collection was not observed in any of the normalised datasets (SF1-Figure 1).



SF1-Figure 1: PCA plots of normalised gene expression data (all markers)

Raw read counts were normalised according to the 6 procedures described in SF1-Table 1. The PCA was calculated for all 69 "time-of-day" candidate markers for a subset of 180 samples from 45 individuals taken at four different time points (stains dried for 48 hours). Colours indicate time-of-day of sample deposition.

However, initial data analysis indicated that not all 69 time-of-day predictor candidates were indeed strongly correlated with the time-of-day of sample collection in our dataset. A second PCA was thus performed, considering only a subset of candidate predictors (CAMKK1, FAAH2, IGF2R, FKBP5, AVIL, ERMN, IL13RA1; SF1-Figure 2), which had shown promising results in an initial phase of data analysis (data not shown).



SF1-Figure 2: PCA plots of normalised gene expression data (selected markers)

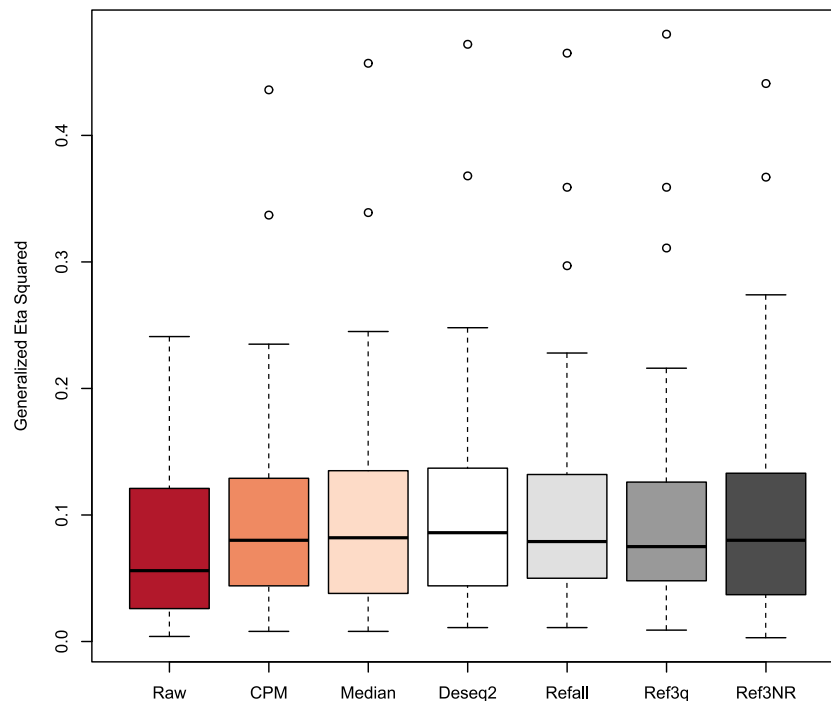
Raw read counts were normalised according to the 6 procedures described in SF1-Table 1. The PCA was calculated for all seven "time-of-day" candidate markers (CAMKK1, FAAH2, IGF2R, FKBP5, AVIL, ERMN, IL13RA1), which had shown promising results in an initial phase of data analysis (data not shown). Analysis was performed for a subset of 180 samples from 45 individuals taken at four different time points (stains dried for 48 hours). Colours indicate time-of-day of sample deposition.

The PCA plots now showed a certain extent of clustering of datapoints according to time-of-day of sample collection, with samples taken at 8 AM showing a more distinct separation than the other groups. Notably, clustering trends were highly comparable between normalisation procedures. Furthermore, all normalised datasets showed a similar proportion of variance explained by the first two principal components. PCA thus did not reveal major differences between the six normalisation procedures.

4 – Quantitative comparison of normalisation procedures

In a second step, we aimed to compare the effectiveness of the different normalisation approaches in a quantitative manner. An effective normalisation should remove or at least reduce differences in read counts from technical variability but preserve differences due to true biological differences in gene expression [4]. The "effectiveness" of a normalisation may be assessed in different ways. In this study, we chose to define an effective normalisation procedure as one that reduces intra-group variability (i.e. variability between samples deposited at the same timepoint), while at the same time preserving or even increasing variability between groups and hence used the generalised η^2 as a measure of normalisation effectiveness.

For this purpose, ANOVAs were calculated using the "rstatix" (v. 0.7.2) package in R [13, 15] and generalised η^2 values obtained for each gene in each of the six normalised as well as in the unnormalised dataset from the ANOVA table.



SF1-Figure 3:

Raw read counts were normalised according to the six procedures described in SF1-Table 1. Boxplots show the distribution of generalised η^2 for normalised and raw read counts. Boxes indicate median and interquartile range (IQR) of this distribution, whiskers extend from the IQR to the largest/smallest value no further than 1.5x IQR. Data points beyond whiskers are plotted individually.

SF1-Figure 3 shows the distribution of generalised η^2 for normalised and raw read counts. Generalised η^2 increased in all normalised datasets compared to the non-normalised data. It may thus be concluded that each of the six considered approaches is generally suitable for normalisation. While some differences were observed for individual candidate predictors, no normalisation procedure performed vastly better than the others.

5 – Conclusion

In consequence, we decided to perform all downstream analyses using two different normalisation approaches from the two conceptionally different procedure groups (normalisation based on reference genes and normalisation based on read count distribution). Within each group, we chose the approach leading to the highest average generalised η^2 values: Refall and CPM. (The normalisation procedure implemented in the DESeq2 package was considered unsuitable due to the limitation described above. However, our comparisons showed that the read counts normalised with this approach did not differ relevantly from read counts normalised with any of the other approaches).

Considering the results presented in SF1-Figure 1 to 3, it is to be expected that downstream analyses would lead to comparable results if any of the other normalisation procedures would be chosen instead.

SF1 - References

1. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
2. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*. 2013;59:892–902. doi:10.1373/clinchem.2013.206375.
3. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat Genet*. 2001;29:365–71. doi:10.1038/ng1201-365.
4. Evans C, Hardin J, Stoeckel DM. Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Brief Bioinformatics*. 2018;19:776–92. doi:10.1093/bib/bbx008.
5. Gosch A, Bhardwaj A, Courts C. TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains – identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain deposition. *Forensic Science International: Genetics*. 2023;102915. doi:10.1016/j.fsigen.2023.102915.
6. Grabia S, Smyczynska U, Pagacz K, Fendler W. NormiRazor: tool applying GPU-accelerated computing for determination of internal references in microRNA transcription studies. *BMC Bioinformatics*. 2020;21:425. doi:10.1186/s12859-020-03743-8.
7. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
8. members of the teaching team at the Harvard Chan Bioinformatics Core (HBC). Introduction to DGE. https://hbcctraining.github.io/DGE_workshop/lessons/02_DGE_count_normalization.html. Accessed 24 Jun 2024.
9. Hounkpe BW, Chenou F, Lima F de, Paula EV de. HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res*. 2021;49:D947-D955. doi:10.1093/nar/gkaa609.
10. Stamova BS, Apperson M, Walker WL, Tian Y, Xu H, Adamczyk P, et al. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BMC Med Genomics*. 2009;2:49. doi:10.1186/1755-8794-2-49.
11. Dos Santos KCG, Desgagné-Penix I, Germain H. Custom selected reference genes outperform pre-defined reference genes in transcriptomic analysis. *BMC Genomics*. 2020;21:35. doi:10.1186/s12864-019-6426-2.
12. Kirk D, Allen R. Exploration of Rhythmic Patterns of Gene Expression to Estimate the Time of Day a Bloodstain Was Created. *Research and Reports in Forensic Medical Science*. 2021:1–11. doi:10.2147/RRFMS.S327044.
13. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.
14. Kassambara A, Mundt F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate. 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.
15. Kassambara A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. <https://rpkgs.datanovia.com/rstatix/>.

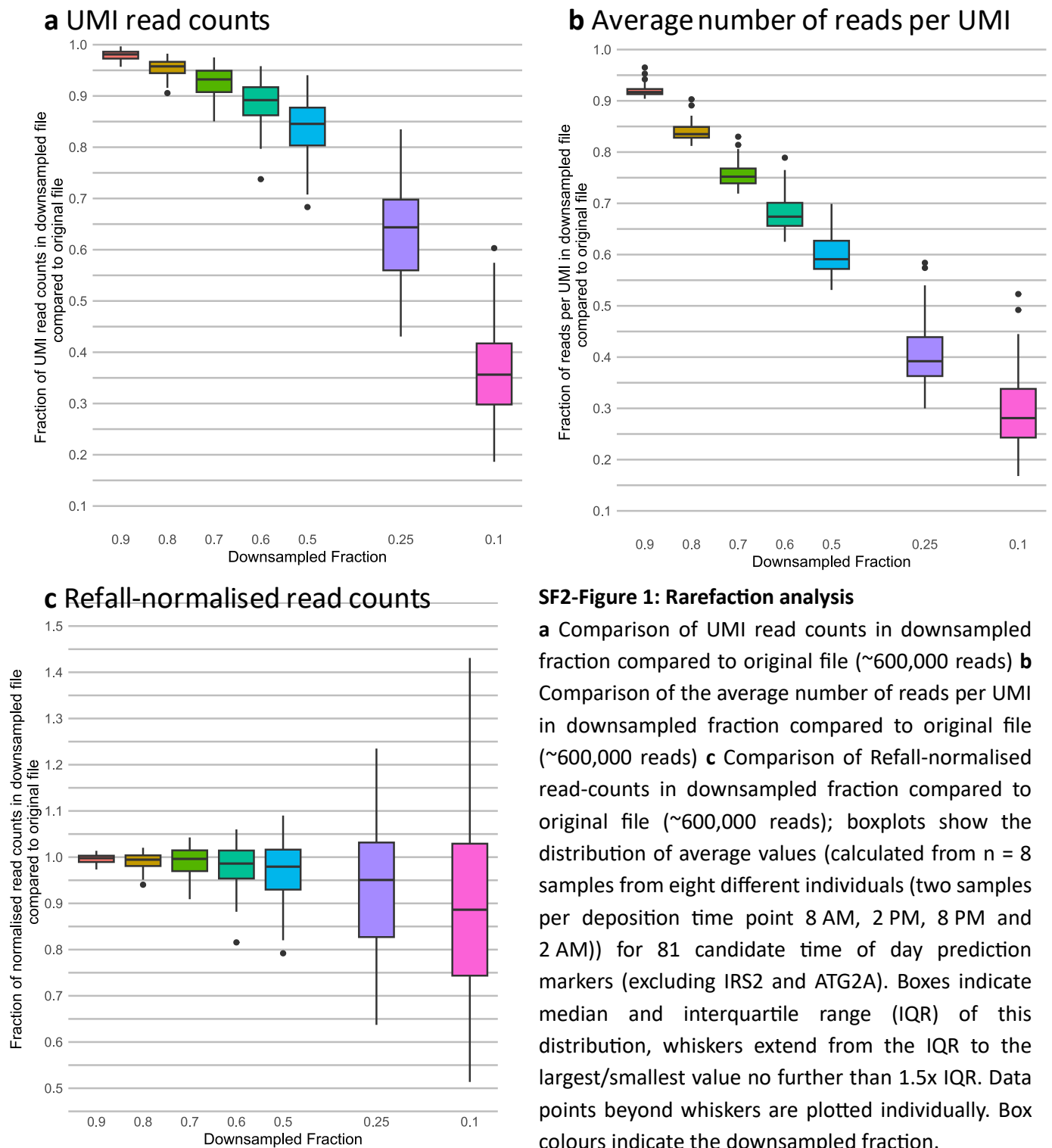
Supplementary File 2: Optimisation of sequencing depth

When sequencing libraries are prepared with Unique Molecular Identifiers (UMIs), sufficient sequencing depth is necessary to accurately quantify the number of different UMIs per target marker present in each sample. For sequencing libraries without UMIs, an increase in sequencing reads per sample results in a larger number of reads per marker (thus, accounting for sequencing depth is strictly necessary for read count normalisation). For UMI-based sequencing libraries, in theory, an increase in sequencing reads only leads to an increase in UMI reads as long as not all unique UMI sequences have been sequenced yet. After this point, further increasing sequencing depth will result in an increase in reads per UMI while the UMI read counts will reach a plateau. The sequencing depth at which this plateau is reached will differ depending on the target gene expression level in the individual sample as well as the expression levels of all other markers in the same sample and thus needs to be individually determined for each marker panel and sample type. As targeted cDNA sequencing especially using UMI-based protocols is not widely used for gene expression quantification yet, gold standard procedures or guidelines how to set a minimum sequencing depth threshold are not available to this point.

For the purpose of this study, we aimed to identify the sequencing depth at which the plateau is reached for the majority of markers by performing rarefaction analysis, i.e. starting at a certain sequencing depth and downsampling to different percentages of reads. For rarefaction analysis, we selected eight samples from eight different individuals (two samples per deposition time point 8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM), sequenced at (or downsampled to) a starting depth of ~600,000 reads per sample. The starting depth was chosen as representing approximately 1.4x the depth recommended by the manufacturer (recommendation in the manufacturer's manual: 5,000 reads per marker for medium sequencing depth; resulting in a recommended sequencing depth of 430,000 reads per sample for a marker panel for which expression of 86 markers is expected (no expression is expected for gDNA controls and non-blood body fluid markers). Reads were then downsampled to 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 25% and 10% of the original 600,000 reads per sample. Downsampling of basecaller.bam files was performed using the filterBam function from the Rsamtools R package (v. 2.18.0) [1]. The UMI read counts per marker and the average reads per UMI for each marker in each downsampled file were compared to the original read file (~600,000 reads).

For two markers (*ATG2A* and *IRS2*), an almost linear increase in UMI read counts was observed with increased sequencing depth. For these markers, increasing the sequencing depth did not at all (*ATG2A*) or only slightly (*IRS2*) lead to an increase in the average number of reads per UMI. This was interpreted as an indication of some malfunction in the primer binding or amplification process and these two markers were thus excluded from further analysis.

The reduction of raw and Refall-normalised UMI read counts per marker and average reads per UMI for the remaining 81 time of day candidate prediction markers is shown in SF2-Figure 1. Per marker values are presented in SF2-Tables 1-3 at the end of this file.

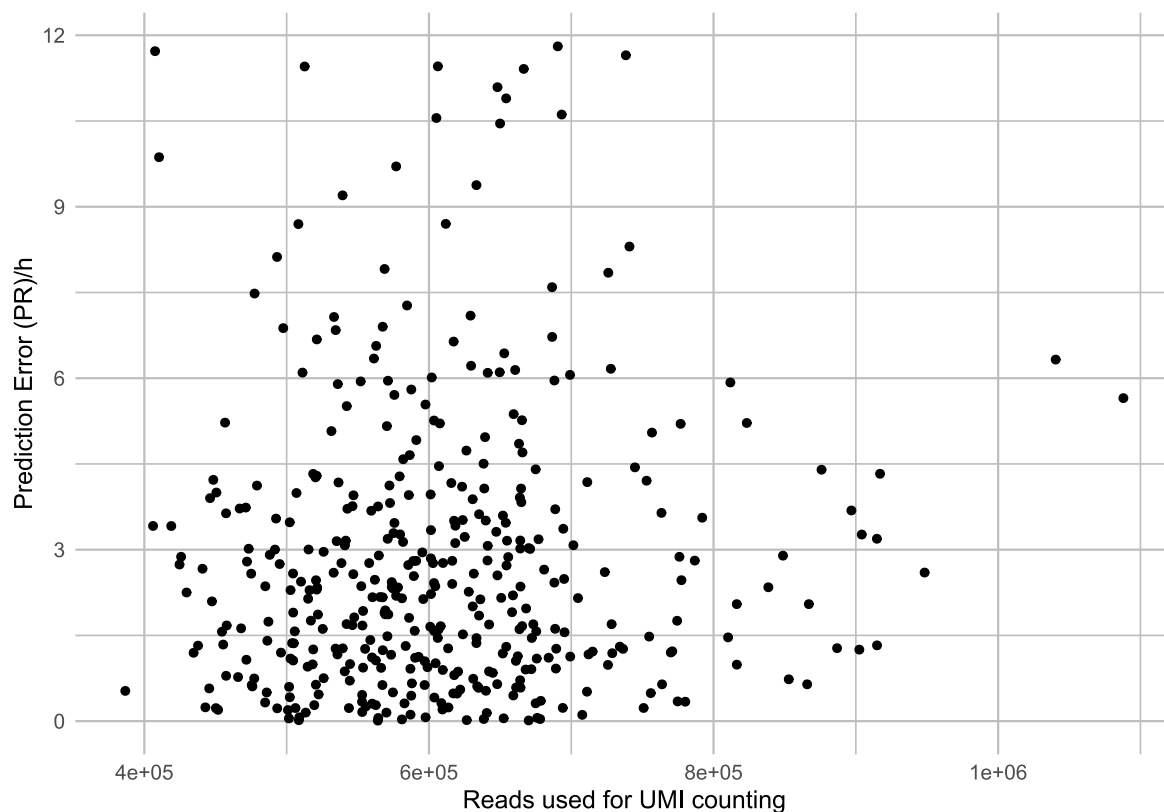


SF2-Figure 1 shows that an increase in sequencing depths only leads to a small increase in UMI read counts for the highest downsampling steps while an almost linear increase in average number of reads per UMI can be observed. The variation in normalised read counts in the downsampled fractions is small compared to the original file for the highest downsampling steps (SF2-Figure 1c). This indicates saturation or near-saturation was achieved for the majority of markers. Further increasing the sequencing depth would lead to a further increase of reads per UMI but no relevant increase in UMI read counts is to be expected.

Based on SF2-Figure 1 we conclude that saturation was achieved for the majority of markers when downsampled to 80% (corresponding to a sequencing depth of ~480,000 reads per sample (~400,000 reads used for UMI counting)). We thus decided to aim for a sequencing depth resulting in a minimum of ~400,000 reads used for UMI counting per sample.

To evaluate the validity of our approach, we assessed the impact of sequencing depth on prediction error in our final model:

Visual inspection does not indicate a direct relationship between the number of reads used for UMI counting and prediction error (SF2-Figure 2).



SF2-Figure 2: Relationship between absolute error and sequencing depth

Plot showing the relationship between the number of reads used for UMI counting and the absolute prediction error obtained for samples in the respective test set in five-fold cross-validation for the final model (Penalised Regression on Refall-normalised dataset, $n=408$ dried blood samples from 51 individuals deposited at eight different timepoints).

Additionally, the impact of sequencing depth on prediction error was assessed by including the number of reads used for UMI counting in a mixed-effects model as described in section 5.3.9. In accordance with SF2-Figure 2, the prediction error was not significantly impacted by the number of reads used for UMI counting ($p_{\text{LMM}} > 0.05$).

Finally, we evaluated whether excluding the markers showing the highest risk of not having fully reached saturation at the chosen minimum sequencing depth would improve prediction performance. These markers were identified as markers showing an average deviation of $>3\%$ in the 80% downsampled fraction compared to the original file or a deviation of $>5\%$ for at least one of the eight samples. According to these criteria, 18 markers were identified as potentially not having fully reached

saturation (highlighted in orange in SF2-Table 3). Of these, seven were amongst the ten highest-ranking markers in the sine or the cosine component of the final model (Table 2). We therefore excluded these seven markers and constructed a new PR model on the Refall-normalised dataset described in sections 5.3.4 and 5.3.5. Using five-fold cross-validation, we obtained an RMSE of 3.89 h (a mean absolute prediction error of 2.92 h, and a prediction accuracy within +/- 4 hours of 0.77), hence representing a small decrease in prediction accuracy compared to the original model including these seven markers (RMSE of 3.73 h, mean absolute prediction error of 2.81 h and a prediction accuracy within +/- 4 hours of 0.78, cf. Table 1).

From these results, we conclude that the sequencing depth used in this study was sufficient for the sample type and marker panel analysed here. In addition, we note the necessity of developing gold standard procedures and guidelines for this type of analysis to ensure validity and comparability of results in future studies.

SF2-Table 1: Rarefaction analysis – UMI read counts

Comparison of UMI read counts in downsampled fraction compared to original file (~600,000 reads). The table shows average values calculated from n = 8 samples from eight different individuals (two samples per deposition time point 8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM)) for 72 candidate time of day prediction markers and 9 references genes.

Marker	Downsampled Fraction						
	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
ABCD2	0.990	0.969	0.937	0.934	0.869	0.703	0.429
ABHD5	0.980	0.956	0.927	0.889	0.844	0.630	0.352
ALOX5AP	0.979	0.955	0.920	0.885	0.833	0.627	0.342
APMAP	0.970	0.940	0.902	0.851	0.793	0.545	0.280
ARG1	0.986	0.962	0.951	0.907	0.877	0.676	0.418
AVIL	0.986	0.957	0.939	0.894	0.859	0.680	0.399
BACH2	0.983	0.960	0.932	0.891	0.850	0.655	0.366
BCL2	0.987	0.972	0.954	0.931	0.890	0.738	0.464
CAMKK1	0.960	0.920	0.885	0.833	0.733	0.472	0.223
CHST15	0.967	0.928	0.881	0.819	0.758	0.508	0.250
CLEC4E	0.984	0.965	0.942	0.914	0.874	0.685	0.397
CLIC3	0.984	0.944	0.910	0.869	0.815	0.596	0.320
CNTLN	0.986	0.964	0.942	0.908	0.873	0.676	0.400
CPD	0.981	0.955	0.922	0.883	0.824	0.610	0.340
CRISPLD2	0.968	0.950	0.908	0.860	0.783	0.560	0.275
DAAM2	0.997	0.941	0.958	0.880	0.856	0.712	0.401
DEC1	0.975	0.950	0.916	0.871	0.810	0.590	0.306
ECHDC3	0.986	0.965	0.958	0.927	0.903	0.725	0.412
ENHO	0.984	0.975	0.926	0.890	0.803	0.667	0.326
ERGIC1	0.969	0.932	0.892	0.836	0.776	0.530	0.262
ERMN	0.984	0.961	0.938	0.897	0.857	0.680	0.400
FAAH2	0.971	0.938	0.869	0.829	0.766	0.528	0.259
FBXL16	0.980	0.979	0.953	0.921	0.915	0.712	0.434

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
FKBP5	0.982	0.959	0.933	0.904	0.858	0.662	0.382
FLT3	0.972	0.945	0.957	0.916	0.882	0.690	0.442
FOSL2	0.972	0.936	0.899	0.845	0.781	0.532	0.272
FPGS	0.993	0.979	0.968	0.955	0.929	0.804	0.570
GABARAPL1	0.973	0.944	0.910	0.862	0.806	0.583	0.311
GCNT4	0.984	0.961	0.943	0.902	0.876	0.669	0.418
HAL	0.978	0.951	0.918	0.880	0.833	0.607	0.328
HDAC9	0.982	0.966	0.932	0.897	0.847	0.655	0.377
HGS	0.970	0.935	0.889	0.836	0.779	0.537	0.275
HNRNPDL	0.968	0.927	0.880	0.826	0.756	0.503	0.255
HPCAL4	0.980	0.978	0.937	0.877	0.819	0.625	0.314
ID3	0.985	0.948	0.913	0.892	0.838	0.641	0.372
IGF2R	0.974	0.940	0.906	0.854	0.793	0.546	0.283
IL13RA1	0.970	0.927	0.900	0.842	0.767	0.532	0.271
IL18R1	0.973	0.931	0.882	0.815	0.776	0.521	0.260
IL1R1	0.972	0.949	0.895	0.865	0.804	0.560	0.302
IL1R2	0.987	0.965	0.942	0.908	0.870	0.675	0.398
KIDINS220	0.980	0.950	0.912	0.876	0.820	0.602	0.316
KLF9	0.979	0.955	0.920	0.885	0.826	0.612	0.334
LEF1	0.991	0.979	0.963	0.945	0.919	0.781	0.516
MAL	0.981	0.959	0.930	0.895	0.845	0.644	0.356
MEGF9	0.981	0.958	0.927	0.890	0.846	0.624	0.340
MFGE8	0.976	0.953	0.920	0.878	0.834	0.636	0.346
MGAM	0.972	0.934	0.890	0.848	0.785	0.551	0.280
MKNK2	0.988	0.973	0.955	0.933	0.901	0.747	0.481
MRFAP1	0.987	0.972	0.950	0.928	0.896	0.730	0.456
MSRB2	0.987	0.966	0.937	0.892	0.852	0.652	0.397
MTHFS	0.977	0.949	0.906	0.854	0.793	0.560	0.296
MYO1E	0.990	0.974	0.969	0.947	0.932	0.809	0.543
NELL2	0.990	0.978	0.962	0.943	0.921	0.802	0.551
NR1D1	0.979	0.960	0.944	0.908	0.858	0.655	0.382
NR1D2	0.983	0.961	0.938	0.903	0.865	0.661	0.381
NRCAM	0.984	0.960	0.935	0.894	0.865	0.634	0.341
OTUD5	0.989	0.972	0.952	0.920	0.893	0.724	0.447
PER1	0.982	0.965	0.935	0.904	0.863	0.666	0.392
PER2	0.967	0.920	0.854	0.797	0.731	0.487	0.244
PER3	0.973	0.928	0.874	0.870	0.756	0.552	0.283
PFKFB2	0.984	0.955	0.932	0.877	0.838	0.613	0.321
PHC2	0.979	0.953	0.928	0.883	0.828	0.620	0.345
PIIB	0.989	0.975	0.956	0.934	0.901	0.740	0.468
REPS2	0.979	0.957	0.925	0.893	0.852	0.632	0.363
SAP30	0.977	0.952	0.915	0.874	0.835	0.627	0.343

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
SEC14L1	0.992	0.982	0.972	0.958	0.940	0.826	0.575
SIPA1L2	0.957	0.906	0.850	0.738	0.683	0.431	0.186
SMAP2	0.989	0.968	0.947	0.917	0.879	0.694	0.408
SPATA6	0.961	0.916	0.858	0.800	0.708	0.461	0.207
SYTL3	0.971	0.934	0.882	0.837	0.763	0.508	0.263
TBXAS1	0.990	0.982	0.969	0.955	0.940	0.835	0.603
TCF7	0.986	0.964	0.943	0.910	0.875	0.682	0.400
TMCC3	0.991	0.971	0.949	0.930	0.912	0.759	0.490
TPST1	0.992	0.967	0.941	0.922	0.893	0.732	0.431
TRABD2A	0.984	0.964	0.944	0.918	0.877	0.698	0.417
TRAP1	0.978	0.963	0.954	0.923	0.863	0.700	0.402
TSC22D3	0.986	0.969	0.951	0.925	0.889	0.733	0.464
UPB1	0.960	0.976	0.975	0.894	0.829	0.687	0.328
USP19	0.965	0.931	0.880	0.820	0.758	0.531	0.248
XKR8	0.991	0.981	0.970	0.943	0.923	0.786	0.523
ZBTB16	0.977	0.953	0.915	0.861	0.808	0.572	0.298

SF2-Table 2: Rarefaction analysis – Average reads per UMI

Comparison of the average number of reads per UMI in downsampled fraction compared to original file (~600,000 reads). The table shows average values calculated from n = 8 samples from eight different individuals (two samples per deposition time point 8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM)) for 72 candidate time of day prediction markers and 9 references genes.

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
ABCD2	0.912	0.821	0.739	0.636	0.558	0.358	0.237
ABHD5	0.914	0.828	0.755	0.674	0.594	0.403	0.292
ALOX5AP	0.921	0.838	0.761	0.679	0.597	0.404	0.298
APMAP	0.924	0.848	0.778	0.713	0.639	0.459	0.370
ARG1	0.916	0.831	0.749	0.672	0.572	0.366	0.243
AVIL	0.913	0.819	0.749	0.667	0.579	0.371	0.249
BACH2	0.917	0.832	0.744	0.675	0.591	0.394	0.273
BCL2	0.904	0.816	0.733	0.649	0.551	0.334	0.216
CAMKK1	0.926	0.870	0.792	0.737	0.672	0.511	0.416
CHST15	0.923	0.865	0.789	0.730	0.659	0.502	0.410
CLEC4E	0.914	0.829	0.740	0.658	0.575	0.365	0.245
CLIC3	0.914	0.851	0.760	0.688	0.615	0.419	0.314
CNTLN	0.912	0.830	0.746	0.659	0.573	0.363	0.254
CPD	0.914	0.840	0.758	0.680	0.599	0.412	0.304
CRISPLD2	0.928	0.839	0.775	0.702	0.634	0.449	0.352
DAAM2	0.926	0.860	0.749	0.672	0.586	0.305	0.308
DECR1	0.929	0.845	0.763	0.694	0.625	0.430	0.326
ECHDC3	0.912	0.839	0.739	0.653	0.553	0.363	0.217

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
ENHO	0.934	0.844	0.740	0.701	0.627	0.396	0.242
ERGIC1	0.929	0.862	0.789	0.716	0.646	0.477	0.382
ERMN	0.914	0.834	0.752	0.674	0.591	0.383	0.262
FAAH2	0.929	0.866	0.791	0.731	0.657	0.487	0.395
FBXL16	0.925	0.816	0.732	0.656	0.559	0.359	0.229
FKBP5	0.915	0.832	0.749	0.664	0.585	0.379	0.260
FLT3	0.917	0.849	0.742	0.644	0.590	0.352	0.257
FOSL2	0.922	0.852	0.774	0.716	0.643	0.469	0.366
FPGS	0.907	0.816	0.719	0.625	0.535	0.308	0.172
GABARAPL1	0.922	0.841	0.768	0.694	0.623	0.426	0.322
GCNT4	0.912	0.830	0.741	0.662	0.571	0.362	0.247
HAL	0.916	0.844	0.756	0.681	0.598	0.425	0.304
HDAC9	0.914	0.829	0.751	0.671	0.591	0.378	0.262
HGS	0.929	0.853	0.787	0.712	0.645	0.458	0.372
HNRNPDL	0.937	0.870	0.796	0.733	0.662	0.504	0.398
HPCAL4	0.919	0.847	0.762	0.681	0.617	0.397	0.322
ID3	0.911	0.840	0.763	0.692	0.594	0.390	0.261
IGF2R	0.923	0.844	0.774	0.705	0.630	0.456	0.353
IL13RA1	0.923	0.852	0.785	0.721	0.649	0.475	0.384
IL18R1	0.920	0.866	0.801	0.723	0.626	0.496	0.381
IL1R1	0.924	0.825	0.760	0.692	0.617	0.436	0.324
IL1R2	0.916	0.830	0.748	0.665	0.573	0.373	0.252
KIDINS220	0.915	0.843	0.763	0.680	0.605	0.418	0.312
KLF9	0.923	0.843	0.762	0.679	0.606	0.413	0.306
LEF1	0.909	0.820	0.726	0.634	0.544	0.321	0.197
MAL	0.916	0.835	0.749	0.674	0.589	0.382	0.283
MEGF9	0.919	0.836	0.760	0.680	0.589	0.407	0.298
MFGE8	0.925	0.845	0.760	0.672	0.599	0.398	0.295
MGAM	0.922	0.851	0.787	0.707	0.636	0.459	0.361
MKNK2	0.913	0.821	0.737	0.645	0.559	0.334	0.211
MRFAP1	0.913	0.826	0.740	0.648	0.561	0.347	0.220
MSRB2	0.911	0.825	0.748	0.673	0.591	0.383	0.267
MTHFS	0.915	0.835	0.770	0.707	0.629	0.457	0.348
MYO1E	0.911	0.816	0.723	0.633	0.534	0.318	0.188
NELL2	0.909	0.820	0.727	0.638	0.542	0.311	0.184
NR1D1	0.923	0.828	0.744	0.664	0.582	0.380	0.266
NR1D2	0.918	0.830	0.747	0.667	0.577	0.380	0.261
NRCAM	0.910	0.832	0.754	0.678	0.580	0.366	0.274
OTUD5	0.907	0.822	0.735	0.656	0.559	0.347	0.227
PER1	0.917	0.830	0.751	0.669	0.577	0.379	0.257
PER2	0.942	0.903	0.797	0.749	0.682	0.540	0.445
PER3	0.919	0.851	0.790	0.710	0.644	0.472	0.355

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
PFKFB2	0.916	0.852	0.761	0.683	0.602	0.418	0.309
PHC2	0.924	0.851	0.754	0.683	0.606	0.406	0.288
PPIB	0.908	0.820	0.732	0.640	0.561	0.339	0.219
REPS2	0.917	0.835	0.758	0.677	0.583	0.392	0.281
SAP30	0.921	0.832	0.760	0.681	0.598	0.405	0.299
SEC14L1	0.906	0.813	0.721	0.628	0.532	0.303	0.175
SIPA1L2	0.965	0.891	0.830	0.789	0.699	0.574	0.523
SMAP2	0.911	0.828	0.743	0.654	0.567	0.366	0.246
SPATA6	0.930	0.871	0.814	0.765	0.699	0.584	0.492
SYTL3	0.927	0.857	0.806	0.712	0.650	0.489	0.385
TBXAS1	0.912	0.812	0.726	0.633	0.531	0.300	0.168
TCF7	0.915	0.832	0.739	0.658	0.573	0.369	0.254
TMCC3	0.911	0.820	0.733	0.651	0.545	0.329	0.197
TPST1	0.914	0.834	0.739	0.650	0.569	0.342	0.229
TRABD2A	0.910	0.827	0.733	0.653	0.572	0.363	0.249
TRAP1	0.922	0.828	0.731	0.653	0.583	0.366	0.238
TSC22D3	0.914	0.826	0.734	0.652	0.563	0.340	0.217
UPB1	0.953	0.838	0.737	0.669	0.627	0.435	0.316
USP19	0.931	0.858	0.793	0.740	0.671	0.484	0.388
XKR8	0.908	0.819	0.726	0.634	0.541	0.315	0.188
ZBTB16	0.918	0.829	0.765	0.688	0.610	0.439	0.338

SF2-Table 3: Rarefaction analysis – Refall-normalised read counts

Comparison of Refall-normalised read-counts in downsampled fraction compared to original file (~600,000 reads). The table shows average values calculated from n = 8 samples from eight different individuals (two samples per deposition time point 8 AM, 2 PM, 8 PM and 2 AM)) for 72 candidate time of day prediction markers and 9 references genes. Markers with the highest risk of not fully having reached saturation (i.e. markers showing an average deviation of >3% in the 80% downsampled fraction compared to the original file or a deviation of >5% for at least one of the eight samples) are highlighted in orange.

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
ABCD2	1.007	1.006	1.002	1.033	1.007	1.039	1.067
ABHD5	0.996	0.993	0.990	0.983	0.977	0.928	0.873
ALOX5AP	0.996	0.992	0.983	0.979	0.966	0.927	0.850
APMAP	0.987	0.976	0.964	0.941	0.919	0.805	0.694
ARG1	1.003	0.999	1.017	1.003	1.016	0.999	1.040
AVIL	1.003	0.994	1.004	0.989	0.995	1.003	0.992
BACH2	0.999	0.997	0.996	0.986	0.985	0.967	0.904
BCL2	1.004	1.009	1.020	1.030	1.031	1.091	1.153
CAMKK1	0.976	0.956	0.946	0.921	0.848	0.697	0.556
CHST15	0.983	0.964	0.942	0.906	0.878	0.750	0.620

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
CLEC4E	1.001	1.002	1.006	1.011	1.013	1.012	0.987
CLIC3	1.001	0.980	0.972	0.962	0.944	0.884	0.802
CNTLN	1.003	1.001	1.006	1.004	1.011	0.999	0.995
CPD	0.998	0.991	0.985	0.977	0.954	0.901	0.845
CRISPLD2	0.984	0.986	0.970	0.951	0.908	0.827	0.684
DAAM2	1.014	0.977	1.024	0.974	0.993	1.052	1.006
DECR1	0.992	0.987	0.979	0.963	0.938	0.871	0.761
ECHDC3	1.003	1.002	1.024	1.025	1.047	1.071	1.023
ENHO	1.001	1.013	0.990	0.986	0.930	0.986	0.774
ERGIC1	0.986	0.968	0.954	0.924	0.898	0.782	0.651
ERMN	1.001	0.998	1.002	0.992	0.993	1.003	0.997
FAAH2	0.988	0.974	0.929	0.916	0.888	0.780	0.649
FBXL16	0.997	1.017	1.018	1.019	1.060	1.054	1.082
FKBP5	0.999	0.996	0.997	0.999	0.994	0.978	0.951
FLT3	0.989	0.981	1.023	1.014	1.024	1.021	1.106
FOSL2	0.989	0.972	0.961	0.935	0.904	0.786	0.675
FPGS	1.010	1.017	1.035	1.057	1.078	1.189	1.420
GABARAPL1	0.989	0.981	0.972	0.954	0.933	0.861	0.773
GCNT4	1.001	0.998	1.008	0.998	1.015	0.990	1.043
HAL	0.994	0.988	0.981	0.974	0.965	0.897	0.815
HDAC9	0.999	1.003	0.996	0.992	0.982	0.968	0.936
HGS	0.987	0.971	0.950	0.925	0.902	0.793	0.683
HNRNPDL	0.984	0.962	0.941	0.914	0.876	0.743	0.634
HPCAL4	0.997	1.015	1.001	0.969	0.949	0.921	0.768
ID3	1.002	0.985	0.976	0.987	0.971	0.950	0.921
IGF2R	0.991	0.977	0.968	0.944	0.918	0.805	0.703
IL13RA1	0.987	0.963	0.962	0.931	0.888	0.784	0.669
IL18R1	0.990	0.967	0.943	0.901	0.898	0.768	0.642
IL1R1	0.989	0.985	0.957	0.957	0.932	0.826	0.750
IL1R2	1.004	1.003	1.007	1.004	1.008	0.996	0.987
KIDINS220	0.997	0.987	0.975	0.969	0.949	0.888	0.787
KLF9	0.996	0.992	0.983	0.978	0.957	0.904	0.829
LEF1	1.008	1.017	1.030	1.045	1.065	1.155	1.283
MAL	0.998	0.996	0.994	0.990	0.979	0.951	0.886
MEGF9	0.998	0.995	0.991	0.985	0.979	0.921	0.842
MFGE8	0.993	0.990	0.983	0.970	0.966	0.937	0.857
MGAM	0.988	0.970	0.952	0.938	0.909	0.814	0.694
MKNK2	1.005	1.011	1.021	1.032	1.044	1.106	1.199
MRFAP1	1.004	1.009	1.016	1.026	1.038	1.080	1.135
MSRB2	1.004	1.004	1.001	0.986	0.987	0.963	0.982
MTHFS	0.994	0.986	0.968	0.944	0.919	0.827	0.737
MYO1E	1.007	1.012	1.035	1.047	1.080	1.197	1.353

	Downsampled Fraction						
Marker	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.25	0.1
NELL2	1.007	1.016	1.028	1.043	1.067	1.187	1.376
NR1D1	0.995	0.997	1.009	1.004	0.995	0.969	0.951
NR1D2	1.000	0.998	1.003	0.999	1.002	0.976	0.949
NRCAM	1.001	0.997	0.999	0.988	1.002	0.932	0.842
OTUD5	1.006	1.010	1.018	1.018	1.035	1.069	1.109
PER1	0.999	1.002	1.000	1.000	1.000	0.985	0.979
PER2	0.983	0.956	0.913	0.882	0.848	0.719	0.599
PER3	0.990	0.964	0.934	0.962	0.877	0.818	0.705
PFKFB2	1.001	0.992	0.996	0.970	0.971	0.905	0.793
PHC2	0.995	0.989	0.992	0.976	0.959	0.915	0.855
PIIB	1.006	1.013	1.021	1.033	1.044	1.093	1.158
REPS2	0.996	0.994	0.988	0.988	0.987	0.934	0.902
SAP30	0.993	0.989	0.979	0.967	0.967	0.927	0.850
SEC14L1	1.009	1.020	1.039	1.060	1.090	1.222	1.431
SIPA1L2	0.973	0.940	0.909	0.816	0.792	0.637	0.462
SMAP2	1.005	1.006	1.012	1.014	1.019	1.025	1.010
SPATA6	0.978	0.951	0.917	0.885	0.820	0.685	0.514
SYTL3	0.988	0.970	0.943	0.925	0.884	0.750	0.655
TBXAS1	1.007	1.020	1.036	1.056	1.090	1.235	1.500
TCF7	1.003	1.001	1.008	1.007	1.013	1.008	0.994
TMCC3	1.008	1.008	1.015	1.029	1.058	1.129	1.246
TPST1	1.009	1.004	1.005	1.020	1.035	1.083	1.069
TRABD2A	1.001	1.001	1.009	1.016	1.017	1.032	1.035
TRAP1	0.995	1.000	1.019	1.021	0.999	1.037	1.008
TSC22D3	1.003	1.006	1.016	1.023	1.030	1.085	1.158
UPB1	0.976	1.014	1.043	0.989	0.961	1.014	0.811
USP19	0.981	0.967	0.940	0.907	0.878	0.783	0.615
XKR8	1.008	1.019	1.037	1.043	1.070	1.163	1.299
ZBTB16	0.994	0.989	0.978	0.953	0.935	0.846	0.734

References

1. Morgan M, Pagès H, Obenchain V, Hayden N. Rsamtools: Binary alignment (BAM), FASTA, variant call (BCF), and tabix: R package version 2.18.0 2023. doi:10.18129/B9.bioc.Rsamtools.

Supplementary File 3: Library preparation QIAseq targeted RNA sequencing with UMIs

Step 1: Genomic DNA elimination

1. Thaw Reagents and briefly centrifuge to collect at the bottom of wells
2. Prepare genomic DNA elimination mix for each sample:

Component	Volume [μ l]
Buffer GE	1
Total RNA (25 ng)	≤ 4
Nuclease free water	To 5
Total	5

3. Mix gently and briefly centrifuge
4. Incubate at 42°C for 5 min, then immediately place on ice for 1 min

Step 2: Reverse Transcription

1. Prepare Reverse Transcription mix for each sample:

Component	Volume [μ l]
5x Buffer BC3	2
Control P2	0.5
RE3 Reverse Transcriptase Mix	1
RNAse free water	1.5
Total	5

2. Add 5 μ l Reverse Transcription mix to each gDNA-eliminated sample, mix gently and briefly centrifuge
3. Incubate in thermocycler:

Temperature	Time
42°C	15 min
95°C	5 min

STOPPING POINT

- ➔ Store samples on ice for short term or at -15 to -30°C for longer storage

Step 3: Molecular Barcode Assignment

1. Prepare Barcode assignment reaction mix for each sample:

Component	Volume [μ l]
QIAseq RNA 5x Buffer	4
BC Primer mix	2
HotStar Taq DNA Polymerase	0.8
DNAse-free water	3.2
cDNA	10
Total	20

2. Mix gently and briefly centrifuge
3. Place in thermal cycler with the following reaction conditions:

Temperature	Time
95°C	15 min
55°C	15 min
65°C	15 min
72°C	7 min
4°C	Hold

STOPPING POINT

- ➔ Store samples on ice for short term or at -15 to -30°C for longer storage

Step 4: Cleanup of BC Assignment reaction with 2 rounds of QIAseq beads purification

1. Bring QIAseq beads to room temperature 30 min prior to use and mix well
2. Add 30 μ l water to the 20 μ l reaction mix (final volume: 50 μ l) and mix well
3. Add 90 μ l QIAseq beads (1.8 x volume) to the reaction mix and mix well
4. Incubate at room temperature for 5 min
5. Place on a 96-well magnetic rack for min. 2 minutes until solution clears
6. Discard supernatant without disturbing the beads
7. Quickspin the to settle any residual liquid to the bottom and completely remove it
8. Elute the DNA target beads in 25 μ l sterile water and mix well
9. Incubate 1-5 mins at room temperature. There is no need to separate beads from eluate.
10. Add 32.5 μ l (1.3 x volume) of QIAseq beads to 25 μ l reaction and mix well
11. Incubate at room temperature for 5 min
12. Place on a 96-well magnetic rack for min. 2 minutes until solution clears
13. Discard supernatant without disturbing the beads
14. Quickspin the tube to settle any residual liquid to the bottom and completely remove it
15. Add 200 μ l freshly prepared ethanol (80%) to wells on the magnetic rack. Move the tubes from side to side between the two positions of the magnet to wash the beads, then carefully discard supernatant without disturbing the pellet.
16. Repeat step 16 for a second wash.

17. Quickspin the tube to settle any residual liquid to the bottom and completely remove it
18. Air-dry beads for 5-10 min
19. Elute DNA target beads into 12 µl sterile water, mix well, incubate at room temperature for 5 minutes then place tubes on magnetic rack until the solution is clear
20. Transfer 10 µl supernatant to a clean PCR stripe

STOPPING POINT

- ➔ Store samples on ice for short term or at -15 to -30°C for longer storage

Step 5: 1st stage PCR

1. Prepare 1st stage PCR mix for each sample:

Component	Volume [μ l]
QIAseq RNA 5x Buffer	5
LA Primer Mix	2.5
RS2 Primer	1.5
Purified product from previous protocol	10
Hot Star Taq DNA Polymerase	1
DNase free water	5
Total	25

2. Place in thermal cycler:

Stage	Temperature	Time
Hold	95°C	15 min
Cycle x 12	95°C	15s
	60°C	5 min
Hold	4°C	Hold

STOPPING POINT

- ➔ Store samples on ice for short term or at -15 to -30°C for longer storage

Step 6: Cleanup of 1st stage PCR with 2 rounds of QIAseq beads purification

1. Bring QIAseq beads to room temperature 30 min prior to use and mix well
2. Add 40 μ l (1.6 x volume) of QIAseq beads to 25 μ l PCR reaction and mix well
3. Incubate at room temperature for 5 min
4. Place on a 96-well magnetic rack for min. 2 minutes until solution clears
5. Discard supernatant without disturbing the beads
6. Quickspin the tube to settle any residual liquid to the bottom and completely remove it
7. Elute the target DNA in 25 μ l of water and mix well
8. Incubate 1-5mins at room temperature. There is no need to separate the beads from the eluate.
9. Add 40 μ l (1.6 x volume) of QIAseq beads to the 25 μ l reaction and mix well
10. Incubate at room temperature for 5 minutes.
11. Place on a 96-well magnetic rack for min. 2 minutes until solution clears
12. Discard supernatant without disturbing the beads
13. Add 200 μ l freshly prepared ethanol (80%) to wells on the magnetic rack. Move the tubes from side to side between the two positions of the magnet to wash the beads, then carefully discard supernatant without disturbing the pellet.
14. Repeat step 16 for a second wash.
15. Quickspin the tube to settle any residual liquid to the bottom and completely remove it

TrACES of Time: Towards estimating time-of-day of bloodstain deposition by targeted RNA sequencing –
Supplementary File 3

16. Air-dry beads for for 5-10 min
17. Elute DNA target beads into 27 µl sterile water, mix well by pipetting, incubate at room temperature for 5 minutes then place tubes on magnetic rack until the solution is clear
18. Transfer 25 µl supernatant to a clean PCR stripe

STOPPING POINT

- ➔ Store samples on ice for short term or at -15 to -30°C for longer storage

Step 7: 2nd stage Universal Index PCR

1. Prepare 2nd stage PCR mix for each sample in barcode array plate.

Component	Volume [μl]
QIAseq RNA 5x Buffer	10
FS-trP1	-
RS-ID#	-
Purified product from previous protocol	25
Hot Star Taq DNA Polymerase	2
DNase free water	13
Total	50

#ID1-ID96 (adapted from Ion Xpress 1- 96)

2. Thermal cycler program:

Stage	Temperature	Time
Hold	95°C	15 min
Cycle x 20	95°C	15s
	60°C	2 min
Hold	4°C	Hold

STOPPING POINT

- ➔ Store samples on ice for short term or at -15 to -30°C for longer storage

Step 8: Cleanup of universal PCR with 1 round of QIAseq beads purification

1. Bring QIAseq beads to room temperature 30 min prior to use and mix well
2. Add 55 μl (1.1 x volume) of QIAseq beads to 50μl PCR reaction and mix well
3. Incubate at room temperature for 5 min
4. Place on a 96-well magnetic rack for min. 2 minutes until solution clears
5. Discard supernatant without disturbing the beads
6. Quickspin the tube to settle any residual liquid to the bottom and completely remove it
7. Add 200 μl freshly prepared ethanol (80%) to wells on the magnetic rack. Move the tubes from side to side between the two positions of the magnet to wash the beads, then carefully discard supernatant without disturbing the pellet.
8. Repeat step 16 for a second wash.
9. Quickspin the tube to settle any residual liquid to the bottom and completely remove it
10. Air-dry beads for for 5-10 min
11. Elute DNA target beads into 27 μl sterile water, mix well by pipetting, and incubate at RT for 15 minutes
12. then place tubes on magnetic rack until the solution is clear
13. Transfer 25 μl supernatant to a clean PCR stripe

STOPPING POINT

➔ Store samples on ice for short term or at -15 to -30°C for longer storage.

Step 9: Library Quantification

1. Prepare a serial dilution for Ion Torrent DNA standard:

Standard	DNA Standard	Nuclease-free water
1	5 µl undiluted	45 µl
2	5 µl Std. 1	45 µl
3	5 µl Std. 2	45 µl
4	5 µl Std. 3	45 µl
5	5 µl Std. 4	45 µl

2. Prepare dilutions for each sample library:

Dilution	Library	Nuclease-free water
Starting Dilution (1:20)	2 µl undiluted	38 µl
Dilution 1 (1:2,000)	2 µl of 1:20	198 µl
Dilution 2 (1:20,000)	5 µl of 1:2,000	45 µl

3. Prepare a PCR mastermix

Component	Volume [µl]
RNAse/DNAse free water	2.75
SYBR Green Mastermix	6.25
Primermix	0.5
Total	22

4. Add 3 µl of sample per reaction well
5. Tightly seal the reaction plate
6. Centrifuge for 1 min at 1000 x g to remove any bubbles
7. Start qPCR run with the following cycling conditions

Stage	Temperature	Time
Hold	95°C	10 min
Cycle x 30	95°C	15 s
	60°C	30 s
	72°C	2 min*

*collect fluorescence data

8. Calculate library concentration using the “GeneRead Library Quant Kit” Data Analysis File (available from: <https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/nextgeneration-sequencing/qiaseq-library-quant-system> (last accessed: 2025-01-03))

Step 10: Library Dilution

1. Dilute each individual library to 50 pM in nuclease-free water

Zusammenfassung

In dem hier dargestellten Manuskript 3 wurde auf Erkenntnissen aus der Publikation 1 aufgebaut und ein Verfahren zur Schätzung der Depositionstageszeit forensisch relevanter Blutspuren entwickelt und getestet.

Zur Genexpressionsquantifizierung der vorab selektierten Markerkandidaten wurde dabei ein Verfahren der gezielten Sequenzierung gewählt, da diese Methode die simultane Genexpressionsquantifizierung einer hinreichenden Markeranzahl ermöglicht. Um eine ausreichend hohe Quantifizierungsgenauigkeit der Genexpression zu erreichen, wurde die UMI-Technologie verwendet [146]. Die Etablierung des gezielten Sequenzierverfahrens umfasste dabei die Optimierung der Sequenziertiefe und die Auswahl eines geeigneten Normalisierungsverfahrens, da beide Schritte für eine akkurate Genexpressionsquantifizierung notwendig sind, in verfügbaren Forschungsarbeiten bislang jedoch nur unzureichend behandelt worden waren.

Da so etablierte Verfahren der gezielten Sequenzierung wurde angewendet, um die Expression von 69 Markerkandidaten (und neun Referenzgenen zur Normalisierung) in einem Kollektiv aus 408 getrockneten Blutproben von 51 gesunden Probanden (20 männlich, 31 weiblich, Altersmedian: 26 Jahre, Altersspanne: 19-61 Jahre) entnommen zu acht verschiedenen Tageszeiten zu quantifizieren. Auf Basis der so erhaltenen Genexpressionsdaten wurden verschiedene statistische Modelle zur Schätzung der Tageszeit entwickelt und verglichen. Das unter Berücksichtigung mehrerer Selektionskriterien für am besten befundene Schätzmodell verwendet eine trigonometrische Transformation der kontinuierlichen, zyklischen Variable Tageszeit und anschließend zwei separate penalisierte Regressionsmodelle zur Schätzung der Sinus- und die Kosinuskomponente der Tageszeit. Mit diesem Modell konnte die Depositionstageszeit im vorliegenden Testdatensatz (unter Anwendung einer fünffachen Kreuzvalidierung) mit einer Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme von 3 Stunden und 44 Minuten und einer Genauigkeit (innerhalb von ± 4 Stunden) von 78 % geschätzt werden.

Anschließend wurde die Schätzgenauigkeit des Modells unter verschiedenen forensisch relevanten Bedingungen untersucht und verschiedene Einflussfaktoren näher charakterisiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass große interindividuelle Unterschiede bestehen und die Schätzgenauigkeit durch Normalisierung auf mehrere Proben von einem Individuum stark verbessert werden kann. Es konnten jedoch keine individuellen Eigenschaften oder Verhaltensweisen (wie Alter, Geschlecht, Chronotyp, Medikamenteneinnahmen, Nahrungsaufnahme oder physische Aktivitäten) festgestellt werden, die für sich genommen einen signifikanten Einfluss auf das Schätzergebnis ausübten. Es ist somit anzunehmen, dass die interindividuellen Unterschiede multifaktoriell bedingt sind und eine umfangreichere Charakterisierung dieser Einflussfaktoren in zukünftigen Untersuchungen erforderlich ist.

Weiterhin wurde der Einfluss der Lagerungsdauer durch Vergleich von für 48 Stunden und für 16 Tage gelagerte Proben untersucht. Dabei zeigte sich eine gute Korrelation der Schätzergebnisse für frische und gealterte Blutproben. Diese Aussage ist jedoch auf unter zwar realistischen aber eher günstigen Bedingungen (Raumtemperatur, trocken, Einfall von Tageslicht) gelagerte Proben beschränkt; zukünftige Studien sollten die Untersuchung längerer Zeiträume und ungünstigerer Umgebungsbedingungen umfassen. Auch der Einfluss der in die Analyse eingesetzten RNA-Mengen wurde untersucht. Gute Schätzergebnisse konnten mit Einsatzmengen von 25 ng RNA (einer Menge, die realistischerweise aus Blutspuren von Tatorten gewinnbar ist) erzielt werden, bei niedrigeren Einsatzmengen zeigte sich eine Abnahme der Schätzgenauigkeit.

Das vorliegende Manuskript 3 dieser Arbeit stellt erstmals ein Schätzmodell für den Depositionstageszeitpunkt von Blutspuren auf Basis gezielter RNA-Sequenzierung vor und es wird belegt, dass Tageszeitinformation in an Tatorten auffindbaren Blutspuren auf molekularer Ebene repräsentiert ist und aus diesen erhoben werden kann. Aus den erzielten Schätzgenauigkeiten ergibt sich, dass das Modell in seinem aktuellen Zustand nur sehr bedingt Informationen für die evaluative Phase einer gerichtlichen Verhandlung liefern kann; der Einsatz als investigatives Instrument während einer Ermittlung kann jedoch erheblichen Erkenntnisgewinn ermöglichen. Eine Verbesserung der Schätzgenauigkeit könnte in zukünftigen Studien durch ein verbessertes Verständnis endogener und exogener Einflussfaktoren erreicht werden.

4. Allgemeine Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Publikationen/Manuskripte vorgestellt, in denen die Möglichkeiten der RNA-basierten Tageszeitschätzung aus biologischen Tatortspuren zur Spurenkontextualisierung erforscht werden. Für die Körperflüssigkeit Blut gelang die Identifizierung geeigneter mRNA-Marker mittels Gesamttranskriptomsequenzierung (Publikation 1 [143]) und die darauf aufbauende Etablierung eines labortechnischen Verfahrens und eines statistischen Modells, die für die Depositionstageszeitschätzung forensisch relevanter Blutspuren grundsätzlich geeignet sind (Manuskript 3 [102]). Für die Körperflüssigkeit Speichel ist die Identifizierung geeigneter Marker im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen; mögliche (grundsätzliche) Ursachen dafür und Verbesserungsansätze für zukünftige Forschungsarbeiten wurden in Publikation 2 [147] dieser Arbeit evaluiert.

In dieser Diskussion sollen zunächst das Potential und die Limitationen des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens zur forensischen Tatzeitbestimmung von Blutspuren erörtert und in den Kontext sowohl forensischer als auch biologisch-medizinischer Forschung eingeordnet werden. Abschließend soll ein Ausblick erfolgen, welche Vorteile neue Sequenziertechnologien für die Anwendung in der forensischen Forschung und Fallarbeit liefern können und welche Herausforderungen mit deren Einsatz einhergehen.

4.1 Möglichkeiten und Limitationen der forensischen Tageszeitbestimmung

4.1.1 Statistische Modellierungsansätze

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenen Ansätze zur Modellierung von Tageszeit in Abhängigkeit von Genexpressionsdaten untersucht und einander gegenübergestellt (Manuskript 3 [102]). Der unter Berücksichtigung verschiedener rationaler Auswahlkriterien für am besten geeignet befundene Ansatz basiert auf einer Normalisierung der Genexpression auf stabil exprimierte Referenzgene, einer trigonometrischen Transformation der Tageszeit als zyklische, kontinuierliche Zielvariable sowie der Schätzung der Zielvariable unter Verwendung eines penalisierten Regressionsmodells.

Die vorliegende Arbeit stellt nicht den ersten Versuch der Entwicklung eines Verfahrens zur Schätzung der Tageszeit anhand von Genexpressionsmessungen dar. Eine Diskussion der bereits publizierten Ansätze in der forensisch-molekularbiologischen Forschungsliteratur aus den Jahren 2016 [130] und 2023 [141] sowie eine Gegenüberstellung der in diesen Studien erzielten Ergebnisse mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit erfolgte in Manuskript 3 [102]. Eine Zusammenfassung dieser Gegenüberstellung kann zudem der Tabelle 2 entnommen werden.

Weiterhin wird das Ziel der Zeitschätzung aus Genexpressionsdaten auch in der humanmedizinischen Forschung verfolgt. Von Interesse ist in diesem Fall zwar nicht die Schätzung der externen Tageszeit (ET), sondern die Schätzung der inneren, „circadianen“ Zeit (CT) des Individuums, welche im Vergleich zur ET verschoben sein kann und einen relevanten Parameter bei der Diagnose bestimmter Erkrankungen darstellt oder die Anwendung bestimmter therapeutischer Protokolle („Chronotherapie“) optimieren kann [148,149] (vgl. „1.5.4 Bedeutung diurnaler Rhythmen für die medizinische Forschung und Anwendung“). Aus statistischer Sicht stellt das Problem der medizinischen CT-Schätzung jedoch eine der forensischen ET-Schätzung sehr ähnliche Fragestellung dar, sodass ein Vergleich der verwendeten statistischen Algorithmen sinnvoll erscheint. Zudem beschreiben einige Studien aus der humanmedizinischen Forschung in Ermangelung der Kenntnis der CT ein Modell zur Schätzung der ET [148,150], was den direkten Vergleich vereinfacht.

Nachfolgend sollen die in der medizinischen Forschung zur CT-Schätzung am besten charakterisierten Vertreter dieser Modelle kurz beschrieben werden und eine Gegenüberstellung damit erzielbarer Schätzgenauigkeiten im Vergleich zu den in der forensisch-molekularbiologischen Literatur [151]beschriebenen Modellen erfolgen (Tabelle 2, S. 150-152).

Modell „ZeitZeiger“ [152]

Der Algorithmus ZeitZeiger betrachtet Zeit als kontinuierliche, periodische Variable durch Transformation in Polarkoordinaten. Für jeden potenziellen Prädiktor, also jedes Gen, für das Expressionsdaten vorliegen, wird ein periodischer Glättungsspline⁸ in Abhängigkeit von der periodischen Variable Zeit modelliert. Durch eine Hauptkomponentenanalyse wird der hochdimensionale Datensatz auf eine kleinere Auswahl an Prädiktoren reduziert. Das Modell erlaubt die Schätzung der Zeit für einzelne, unbekannte Proben, wofür die gemessenen Genexpressionsdaten auf die oben ermittelten Hauptkomponenten reduziert werden müssen.

In einer individualisierten Variante des Verfahrens wird ein wie oben beschriebenes Modell für die zuvor ausgewählten Marker auf Daten der Proben von einem einzelnen Individuum trainiert und anschließend anhand einer weiteren Probe von derselben Person getestet.

Modell „Partial Least Squares Regression (PLSR)“ [149]

Für den PLSR-Ansatz wird Zeit in kartesische Koordinaten transformiert und eine Regression der partiellen kleinsten Quadrate (engl.: *Partial Least Squares Regression*) dieser kartesischen Koordinaten auf die Genexpressionsmatrix durchgeführt. Die mögliche Ko-Linearität der Expression mehrerer

⁸Ein Spline stellt eine mathematische Funktion dar, die in mehrere Segmente unterteilt ist. Die einzelnen Segmente werden von niedrig-gradigen Polynomen dargestellt, die an als „Knoten“ bezeichneten Punkten ineinander übergehen [151]. Eine Glättung (engl. *Smoothing*) von Splines wird mit dem Ziel durchgeführt, lokale Schwankungen („Rauschen“) in den Daten auszugleichen und somit vor allem globale Trends in den Daten mit dem Modell abzubilden. Der Grad der Glättung wird dabei im Rahmen der Modellanpassung optimiert [153].

mRNA-Marker wird dabei durch Reduktion in einen latenten Faktorraum berücksichtigt, wobei die Zahl der latenten Faktoren und die Zahl der berücksichtigten mRNA-Marker optimiert werden muss, um eine Überanpassung des Modells zu vermeiden.

Eine Variante des PLSR besteht darin, das Modell anstatt auf normalisierten Genexpressionsdaten auf der Expressionsdifferenz von zwei mit 12-Stunden-Zeitabstand genommenen Proben zu trainieren. Diese Variante wird als „Zwei-Proben differentieller Ansatz“ bezeichnet.

Zur Etablierung des PLSR-Modells wurden Quantil-normalisierte Expressionsdaten verwendet. Diese Quantil-Normalisierung kann auf einzelne, unbekannte Proben übertragen werden. Dazu müssen jedoch Genexpressionsdaten für den gesamten ursprünglich zur Normalisierung verwendeten Datensatz (etwa 10.000 Transkripte) vorhanden sein [150].

Modell „TimeSignatR/TimeMachine“ [148,150]

Der Algorithmus TimeSignatR basiert auf der trigonometrischen Transformation der Tageszeit in eine Sinus- und eine Kosinuskomponente (wie auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben, s. Manuskript 3 [102], Abbildung 1) und der Generierung von Regressionsmodellen für beide Komponenten unter Verwendung von elastischen Netzen (penalisierte Regression)⁹. Der Algorithmus ist somit nahezu identisch mit dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten auf penalisierter Regression basierenden Schätzmodell und erbrachte auch nahezu identische Ergebnisse (Manuskript 3 [102]). In der ursprünglichen Publikation [148] wird zur plattformunabhängigen Anwendung des Schätzmodells „TimeSignatR“ eine Normalisierung über alle Proben von einem Individuum durchgeführt („Innersubjekt-Normalisierung“). Kürzlich haben die Autoren eine Variante ihres Schätzmodells, bezeichnet als „TimeMachine“ publiziert, bei der Plattformunabhängigkeit durch Normalisierung auf andere Markergene („ratio TimeMachine“, rTM) bzw. durch Z-Scoring¹⁰ („Z-Score TimeMachine“, zTM) erreicht wird [150]. Folglich unterscheiden sich TimeSignatR und TimeMachine nur in der Anwendung des Normalisierungsverfahrens, nicht aber in der eigentlichen Durchführung der Tageszeitschätzung.

⁹In der klassischen Regressionsanalyse werden Funktionen zur Beschreibung von Zusammenhängen in Datensätzen in der Regel durch Minimierung der Residuenquadratsumme (d.h. der Summe der quadrierten Abweichungen der beobachteten Datenpunkte von der Funktion) gebildet. Dabei kann es jedoch zur „Überanpassung“ (engl.: „*Overfitting*“) kommen, d.h. es werden sehr komplexe Funktionen gebildet, die den vorliegenden Datensatz genau abbilden, dabei jedoch schlechte Vorhersagewerte für im ursprünglichen Datensatz nicht enthaltene Datenpunkte liefern. Um besser generalisierbare Regressionsmodelle zu erhalten, werden durch die penalisierte Regression Strafterme für zu große Modellkoeffizienten eingeführt. Zu diesem Zweck können unterschiedliche methodische Ansätze gewählt werden: Bei der *Ridge-Regression* wird die Summe der quadrierten Koeffizienten bestraft, wodurch alle Koeffizienten reduziert werden, aber nicht auf 0 gesetzt werden können. Bei der *Lasso-Regression* erfolgt eine Bestrafung der Summe der absoluten Modellkoeffizienten, wodurch Koeffizienten weniger relevanter Prädiktoren auf 0 gesetzt werden. Bei der hier verwendeten *elastischen-Netz-Regularisierung* werden Lasso- und Ridge-Regularisierung in gewichteter Form miteinander kombiniert, wobei der Wichtungsfaktor im Rahmen der Modellanpassung optimiert wird [154,155].

¹⁰Transformation der Genexpressionsdaten, durch die beschrieben wird, um wie viele Standardabweichungen die Expression eines Gens vom Mittelwert der Expression aller Gene in einer Probe abweicht [150].

Studie	Zustand Blut	Zeit	Trainingsdatensatz	Testdatensatz	Unabhängigkeit von Trainings- und Testdatensatz	Marker	Messmethode	Normalisierung	Modell	MAE/h	MdAE/h	RMSE/h	Anteil korrekt ($\pm 4h$)
[130]	flüssig	ET	216 Proben, 12 männl. Individuen $\Delta t=3h$; Schlaflabor, kontrollierte Nahrungsaufnahme, regulärer Schlaf [156]	wie Trainingsdaten (LOOCV)	Nein, Proben von einem Individuum in Trainings- und Testdatensatz	6 mRNA 3 mRNA, 2 Hormone	qPCR qPCR, Radioimmunoassay	Referenzgen (ACTB)	Multinomial logistische Regression (3 Kategorien)	2,3* 1,91*	n.a. n.a.	4,29* 3,91*	0,71* 0,76*
[141]	getrocknet	ET	64 Proben, 8 Individuen, $\Delta t=3h$ (80%); alltägliche Bedingungen	wie Trainingsdaten (20%)	Nein, Proben von einem Individuum in Trainings- und Testdatensatz	4 mRNA	qPCR	Referenzgen (ACTB)	K-Nächster Nachbar ¹	3,92	n.a.	5,98	n.a.
[102]	getrocknet	ET	408 Proben, 51 Individuen, $\Delta t=3h$; alltägliche Bedingungen	wie Trainingsdaten (5x-CV)	Kreuzvalidierung getrennt nach Personen;	54 mRNA	gezielte Seq.	Referenzgene (9, ausgewählt)	PR	2,81	2,28	3,73	0,78
					keine nach ISN	62 mRNA		Referenzgene (9, ausgewählt) +ISN	PR	1,97	1,54	2,62	0,87
[152]	flüssig	CT	vereinte Analyse von 3 Datensätzen: 498 Proben, 60 Individuen, $\Delta t=3-4h$; Schlaflabor, unterschiedliche Licht- und Schlafbedingungen [157–159]	wie Trainingsdaten (10x-CV)	Kreuzvalidierung getrennt nach Personen; Unabhängigkeit durch vereinte Normalisierung und Batch-Korrektur beschränkt	15 mRNA	Microarray	Intra-Studien Normalisierung, Log-Transformation und Inter-Studien-Batch-Korrektur	ZeitZeiger, universell	n.a.	2,1	n.a.	n.a.
	flüssig	CT	s.o., Modell auf Daten von einer Person trainiert	wie Trainingsdaten (individuelle LOOCV)	keine (individualisiertes Modell)	15 mRNA			ZeitZeiger, individualisiert	n.a.	dicht bei 2,1	n.a.	n.a.

Studie	Zustand Blut	Zeit	Trainingsdatensatz	Testdatensatz	Unabhängigkeit von Trainings- und Testdatensatz	Marker	Messmethode	Normalisierung	Modell	MAE/h	MdAE/h	RMSE/h	Anteil korrekt ($\pm 4h$)
[149]	flüssig	CT	vereinte Analyse von 2 Datensätzen: 678 Proben, 53 Individuen, $\Delta t=3h$ (50%); Schlaflabor, vier Konditionen: Schlaf in Phase mit Melatonin, Schlaf außer Phase mit Melatonin, Totaler Schlafentzug ohne Schlafmangel, Totaler Schlafentzug mit Schlafmangel [157,158]	wie Trainingsdaten (50%)	Kreuzvalidierung getrennt nach Personen; Unabhängigkeit durch vereinte Normalisierung beschränkt	107	Microarray	Quantil-Normalisierung für Trainings- und Testdaten, Batch-Korrektur nur für Testdaten	Zeitzeiger	n.a.	~2,6**	4,73*	~0,7**
		CT				100			PLSR	n.a.	~1,7**	3,28*	~0,82**
		CT				100			PLSR - 2 Proben differentiell	n.a.	~0,8**	1,68*	0,95**
[148]	flüssig	ET	Probenzahl n.a., 24 Individuen, $\Delta t=3h$; Schlaflabor, zwei Konditionen: Totaler Schlafentzug ohne Schlafmangel, Totaler Schlafentzug mit Schlafmangel [158]	153 Proben, 11 Individuen, $\Delta t=2h$; Schlaflabor, Schlaf- und Wachrhythmus mit Ruheposition während Wachzeit	Getrennte Datensätze; Unabhängigkeit durch vereinte Normalisierung und Batch-Korrektur beschränkt	n.a.	Trainingsdaten: Microarray, Testdaten: Gesamttranskriptom-Seq.	Intra-Studien Normalisierung, Log-Transformation und Inter-Studien-Batch-Korrektur	Zeitzeiger	n.a.	3,12	n.a.	~0,6**
					Getrennte Datensätze; Unabhängigkeit durch vereinte Normalisierung beschränkt	100		Quantil-Normalisierung für Trainings- und Testdaten	PLSR	n.a.	2,23	n.a.	~0,72**
					Getrennte Datensätze; keine Unabhängigkeit für mehrere Proben von einer Person (individualisiertes Modell)	41		ISN	Time-SignatR	n.a.	1,47	n.a.	~0,9**

Studie	Zustand Blut	Zeit	Trainingsdatensatz	Testdatensatz	Unabhängigkeit von Trainings- und Testdatensatz	Marker	Messmethode	Normalisierung	Modell	MAE/h	MdAE/h	RMSE/h	Anteil korrekt (± 4h)
[150]	wie [148]	CT	wie [148]	wie [148]	Getrennte Datensätze; Unabhängigkeit durch vereinte Normalisierung beschränkt	100	wie [148]	Quantil-Normalisierung für Trainings- und Testdaten	PLSR	n.a.	2,62	n.a.	~0,8**
					Getrennte Datensätze	37		Paarweise Marker-Verhältnisse	rTM	n.a.	1,88	n.a.	~0,8**
						37		Z-Scoring	zTM	n.a.	1,88	n.a.	~0,8**
		ET			Getrennte Datensätze; Unabhängigkeit durch vereinte Normalisierung beschränkt	100		Quantil-Normalisierung für Trainings- und Testdaten	PLSR	n.a.	2,68	n.a.	~0,63**
					Getrennte Datensätze	37		Paarweise Marker-Verhältnisse	rTM	n.a.	2,65	n.a.	~0,68**
						37		Z-Scoring	zTM	n.a.	3,23	n.a.	~0,6**

Tabelle 2: Übersicht über publizierte Modelle zur Schätzung der externen Tageszeit (ET) bzw. der individuellen circadianen Zeit (CT)

MAE: mittlerer absoluter Fehler; MdAE: Medianer absoluter Fehler; RMSE: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme;

ISN: Innersubjektnormalisierung; LOOCV: *Leave-one-out-Crossvalidation* (dt.: „einen-auslassen-Kreuzvalidierung“); nx-CV: n-fache Kreuzvalidierung; n.a.: nicht angegeben;

Orange hinterlegt: Modelle, die das Vorhandensein mehrerer Proben von einer Person voraussetzen;

Blau umrandet: Modelle erstellt im Rahmen der vorliegenden Arbeit;

*: Wert in Publikation nicht angegeben, aber aus angegebenen Werten errechnet;

** : Wert in Publikation nicht angegeben, aus Abbildung abgeschätzt;

*an Stelle des RMSE erfolgte hier die Angabe des mittleren Fehlers sowie dessen Standardabweichung. Bei mittleren Fehlern von 0 sind Standardabweichung und RMSE identisch. Da die mittleren Fehler hier nahe 0 (wenn auch nicht exakt bei 0) lagen, ist von einer Vergleichbarkeit der Größenordnungen auszugehen;

¹: Modellierung der Variable Zeit unklar, Angabe fehlt in Publikation;

Die Tabelle 2 stellt einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Schätzmodelle und der damit erzielten Schätzgenauigkeiten zusammenfassend dar. Eine Limitierung der Vergleichbarkeit ergibt sich daraus, dass nicht für alle Studien dieselben Parameter zur Beurteilung der Schätzgenauigkeit angegeben wurden (bzw. aus den angegebenen Daten ableitbar waren). Weiterhin lassen Vergleiche der absoluten Schätzgenauigkeiten aufgrund der Berücksichtigung unterschiedlicher mRNA-Marker, unterschiedlicher Messmethoden sowie der Anwendung auf unterschiedliche Test- und Trainingsdatensätze (mit teilweise fraglicher Unabhängigkeit) nur bedingt Rückschlüsse auf den Einfluss einzelner Variablen zu. Dennoch ist die bemerkenswerte Beobachtung zu machen, dass die Schätzgenauigkeiten der dargestellten Modelle in einer ähnlichen Größenordnung liegen oder sogar schlechtere Schätzungen ergeben als das in der vorliegenden Arbeit (Manuskript 3 [102]) etablierte Modell. Etwas bessere Ergebnisse brachte lediglich das PLSR-Modell in einer der aufgeführten Studien [149], wobei von anderen Autoren bereits kritisch festgestellt wurde, dass für dieses Modell eine gemeinsame Quantil-Normalisierung für Trainings- und Testdatensatz erfolgte, wodurch die Unabhängigkeit beider Datensätze eingeschränkt und damit die Modellgenauigkeit überschätzt worden sein könnte [148].

Analog zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Feststellung (Publikation 1 [143] und Manuskript 3 [102]), konnten in mehreren Studien bessere Schätzgenauigkeiten erreicht werden, wenn dem Modell Genexpressionsdaten von mehr als einer Probe pro Individuum zur Verfügung gestellt wurden (in Tabelle 2 orange hinterlegt).

In der Zusammenschau ist festzustellen, dass das in der vorliegenden Arbeit etablierte Modell (Tabelle 2, blaue Umrandung) das für forensisch relevante Bedingungen am besten geeignete, robusteste und am umfangreichsten validierte Modell darstellt. Eine Verbesserung des Modellalgorithmus zum Beispiel durch Anwendung eines der hier beschriebenen, in der medizinischen Forschung verwendeten Schätzmodelle wäre denkbar. Insbesondere stellt der rTM-Ansatz, bei dem statt auf Referenzgene zu normalisieren, paarweise Expressionsverhältnisse zwischen rhythmischen Markern gebildet werden, einen vielversprechenden Ansatz dar. Ein ähnliches Vorgehen war bereits von Kirk et al. [140] vorgeschlagen worden, nachdem diese signifikant rhythmische Oszillation für die Expression des Gens *PER3* nach Normalisierung auf das Uhrgen *CLOCK*, nicht jedoch nach Normalisierung auf das stabil exprimierte Referenzgen *S100A12* beobachtet hatten. Dieser Ansatz war für die vorliegende Arbeit aufgrund der Schwierigkeit der Identifikation geeigneter Markerpaare sowie der potenziell erhöhten Anfälligkeit gegenüber externen Einflussfaktoren (sobald nur ein Marker in einem Markerpaar betroffen ist) verworfen worden. Die kürzlich von Huang et al. vorgeschlagene Bildung erschöpfender Markerpaare aus allen Kandidaten [150] könnte dem jedoch entgegen wirken.

Insgesamt legen die Vergleiche in Tabelle 2 dennoch nahe, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete Algorithmus (blaue Umrandung) im Vergleich zu anderen Ansätzen sehr ähnlich gute oder sogar bessere Ergebnisse liefert, sodass ein vergleichsweise höheres Verbesserungspotential in der Wahl der untersuchten Marker (s. „4.1.2 Ausgewählte mRNA-Marker“) und vor allem der Optimierung bzw. Erweiterung des Trainingsdatensatzes gesehen wird (s. „4.1.3 Untersuchter Trainings- und Testdatensatz“).

4.1.2 Ausgewählte mRNA-Marker

In zuvor publizierten Arbeiten zur forensischen Tageszeitbestimmung sind ausschließlich aus der humanmedizinischen/biologischen Forschungsliteratur beschriebene Marker untersucht worden. Aus dieser Tatsache wurde zu Beginn dieser Arbeit die Annahme abgeleitet, dass die für eine forensische Anwendung potenziell bestgeeigneten Marker noch nicht gefunden worden sein könnten (vgl. „1.6 Bedeutung diurnaler Rhythmen für die forensische Forschung und Anwendung“). Zur Identifizierung geeigneter Markerkandidaten wurde eine Gesamttranskriptomsequenzierung durchgeführt; ein Verfahren, das sich in den letzten Jahren zum Goldstandard für die unvoreingenommene Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte entwickelt hat [160]. Die Auswahl geeigneter statistischer Ansätze stellt jedoch, wie in Publikation 1 [143] dieser Arbeit dargelegt, insbesondere für komplexere Zielvariablen wie die kontinuierliche, zyklische Variable „Tageszeit“, eine große Herausforderung dar. Gleichzeitig beeinflusst die Wahl des statistischen Ansatzes und der entsprechenden Analyseparameter in hohem Maße, welche Marker als signifikant differentiell exprimiert eingestuft werden. So wurde es beispielsweise auch bei der Auswahl von Markern zur Schätzung der circadianen Zeit im biomedizinischen Kontext [149] oder der Selektion von mRNA-Markern zur Schätzung des Lebensalters in einer forensisch motivierten Studie [33] beobachtet. Verschiedenen Empfehlungen zur differentiellen Genexpressionsanalyse [160,161] folgend wurden somit mehrere unterschiedliche Algorithmen kombiniert, um eine Liste der meistversprechenden Kandidatenmarker zu ermitteln (Publikation 1 [143] dieser Arbeit). Die Tatsache, dass für die Mehrheit dieser Marker in unabhängigen Datensätzen und unter Verwendung unabhängiger Messmethoden (qPCR bzw. gezielte Sequenzierung in der Publikation 1 [143] bzw. dem Manuskript 3 [102] dieser Arbeit) Genexpressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Tageszeit festgestellt werden konnten, unterstützt die Validität dieser Herangehensweise. Von den mittels Gesamttranskriptomsequenzierung identifizierten Markern stimmt nur einer (*PER1*) mit den von Lech et al. [130] verwendeten Markern überein. Mehrere als „klassische“ Uhrengene bezeichnete Marker [149] zeigten im Gesamttranskriptomdatensatz zwar signifikante Expressionsunterschiede, wurden jedoch aufgrund der geringen Ausprägung dieser Unterschiede ($|\log_2(\text{FoldChange})| < 0,5$) nicht zu den vielversprechenden Kandidaten gezählt (Publikation 1 [143] dieser Arbeit). Aufgrund der Vielzahl an Studien, die diese

Marker als signifikant diurnal bzw. circadian oszillierend beschrieben haben, wurden zwei weitere der von Lech et al. [130] verwendeten Marker in den Ansatz zur gezielten Sequenzierung (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit) zusätzlich mit aufgenommen. Davon zeigte einer eine hohe Relevanz im finalen Schätzmodell (*PER3*), während der zweite (*MKNK2*) ausgeschlossen wurde (Modellkoeffizienten von 0). Insgesamt ist es aufgrund der vielen Unterschiede zwischen dem in der vorliegenden Arbeit etablierten Tageszeitschätzmodell und dem von Lech et al. [130] publizierten Modell nicht möglich, quantitativ zu erfassen, in welchem Maße die Wahl der berücksichtigten Marker zu einer Verbesserung der Schätzgenauigkeit beiträgt. Zu diesem Zweck müssten Schätzmodelle basierend auf demselben statistischen Ansatz unter Berücksichtigung der jeweiligen Markerlisten anhand von identischen Trainings- und Testdatensätzen verglichen werden. Dennoch ist es aus biologischer Sicht plausibel, dass die in der vorliegenden Arbeit getroffene Kandidatenauswahl die forensisch relevanten Bedingungen besser abbildet, als die zuvor auf Basis biomedizinischer/humanbiologischer Studien identifizierten Markerkandidaten. Gleichzeitig ist aufgrund der Berücksichtigung einer höheren Markeranzahl (ermöglicht durch den Einsatz von Technologie zur gezielten Sequenzierung [102]) von einer erhöhten Robustheit gegenüber Störfaktoren auszugehen [162].

Eine Betrachtung der jeweils zehn relevantesten Marker der Sinus- und der Kosinus-Komponente des finalen Modells (Manuskript 3 [102]) zeigt, dass alle Marker mit Ausnahme von *ENHO* bereits in einer oder mehreren vorherigen Publikationen mit diurnal oder circadian rhythmisch oszillierender Expression beschrieben worden sind (vgl. Suppl. Table 8 in Publikation 1 dieser Arbeit [143]).

Die Marker *PER2* und *PER3* sind gut charakterisierte Uhrengene [163] (vgl. „1.5.3 Die molekulare Grundlage circadianer Rhythmik“). Mehrere Marker des finalen Modells spielen zudem wichtige Rollen in biologischen Signalwegen oder Funktionen, die von der inneren Uhr reguliert werden:

- *TPST1* (*tyrosylprotein sulfotransferase 1*) [164], *MYO1E* (*class I myosin*) [165] und *ARG1* (*arginase 1*) [166] sind an der Funktionalität von Zellen des Immunsystems beteiligt. Es ist bekannt, dass sowohl angeborene als auch adaptive Immunfunktionen diurnalen Schwankungen unterliegen [167], sodass diurnale Expressionsschwankungen an dieser Funktion beteiligter Gene aus biologischer Sicht als plausibel zu erachten sind.
- *FAAH2* (*fatty acid amide hydrolase 2*) [168] und *ENHO* (*energy homeostatis associated gene*, kodiert für das Peptid Adropin) [169] sind Komponenten metabolischer Signalwege. Die komplexe Interaktion zwischen dem Stoffwechsel und der inneren Uhr ist gut beschrieben [122]. Zudem legen experimentelle Untersuchungen an Mäusen nahe, dass die Expression von *ENHO* in der Leber direkt von Uhrengenen kontrolliert wird [169].

Weitere Marker des finalen Modells sind an Signalwegen beteiligt, die indirekt mit der inneren Uhr in Verbindung stehen könnten. In Ermangelung direkter experimenteller Evidenz (soweit hier zum Zeitpunkt der Niederschrift bekannt) kann über diese Zusammenhänge jedoch nur spekuliert werden, sodass nähere Ausführungen an dieser Stelle nicht zielführend sind. Festzustellen ist jedenfalls, dass die biologische Funktion der Marker in einem forensisch anwendbaren Vorhersagemodell zwar von allgemeinem Interesse, für den Einsatz in der forensischen Fallarbeit jedoch nicht als Voraussetzung anzusehen ist (vgl. „1.3 Forensisch relevante RNA-Typen“).

4.1.3 Untersuchter Trainings- und Testdatensatz

In der vorliegenden Arbeit wird die grundsätzliche Eignung von Transkriptomanalysen zur Schätzung des Spurendepositionstageszeitpunkts aufgezeigt und ein dafür geeignetes Messverfahren in Kombination mit einem geeigneten Schätzmodell entwickelt. Um für eine Anwendung in der forensischen Fallarbeit in Frage zu kommen, sind jedoch weitere Validierungsarbeiten anhand umfangreicherer Trainings- und Testdatensätze notwendig. Nachfolgend soll aufgezeigt werden, welche Faktoren zu diesem Zweck in zukünftigen Studien untersucht werden sollten.

4.1.3.1 Individuelle Eigenschaften

Die Studienteilnehmer in dieser Arbeit sind mit dem Ziel ausgewählt worden, den „Durchschnitt“ einer Population gesunder Individuen abzubilden (Publikation 1 [143] und Manuskript 3 [102] dieser Arbeit). Sowohl im Schritt der Markeridentifizierung (Publikation 1 [143] dieser Arbeit) als auch im Schritt der Modelletablierung und -validierung (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit) zeigte sich, dass die Tageszeit für Proben verschiedener Personen unterschiedlich gut geschätzt werden kann und dass generell eine Verbesserung der Schätzgenauigkeit erreicht wird, wenn die gemessene Expression auf den Mittelwert der Expression des jeweiligen Individuums normalisiert wird (s. auch Tabelle 2). Die Kenntnis individueller Eigenschaften, die die Schätzgenauigkeit beeinflussen, kann somit zu einer Erstellung verbesserter Modelle in der Zukunft beitragen.

Die innere Uhr des Menschen ist ein hochkomplexes biologisches Phänomen, welches auf zellulärer Ebene über die Modulation von Genexpression gesteuert wird (vgl. „1.5 Chronobiologische Grundlagen“). Sowohl die zentralen Uhrengene als auch die Uhrengen-kontrollierten Prozesse können von endogenen und auch exogenen individuellen Faktoren beeinflusst werden [114,120].

Ein ähnliches komplexes biologischen Phänomen, welches umfangreich für die Anwendung in der forensischen Fallarbeit untersucht worden ist, stellt das menschliche Altern dar. Die ersten Studien mit dem Ziel, eine Methode zur Schätzung des Lebensalters eines Spurenverursacher zu entwickeln, konzentrierten sich auf die Identifizierung geeigneter Marker (in der Regel differentiell methylierte DNA-Marker) und die Entwicklung geeigneter Schätzmodelle anhand von „durchschnittlichen“

gesunden Probandenkollektiven [170–174]. Diese Verfahren werden nach gesetzlicher Zulassung im Jahr 2019 in Deutschland in der forensischen Ermittlungsarbeit eingesetzt. In darauf aufbauenden Studien wird seither versucht, ein besseres Verständnis für den Einfluss individueller Eigenschaften wie Geschlecht und biogeographische Herkunft oder exogener Faktoren wie verschiedenen Lebensstilaspekten zu erlangen und zu untersuchen, wie die Kenntnis dieser Faktoren die Schätzgenauigkeit der Modelle verbessern kann [162,172].

Ähnlich wie den ebenfalls sehr komplexen biologischen Prozessen, die mit dem menschlichen Altern einhergehen, kann also die Erfassung der Gesamtheit aller endogenen und exogenen Faktoren, die potenziell Einfluss auf die Depositionstageszeitschätzung biologischer Spuren haben, nicht im Rahmen einer einzelnen Arbeit gelingen. Weitere Studien zur Erforschung dieser Einflussfaktoren sind somit notwendig. Nachfolgend soll eine kurze (nicht erschöpfende) Diskussion von Faktoren erfolgen (nachfolgend jeweils durch Fettdruck hervorgehoben), die in der Vergangenheit als mit der inneren Uhr eines Menschen in Verbindung stehend beschrieben worden sind und deren Untersuchung in zukünftigen Studien mit forensischem Fokus somit von Bedeutung sein kann:

- Es konnte beobachtet werden, dass sich Menschen in ihrer individuellen Neigung zu Schlaf, Wachphasen und Leistungshöhepunkten zu bestimmten Tageszeiten voneinander unterscheiden. Diese Neigung wird als individueller „**Chronotyp**“ bezeichnet [175]. Mehrere Studien konnten zeigen, dass der individuelle Chronotyp mit physiologischen Rhythmen wie etwa dem Schlaf-Wach-Rhythmus, der Schwankung der Körpertemperatur oder der Sekretion von Melatonin und Kortisol korreliert [175]. Varianten in Uhrengenomen oder uhrenassoziierten Genen (z.B. *PER2*, *RGS16*) sind mit der Eigenschaft „Chronotyp“ in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) assoziiert worden [176]. Das Konzept „Chronotyp“ wird jedoch auch kritisch betrachtet, da der Chronotyp in verschiedenen Studien unterschiedlich definiert und erfasst wird, wobei häufig nicht eindeutig unterschieden wird, in welchem Maße der Chronotyp eine individuelle Eigenschaft oder eher ein Ergebnis externer Einflussfaktoren darstellt [175].

In der vorliegenden Arbeit wurde die deutsche Übersetzung des Horne-Östberg-Morningness-Eveningness-Fragebogens (D-MEQ) [177] zur Erfassung des individuellen Chronotyps verwendet. Dieser Fragebogen wird häufig in wissenschaftlichen Studien eingesetzt und während er lediglich diurnale Präferenzen der Person erfasst, (welche von dem Lebensstil der Person, wie zum Beispiel den Arbeitszeiten, alltäglich maskiert sein können,) erlaubt der Fragebogen dennoch die Identifizierung von denjenigen Probanden im vorliegenden Probandenkollektiv mit den am stärksten vom Mittel abweichenden individuellen Neigungen, für welche somit die höchste Wahrscheinlichkeit einer extremen Verschiebung biologischer Rhythmen unter allen Studienteilnehmern angenommen werden kann. Dennoch konnten für

diese Studienteilnehmer im Vergleich zu Probanden mit weniger extremen Chronotypen keine auffällig erhöhten Schätzfehler festgestellt werden. Es ist jedoch denkbar, dass ein Einfluss des Chronotyps zu beobachten wäre, wenn andere Methoden zur Erfassung dieser individuellen Eigenschaft verwendet werden würden (z.B. der *Munich Chronotype Questionnaire* [178], der den Chronotypen anhand individueller Schlaf-Wach-Rhythmen an freien und an Arbeitstagen abschätzt und somit ein besseres Maß für den aktuellen Zustand des Individuums darstellt [175]).

- Mehrere Studien (zusammengefasst in [179]) weisen auf Unterschiede der circadianen/diurnalen Rhythmik zwischen **Geschlechtern** hin, wobei Unterschiede zwischen Chronotypen, der Anpassung an circadiane Fehlausrichtungen und Unterschiede in der rhythmisch oszillierenden Expression von Transkripten zwischen männlichen und weiblichen Säugetieren beschrieben werden. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigten sich in unserer Studie (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit) keine Unterschiede in der Schätzgenauigkeit zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmern. Auch konnte eine Berücksichtigung des Geschlechts im Modell die Schätzgenauigkeit nicht relevant verbessern. Es ist jedoch denkbar, dass Kandidatenmarker mit bedeutenden Expressionsunterschieden zwischen Männern und Frauen bereits im Prozess der Markeridentifizierung (Publikation 1 [143] dieser Arbeit) ausgeschlossen worden sind, da die Auswahl der Marker anhand eines Probandenkollektivs mit gleichen Anteilen männlicher und weiblicher Probanden erfolgte. Somit kann das in dieser Arbeit vorgestellte Modell als verhältnismäßig robust gegenüber Unterschieden zwischen Geschlechtern angenommen werden. Der Einfluss des biologischen Geschlechts auf diurnale Rhythmik der Genexpression sollte jedoch in zukünftigen Studien nicht vernachlässigt werden.
- Studien an Menschen und auch an Tieren (zusammengefasst in [180,181]) zeigen dynamische Veränderungen biologischer Rhythmen mit dem **Lebensalter**. Die Entwicklung der inneren Uhr eines Säugetiers beginnt bereits im Uterus, wird jedoch im Laufe der ersten Lebensjahre fortgesetzt [181]. Bei Erwachsenen wird mit zunehmendem Lebensalter eine Verschiebung hin zu früheren Chronotypen, eine reduzierten Anpassungsfähigkeit an Phasenverschiebungen sowie eine progressive Abschwächung verschiedener biologischer Rhythmen beschrieben [180,182]. Mehrere altersassoziierte Krankheiten wie chronische Entzündungen, Stoffwechselstörungen, neurodegenerative Erkrankungen und Krebs stehen mit der inneren Uhr in Verbindung. Eine gezielte Untersuchung dieses Zusammenhangs ist aufgrund einer Vielzahl möglicher Störfaktoren sehr schwierig. Studien legen jedoch nahe, dass der Zusammenhang bidirektional ist; dass also Störungen der diurnalen Rhythmik das Risiko von altersassoziierten Erkrankungen erhöhen, diese Erkrankungen jedoch auch Disruptionen der

diurnalen Rhythmik auslösen können [126,183]. In dem in Manuskript 3 [102] dieser Arbeit untersuchten Probandenkollektiv konnte kein direkter Einfluss des Alters der Studienteilnehmer auf die Schätzgenauigkeit beobachtet werden. Es ist jedoch festzuhalten, dass die meisten altersassoziierten Effekte bei Personen > 60 Jahren [180] oder Neugeborenen/Kleinkindern [181] beschrieben worden sind, wohingegen die hier untersuchten Probanden zwischen 19 und 61 Jahren alt waren. Es ist somit denkbar, dass ein Einfluss des Alters auf die Schätzgenauigkeit in zukünftigen Studien beobachtet werden kann, wenn die Altersspanne der Studienteilnehmer erweitert wird.

- Chronobiologische Rhythmen (sowie deren Störungen) konnten mit zahlreichen pathologischen Veränderungen und **Krankheiten** in Verbindung gebracht werden (s. „1.5.4 Bedeutung diurnaler Rhythmen für die medizinische Forschung und Anwendung“). Krankheiten können die rhythmische Expression von Uhrengenen und auch von uhrengenkontrollierten Genen verändern. Unter den relevanten Markern in dem hier vorgestellten, finalen Schätzmodell (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit) fanden sich unter anderem Uhrengene und in immunregulatorische Funktionen involvierte Gene (s. „4.1.2 Ausgewählte mRNA-Marker“). Es erscheint daher plausibel, dass individuelle Erkrankungen, die diese Signalwege beeinflussen, oder die Aufnahme von Medikamenten, die mit diesen Signalwegen interagieren, die Expression relevanter Marker verändern. Während Personen mit chronischen oder akuten Erkrankungen, die in direktem Zusammenhang mit der inneren Uhr stehen, von der Studienteilnahme ausgeschlossen worden waren, können einzelne Teilnehmer dennoch von Zuständen betroffen gewesen sein, die die Expression einzelner Marker beeinflussen (z.B. eine virale oder bakterielle Infektion, die eine Immunantwort auslöst). Die Beobachtung tendenziell erhöhter Schätzfehler bei Studienteilnehmern, die bestimmte Medikamente eingenommen haben, kann als Hinweis auf die Bedeutung des individuellen Gesundheitsstatus für die Schätzgenauigkeit gesehen werden. Der Einfluss (insbesondere häufig auftretender) Erkrankungen wie bakterieller Infektionen muss jedoch in größerem und systematischerem Umfang charakterisiert werden.
- Während **Licht** als wichtigster externer Zeitgeber für die den circadianen „Schrittmacher“ im suprachiasmatischen Nukleus (vgl. „1.5.2 Die zentrale Steuerung der circadianen Rhythmik“) beschrieben wird, können zusätzliche externe Faktoren wie **Schlaf, Nahrung und körperliche Aktivität** periphere Uhren beeinflussen und sogar zurücksetzen [184]. Länger andauernde Abweichungen der Nahrungsaufnahme-/Fasten-Zyklen, Schlaf-/Wach- oder Ruhe-/Aktivitäts-Mustern von den externen Licht-/Dunkel-Rhythmen (wie zum Beispiel bei Schichtarbeitern oder Personen mit länger andauernder Bettruhe) können zu erheblichen Veränderungen der circadianen Rhythmik führen [184]. In einer experimentellen Untersuchung der erzwungenen

Desynchronität (Verschiebung der Schlafphase um 12 Stunden gegenüber der regulären biologischen Nacht, wie etwa zu beobachten bei Schichtdienst oder Jet-Lag) konnte beobachtet werden, dass der Anteil von Transkripten mit rhythmischer Expression in menschlichem Blut reduziert ist (von 6,4 % aller Transkripte auf 1,0 %) [157]. Noch ausgeprägtere Veränderungen wurden in einer experimentellen Untersuchung des Einflusses verlängerter Bettruhe (90 Tage) beobachtet, bei der über 91 % der Transkripte durch das Studienprotokoll veränderte Expression zeigten [185]. Neben diesen Langzeiteffekten zeigten auch alltägliche Veränderungen wie etwa das Auslassen des Frühstücks an einem einzelnen Tag einen signifikanten Einfluss auf die Expression einzelner Uhrgene (*BMAL1*, *CRY1*, *REV-ERB α* , *ROR α* und *SIRT1*) in weißen Blutkörperchen, wohingegen die Expression anderer Uhrgene (*PER1*, *PER2*) von diesem Umstand nicht signifikant beeinflusst wurde [186]. In ähnlicher Weise konnte beobachtet werden, dass Schlafentzug (Wachzustand über 24 Stunden) die rhythmische Expression einzelner Uhrgene (*BMAL1* und *HSPA1B*) in menschlichem Vollblut beeinflusst, während andere untersuchte Marker (z.B. *PER1*, *PER3* und *REV-ERB α*) keine Veränderungen zeigten [156]. Nach hiesigem Kenntnisstand zum Zeitpunkt der Niederschrift liegen bislang keine experimentellen Untersuchungen des Einflusses kurzer zwischenzeitlicher Schlafphasen auf die Expression rhythmischer Gene in menschlichem Blut vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren Personen, die unter Bedingungen der wiederholten oder langanhaltenden Desynchronität leben (wie etwa verursacht von Schichtarbeit oder Jet-Lag) von der Studienteilnahme ausgeschlossen worden. Die Möglichkeit der Depositionstageszeitschätzung unter diesen Umständen sollte somit in zukünftigen Studien untersucht werden. In der vorliegenden Studie (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit) wurden die Studienteilnehmer zudem angewiesen, für den gesamten Zeitraum der Probensammlung wach zu bleiben. Die Studienteilnehmer erlebten also eine verlängerte Wachphase (über einen Zeitraum von 21 Stunden) und waren in der Phase ihrer regulären biologischen Nacht externen Einflüssen wie Licht ausgesetzt, nahmen Nahrung auf oder führten physische Aktivitäten aus. Dieses Studienprotokoll wurde in Hinblick auf die forensische Anwendung gewählt, wobei die Annahme getroffen wurde, dass Personen, die in der Nachtzeit eine kriminelle Handlung (wie zum Beispiel einen Einbruch) verüben, in den Stunden vor dieser Handlung mit höherer Wahrscheinlichkeit wach bleiben, als schlafen zu gehen. Während die drastischen Veränderungen der circadianen Rhythmik, die für Langzeit-Desynchronität beschrieben worden sind (s.o.), unter diesen Umständen nicht zu erwarten sind, können kleinere Veränderungen der Phase oder der Amplitude einzelner Marker durchaus auch von dieser kurzfristigen Disruption hervorgerufen werden. In einer zukünftigen Studie wäre somit der direkte Vergleich von Schätzgenauigkeiten für in der Nacht deponierte Proben nach

vorherigem Schlaf und nach vorherigem Wach-Zustand erstrebenswert. Zudem, und insbesondere hinsichtlich dessen, dass mehrere Marker im finalen Schätzmodell Teil metabolischer Signalwege sind (s. „4.1.2 Ausgewählte mRNA-Marker“), wäre eine Untersuchung des Einflusses bestimmter Ernährungsgewohnheiten (wie beispielsweise dem Intervallfasten) von Interesse. Aufgrund der großen Variabilität von Ernährungsformen und Nahrungsaufnahmezeiten in der vorliegenden Studie wie sie in einem nicht-kontrollierten Umfeld zu erwarten ist (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit), war eine Untersuchung des Einflusses individueller Nahrungsaufnahmen nicht durchführbar. Da jedoch ein relevanter Anteil der Studienteilnehmer Koffein konsumierte und wissenschaftliche Erkenntnisse zum Einfluss von Koffein auf die inneren Rhythmen vorliegen [187], wurde der Einfluss speziell der Aufnahme von Koffein näher betrachtet: Dabei zeigten sich keine auffälligen Unterschiede der Schätzfehler zwischen Proben mit und ohne Koffeinaufnahme in den letzten drei Stunden vor Spurendeposition. In einer vorherigen Studie war gezeigt worden, dass Koffein eine Phasenverschiebung der Melatoninsekretion beim Menschen auslöst und die Perioden von Uhrengenen in kultivierten Zellen unter Koffeineinfluss verlängert sind. Der Einfluss von Koffein auf die Expression diurnal rhythmischer Gene in menschlichem Blut ist jedoch dem nach hiesigem Kenntnisstand zum Zeitpunkt der Niederschrift bislang nicht untersucht worden. Dennoch legen die vorherigen Beobachtungen [187] nahe, dass Koffeinkonsum (und dessen Regelmäßigkeit) eher Langzeit- als Kurzeitwirkungen haben könnte. Eine Untersuchung des Einflusses von Koffeinkonsumgewohnheiten in zukünftigen Studien wäre somit von Interesse.

- Einige der beschriebenen endogenen Eigenschaften und Umwelteinflüsse unterscheiden sich zwischen Personen unterschiedlicher **Ethnie** oder Personen, die in unterschiedlichen **geographischen Regionen** leben (z.B. Tageslicht, durchschnittliche Aufstehzeit, physische Aktivität oder Ernährungsgewohnheiten) [188]. Alle Studienteilnehmer (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit) lebten zum Zeitpunkt der Studienteilnahme in Deutschland, innerhalb eines Umkreises von 180 km von Köln. In zukünftigen Studien bleibt also zu ermitteln, ob das in dieser Studie präsentierte Modell für Personen aus anderen geographischen Regionen oder mit anderen ethnischen Ursprüngen angepasst werden muss (wie es ähnlich bereits im Zusammenhang mit der Lebensaltersschätzung festgestellt werden konnte [189]).

In der Zusammenschau kann also festgestellt werden, dass die innere Uhr des Menschen ein hochkomplexes biologisches Phänomen ist, welches von einer Vielzahl endogener und exogener, zum Teil auch miteinander wechselwirkender Eigenschaften und Faktoren beeinflusst wird. Die Autoren Koop et al. [162] stellten für das ähnlich komplexe Phänomen des menschlichen Alterns im Zusammenhang mit forensischen Schätzmodellen fest, dass zwei Herangehensweisen zielführend sein

können, um diesen Faktoren in zukünftigen Studien Rechnung zu tragen. Ähnliche Strategien können somit auch zur Verbesserung der forensischen Depositionstageszeitschätzung beitragen:

- (1) Die Identifizierung relevanter Störvariablen, also die Ermittlung von Faktoren, die relevante und systematische Schätzfehler verursachen, die unter forensischen Bedingungen eine Rolle spielen können
- (2) Die Entwicklung „robuster“ Schätzmodelle, die diese Störvariablen berücksichtigen, indem sie sie entweder kompensieren (was möglicherweise durch die Berücksichtigung einer ausreichend großen Anzahl von Markern erreicht werden kann) oder indem ihr Einfluss durch die Entwicklung spezialisierter (zum Beispiel populationspezifischer Modelle) eliminiert wird

4.1.3.2 Stabilität von RNA

Im Gegensatz zu häufig in humanbiologischen/medizinischen Studien untersuchten Blutproben, welche in der Regel in flüssiger Form vorliegen und mit Stabilisatoren wie zum Beispiel EDTA (engl.: *ethylene diamine tetraacetic acid*, dt.: Ethylendiamintetraessigsäure) versetzt sind, liegen forensisch relevante Blutspuren zumeist in getrockneter Form vor und können für nicht unerhebliche Zeiträume die Integrität der darin enthaltenen Nukleinsäuren schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt sein. McDade et al. [190] konnten mittels Microarray-Untersuchungen feststellen, dass das Transkriptom flüssiger Blutproben gut mit dem Transkriptom getrockneter Blutproben korreliert. Für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung war zudem die Erkenntnis, dass das Expressionsmuster diurnal rhythmischer Transkripte in getrockneten Blutspuren das Expressionsmuster zum Depositionszeitpunkt widerspiegelt und sich die Oszillation in trocknenden Blutspuren nicht in relevantem Maße fortzusetzen scheint (Publikation 1 dieser Arbeit [143], Part II). Es liegen jedoch auch Erkenntnisse darüber vor, dass die relativen Mengen einzelner Transkripte mit der Lagerdauer abnehmen [34]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass für einzelne Transkripte nach Trocknung der Blutspuren keine tageszeitabhängigen Oszillationen mehr zu beobachten sind (Publikation 1 [143], Part II). Um auf getrocknete Blutspuren anwendbar zu sein, wurde das Depositionstageszeitschätzmodell in dieser Arbeit daher mit Genexpressionsmessdaten aus getrockneten Blutspuren trainiert (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit). Zur Abschätzung des Einflusses der Lagerdauer wurden von jedem Probanden zu jedem Tageszeitpunkt zwei Blutproben gewonnen, wovon je eine für 48 Stunden und die zweite für eine Zeitdauer von 16 Tagen gelagert wurde. Die Messergebnisse und Tageszeitschätzungen der gealterten Blutspuren zeigten dabei eine starke Korrelation mit den frischen, getrockneten Blutspuren nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit). Dies steht im Einklang mit vorherigen Studien, in denen beobachtet werden konnte, dass sich das Transkriptom in Proben getrockneten Blutes nur geringfügig mit der Zeit verändert [34,35]. Dennoch ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Arbeit nur eine

begrenzte Lagerdauer von 16 Tagen sowie zwar realistische, aber dennoch günstige Lagerungsbedingungen (Raumtemperatur, trocken, Tageslicht aber keine direkte Sonnenlichtexposition) experimentell untersucht worden sind. In vorherigen Studien konnte jedoch beobachtet werden, dass feuchte Lagerungsbedingungen, die sowohl die enzymatisch vermittelte als auch die unkatalysierte Hydrolyse von Nukleinsäuren begünstigen und zudem das Wachstum von Bakterien oder Pilzen ermöglichen, die ebenfalls die Integrität von Nukleinsäuren drastisch beeinflussen [34,191], und somit die zuverlässige Quantifizierung der Expression diurnal rhythmischer RNA-Marker beeinträchtigen können. Folglich sollte der Einfluss der Nukleinsäureintegrität auf die Schätzgenauigkeit zukünftig noch umfangreicher charakterisiert werden.

4.1.3.3 Mischungen

Die Schritte der Markeridentifizierung, -validierung und Modellentwicklung in der vorliegenden Arbeit (Publikation 1 [143] und Manuskript 3 [102]) wurden ausschließlich für Proben aus Vollblut von einzelnen Personen durchgeführt. In der forensischen Fallarbeit treten regelmäßig Mischspuren aus mehreren biologischen Körperflüssigkeiten/Geweben auf. Das Vorliegen einer Mischung zellhaltigen Materials verschiedener Personen kann anhand des DNA-Profiles (STR-Typisierung) festgestellt werden. Da das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren keine Zuordnung der quantifizierten Transkripte zu einem Spurenverursacher in einer Mischspur ermöglicht, ist eine Durchführung der Tageszeitschätzung bei Mischspuren mit dem in der vorliegenden Arbeit etablierten Verfahren nicht möglich.

Bei der Identifikation von Körperflüssigkeiten kann die Zuordnung einer Körperflüssigkeit zu Spurenverursachern in einer Mischspur über die Sequenzierung von SNPs in den exprimierten Transkripten und der genomischen DNA der an der Mischspur beteiligten Personen erfolgen [101]. Eine ähnliche Zuordnung von Transkripten zu Spurenverursachern in Mischungen könnte theoretisch auch für den Anwendungsfall der Depositionstageszeitschätzung etabliert werden. Da zur Schätzung der Depositionstageszeit jedoch die Expression aller Marker im Modell quantifiziert werden muss, wäre eine zuverlässige Tageszeitschätzung bei Mischspuren nur dann möglich, wenn sich die an der Mischung beteiligten Spurenverursacher in jedem Transkript an mindestens einer SNP-Position voneinander unterscheiden. Aus Studien zur Körperflüssigkeitsidentifikation und Spurenverursacherzuordnung [192,193] wird ersichtlich, dass nicht immer für alle Markertranskripte geeignete SNPs identifiziert oder geeignete Primer zur Amplifikation der entsprechenden Bereiche konstruiert werden können. Zudem ist bei Vorliegen von nur ein oder zwei (in der Regel bi-allelischen) SNPs die Wahrscheinlichkeit hoch, dass Verursacher in einer Mischspur für eines oder mehrere Transkripte bei allen SNPs zufällig denselben Genotypen aufweisen. Ein Verfahren zur Zuordnung von Transkripten in Mischspuren für die forensische Tageszeitschätzung wäre somit, wenn überhaupt, nur

unter hohem Aufwand und bestimmten Voraussetzungen (z.B. Entwicklung eines statistischen Modells, welches nur Marker verwendet, für die entsprechende SNPs identifiziert werden konnten) etablierbar.

Eine weitere Schwierigkeit stellt das Vorliegen von Mischungen aus verschiedenen Körperflüssigkeiten dar. Da sich die Transkripte mit rhythmischer Expression zwischen verschiedenen Zelltypen und biologischen Körperflüssigkeiten/Geweben unterscheiden, ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Marker in anderen Körperflüssigkeiten/Geweben andere Expressionsmuster aufweisen. Somit können zuverlässige Depositionstageszeitschätzungen nur dann durchgeführt werden, wenn ausschließlich Blut vorliegt. Um diese Voraussetzung zu überprüfen, wurden bereits veröffentlichte und validierte Marker zur Körperflüssigkeitsbestimmung („BFI-Marker“) [193] in die Liste der Zielmoleküle zur gezielten Sequenzierung mit aufgenommen (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit).

Ein Versuch der Identifikation geeigneter Tageszeitmarker aus Speichel war nicht erfolgreich (Publikation 2 [147] dieser Arbeit). Die Identifizierung geeigneter RNA-Marker zur Tageszeitschätzung in anderen Körperflüssigkeiten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht angestrebt. Sofern eine Identifikation derartiger Marker in zukünftigen Studien jedoch gelingt, wäre die Integration der Marker in das in der vorliegenden Arbeit etablierte Verfahren zur gezielten Genexpressionsquantifizierung mit verhältnismäßig geringem Aufwand möglich.

4.1.3.4 Sensitivität

Forensisch relevante Blutspuren liegen regelmäßig in sehr geringen Volumina vor. In der vorliegenden Arbeit (Manuskript 3 [102]) wurde ein Messverfahren entwickelt, welches mit einer Einsatzmenge von 25 ng Gesamt-RNA durchführbar ist. Diese RNA-Menge konnte zuverlässig aus getrockneten Blutproben mit einem Ausgangsvolumen von 50 µl gewonnen werden und ist somit für realistische forensische Blutspuren einsetzbar. Bei der Testung geringerer RNA-Mengen (20 % und 2 % der optimalen Menge) zeigte sich jedoch eine Reduktion der Schätzgenauigkeit (Manuskript 3 [102] dieser Arbeit). Dies ist darauf zurückzuführen, dass einige der relevanten Marker im Schätzmodell eher geringe Expressionsniveaus aufweisen und somit bei Einsatz geringer RNA-Mengen nicht mehr detektiert oder nicht mehr zuverlässig quantifiziert werden können [146].

Während bei zu geringen RNA-Mengen in der untersuchten Probe die relative Menge der Marker-Transkripte nicht zuverlässig geschätzt werden kann, ist dennoch eine Verbesserung der Sensitivität durch eine Optimierung der verschiedenen Analyseschritte denkbar. Wichtig ist dabei vor allem die Wahl eines Extraktionsverfahrens, mit dem RNA effizient aus den Proben isoliert werden kann. Das eingesetzte Verfahren der Firma Thermo Fisher Scientific (basierend auf Phenol-Chloroform-Phasentrennung und Aufreinigung über Glasfaserfilter) erwies sich im Vergleich mit anderen

Extraktionsverfahren als sehr gut geeignet [19]. Optimierungspotential besteht jedoch bei dem zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung verwendeten „QIAseq targeted RNA panels“-Verfahren. In diesem Protokoll werden die Zielmoleküle in drei unterschiedlichen Prozessierungsschritten über magnetische Partikel aufgereinigt, wobei bei jedem dieser Aufreinigungsschritte ein gewisser Anteil der Probe verloren geht. Eine Reduktion des Probenverlusts könnte zum Beispiel durch die Verwendung enzymatischer Aufreinigungsverfahren erreicht werden [194], wobei jedoch eine gute Effizienz der enzymatischen Aufreinigung und Kompatibilität mit den darauffolgenden Reaktionsschritten nur durch Optimierung und Abstimmung der entsprechenden Pufferbedingungen erreicht werden kann. Da die Zusammensetzungen der Puffer in kommerziellen Produkten häufig proprietär und nicht öffentlich zugänglich sind, sind derartige Optimierungsbestrebungen in der Regel nur in Kooperation mit den jeweiligen Herstellern durchführbar. Eine Optimierung des Probenvorbereitungsverfahrens für das „QIAseq targeted RNA panel“-Protokoll wird von dem Hersteller QIAGEN angestrebt (persönliche Kommunikation mit P. Bajad, QIAGEN GmbH, März 2023), wodurch eine verbesserte Sensitivität in der Zukunft erreicht werden könnte.

4.1.4 Möglichkeiten der Weiterentwicklung

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur forensischen Depositionstageszeitschätzung von Blutspuren bietet verschiedene Anknüpfungspunkte zur Weiterentwicklung und Verbesserung, die nachfolgend aufgezeigt werden sollen.

Der Fokus der Methodenentwicklung lag zunächst auf der Analyse von mRNA-Markern, da dies zum aktuellen Zeitpunkt der am besten charakterisierte RNA-Typ ist, effiziente Verfahren zur Ko-Extraktion von mRNA und DNA aus forensischem Spurenmaterial etabliert sind [15,19] und die Analyse von mRNA nur geringe Abwandlungen bereits für DNA etablierter Verfahren erfordert, sodass die Arbeitsabläufe verhältnismäßig einfach in forensisch-molekularbiologische Routineabläufe integriert werden können. Es gibt jedoch andere Typen von RNA, deren Untersuchung für die forensische Tageszeitschätzung in zukünftigen Studien von Interesse sein könnte: Mehrere Studien beschreiben, dass bestimmte miRNAs signifikant rhythmische Expressionsmuster in menschlichem Blut aufweisen [195,196]. Wie bereits dargelegt (vgl. „1.3 Forensisch relevante RNA-Typen“) stellen miRNAs aufgrund ihrer erhöhten Degradationsresistenz interessante Kandidaten für die forensische Anwendung dar [52,197]. In einer ersten Machbarkeitsstudie konnten für die miRNA-Kandidaten miRNA-142-5p und miRNA-541 Expressionsunterschiede in der Glaskörperflüssigkeit zwischen am Tag und in der Nacht verstorbenen Personen beobachtet werden [137]. Während für dieselben miRNA-Kandidaten keine Expressionsunterschiede zwischen zu verschiedenen Tageszeiten entnommen Blutproben gemessen

wurden [138], ist das Potential der Analyse des miRNoms (Gesamtheit aller miRNAs) für die Depositionstageszeitschätzung biologischer Spuren bislang unzureichend erforscht.

Ein weiterer RNA-Typ, der in kürzlich erschienen Studien mit forensischer Orientierung aufgrund seiner erhöhten Degradationsresistenz untersucht wurde, ist die circRNA [58,198,199]. Zum Zeitpunkt der Niederschrift sind hier keine Studien zur systematischen Charakterisierung der Expression von circRNA in menschlichem Blut im Verlauf eines Tages bekannt. Diurnal rhythmische Oszillationen verschiedener circRNA konnten jedoch im Gehirn von Hühnern und Mäusen beschrieben werden [200,201], sodass eine nähere Untersuchung des Potentials dieses RNA-Typs für forensische Tageszeitschätzungen naheliegend erscheint.

Neben RNA wurden auch andere Biomoleküle wie Metabolite [139,202,203] und Hormone [131,132] als Träger von Tageszeitinformation in biologischen Spuren beschrieben. Lech et al. konnten dabei feststellen, dass die Kombination verschiedener Molekültypen in einem Modell die Schätzgenauigkeit verbessern kann [130,139]. Um abschließend bewerten zu können, ob eine Hinzunahme zusätzlicher Markermoleküle tatsächlich von Vorteil ist, wären jedoch vergleichende Untersuchungen zur Stabilität der unterschiedlichen Molekültypen notwendig. Zudem müsste für die Anwendung in der forensischen Fallarbeit der Nutzen einer verbesserten Schätzgenauigkeit gegen den für die zusätzlichen Analysen notwendigen Probenmaterialverbrauch (und Kostenaufwand) abgewogen werden.

Abschließend ist zu erwähnen, dass in der vorliegenden Arbeit die Tageszeit der Spurendeposition betrachtet wurde, welche jedoch nur einen Teilaspekt der forensisch relevanten Kontextualisierungsinformation „Zeit“ darstellt. Eine Komplementierung dieser Information mit Hinweisen zur seit der Deposition vergangenen Zeit (Spurenalter) könnte ein vollständigeres Bild ergeben. Möglichkeiten zur Schätzung des Spurenalters werden derzeit von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht: Fu et al. haben einen 5'-3'-qPCR-Ansatz zur Erfassung der differentiellen Degradation von Transkriptenden entwickelt [36]. Dabei werden Bereiche vom 5'- und vom 3'-Ende eines Transkripts amplifiziert und die gemessenen Konzentrationen verglichen. Da die 5'-Enden der Transkripte schneller degradieren als die 3'-Enden, ermöglichte die Messung der relativen Amplifikatmengen eine Schätzung des Alters von Blutspuren mit einer Genauigkeit von 2-4 Wochen (für bis zu 6 Monate alte Spuren) bzw. 4-6 Wochen (für >6 Monate alte Spuren) [36]. Unter Verwendung derselben Messmethode in Kombination mit einem auf „Elastisches-Netz-Regularisierung“ basierenden statistischen Schätzmodell konnte in einem Kooperationsprojekt zweier anderer Forschungsgruppen ein mittlerer absoluter Schätzfehler von 19 Tagen erzielt werden (wobei jedoch relevante Unterschiede zwischen den teilnehmenden Laboren festgestellt wurden) [37]. In beiden Studien wurden ausschließlich bei Raumtemperatur gelagerte Blutspuren untersucht [36,37]. In

alternativen Ansätzen erfolgte die Untersuchung stabiler und schnell degradierender Transkripte, mit dem Ziel aus den relativen Transkriptmengen Rückschlüsse auf das Spurenalter ziehen zu können [34,204]. Während umfangreichere Arbeiten zur Validierung der etablierten Verfahren und Schätzmodelle unter verschiedenen forensisch relevanten Bedingungen noch ausstehen, belegen die Forschungsergebnisse das grundsätzliche Potential von Transkriptomanalysen zur Schätzung der Lagerdauer einer Spur.

Erkenntnisse zum Alter einer Spur könnten auch genutzt werden, um Informationen darüber zu abzuleiten, ob die Integrität einer Probe für zuverlässige Tageszeitschätzungen ausreicht (vgl. „4.1.3.2 Stabilität von RNA“). Eine simultane Analyse beider Arten von Zeitschätzungsmarkern könnte über eine Erweiterung des in dieser Arbeit vorgestellten gezielten Sequenzierverfahrens durch Integration zusätzlicher Primer (Manuskript 3 [102]) erreicht werden.

4.2 Anwendung von MPS zur Analyse von RNA in der forensischen Molekularbiologie

4.2.1 Gesamttranskriptomsequenzierung

Die Entwicklung massiv-paralleler Sequenzierverfahren hat die Forschung in molekularbiologischen Disziplinen revolutioniert und in vielen Anwendungsgebieten wie der klinischen Forschung, Pharmazie oder Mikrobiologie große Fortschritte ermöglicht [205,206]. Auch in der forensischen Molekularbiologie hat die Möglichkeit der schnellen und erschwinglichen Analyse gesamter Genome die Entwicklung neuer Untersuchungsformen wie der Phänotypisierung [207] oder der Unterscheidung von eineiigen Zwillingen [208] ermöglicht oder vorangebracht.

Auch gesamte Transkriptome können mittels MPS untersucht und verglichen werden (s. „1.4.6 Gesamttranskriptomsequenzierung“). Bislang wurde die Sequenzierung gesamter Transkriptome erst in wenigen Studien mit forensisch-molekularbiologischem Anwendungsbezug eingesetzt. Zusätzlich zur Publikation 1 [143] dieser Arbeit erfolgte mittels Gesamttranskriptomsequenzierung die Identifizierung von RNA-Markerkandidaten für forensische Schätzungen des Lebensalters eines Spurenverursachers [33], des Spurenalters [34,35], und des Post-Mortem-Intervals [39] sowie zur Unterscheidung forensisch relevanter Hirnregionen (wobei die identifizierten Marker in einem Validierungs-Experiment mittels Endpunkt-PCR-CE in derselben Studie nicht bestätigt werden konnten) [209]. Diese Studien belegen das Potential der Gesamttranskriptomsequenzierung zur Identifizierung geeigneter Marker für verschiedene forensisch relevante Fragestellungen. Limitationen der Gesamttranskriptomsequenzierung bestehen in der hohen Anforderung an bioinformatische Expertise für die Datenauswertung sowie der enormen Vielfalt verfügbarer Analysealgorithmen und der Auswahl der für die vorliegende Fragestellung am besten geeigneten Analysestrategien. Dabei sind zwar verschiedene vergleichende Studien einzelner Analyseschritte unter bestimmten Bedingungen

veröffentlicht worden (z.B. [161,210–212]), es können jedoch kaum allgemeine und für alle Fragestellungen gültige Empfehlungen formuliert werden [91,92]. Diese Schwierigkeit spiegelt sich auch in einer großen Heterogenität der in den oben genannten forensisch-molekularbiologischen Forschungsarbeiten angewendeten Datenanalyseverfahren wider. Verschiedene Publikationen schlagen zur Reduktion der durch die verschiedenen Analyseansätze hervorgerufenen Heterogenität eine Kombination mehrerer Algorithmen vor [160,161]; ein Verfahren, das auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam (für eine ausführliche Diskussion der Auswahl der verwendeten Analyseverfahren s. Publikation 1 [143] dieser Arbeit). Weiterhin ist die Validierung der mittels Gesamttranskriptomsequenzierung identifizierten Kandidaten in einem unabhängigen experimentellen Ansatz unerlässlich (für die vorliegende Fragestellung in Publikation 1 [143], Part II und Manuskript 3 dieser Arbeit [102] berichtet).

Eine weitere Herausforderung für den Einsatz der Gesamttranskriptomsequenzierung in forensisch-molekularbiologischen Studien stellt die Qualität der untersuchten Proben dar. So konnten in der vorliegenden Arbeit keine Gesamttranskriptomsequenzdaten von ausreichender Qualität für eine differentielle Genexpressionsanalyse aus Speichel gewonnen werden (s. Publikation 2 dieser Arbeit [147]). Ähnliche Schwierigkeiten für die Körperflüssigkeit Speichel wurden im Forschungsprojekt „RNAge“ mit dem Ziel der Identifizierung von RNA-Markern zur Lebensaltersschätzung aus Blut und Speichel [33,147] beobachtet. Auch in Studien zur Spurenaltersschätzung musste die Körperflüssigkeit Speichel aufgrund schlechter Qualität der Sequenzierdaten von detaillierteren Analysen ausgeschlossen werden [34,35]. In der Publikation 2 [147] dieser Arbeit konnten der hohe Anteil bakterieller Nukleinsäuren, die heterogene Probenzusammensetzung und Degradation der RNA als Ursachen für diese Schwierigkeit identifiziert werden. Mögliche Verbesserungsansätze werden in der Publikation 2 [147] dieser Arbeit diskutiert. Ähnliche Schwierigkeiten sind auch bei der Sequenzierung anderer forensisch relevanter Probentypen wie Vaginalsekret (hoher Anteil bakterieller Nukleinsäuren beobachtet in [35]), Rektal- und Nasenschleimhaut (Gesamttranskriptomsequenzierungsexperimente für diese Körperflüssigkeiten sind hier zum Zeitpunkt der Niederschrift nicht bekannt, eine Ähnlichkeit zu Mund- und Vaginalschleimhaut ist jedoch anzunehmen) oder postmortal entnommenem Gewebe (insbesondere bei stärker vorangeschrittener Fäulnis bzw. Verwesung) [39,213] zu erwarten. Soweit hier zum Zeitpunkt der Niederschrift bekannt sind jedoch nach Veröffentlichung von [147] keine weiteren Studien zur Gesamttranskriptomsequenzierung anspruchsvoller, forensisch relevanter Probentypen durchgeführt und publiziert worden, sodass eine experimentelle Testung der in [147] vorgeschlagenen Verbesserungsansätze noch aussteht.

4.2.2 Gezielte Sequenzierung

Die gezielte Sequenzierung ist im Fachgebiet der forensischen Molekularbiologie bereits teilweise etabliert. Eine Umfrage aus dem Jahr 2020 (105 Teilnehmer) ergab, dass über 70 % der teilnehmenden Labore in Europa bereits ein MPS-Gerät besitzen oder planen, innerhalb der nächsten zwei Jahre eines anzuschaffen [94]. In einer weltweit durchgeführten Umfrage aus dem Jahr 2021 (367 Teilnehmer) lag dieser Anteil mit 51 % etwas niedriger [214]. In den meisten europäischen Laboren kommen Tisch-Sequenzierer der Firmen Illumina oder Thermo Fisher Scientific (Sequenziertechnologien dargestellt in „1.4.6 Gesamttranskriptomsequenzierung“ und „1.4.7 Gezielte Sequenzierung“) zum Einsatz [94]. Der Schwerpunkt des Interesses liegt dabei vor allem auf DNA-basierten Anwendungen (STR-Sequenzierung, Sequenzierung von SNPs zur Identifizierung, Phänotypisierung oder Untersuchung der biogeographischen Herkunft, Sequenzierung mitochondrialer DNA und Untersuchung von DNA-Methylierung) [94,214]. Für diese Anwendungsmöglichkeiten existieren teilweise bereits kommerzielle Produkte für den Einsatz in der forensischen Fallarbeit von Herstellern wie Verogen/Illumina [215] oder Thermo Fisher Scientific [216]. Hürden bei der Implementierung dieser Technologien liegen vor allem bei den Kosten, dem höheren Arbeits- und Analyseaufwand, dem Mangel an Erfahrung und geschultem Personal und fehlenden Standards/Richtlinien zur Durchführung und Implementierung [94,214].

Die gezielte Sequenzierung von RNA/cDNA zur Genexpressionsquantifizierung ist im Bereich der forensischen Molekularbiologie deutlich weniger etabliert [94,214]. Die Anwendung dieser Technologie für die Körperflüssigkeits-/Organgewebsbestimmung wird in mehreren Forschungsarbeiten beschrieben [100,101,192,217,218], wobei hier zum Zeitpunkt der Niederschrift kein Labor bekannt ist, in dem das Verfahren auch in der Fallarbeit eingesetzt wird. Kommerzielle Produkte gibt es, abgesehen von einem von der Firma Thermo Fisher Scientific erhältlichen „*Research Community Panel*“ [219], nicht. In zwei weiteren Forschungsarbeiten, die sich aktuell in Begutachtung bei wissenschaftlichen Zeitschriften befinden (Manuskript 3 dieser Arbeit [102] und ein Manuskript zur RNA-basierten Lebensaltersschätzung (vgl. Abschnitt „Weitere Publikationen“)), wird das Potential der gezielten Sequenzierung in zusätzlichen forensisch-molekularbiologischen Anwendungsbereichen dargelegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass die Genauigkeit der gezielten Sequenzierung zur Genexpressionsquantifizierung im Bereich der forensischen Molekularbiologie bislang unzureichend untersucht worden ist. So wurde in einer vorgelagerten, vergleichenden Untersuchung experimentell ermittelt, dass verhältnismäßig geringe Genexpressionsunterschiede (wie sie im Blut zu unterschiedlichen Tageszeiten auftreten) bei Verwendung der UMI-Technologie (implementiert im „*QIAseq targeted RNA panel*“-Protokoll der Firma QIAGEN, vgl. Abschnitt „1.4.7 Gezielte Sequenzierung“) besser aufgelöst werden können, als wenn eine Methode ohne diese Technologie

verwendet wird („Ion AmpliSeq“-Protokoll der Firma Thermo Fisher Scientific¹¹) [146]. Weiterhin gibt es bislang keine publizierten Erkenntnisse zur Etablierung einer optimalen Sequenziertiefe oder zur Normalisierung von Genexpressionsmessdaten aus gezielten Sequenzierexperimenten. Diese experimentellen Schritte sind in bislang publizierten Studien sehr heterogen durchgeführt oder gar nicht berücksichtigt bzw. berichtet worden [102]. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Ansätze zur Etablierung geeigneter Verfahren werden in den *Supplementary Files* des Manuskripts 3 [102] im Detail beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die MPS-Technologie ein großes Potential birgt, die forensisch-molekularbiologischen Analysemethoden insbesondere auch im Bereich der RNA-basierten Spurenkontextualisierung zu erweitern und zu verbessern. Dabei müssen jedoch verschiedene technische Herausforderungen gelöst und Richtlinien/Standards für die experimentelle Durchführung und Auswertung etabliert werden. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zur Anwendung der Gesamttranskriptomsequenzierung auf anspruchsvolle, heterogene Probenarten wie Speichel und zur Verbesserung der Genexpressionsquantifizierungsgenauigkeit bei der gezielten Sequenzierung leisten einen Beitrag zur Bewältigung dieser Herausforderungen.

¹¹Es wird angemerkt, dass auch die Firma Thermo Fisher Scientific ein kommerzielles Produkt mit Verwendung der UMI-Technologie entwickelt hat („Ion AmpliSeq HD panels“) [220]. Das Produkt wird jedoch zum aktuellen Zeitpunkt nur mit Primern für Fusionsgene vertrieben. Anfragen an den Hersteller zur Etablierung einer Möglichkeit der Anwendung des Produkts für die Quantifizierung regulärer Genexpression blieben unbeantwortet, sodass der auf der UMI-Technologie basierende Ansatz der Firma Thermo Fisher Scientific in dem beschriebenen Vergleichsexperiment [146] nicht berücksichtigt werden konnte.

5. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, zu erforschen, ob eine auf der Messung differentiell exprimierter, mit der Tageszeit oszillierend exprimierter RNA-Marker basierende Methode zur Schätzung des Depositionstageszeitpunktes forensisch relevanter Blut- und Speichelspuren entwickelt werden kann.

Für die Körperflüssigkeit wurden Blut geeignete, in Abhängigkeit von der Tageszeit differentiell exprimierte RNA-Markerkandidaten identifiziert und unter Verwendung der gezielten Sequenzierung auf einem Ion-S5-Tischsequenzierer wurde ein Verfahren zur akkuraten Genexpressionsquantifizierung dieser Markerkandidaten entwickelt. Basierend auf den so erhaltenen Genexpressionsmesswerten konnte ein statistisches Modell trainiert werden, mit dem die kontinuierliche und zyklische Variable Tageszeit mit einer Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme von 3 Stunden und 44 Minuten sowie einer Genauigkeit (innerhalb von ± 4 Stunden) von 78 % geschätzt wurde. Es kann folglich festgestellt werden, dass Information über die Depositionstageszeit im Expressionsmuster ausgewählter RNA-Marker enthalten ist und die gezielte Untersuchung ausgewählter Transkripte somit eine Schätzung des Depositionszeitpunkts ermöglicht. Die Schätzgenauigkeit, die dabei zum aktuellen Entwicklungsstand erreicht wird, limitiert die Anwendbarkeit des Verfahrens in der evaluativen Phase eines gerichtlichen Verfahrens. Dennoch kann ein relevanter Erkenntnisgewinn für die investigative Ermittlungsarbeit, z.B. zur Eingrenzung der möglichen Tatzeit, erreicht werden. Die präsentierten Ergebnisse stellen somit eine wichtige Grundlage für die Entwicklung eines Verfahrens zur Anwendung in der forensischen Fallarbeit dar.

Aufgrund der Herausforderungen, die sich für die Körperflüssigkeit Speichel bei Durchführung einer Gesamttranskriptomsequenzierung ergeben, konnte ein entsprechendes Verfahren für diese Körperflüssigkeit nicht etabliert werden. Stattdessen konnten jedoch die Ursachen dieser Schwierigkeiten erfasst und mögliche Lösungsansätze für zukünftige Untersuchungen abgeleitet werden. Die vorgelegten Arbeiten zählen zu den ersten forensisch-molekularbiologischen Studien, in denen Verfahren der massiv-parallelen Sequenzierung (sowohl die Sequenzierung des gesamten Transkriptoms als auch die gezielte Sequenzierung ausgewählter Transkripte) zur Genexpressionsquantifizierung in forensisch relevanten Probenotypen eingesetzt wurden. Dabei mussten verschiedene technische Probleme gelöst und mangels etablierter Richtlinien/Standards eigene Vorgehensweisen zur Sicherstellung akkurater und reproduzierbarer Genexpressionsmessungen entworfen und etabliert werden. Die so gewonnen Erkenntnisse können zur Bewältigung von Herausforderungen und Etablierung von Standards in zukünftigen Studien beitragen, in denen aufgrund des großen Potentials für Fragestellungen der forensischen Molekularbiologie mit einem vermehrten Einsatz von MPS-Technologien für die Genexpressionsquantifizierung zu rechnen ist.

6. Referenzen

- [1] J.M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, first., Academic Press, Elsevier Inc., Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2009.
- [2] J. Edson, E.M. Brooks, C. McLaren, J. Robertson, D. McNevin, A. Cooper, J.J. Austin, A quantitative assessment of a reliable screening technique for the STR analysis of telogen hair roots, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.10.001>.
- [3] M.K. Balogh, J. Burger, K. Bender, P.M. Schneider, K.W. Alt, Fingerprints from fingerprints, *International Congress Series* 1239 (2003) 953–957. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00230-3](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00230-3).
- [4] I. Findlay, A. Taylor, P. Quirke, R. Frazier, A. Urquhart, DNA fingerprinting from single cells, *Nature Scientific Correspondence* 389 (1997). <https://doi.org/10.1038/39225>.
- [5] C. Courts, B. Madea, Full STR profile of a 67-year-old bone found in a fresh water lake, *J. Forensic Sci.* 56 Suppl 1 (2011) S172–S175. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01589.x>.
- [6] P. Gill, C. Benschop, J. Buckleton, Ø. Bleka, D. Taylor, 2021. A Review of Probabilistic Genotyping Systems: EuroForMix, DNASTatistX and STRmix™. *Genes (Basel)* 12, 1559. <https://doi.org/10.3390/genes12101559>.
- [7] A. Gosch, C. Courts, On DNA transfer: The lack and difficulty of systematic research and how to do it better, *Forensic Sci. Int. Genet.* 40 (2019) 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.01.012>.
- [8] R.A.H. van Oorschot, B. Szkuta, G.E. Meakin, B. Kokshoorn, M. Goray, DNA transfer in forensic science: A review, *Forensic Sci. Int. Genet.* 38 (2019) 140–166. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.014>.
- [9] J.M. Robinson, Z. Pasternak, C.E. Mason, E. Elhaik, Forensic Applications of Microbiomics: A Review, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 608101. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.608101>.
- [10] C. Haas, J. Neubauer, A.P. Salzmann, E. Hanson, J. Ballantyne, 2021. Forensic transcriptome analysis using massively parallel sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 52, 102486. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102486>.
- [11] G.J. Parker, H.E. McKiernan, K.M. Legg, Z.C. Goecker, Forensic proteomics, *Forensic Sci. Int. Genet.* 54 (2021) 102529. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102529>.
- [12] S. Lee, Y.-R. Lee, J. Lee, H.-G. Kang, Discovery and validation of metabolite markers in bloodstains for bloodstain age estimation, *Analyst* (2023). <https://doi.org/10.1039/d3an00603d>.
- [13] C. Courts, A. Gosch, M. Rothschild, RNA-Analyse in der forensischen Molekularbiologie, *Dtsch. Arztebl. Int.* 121 (2024) 363–369. <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2024.0051>.
- [14] T. Sijen, S. Harbison, 2021. On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. *Genes (Basel)* 12, 1728. <https://doi.org/10.3390/genes12111728>.
- [15] A. Lindenbergh, M. de Pagter, G. Ramdayal, M. Visser, D. Zubakov, M. Kayser, T. Sijen, A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 565–577. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.01.009>.
- [16] A.D. Roeder, C. Haas, mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification, *Int. J. Legal Med.* 127 (2013) 707–721. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0794-3>.
- [17] E.K. Hanson, J. Ballantyne, Highly specific mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations, *Sci. Justice* 53 (2013) 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2012.03.007>.
- [18] M. Bamberg, L. Dierig, G. Kulstein, S.N. Kunz, M. Schmidt, T. Hadrys, P. Wiegand, 2021. Development and validation of an mRNA-based multiplex body fluid identification workflow and

- a rectal mucosa marker pilot study. *Forensic Sci. Int. Genet.* 54, 102542. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102542>.
- [19] S. Wang, G. Shanthan, M.M. Bouzga, H.M. Thi Dinh, C. Haas, A.E. Fonneløp, 2021. Evaluating the performance of five up-to-date DNA/RNA co-extraction methods for forensic application. *Forensic Sci. Int.*, 110996. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110996>.
- [20] C. Haas, E. Hanson, W. Bär, R. Banemann, A.M. Bento, A. Berti, E. Borges, C. Bouakaze, A. Carracedo, M. Carvalho, A. Choma, M. Dötsch, M. Durianciková, P. Hoff-Olsen, C. Hohoff, P. Johansen, P.A. Lindenbergh, B. Løddenkötter, B. Ludes, O. Maroñas, N. Morling, H. Niederstätter, W. Parson, G. Patel, C. Popielarz, E. Salata, P.M. Schneider, T. Sijen, B. Sviežená, L. Zatkalíková, J. Ballantyne, mRNA profiling for the identification of blood--results of a collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.01.003>.
- [21] C. Haas, E. Hanson, M.J. Anjos, W. Bär, R. Banemann, A. Berti, E. Borges, C. Bouakaze, A. Carracedo, M. Carvalho, V. Castella, A. Choma, G. de Cock, M. Dötsch, P. Hoff-Olsen, P. Johansen, F. Kohlmeier, P.A. Lindenbergh, B. Ludes, O. Maroñas, D. Moore, M.-L. Morerod, N. Morling, H. Niederstätter, F. Noel, W. Parson, G. Patel, C. Popielarz, E. Salata, P.M. Schneider, T. Sijen, B. Sviežena, M. Turanská, L. Zatkalíková, J. Ballantyne, RNA/DNA co-analysis from blood stains--results of a second collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.02.004>.
- [22] C. Haas, E. Hanson, M.J. Anjos, R. Banemann, A. Berti, E. Borges, A. Carracedo, M. Carvalho, C. Courts, G. de Cock, M. Dötsch, S. Flynn, I. Gomes, C. Hollard, B. Hjort, P. Hoff-Olsen, K. Hríbková, A. Lindenbergh, B. Ludes, O. Maroñas, N. McCallum, D. Moore, N. Morling, H. Niederstätter, F. Noel, W. Parson, C. Popielarz, C. Rapone, A.D. Roeder, Y. Ruiz, E. Sauer, P.M. Schneider, T. Sijen, D.S. Court, B. Sviežená, M. Turanská, A. Vidaki, L. Zatkalíková, J. Ballantyne, RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains--results of a third collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.10.011>.
- [23] C. Haas, E. Hanson, M.J. Anjos, K.N. Ballantyne, R. Banemann, B. Bhoelai, E. Borges, M. Carvalho, C. Courts, G. de Cock, K. Drobnic, M. Dötsch, R. Fleming, C. Franchi, I. Gomes, G. Hadzic, S.A. Harbison, J. Hartevelde, B. Hjort, C. Hollard, P. Hoff-Olsen, C. Hüls, C. Keyser, O. Maroñas, N. McCallum, D. Moore, N. Morling, H. Niederstätter, F. Noël, W. Parson, C. Phillips, C. Popielarz, A.D. Roeder, L. Salvaderi, E. Sauer, P.M. Schneider, G. Shanthan, D.S. Court, M. Turanská, R.A.H. van Oorschot, M. Vennemann, A. Vidaki, L. Zatkalíková, J. Ballantyne, RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: Results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 8 (2014) 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.09.009>.
- [24] C. Haas, E. Hanson, R. Banemann, A.M. Bento, A. Berti, Á. Carracedo, C. Courts, G. de Cock, K. Drobnic, R. Fleming, C. Franchi, I. Gomes, G. Hadzic, S.A. Harbison, B. Hjort, C. Hollard, P. Hoff-Olsen, C. Keyser, A. Kondili, O. Maroñas, N. McCallum, P. Miniati, N. Morling, H. Niederstätter, F. Noël, W. Parson, M.J. Porto, A.D. Roeder, E. Sauer, P.M. Schneider, G. Shanthan, T. Sijen, D. Syndercombe Court, M. Turanská, M. van den Berge, M. Vennemann, A. Vidaki, L. Zatkalíková, J. Ballantyne, RNA/DNA co-analysis from human skin and contact traces--results of a sixth collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 16 (2015) 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.01.002>.
- [25] A.P. Salzmänn, M. Bamberg, C. Courts, G. Dørum, A. Gosch, T. Hadrys, G. Hadzic, M. Neis, P.M. Schneider, T. Sijen, M. den van Berge, P. Wiegand, C. Haas, mRNA profiling of mock casework samples: Results of a FoRNAP collaborative exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 50 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102409>.
- [26] H.N. Wilkinson, M. Hardman, Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes, *Open Biol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>.

- [27] A.C. Ros, S. Bacci, A. Luna, I. Legaz, Forensic Impact of the Omics Science Involved in the Wound: A Systematic Review, *Front. Med. (Lausanne)* 8 (2021). <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.786798>.
- [28] N. Li, Q. Du, R. Bai, J. Sun, Vitality and wound-age estimation in forensic pathology: review and future prospects, *Forensic Sci. Res.* 5 (2020) 15–24. <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1445441>.
- [29] H.K. Hamadeh, P.R. Bushel, S. Jayadev, K. Martin, O. DiSorbo, S. Sieber, L. Bennett, R. Tennant, R. Stoll, J. Barrett, K. Blanchard, R.S. Paules, C.A. Afshari, Gene Expression Analysis Reveals Chemical-Specific Profiles, *Toxicological Sciences* 67 (2002) 219–231. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.2.219>.
- [30] G. Steiner, L. Suter, F. Boess, R. Gasser, M.C. de Vera, S. Albertini, S. Ruepp, Discriminating different classes of toxicants by transcript profiling, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 1236–1248. <https://doi.org/10.1289/txg.7036>.
- [31] L.-M. Mehling, A. Spottke, A. Heidbreder, P. Young, B. Madea, C. Hess, C. Courts, Alterations in gene expression after gamma-hydroxybutyric acid intake-A pilot study, *Int. J. Legal Med.* 131 (2017) 1261–1270. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1609-3>.
- [32] M.J. Peters, R. Joehanes, L.C. Pilling, C. Schurmann, K.N. Conneely, J. Powell, E. Reinmaa, G.L. Sutphin, A. Zhernakova, K. Schramm, Y.A. Wilson, S. Kobes, T. Tukiainen, Y.F. Ramos, H.H.H. Göring, M. Fornage, Y. Liu, S.A. Gharib, B.E. Stranger, P.L. de Jager, A. Aviv, D. Levy, J.M. Murabito, P.J. Munson, T. Huan, A. Hofman, A.G. Uitterlinden, F. Rivadeneira, J. van Rooij, L. Stolk, L. Broer, M.M.P.J. Verbiest, M. Jhamai, P. Arp, A. Metspalu, L. Tserel, L. Milani, N.J. Samani, P. Peterson, S. Kasela, V. Codd, A. Peters, C.K. Ward-Caviness, C. Herder, M. Waldenberger, M. Roden, P. Singmann, S. Zeilinger, T. Illig, G. Homuth, H.-J. Grabe, H. Völzke, L. Steil, T. Kocher, A. Murray, D. Melzer, H. Yaghootkar, S. Bandinelli, E.K. Moses, J.W. Kent, J.E. Curran, M.P. Johnson, S. Williams-Blangero, H.-J. Westra, A.F. McRae, J.A. Smith, S.L.R. Kardia, I. Hovatta, M. Perola, S. Ripatti, V. Salomaa, A.K. Henders, N.G. Martin, A.K. Smith, D. Mehta, E.B. Binder, K.M. Nylocks, E.M. Kennedy, T. Klengel, J. Ding, A.M. Suchy-Dacey, D.A. Enquobahrie, J. Brody, J.I. Rotter, Y.-D.I. Chen, J. Houwing-Duistermaat, M. Kloppenburg, P.E. Slagboom, Q. Helmer, W. den Hollander, S. Bean, T. Raj, N. Bakhshi, Q.P. Wang, L.J. Oyston, B.M. Psaty, R.P. Tracy, G.W. Montgomery, S.T. Turner, J. Blangero, I. Meulenbelt, K.J. Ressler, J. Yang, L. Franke, J. Kettunen, P.M. Visscher, G.G. Neely, R. Korstanje, R.L. Hanson, H. Prokisch, L. Ferrucci, T. Esko, A. Teumer, J.B.J. van Meurs, A.D. Johnson, 2015. The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nat. Commun.* 6, 8570. <https://doi.org/10.1038/ncomms9570>.
- [33] G. Dørum, N.V. Hänggi, D. Burri, Y. Marti, R. Banemann, G. Kulstein, C. Courts, A. Gosch, T. Hadrys, C. Haas, J. Neubauer, Selecting mRNA markers in blood for age estimation of the donor of a biological stain, *Forensic Sci. Int. Genet.* 68 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102976>.
- [34] A.P. Salzmänn, G. Russo, S. Kreutzer, C. Haas, Degradation of human mRNA transcripts over time as an indicator of the time since deposition (TsD) in biological crime scene traces, *Forensic Sci. Int. Genet.* 53 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102524>.
- [35] K.D. Weinbrecht, J. Fu, M. Payton, R. Allen, Time-dependent loss of mRNA transcripts from forensic stains, *RRFMS Volume 7* (2017) 1–12. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S125782>.
- [36] J. Fu, R.W. Allen, A method to estimate the age of bloodstains using quantitative PCR, *Forensic Sci. Int. Genet.* 39 (2019) 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.12.004>.
- [37] N.V. Hänggi, Ø. Bleka, C. Haas, A.E. Fonneløp, Quantitative PCR analysis of bloodstains of different ages, *Forensic Sci. Int.* 350 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111785>.
- [38] S. Scrivano, M. Sanavio, P. Tozzo, L. Caenazzo, Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: A review of current evidence, *Int. J. Legal Med.* 133 (2019) 1629–1640. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02125-x>.

- [39] P.G. Ferreira, M. Muñoz-Aguirre, F. Reverter, C.P. Sá Godinho, A. Sousa, A. Amadoz, R. Sodaiei, M.R. Hidalgo, D. Pervouchine, J. Carbonell-Caballero, R. Nurtdinov, A. Breschi, R. Amador, P. Oliveira, C. Çubuk, J. Curado, F. Aguet, C. Oliveira, J. Dopazo, M. Sammeth, K.G. Ardlie, R. Guigó, The effects of death and post-mortem cold ischemia on human tissue transcriptomes, *Nat. Commun.* 9 (2018) 490. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02772-x>.
- [40] A. Piovesan, M. Caracausi, F. Antonaros, M.C. Pelleri, L. Vitale, GeneBase 1.1: a tool to summarize data from NCBI gene datasets and its application to an update of human gene statistics, *Database (Oxford)* 2016 1–13. <https://doi.org/10.1093/database/baw153>.
- [41] C.R. Neil, M.W. Seiler, D.J. Reynolds, J.J. Smith, F.H. Vaillancourt, P.G. Smith, A.A. Agrawal, Reprogramming RNA processing: an emerging therapeutic landscape, *Trends Pharmacol. Sci.* 43 (2022) 437–454. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.02.011>.
- [42] R.W. Cotton, M.B. Fisher, Review: Properties of sperm and seminal fluid, informed by research on reproduction and contraception, *Forensic Sci. Int. Genet.* 18 (2015) 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.009>.
- [43] C. Robino, E. Chierto, F. Alessandrini, C. Bini, E. Carnevali, M. Fabbri, P. Fattorini, P. Grignani, F. Scarnicci, P. Tozzo, A. Verzeletti, S. Pelotti, L. Buscemi, Evaluation of vaginal mRNA markers in women from different age groups: A GeFI collaborative study, *Forensic Sci. Int. Genet. Supp. Series 7* (2019) 138–139. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.09.053>.
- [44] K. Rolle, M. Piwecka, A. Belter, D. Wawrzyniak, J. Jeleniewicz, M.Z. Barciszewska, J. Barciszewski, 2016. The Sequence and Structure Determine the Function of Mature Human miRNAs. *PLoS ONE* 11, e0151246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151246>.
- [45] E. Sauer, A.-K. Reinke, C. Courts, Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR, *Forensic Sci. Int. Genet.* 22 (2016) 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.01.018>.
- [46] E. Sauer, A. Extra, P. Cachée, C. Courts, Identification of organ tissue types and skin from forensic samples by microRNA expression analysis, *Forensic Sci. Int. Genet.* 28 (2017) 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.002>.
- [47] E. Montanaari, R. Giogetti, F.P. Busardo, A. Giorgetti, A. Tagliabrecci, F. Alessandrini, Suitability of miRNA assessment in postmortem interval estimation, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 25 (2021) 1774–1787. https://doi.org/10.26355/eurev_202102_25069.
- [48] T. Sijen, Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers, *Forensic Sci. Int. Genet.* 18 (2015) 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.015>.
- [49] M. Bamberg, M. Bruder, L. Dierig, S.N. Kunz, M. Schmidt, P. Wiegand, Best of both: a simultaneous analysis of mRNA and miRNA markers for body fluid identification, *Forensic Sci. Int. Genet.* 59 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102707>.
- [50] Y. Li, Z. Wang, D. Ishmael, Y. Lvy, The potential of using non-coding RNAs in forensic science applications, *Forensic Sci. Res.* 8 (2023) 98–106. <https://doi.org/10.1093/fsr/owad003>.
- [51] E. van Rooij, The art of microRNA research, *Circ. Res.* 108 (2011) 219–234. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227496>.
- [52] M. Bamberg, M. Bruder, S.N. Kunz, T. Wöhrle, P. Wiegand, Really the best of both? Application of an mRNA/miRNA multiplex assay to casework samples, animal samples, and a storage study, *Forensic Sci. Int. Genet.* 74 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2024.103129>.
- [53] S. Alshehhi, P.R. Hadrill, Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers, *Forensic Sci. Int.* 298 (2019) 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.046>.

- [54] D.M. Ozata, I. Gainetdinov, A. Zoch, D. O'Carroll, P.D. Zamore, PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions, *Nat. Rev. Genet.* 20 (2019) 89–108. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>.
- [55] S. Wang, Z. Wang, R. Tao, G. He, J. Liu, C. Li, Y. Hou, The potential use of Piwi-interacting RNA biomarkers in forensic body fluid identification: A proof-of-principle study, *Forensic Sci. Int. Genet.* 39 (2019) 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.01.002>.
- [56] C. Fang, P. Zhou, R. Li, J. Guo, H. Qiu, J. Zhang, M. Li, C. Yu, D. Meng, X. Xu, X. Liu, Di Guan, J. Yan, Development of a novel forensic age estimation strategy for aged blood samples by combining piRNA and miRNA markers, *Int. J. Legal Med.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s00414-023-03028-8>.
- [57] J. Greene, A.-M. Baird, L. Brady, M. Lim, S.G. Gray, R. McDermott, S.P. Finn, Circular RNAs: Biogenesis, Function and Role in Human Diseases, *Front. Mol. Biosci.* 4 (2017) 38. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00038>.
- [58] Y. Zhang, B. Liu, C. Shao, H. Xu, A. Xue, Z. Zhao, Y. Shen, Q. Tang, J. Xie, Evaluation of the inclusion of circular RNAs in mRNA profiling in forensic body fluid identification, *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 43–52. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1690-7>.
- [59] B. Liu, Q. Yang, H. Meng, C. Shao, J. Jiang, H. Xu, K. Sun, Y. Zhou, Y. Yao, Z. Zhou, H. Li, Y. Shen, Z. Zhao, Q. Tang, J. Xie, Development of a multiplex system for the identification of forensically relevant body fluids, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2020) 102312. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102312>.
- [60] J. Verwilt, P. Mestdag, J. Vandesompele, Artifacts and biases of the reverse transcription reaction in RNA sequencing, *RNA* 29 (2023) 889–897. <https://doi.org/10.1261/rna.079623.123>.
- [61] J. Schwaber, S. Andersen, L. Nielsen, Shedding light: The importance of reverse transcription efficiency standards in data interpretation, *Biomol. Detect. Quantif.* 17 (2019) 100077. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2018.12.002>.
- [62] C. Lynch, R. Fleming, RNA -based approaches for body fluid identification in forensic science, *WIREs Forensic Sci* (2020). <https://doi.org/10.1002/wfs2.1407>.
- [63] A. Lindenbergh, M. van den Berge, R.-J. Oostra, C. Cleypool, A. Bruggink, A. Kloosterman, T. Sijen, Development of a mRNA profiling multiplex for the inference of organ tissues, *Int. J. Legal Med.* 127 (2013) 891–900. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0895-7>.
- [64] M. van den Berge, T. Sijen, Extended specificity studies of mRNA assays used to infer human organ tissues and body fluids, *Electrophoresis* 38 (2017) 3155–3160. <https://doi.org/10.1002/elps.201700241>.
- [65] D.G. Ginzinger, Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream, *Experimental Hematology* 30 (2002) 503–512. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8).
- [66] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Helleman, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- [67] S.C. Taylor, K. Nadeau, M. Abbasi, C. Lachance, M. Nguyen, J. Fenrich, The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>.
- [68] J.M. Ruijter, M.W. Pfaffl, S. Zhao, A.N. Spiess, G. Boggy, J. Blom, R.G. Rutledge, D. Sisti, A. Lievens, K. de Preter, S. Derveaux, J. Helleman, J. Vandesompele, Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: Bias, resolution, precision, and implications, *Methods* 59 (2013) 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.08.011>.

- [69] J.R. Chapman, J. Waldenström, With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies, *PLoS ONE* 10 (2015) e0141853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>.
- [70] S.A. Bustin, Improving the quality of quantitative polymerase chain reaction experiments: 15 years of MIQE, *Mol. Aspects Med.* 96 (2024) 101249. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101249>.
- [71] C. Courts, M.W. Pfaffl, E. Sauer, W. Parson, Pleading for adherence to the MIQE-Guidelines when reporting quantitative PCR data in forensic genetic research, *Forensic Sci. Int. Genet.* 42 (2019) e21–e24. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.06.021>.
- [72] M.M. Ewing, J.M. Thompson, R.S. McLaren, V.M. Purpero, K.J. Thomas, P.A. Dobrowski, G.A. DeGroot, E.L. Romsos, D.R. Storts, Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant® system, *Forensic Sci. Int. Genet.* 23 (2016) 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.04.007>.
- [73] Thermo Fisher Scientific, TaqMan Assay Multiplex PCR Optimization Application Guide (Pub. No. MAN0010189 E00): MAN0010189, Revision E00, 2024. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/taqman_optimization_man.pdf (Zuletzt geprüft am: 31 Januar 2025).
- [74] Thermo Fisher Scientific, TaqMan Array Cards: Product Bulletin, 2021. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/taqman-array-cards-product-bulletin.pdf> (Zuletzt geprüft am: 31 Januar 2025).
- [75] P.-L. Quan, M. Sauzade, E. Brouzes, dPCR: A Technology Review, *Sensors* 18 (2018) 1271. <https://doi.org/10.3390/s18041271>.
- [76] J.F. Huggett, C.A. Foy, V. Benes, K. Emslie, J.A. Garson, R. Haynes, J. Hellemans, M. Kubista, R.D. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, S.A. Bustin, The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments, *Clin. Chem.* 59 (2013) 892–902. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>.
- [77] QIAGEN, Multiplex digital PCR, 2025. <https://www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr/beginners/dpcr-multiplexing> (Zuletzt geprüft am: 2 Februar 2025).
- [78] A.S. Whale, J.F. Huggett, S. Tzonev, Fundamentals of multiplexing with digital PCR, *Biomol. Detect. Quantif.* 10 (2016) 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.05.002>.
- [79] S.E. Lee, U.N. Koh, R. Fakhr, S.-K. Lim, Development of two step reverse transcription droplet digital PCR (RT-ddPCR) for simultaneous identification of saliva and semen, *Leg. Med. (Tokyo)* 71 (2024) 102536. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2024.102536>.
- [80] M. Dass, M. Ghai, Development of a multiplex PCR assay and quantification of microbial markers by ddPCR for identification of saliva and vaginal fluid, *Forensic Sci. Int.* 362 (2024) 112147. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112147>.
- [81] J. Chilimoniuk, A. Erol, S. Rödiger, M. Burdukiewicz, Challenges and opportunities in processing NanoString nCounter data, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 23 (2024) 1951–1958. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.04.061>.
- [82] G.K. Geiss, R.E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, N. Dowidar, D.L. Dunaway, H.P. Fell, S. Ferree, R.D. George, T. Grogan, J.J. James, M. Maysuria, J.D. Mitton, P. Oliveri, J.L. Osborn, T. Peng, A.L. Ratcliffe, P.J. Webster, E.H. Davidson, L. Hood, K. Dimitrov, Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 317–325. <https://doi.org/10.1038/nbt1385>.
- [83] J.-L. Park, S.-M. Park, J.-H. Kim, H.-C. Lee, S.-H. Lee, K.-M. Woo, S.-Y. Kim, Forensic Body Fluid Identification by Analysis of Multiple RNA Markers Using NanoString Technology, *Genomics Inform.* 11 (2013) 277–281. <https://doi.org/10.5808/GI.2013.11.4.277>.
- [84] P. Danaher, R.L. White, E.K. Hanson, J. Ballantyne, Facile semi-automated forensic body fluid identification by multiplex solution hybridization of NanoString® barcode probes to specific

- mRNA targets, *Forensic Sci. Int. Genet.* 14 (2015) 18–30.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.005>.
- [85] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000).
<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- [86] L.-C. Tsai, C.-W. Su, J.C.-I. Lee, Y.-S. Lu, H.-C. Chen, Y.-C. Lin, A. Linacre, H.-M. Hsieh, The detection and identification of saliva in forensic samples by RT-LAMP, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 14 (2018) 469–477. <https://doi.org/10.1007/s12024-018-0008-5>.
- [87] C.R.H. Lynch, O.L. Martin, C. Billington, R. Fleming, Towards the identification of body fluids using RT-LAMP isothermal amplification coupled with CRISPR-Cas12a, *Forensic Sci. Int. Genet.* 74 (2025) 103167. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2024.103167>.
- [88] M.L. Metzker, Sequencing technologies - the next generation, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 31–46.
<https://doi.org/10.1038/nrg2626>.
- [89] R. Stark, M. Grzelak, J. Hadfield, RNA sequencing: the teenage years, *Nat. Rev. Genet.* 20 (2019) 631–656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>.
- [90] Illumina, Sequencing platforms. <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html> (Zuletzt geprüft am: 2 Februar 2025).
- [91] A. Conesa, P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, M.W. Szczesniak, D.J. Gaffney, L.L. Elo, X. Zhang, A. Mortazavi, A survey of best practices for RNA-seq data analysis, *Genome Biol.* 17 (2016) 13. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>.
- [92] ENCODE, ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-Seq: Revised December 2016, 2016. https://www.encodeproject.org/documents/cede0cbe-d324-4ce7-ace4-f0c3eddf5972/@@download/attachment/ENCODE%20Best%20Practices%20for%20RNA_v2.pdf (Zuletzt geprüft am: 23 Februar 2025).
- [93] C. Everaert, M. Luybaert, J.L.V. Maag, Q.X. Cheng, M.E. Dinger, J. Helleman, P. Mestdagh, Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1559. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01617-3>.
- [94] 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. Legal Med.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02569-0>.
- [95] J.D. Zhang, T. Schindler, E. Küng, M. Ebeling, U. Certa, Highly sensitive amplicon-based transcript quantification by semiconductor sequencing, *BMC Genomics* 15 (2014) 565.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-565>.
- [96] J.M. Rothberg, W. Hinz, T.M. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey, J.H. Leamon, K. Johnson, M.J. Milgrew, M. Edwards, J. Hoon, J.F. Simons, D. Marran, J.W. Myers, J.F. Davidson, A. Branting, J.R. Nobile, B.P. Puc, D. Light, T.A. Clark, M. Huber, J.T. Branciforte, I.B. Stoner, S.E. Cawley, M. Lyons, Y. Fu, N. Homer, M. Sedova, X. Miao, B. Reed, J. Sabina, E. Feierstein, M. Schorn, M. Alanjary, E. Dimalanta, D. Dressman, R. Kasinskas, T. Sokolsky, J.A. Fidanza, E. Namsaraev, K.J. McKernan, A. Williams, G.T. Roth, J. Bustillo, An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing, *Nature* 475 (2011) 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>.
- [97] Q. Peng, R. Vijaya Satya, M. Lewis, P. Randad, Y. Wang, Reducing amplification artifacts in high multiplex amplicon sequencing by using molecular barcodes, *BMC Genomics* 16 (2015) 589.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1806-8>.
- [98] D. Zubakov, I. Kokmeijer, A. Ralf, N. Rajagopalan, L. Calandro, S. Wootton, R. Langit, C. Chang, R. Lagace, M. Kayser, Towards simultaneous individual and tissue identification: A proof-of-principle study on parallel sequencing of STRs, amelogenin, and mRNAs with the Ion Torrent PGM, *Forensic Sci. Int. Genet.* 17 (2015) 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.04.002>.

- [99] E. Hanson, J. Ballantyne, Human Organ Tissue Identification by Targeted RNA Deep Sequencing to Aid the Investigation of Traumatic Injury, *Genes (Basel)* 8 (2017). <https://doi.org/10.3390/genes8110319>.
- [100] G. Dørum, S. Ingold, E. Hanson, J. Ballantyne, L. Snipen, C. Haas, Predicting the origin of stains from next generation sequencing mRNA data, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.001>.
- [101] S. Ingold, G. Dørum, E. Hanson, J. Ballantyne, C. Haas, Assigning forensic body fluids to donors in mixed body fluids by targeted RNA/DNA deep sequencing of coding region SNPs, *Int. J. Legal Med.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02252-w>.
- [102] A. Gosch, S. Sendel, A. Caliebe, C. Courts, TrACES of Time: Towards estimating time-of-day of bloodstain deposition by targeted RNA sequencing, *bioRxiv* (2025). <https://doi.org/10.1101/2025.02.03.636230>.
- [103] Y. Wang, Y. Zhao, A. Bollas, Y. Wang, K.F. Au, Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications, *Nat. Biotechnol.* 39 (2021) 1348–1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>.
- [104] Y. Liu, W. Rosikiewicz, Z. Pan, N. Jillette, P. Wang, A. Taghbalout, J. Foox, C. Mason, M. Carroll, A. Cheng, S. Li, DNA methylation-calling tools for Oxford Nanopore sequencing: a survey and human epigenome-wide evaluation, *Genome Biol.* 22 (2021) 295. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02510-z>.
- [105] D.R. Garalde, E.A. Snell, D. Jachimowicz, B. Sipos, J.H. Lloyd, M. Bruce, N. Pantic, T. Admassu, P. James, A. Warland, M. Jordan, J. Ciccone, S. Serra, J. Keenan, S. Martin, L. McNeill, E.J. Wallace, L. Jayasinghe, C. Wright, J. Blasco, S. Young, D. Brocklebank, S. Juul, J. Clarke, A.J. Heron, D.J. Turner, Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores, *Nat. Methods* 15 (2018) 201–206. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4577>.
- [106] M.R. Ferreira, T.M.T. Carratto, T.S. Frontanilla, R.S. Bonadio, M. Jain, S.F. de Oliveira, E.C. Castelli, C.T. Mendes-Junior, Advances in forensic genetics: Exploring the potential of long read sequencing, *Forensic Sci. Int. Genet.* 74 (2025) 103156. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2024.103156>.
- [107] D. Plesivkova, R. Richards, S. Harbison, A review of the potential of the MinION™ single-molecule sequencing system for forensic applications, *WIREs Forensic Sci* 1 (2019) e1323. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1323>.
- [108] D.D.S.H. de Bruin, M.A. Haagmans, K.J. van der Gaag, J. Hoogenboom, N.E.C. Weiler, N. Tesi, A. Salazar, Y. Zhang, H. Holstege, M. Reinders, A.A. M'charek, T. Sijen, P. Henneman, Exploring nanopore direct sequencing performance of forensic STRs, SNPs, InDels, and DNA methylation markers in a single assay, *Forensic Sci. Int. Genet.* 74 (2024) 103154. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2024.103154>.
- [109] O. Tytgat, S. Škevin, D. Deforce, F. van Nieuwerburgh, Nanopore sequencing of a forensic combined STR and SNP multiplex, *Forensic Sci. Int. Genet.* 56 (2022) 102621. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102621>.
- [110] M. Vitaterna, J.S. Takahashi, F.W. Turek, Overview of Circadian Rhythms, *Alcohol Research & Health* 25 (2001) 85–95.
- [111] J. Aschoff, R. Wever, Über Reproduzierbarkeit circadianer Rhythmen beim Menschen*, *Klinische Wochenschrift* 58 (1980) 323–335. <https://doi.org/10.1007/BF01477275>.
- [112] J.A. Mohawk, C.B. Green, J.S. Takahashi, Central and peripheral circadian clocks in mammals, *Annu. Rev. Neurosci.* 35 (2012) 445–462. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>.
- [113] N. Cermakian, D.B. Boivin, The regulation of central and peripheral circadian clocks in humans, *Obes. Rev.* 10 Suppl 2 (2009) 25–36. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00660.x>.

- [114] F. Fagiani, D. Di Marino, A. Romagnoli, C. Travelli, D. Voltan, L. Di Cesare Mannelli, M. Racchi, S. Govoni, C. Lanni, Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases, *Sig Transduct Target Ther* 7 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y>.
- [115] J.S. Takahashi, H.-K. Hong, C.H. Ko, E.L. McDearmon, The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease, *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>.
- [116] L.A. Solt, D.J. Kojetin, T.P. Burris, The REV-ERBs and RORs: molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis, *Future Med. Chem.* 3 (2011) 623–638. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.9>.
- [117] R. Zhang, N.F. Lahens, H.I. Ballance, M.E. Hughes, J.B. Hogenesch, A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 16219–16224. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408886111>.
- [118] K.-F. Storch, O. Lipan, I. Leykin, N. Viswanathan, F.C. Davis, W.H. Wong, C.J. Weitz, Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart, *Nature* 417 (2002) 78–83. <https://doi.org/10.1038/nature744>.
- [119] Y. Yang, Y. Li, A. Sancar, O. Oztas, The circadian clock shapes the Arabidopsis transcriptome by regulating alternative splicing and alternative polyadenylation, *The Journal of Biological Chemistry* 295 (2020) 7608–7619. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013513>.
- [120] F. Rijo-Ferreira, J.S. Takahashi, Genomics of circadian rhythms in health and disease, *Genome Med.* 11 (2019) 82. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0704-0>.
- [121] A. Hirano, G. Shi, C.R. Jones, A. Lipzen, L.A. Pennacchio, Y. Xu, W.C. Hallows, T. McMahon, M. Yamazaki, L.J. Ptacek, Y.-H. Fu, A Cryptochrome 2 mutation yields advanced sleep phase in humans // Abstract, *Elife* 5 (2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.16695.001>.
- [122] A.S. BaHammam, A. Pirzada, Timing Matters: The Interplay between Early Mealtime, Circadian Rhythms, Gene Expression, Circadian Hormones, and Metabolism-A Narrative Review, *Clocks & Sleep* 5 (2023) 507–535. <https://doi.org/10.3390/clockssleep5030034>.
- [123] M.M. Bellet, E. Deriu, J.Z. Liu, B. Grimaldi, C. Blaschitz, M. Zeller, R.A. Edwards, S. Sahar, S. Dandekar, P. Baldi, M.D. George, M. Raffatellu, P. Sassone-Corsi, Circadian clock regulates the host response to Salmonella, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 9897–9902. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120636110>.
- [124] R.S. Edgar, A. Stangherlin, A.D. Nagy, M.P. Nicoll, S. Efstathiou, J.S. O'Neill, A.B. Reddy, Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 10085–10090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601895113>.
- [125] N.F.W. Zaki, M. Yousif, A.S. BaHammam, D.W. Spence, V.K. Bharti, P. Subramanian, S.R. Pandi-Perumal, Chronotherapeutics: Recognizing the Importance of Timing Factors in the Treatment of Disease and Sleep Disorders, *Clin. Neuropharmacol.* 42 (2019) 80–87. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000341>.
- [126] T.A. Stowe, C.A. McClung, How Does Chronobiology Contribute to the Development of Diseases in Later Life, *Clin. Interv. Aging* 18 (2023) 655–666. <https://doi.org/10.2147/CIA.S380436>.
- [127] D. Dong, D. Yang, L. Lin, S. Wang, B. Wu, Circadian rhythm in pharmacokinetics and its relevance to chronotherapy, *Biochem. Pharmacol.* 178 (2020) 114045. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114045>.
- [128] F. Lévi, C. Focan, A. Karaboué, V. de La Valette, D. Focan-Henrard, B. Baron, F. Kreutz, S. Giacchetti, Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1015–1035. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.11.001>.
- [129] G. Jackson, S. Jones, G. Booth, C. Champod, I.W. Evett, The nature of forensic science opinion--a possible framework to guide thinking and practice in investigations and in court proceedings, *Sci. Justice* 46 (2006) 33–44. [https://doi.org/10.1016/s1355-0306\(06\)71565-9](https://doi.org/10.1016/s1355-0306(06)71565-9).

- [130] K. Lech, F. Liu, K. Ackermann, V.L. Revell, O. Lao, D.J. Skene, M. Kayser, Evaluation of mRNA markers for estimating blood deposition time: Towards alibi testing from human forensic stains with rhythmic biomarkers, *Forensic Sci. Int. Genet.* 21 (2016) 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.008>.
- [131] H. Mikami, K. Terazawa, T. Takatori, S. Tokudome, T. Tsukamoto, K. Haga, Estimation of time of death by quantification of melatonin in corpses, *Int. J. Legal Med.* 107 (1994) 42–51. <https://doi.org/10.1007/BF01247274>.
- [132] K. Ackermann, K.N. Ballantyne, M. Kayser, Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: A prospective and versatile tool for crime scene reconstruction, *Int. J. Legal Med.* 124 (2010) 387–395. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0457-1>.
- [133] F.K. Goodwin, D.A. Newsome, S.P. Markey, Light Suppresses Melatonin Secretion in Humans, *Science* 210 (1980) 1267–1268. <https://doi.org/10.1126/science.7434030>.
- [134] G.P. Chrousos, Stress and disorders of the stress system, *Nat. Rev. Endocrinol.* 5 (2009) 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>.
- [135] A. Kimura, Y. Ishida, T. Hayashi, M. Nosaka, T. Kondo, Estimating time of death based on the biological clock, *Int. J. Legal Med.* 125 (2011) 385–391. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0527-4>.
- [136] A. Kimura, Y. Ishida, M. Nosaka, A. Ishigami, H. Yamamoto, Y. Kuninaka, S. Hata, M. Ozaki, T. Kondo, Application and limitation of a biological clock-based method for estimating time of death in forensic practices, *Sci. Rep.* 13 (2023) 6093. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33328-3>.
- [137] A. Odriozola, J.A. Riancho, R. de La Vega, G. Agudo, A. García-Blanco, E. de Cos, F. Fernández, C. Sañudo, M.T. Zarrabeitia, miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: A proof-of-concept pilot study, *Int. J. Legal Med.* 127 (2013) 573–578. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0811-6>.
- [138] K. Lech, K. Ackermann, A. Wollstein, V.L. Revell, D.J. Skene, M. Kayser, Assessing the suitability of miRNA-142-5p and miRNA-541 for bloodstain deposition timing, *Forensic Sci. Int. Genet.* 12 (2014) 181–184. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.008>.
- [139] K. Lech, F. Liu, S.K. Davies, K. Ackermann, J.E. Ang, B. Middleton, V.L. Revell, F.J. Raynaud, I. Hoveijn, R.A. Hut, D.J. Skene, M. Kayser, Investigation of metabolites for estimating blood deposition time, *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 25–32. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1638-y>.
- [140] D. Kirk, R. Allen, Exploration of Rhythmic Patterns of Gene Expression to Estimate the Time of Day a Bloodstain Was Created, *Research and Reports in Forensic Medical Science* (2021) 1–11. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S327044>.
- [141] F. Cheng, W. Li, Z. Ji, J. Li, W. Hu, M. Zhao, D. Yu, H. Simayijiang, J. Yan, Estimation of bloodstain deposition time within a 24-h day-night cycle with rhythmic mRNA based on a machine learning algorithm, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2023) 102910. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102910>.
- [142] J.F. Duffy, D.-J. Dijk, Getting through to circadian oscillators: why use constant routines?, *J. Biol. Rhythms* 17 (2002) 4–13. <https://doi.org/10.1177/074873002129002294>.
- [143] A. Gosch, A. Bhardwaj, C. Courts, TrACES of Time: Transcriptomic Analyses for the Contextualization of Evidential Stains – identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain deposition, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2023) 102915. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102915>.
- [144] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (2014) 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.

- [145] D.S. Fischer, F.J. Theis, N. Yosef, Impulse model-based differential expression analysis of time course sequencing data, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) e119. <https://doi.org/10.1093/nar/gky675>.
- [146] A. Gosch, C. Courts, Comparative Evaluation of Targeted RNA Sequencing Protocols for Gene Expression Quantification With and Without Unique Molecular Indices (UMIs), *bioRxiv* (2025). <https://doi.org/10.1101/2025.01.27.635010>.
- [147] A. Gosch, R. Banemann, G. Dørum, C. Haas, T. Hadrys, N. Haenggi, G. Kulstein, J. Neubauer, C. Courts, Spitting in the wind?-The challenges of RNA sequencing for biomarker discovery from saliva, *Int. J. Legal Med.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s00414-023-03100-3>.
- [148] R. Braun, W.L. Kath, M. Iwanaszko, E. Kula-Eversole, S.M. Abbott, K.J. Reid, P.C. Zee, R. Allada, Universal method for robust detection of circadian state from gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E9247-E9256. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800314115>.
- [149] E.E. Laing, C.S. Möller-Levet, N. Poh, N. Santhi, S.N. Archer, D.-J. Dijk, Blood transcriptome based biomarkers for human circadian phase, *Elife* 6 (2017). <https://doi.org/10.7554/eLife.20214.001>.
- [150] Y. Huang, R. Braun, Platform-independent estimation of human physiological time from single blood samples, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 121 (2024) e2308114120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2308114120>.
- [151] A. Perperoglou, W. Sauerbrei, M. Abrahamowicz, M. Schmid, A review of spline function procedures in R, *BMC Med. Res. Methodol.* 19 (2019) 46. <https://doi.org/10.1186/s12874-019-0666-3>.
- [152] J.J. Hughey, Machine learning identifies a compact gene set for monitoring the circadian clock in human blood, *Genome Med.* 9 (2017) 19. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0406-4>.
- [153] D. Pollock, Smoothing with Cubic Splines, in: *Handbook of Time Series Analysis, Signal Processing, and Dynamics*, Elsevier, 1999, pp. 293–322.
- [154] M. Oleszak, Regularization in R Tutorial: Ridge, Lasso and Elastic Net, 2019. <https://www.datacamp.com/tutorial/tutorial-ridge-lasso-elastic-net> (Zuletzt geprüft am: 24 Februar 2025).
- [155] H. Zou, T. Hastie, Regularization and variable selection via the elastic net, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 67 (2005) 301–320. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2005.00503.x>.
- [156] K. Ackermann, R. Plomp, O. Lao, B. Middleton, V.L. Revell, D.J. Skene, M. Kayser, Effect of sleep deprivation on rhythms of clock gene expression and melatonin in humans, *Chronobiol. Int.* 30 (2013) 901–909. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.784773>.
- [157] S.N. Archer, E.E. Laing, C.S. Möller-Levet, D.R. van der Veen, G. Bucca, A.S. Lazar, N. Santhi, A. Slak, R. Kabiljo, M. von Schantz, C.P. Smith, D.-J. Dijk, Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E682-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316335111>.
- [158] C.S. Möller-Levet, S.N. Archer, G. Bucca, E.E. Laing, A. Slak, R. Kabiljo, J.C.Y. Lo, N. Santhi, M. von Schantz, C.P. Smith, D.-J. Dijk, Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) E1132-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217154110>.
- [159] E. Arnardottir, E. Nikonova, K.R. Shockley, A. Pdtelezchnikov, R.C. Anafi, K.Q. Tanis, G. Maislin, D.J. Stone, J.J. Renger, C.J. Winrow, A.I. Pack, Blood-Gene Expression Reveals Reduced Circadian Rhythmicity in Individuals p Resistant to Sleep Deprivation, *Sleep* 37 (2014) 1589–1600. <https://doi.org/10.5665/sleep.4064>.
- [160] J. Costa-Silva, D. Domingues, F.M. Lopes, RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool, *PLoS ONE* 12 (2017) e0190152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>.

- [161] D. Spies, P.F. Renz, T.A. Beyer, C. Ciaudo, Comparative analysis of differential gene expression tools for RNA sequencing time course data, *Brief. Bioinformatics* 20 (2019) 288–298. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx115>.
- [162] 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. Legal Med.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02375-0>.
- [163] K.H. Cox, J.S. Takahashi, Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism, *J. Mol. Endocrinol.* 63 (2019) R93–R102. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>.
- [164] I.V. Yang, W. Jiang, H.R. Rutledge, B. Lackford, L.A. Warg, L. de Arras, S. Alper, D.A. Schwartz, D.S. Pisetsky, Identification of novel innate immune genes by transcriptional profiling of macrophages stimulated with TLR ligands, *Mol. Immunol.* 48 (2011) 1886–1895. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.05.015>.
- [165] J. Wenzel, J.L. Ouderkirk, M. Krendel, R. Lang, Class I myosin Myo1e regulates TLR4-triggered macrophage spreading, chemokine release, and antigen presentation via MHC class II, *Eur. J. Immunol.* 45 (2015) 225–237. <https://doi.org/10.1002/eji.201444698>.
- [166] T.M. Grzywa, A. Sosnowska, P. Matryba, Z. Rydzynska, M. Jasinski, D. Nowis, J. Golab, Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response, *Front. Immunol.* 11 (2020) 938. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00938>.
- [167] J.A. Haspel, R. Anafi, M.K. Brown, N. Cermakian, C. Depner, P. Desplats, A.E. Gelman, M. Haack, S. Jelic, B.S. Kim, A.D. Laposky, Y.C. Lee, E. Mongodin, A.A. Prather, B.J. Prendergast, C. Reardon, A.C. Shaw, S. Sengupta, É. Szentirmai, M. Thakkar, W.E. Walker, L.A. Solt, Perfect timing: circadian rhythms, sleep, and immunity - an NIH workshop summary, *JCI Insight* 5 (2020). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131487>.
- [168] B.Q. Wei, T.S. Mikkelsen, M.K. McKinney, E.S. Lander, B.F. Cravatt, A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals, *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 36569–36578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606646200>.
- [169] S. Ghoshal, J.R. Stevens, C. Billon, C. Girardet, S. Sitaula, A.S. Leon, D.C. Rao, J.S. Skinner, T. Rankinen, C. Bouchard, M.V. Nuñez, K.L. Stanhope, D.A. Howatt, A. Daugherty, J. Zhang, M. Schuelke, E.P. Weiss, A.R. Coffey, B.J. Bennett, P. Sethupathy, T.P. Burris, P.J. Havel, A.A. Butler, Adropin: An endocrine link between the biological clock and cholesterol homeostasis, *Mol. Metab.* 8 (2018) 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.002>.
- [170] R. Zbieć-Piekarska, M. Spólnicka, T. Kupiec, A. Parys-Proszek, Ż. Makowska, A. Pałeczka, K. Kucharczyk, R. Płoski, W. Branicki, 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>.
- [171] C.I. Weidner, Q. Lin, C.M. Koch, L. Eisele, F. Beier, P. Ziegler, D.O. Bauerschlag, K.-H. Jöckel, R. Erbel, T.W. Mühleisen, M. Zenke, T.H. Brümmendorf, W. Wagner, Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites, *Genome Biol.* 15 (2014). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>.
- [172] J. Naue, Getting the chronological age out of DNA: using insights of age-dependent DNA methylation for forensic DNA applications, *Genes Genomics* (2023). <https://doi.org/10.1007/s13258-023-01392-8>.
- [173] J. Naue, H.C.J. Hoefsloot, O.R.F. Mook, L. Rijlaarsdam-Hoekstra, M.C.H. van der Zwalm, P. Henneman, A.D. Kloosterman, P.J. Verschure, Chronological age prediction based on DNA methylation: Massive parallel sequencing and random forest regression, *Forensic Sci. Int. Genet.* 31 (2017) 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.015>.
- [174] B. Bekaert, A. Kamalandua, S.C. Zapico, W. van de Voorde, 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>.

- [175] R. Levandovski, E. Sasso, M.P. Hidalgo, Chronotype: a review of the advances, limits and applicability of the main instruments used in the literature to assess human phenotype, *Trends Psychiatry Psychother.* 35 (2013) 3–11. <https://doi.org/10.1590/s2237-60892013000100002>.
- [176] D.A. Kalmbach, L.D. Schneider, J. Cheung, S.J. Bertrand, T. Kariharan, A.I. Pack, P.R. Gehrman, Genetic Basis of Chronotype in Humans: Insights From Three Landmark GWAS, *Sleep* 40 (2017). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw048>.
- [177] B. Griefahn, C. Künemund, P. Brode, P. Mehnert, Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg *Somnologie* 5 (2001) 71–80. <https://doi.org/10.1046/j.1439-054X.2001.01149.x>.
- [178] T. Roenneberg, A. Wirz-Justice, M. Mew, Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes, *J. Biol. Rhythms* 18 (2003) 80–90. <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>.
- [179] S.T. Anderson, G.A. FitzGerald, Sexual dimorphism in body clocks, *Science* 369 (2020) 1164–1165. <https://doi.org/10.1126/science.abd4964>.
- [180] S. Hood, A. Shimon, The aging clock: circadian rhythms and later life, *Journal of Clinical Investigation* 127 (2017) 437–446. <https://doi.org/10.1172/JCI90328>.
- [181] S.D. Wong, K.P. Wright, R.L. Spencer, C. Vetter, L.M. Hicks, O.G. Jenni, M.K. LeBourgeois, Development of the circadian system in early life: maternal and environmental factors, *J. Physiol. Anthropol.* 41 (2022) 22. <https://doi.org/10.1186/s40101-022-00294-0>.
- [182] M. Dittmar, T. Stark, S. Wedell, Circadian Rhythm of Distal Skin Temperature in Healthy Older and Young Women and Its Relationship with Sleep-Wake Rhythm and Environmental Factors under Natural Living Conditions, *Geriatrics (Basel)* 9 (2024). <https://doi.org/10.3390/geriatrics9040102>.
- [183] M.R. Buijink, S. Michel, A multi-level assessment of the bidirectional relationship between aging and the circadian clock, *J. Neurochem.* 157 (2021) 73–94. <https://doi.org/10.1111/jnc.15286>.
- [184] K.L. Healy, A.R. Morris, A.C. Liu, Circadian Synchrony: Sleep, Nutrition, and Physical Activity, *Front. Netw. Physiol.* 1 (2021). <https://doi.org/10.3389/fnetp.2021.732243>.
- [185] S.N. Archer, C. Möller-Levet, M.-Á. Bonmatí-Carrión, E.E. Laing, D.-J. Dijk, Extensive dynamic changes in the human transcriptome and its circadian organization during prolonged bed rest, *iScience* 27 (2024) 109331. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109331>.
- [186] D. Jakubowicz, J. Wainstein, Z. Landau, I. Raz, B. Ahren, N. Chapnik, T. Ganz, M. Menaged, M. Barnea, Y. Bar-Dayan, O. Froy, Influences of Breakfast on Clock Gene Expression and Postprandial Glycemia in Healthy Individuals and Individuals With Diabetes: A Randomized Clinical Trial, *Diabetes Care* 40 (2017) 1573–1579. <https://doi.org/10.2337/dc16-2753>.
- [187] T. Burke, R. Markwald, A. McHill, E.D. Chinoy, J.A. Snider, S.C. Bessman, C.M. Jung, J.S. O'Neill, K.P. Wright, Effects of caffeine on the human circadian clock in vivo and in vitro, *Science Translational Medicine* 7 (2016). <https://doi.org/10.5194/gi-2016-11-RC2>.
- [188] K.J. Egan, K.L. Knutson, A.C. Pereira, M. von Schantz, The role of race and ethnicity in sleep, circadian rhythms and cardiovascular health, *Sleep Med. Rev.* 33 (2017) 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2016.05.004>.
- [189] J. Fleckhaus, P. Bugert, N. Al-Rashedi, M.A. Rothschild, Investigation of the impact of biogeographic ancestry on DNA methylation based age predictions comparing a Middle East and a Central European population, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2023) 102923. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102923>.
- [190] T.W. McDade, K. M. Ross, R. L. Fried, J.M.G. Arevalo, J. Ma, G.E. Miller, S.W. Cole, Genome-Wide Profiling of RNA from Dried Blood Spots: Convergence with Bioinformatic Results Derived from Whole Venous Blood and Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Biodemography Soc. Biol.* 62 (2016) 182–197. <https://doi.org/10.1080/19485565.2016.1185600>.

- [191] M. Sirker, P.M. Schneider, I. Gomes, A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions, *Int. J. Legal Med.* 130 (2016) 1431–1438. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1373-9>.
- [192] M. Neis, T. Groß, H. Schneider, P.M. Schneider, C. Courts, Comprehensive Body Fluid Identification and Contributor Assignment by combining Targeted Sequencing of mRNA and coding region SNPs, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2024) 103125. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2024.103125>.
- [193] E. Hanson, G. Dørum, M. Zamborlin, S. Wang, M. Gysi, S. Ingold, R. Lagace, C. Roth, C. Haas, J. Ballantyne, Targeted S5 RNA sequencing assay for the identification and direct association of common body fluids with DNA donors in mixtures, *Int. J. Legal Med.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02908-9>.
- [194] J. Bell, A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT, *BioTechniques* 44 (2008) 834. <https://doi.org/10.2144/000112890>.
- [195] N. Mehta, H.-Y.M. Cheng, Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping, *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 3609–3624. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.022>.
- [196] X. Wang, G. Tian, Z. Li, L. Zheng, The Crosstalk Between miRNA and Mammalian Circadian Clock, *Current Medicinal Chemistry* 22 (2015) 1582–1588. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150227155009>.
- [197] C.L. Glynn, Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations, *RNA* 26 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1261/rna.072173.119>.
- [198] X. Chen, H. Xu, Y. Lin, B. Zhu, Forensic stability evaluation of selected miRNA and circRNA markers in human bloodstained samples exposed to different environmental conditions, *Forensic Sci. Int.* 362 (2024) 112148. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112148>.
- [199] C. Tu, T. Du, X. Ye, C. Shao, J. Xie, Y. Shen, Using miRNAs and circRNAs to estimate PMI in advanced stage, *Leg. Med. (Tokyo)* 38 (2019) 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2019.04.002>.
- [200] X. Tan, J. Zhang, J. Dong, M. Huang, Z. Zhou, D. Wang, Novel Insights into the Circadian Rhythms Based on Long Noncoding and Circular RNA Profiling, *Int. J. Mol. Sci.* 25 (2024). <https://doi.org/10.3390/ijms25021161>.
- [201] A. Ivanov, D. Mattei, K. Radschkeit, A.-C. Compagnion, J.P. Pett, H. Herzel, R.C. Paolicelli, M. Piwecka, U. Meyer, D. Beule, Analyses of circRNA Expression throughout the Light-Dark Cycle Reveal a Strong Regulation of Cdr1as, Associated with Light Entrainment in the SCN, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms232012347>.
- [202] F. Cheng, W. Li, J. Li, Z. Ji, W. Hu, M. Zhao, D. Yu, L. Zhang, P. Yuan, H. Simayijiang, J. Yan, Circadian metabolites for evaluating the timing of bloodstain deposition: A preliminary study, *Forensic Sci. Int.* 361 (2024) 112102. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112102>.
- [203] Y. Minami, T. Kasukawa, Y. Kakazu, M. Iigo, M. Sugimoto, S. Ikeda, A. Yasui, van der Horst, Gijsbertus T.J., T. Soga, H.R. Ueda, Measurement of internal body time by blood metabolics, *PNAS* 106 (2009) 9890–9895. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900617106>.
- [204] Y. Wei, J. Wang, Q. Wang, B. Cong, S. Li, The estimation of bloodstain age utilizing circRNAs and mRNAs biomarkers, *Forensic Sci. Int.* 338 (2022) 111408. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111408>.
- [205] D.C. Koboldt, K.M. Steinberg, D.E. Larson, R.K. Wilson, E.R. Mardis, The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics, *Cell* 155 (2013) 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>.
- [206] H. Satam, K. Joshi, U. Mangrolia, S. Waghoo, G. Zaidi, S. Rawool, R.P. Thakare, S. Banday, A.K. Mishra, G. Das, S.K. Malonia, Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements, *Biology (Basel)* 12 (2023) 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>.

- [207] M. Kukla-Bartoszek, P. Teisseyre, E. Pośpiech, J. Karłowska-Pik, P. Zieliński, A. Woźniak, M. Boroń, M. Dąbrowski, M. Zubańska, A. Jarosz, R. Płoski, T. Grzybowski, M. Spólnicka, J. Mielniczuk, W. Branicki, Searching for improvements in predicting human eye colour from DNA, *Int. J. Legal Med.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02645-5>.
- [208] J. Weber-Lehmann, E. Schilling, G. Gradl, D.C. Richter, J. Wiehler, B. Rolf, Finding the needle in the haystack: Differentiating "identical" twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing, *Forensic Sci. Int. Genet.* 9 (2014) 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.015>.
- [209] J. Euteneuer, L. Moitinho-Silva, C. Courts, Forensically relevant anatomical brain regions cannot be sub-differentiated by RNA expression analysis, *Forensic Sci. Med. Pathol.* (2024). <https://doi.org/10.1007/s12024-024-00787-7>.
- [210] X. Adiconis, D. Borges-Rivera, R. Satija, D.S. DeLuca, M.A. Busby, A.M. Berlin, A. Sivachenko, D.A. Thompson, A. Wysocki, T. Fennell, A. Gnirke, N. Pochet, A. Regev, J.Z. Levin, Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples, *Nat. Methods* 10 (2013) 623–629. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2483>.
- [211] Y. Lin, K. Golovkina, Z.-X. Chen, H.N. Lee, Y.L.S. Negron, H. Sultana, B. Oliver, S.T. Harbison, Comparison of normalization and differential expression analyses using RNA-Seq data from 726 individual *Drosophila melanogaster*, *BMC Genomics* 17 (2016) 28. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2353-z>.
- [212] C. Soneson, M. Delorenzi, A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data, *BMC Bioinformatics* 14 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-91>.
- [213] Y. Zhu, L. Wang, Y. Yin, E. Yang, Systematic analysis of gene expression patterns associated with postmortem interval in human tissues, *Sci. Rep.* 7 (2017) 5435. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05882-0>.
- [214] M.M. Foley, F. Oldoni, A global snapshot of current opinions of next-generation sequencing technologies usage in forensics, *Forensic Sci. Int. Genet.* 63 (2023) 102819. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102819>.
- [215] C. Xavier, W. Parson, Evaluation of the Illumina ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit - MPS forensic application for the MiSeq FGx™ benchtop sequencer, *Forensic Sci. Int. Genet.* 28 (2017) 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.018>.
- [216] P. Müller, A. Alonso, P.A. Barrio, B. Berger, M. Bodner, P. Martin, W. Parson, Systematic evaluation of the early access applied biosystems precision ID Globalfiler mixture ID and Globalfiler NGS STR panels for the ion S5 system, *Forensic Sci. Int. Genet.* 36 (2018) 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.06.016>.
- [217] G. Dørum, S. Ingold, E. Hanson, J. Ballantyne, G. Russo, S. Aluri, L. Snipen, C. Haas, Predicting the origin of stains from whole miRNome massively parallel sequencing data, *Forensic Sci. Int. Genet.* 40 (2019) 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.02.015>.
- [218] S. Ingold, G. Dørum, E. Hanson, A. Berti, W. Branicki, P. Brito, P. Elsmore, K.B. Gettings, F. Giangasparo, T.E. Gross, S. Hansen, E.N. Hanssen, M.-L. Kampmann, M. Kayser, F.-X. Laurent, N. Morling, A. Mosquera-Miguel, W. Parson, C. Phillips, M.J. Porto, E. Pośpiech, A.D. Roeder, P.M. Schneider, K. Schulze Johann, C.R. Steffen, D. Syndercombe-Court, M. Trautmann, M. van den Berge, K.J. van der Gaag, J. Vannier, V. Verdoliva, A. Vidaki, C. Xavier, J. Ballantyne, C. Haas, Body fluid identification using a targeted mRNA massively parallel sequencing approach - results of a EUROFORGEN/EDNAP collaborative exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.002>.
- [219] Thermo Fisher Scientific, Ion AmpliSeq Community Panels for Human Identification. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/forensics/human-identification/forensic-dna-analysis/dna-analysis/next-generation-sequencing-ngs-forensics/ion-ampliseq-community-panels.html#bodyfluid> (Zuletzt geprüft am: 8 Februar 2025).

[220] Thermo Fisher Scientific, Ion AmpliSeq HD Panels for Targeted Next-Generation Sequencing. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-select-targets/ion-ampliseq-hd-technology.html> (Zuletzt geprüft am: 8 Februar 2025).

Danksagung

Zuerst und ganz besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Cornelius Courts, der mir als Doktor-Bruder (denn für einen Vater ist man 29 noch zu jung!) die Möglichkeit gegeben hat, dieses hochspannende Forschungsprojekt von der allerersten Minute der Ideenentwicklung über die Hochs und Tiefs der Mittelbeantragung bis zum Projektabschluss mitzugestalten und dabei viele wertvolle wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln. Ich bedanke mich für die immer offene Tür, den konstruktiven Input und viele wissenschaftliche und auch weniger wissenschaftliche (Mittagspausen-)Diskussionen, für die Vielzahl an Möglichkeiten, in weiteren wissenschaftlichen Projekten, auf fachlichen Tagungen sowie durch die Mitwirkung in der Fallarbeit Erfahrungen zu sammeln und neue Kenntnisse zu erwerben und zu guter Letzt natürlich auch für den Einsatz dafür, dass ich all dies in den kommenden Jahren auch weiterhin tun darf.

Weiterhin gilt mein außerordentlicher Dank dem Institut für Rechtsmedizin in Köln und im Besonderen Herrn Prof. Rothschild und Frau Prof. Banaschak für die Möglichkeit der Projektbearbeitung sowie das entgegengebrachte Vertrauen für die Weiteranstellung am Institut.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Manuela Dittmar, die bereits bei der Prüfung zu meiner Masterarbeit Interesse an dem Thema der forensischen Tageszeitschätzung zeigte und erneut bereit war, die Zweitbegutachtung meiner Arbeit zu übernehmen.

Ein großes Dankeschön geht auch an Archana Bhardwaj für ihre Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung des Gesamttranskriptomsequenz-Daten; Amke Caliebe und Sebastian Sendel für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Erstellung des Tageszeitschätzmodells sowie den hilfreichen und freundschaftlichen Austausch über die Projektbearbeitungszeit (und hoffentlich darüber hinaus); und die Teams aus Zürich, Wiesbaden und München für die tolle Zusammenarbeit und viele fröhliche und produktive Online- und zum Glück auch Offline-Treffen.

Weiterhin möchte ich den anonymen, freiwilligen Blut- und Speichelproben-Spendern in allen Projektphasen herzlich für ihre Unterstützung danken!

Ein großer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen aus der Forensischen Molekularbiologie der Rechtsmedizin in Köln, die einen „Immi“ aus dem Norden herzlich aufgenommen und trotz widriger Umstände (mit Krankheiten, kaputten Geräten und einem noch viel kaputteren LIMS) immer ein offenes und freundschaftliches Miteinander bewahrt haben; ein ganz besonderes DANKE (die Allerbesten zum nicht allein sondern kollektiv eskalieren!) geht dabei an meine (Ex-)Doktorandenkollegen Kathrin und Max, mit denen sogar das Ausfüllen der langweiligsten Tabellen Spaß macht.

Ein persönliches Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir ausreichend norddeutsche Pragmatik und Gelassenheit vermittelt haben, um mit verschiedensten Problemen umzugehen und die sich trotz eher geringer Vorkenntnisse im Bereich der Biologie ehrlich für meine Arbeit interessieren. Meinem Mann Eike danke ich für seine liebevolle Unterstützung, Geduld und die unerschütterliche Gewissheit, jemanden an seiner Seite zu haben, der immer da ist, wenn man ihn braucht.