

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

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

**Lebensaltersschätzung anhand der Konzentration von *advanced glycation end products (AGEs)* in Dentin**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Florian Greis

(2018)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Janda

Für meine Mutter

Ursula Maria Greis

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Greis F, Reckert A, Fischer K, Ritz-Timme S (2017) Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation? *International Journal of Legal Medicine*: 1-7

(*Int J Legal Med* DOI [10.1007/s00414-017-1671-x](https://doi.org/10.1007/s00414-017-1671-x))

## Zusammenfassung

Durch eine starke Zunahme grenzüberschreitender Migration gewinnt das Thema „Lebensaltersschätzung“ in der Rechtsmedizin zunehmend an Bedeutung; dies gilt insbesondere für die forensische Altersdiagnostik bei Lebenden. Eine weitere wichtige Indikation für Lebensaltersschätzungen ist die Identifizierung unbekannter Leichen.

Während in der Wachstumsperiode morphologische Veränderungen eine relativ zuverlässige Grundlage für Altersschätzungen bieten, stellen im Erwachsenenalter molekulare Alterungsprozesse eine bessere Basis dar. Eine mittlerweile in der forensischen Praxis etablierte Methode zur molekularen Altersschätzung basiert auf der *in-vivo*-Razemisierung von L-Asparaginsäureresten (*aspartic acid racemization, AAR*) in Wurzeldentin.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung der Frage, ob die Akkumulation von *advanced glycation end products (AGEs)* in Dentin als Basis für die Entwicklung einer weiteren, unabhängigen Altersschätzungsmethode nutzbar ist, die dann als Ergänzung einer Altersschätzung auf Basis der *AAR* an derselben Gewebprobe angewandt werden könnte. Es war zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Pentosidin (eines der am besten beschriebenen *AGEs*) und dem chronologischen Lebensalter besteht, und wenn ja, ob dieser eng genug ist, um als Basis für forensische Altersdiagnostik zu dienen.

Hierzu wurden die Pentosidinkonzentrationen im Wurzeldentin 64 gesunder Zähne von Probanden mit bekanntem Alter bestimmt und der Zusammenhang zwischen den ermittelten Pentosidinkonzentrationen und dem Lebensalter geprüft. Neben gesunden Zähnen wurden kariöse Zähne, Zähne mit pinkfarbener verfärbtem Dentin („*pink teeth*“), Zähne von Personen mit Diabetes mellitus sowie erhitze Zähne untersucht, um mögliche Einflüsse auf die Pentosidinkonzentration in Dentin zu identifizieren. In 23 Fällen wurde neben der Pentosidinkonzentration auch der Razemisierungsgrad von Asparaginsäure (*AAR*) bestimmt.

Die Pentosidinkonzentration in gesundem Wurzeldentin wies eine enge Beziehung zum chronologischen Lebensalter auf ( $r = 0,94$ ). Zwischen dem Razemisierungsgrad von Asparaginsäure in gesundem Wurzeldentin und dem chronologischen Lebensalter bestand eine noch engere Beziehung ( $r = 0,97$ ). Im Dentin der kariösen und erhitzten Zähne sowie der Zähne der Probanden mit Diabetes mellitus wurden teils Pentosidinkonzentrationen festgestellt, die deutlich von den altersentsprechenden Werten des Kollektivs der gesunden Zähne abwichen; für die *AAR* war dies bei den kariösen und erhitzten Zähnen ebenfalls zu beobachten.

Im Hinblick auf die enge Korrelation zwischen den Pentosidinkonzentrationen in gesundem Wurzelentin und dem chronologischen Lebensalter ist festzustellen, dass die Bestimmung der Pentosidinkonzentrationen im Dentin als Grundlage für forensische Altersschätzungen dienen kann. Theoretisch könnte die kombinierte Bestimmung von Pentosidinkonzentration und *AAR* ermöglichen, methodenspezifische Schwächen beider Methoden zu erkennen bzw. auszuschließen. Weil die *AGE*-basierte Methode jedoch, ebenso wie die Altersschätzung aufgrund der *AAR*, empfindlich gegen die Einflüsse von Karies und Hitze ist, ist sie bezüglich dieser Einflüsse kein Mehrgewinn. Darüber hinaus stellt der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Entstehung von *AGEs* eine weitere Limitation dieses methodischen Ansatzes dar. Dennoch bietet die *AGE*-basierte Methode in besonderen Fällen, in denen stark (von erwartbaren Werten) abweichende *AAR*-Messergebnisse vorliegen, eine Möglichkeit der Absicherung (z. B. bei sehr langen Liegezeiten oder im Hinblick auf eine mögliche Zahnverwechslung). Sie könnte möglicherweise auch ein interessantes Indikationsfeld bei der Bearbeitung sehr alter (forensisch nicht mehr relevanter, aber anthropologisch interessanter) Skelettfunde finden.

## Abstract

Forensic age estimation gains in importance; especially age estimation of living persons becomes more important due to an increasing number of migrations. In addition, the identification of unknown deceased is another indication of age estimation.

During the growth period of human individuals, morphological changes are a reliable basis for age estimation; in adulthood, molecular changes of aging are a promising approach. One already established method of molecular age estimation is based on the in-vivo-racemization of L-aspartic acid (aspartic acid racemization, AAR) in root dentine.

Our aim was to examine, if the accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in dentine may be a useful approach for the development of another independent method of age estimation; such a new method might complement the method based on AAR using the same tissue sample. Therefore we examined, if there is a correlation between the concentration of pentosidine (one of the best known AGEs) in dentine and chronological age and, if so, if it is close enough to be used as basis for forensic age estimation.

For this purpose, the concentration of pentosidine in root dentine of 64 healthy teeth of known age was determined; then the relationship between the determined concentrations and chronological age was examined. Besides healthy teeth, also carious teeth, teeth with pink coloured dentine ("pink teeth"), teeth of patients with diabetes mellitus and heated teeth were investigated to identify a potential influence on the pentosidine concentration in dentine. In 23 cases, the extent of AAR was determined in parallel.

A strong correlation between the pentosidine concentration in healthy root dentine and chronological age was observed ( $r = 0.94$ ). The correlation between the extent of AAR and chronological age was even stronger ( $r = 0.97$ ). Pentosidine concentrations in dentine of carious and heated teeth and of teeth of patients with diabetes mellitus partly deviated considerably from concentrations in healthy samples of the same age. AAR values also differed in carious and heated teeth.

Due to the strong correlation between the pentosidine concentration in healthy root dentine and chronological age, the determination of the pentosidine concentration may serve as basis for forensic age estimation. In theory, the combined determination of pentosidine concentration and AAR values could enable to identify/rule out relevant effects of confounding factors of both methods. But since both the AGE based and the AAR based method are influenced by caries and heat, the combination has no benefit with regard to these two

confounding factors. In addition, the influence of diabetes mellitus on the production of AGEs is another limitation of AGE based age estimation. Nevertheless, the new method provides a possibility of hedging, when considerably deviating AAR values (from expectable values) are measured (e.g. after long storage periods or in cases of tooth mix ups). Furthermore, the approach might get relevance in cases with very long post mortem intervals (no forensic, but anthropological fields of indication).

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AAR</b>	<i>aspartic acid racemization</i>
<b>AGE</b>	<i>advanced glycation end product</i>
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>C</b>	Kohlenstoff
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>CEL</b>	N-Carboxyethyllysin
<b>CML</b>	N-Carboxymethyllysin
<b>CpG</b>	Desoxycytidin/Phosphorsäure/Desoxyguanosin
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>GC-MS</b>	<i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
<b>Gew.%</b>	Gewichtsprozent
<b>H</b>	Wasserstoff
<b>h</b>	<i>hour</i>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HDL</b>	<i>high density lipoprotein</i>
<b>HFBA</b>	<i>heptafluorobutyric acid</i>
<b>HPA</b>	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i>
<b>ICDAS</b>	<i>international caries detection and assessment system</i>
<b>kN</b>	Kilonewton
<b>LC-MS</b>	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
<b>LDL</b>	<i>low density lipoprotein</i>
<b>ln</b>	natürlicher Logarithmus

<b>LU*s</b>	<i>luminescence units * seconds</i>
<b>M</b>	molare Masse
<b>MALDI-TOF</b>	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>μmol</b>	Mikromol
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>min</b>	<i>minute</i>
<b>N</b>	Normalität, Äquivalentkonzentration
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniak
<b>nm</b>	Nanometer
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>r</b>	Korrelationskoeffizient
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>Vol.</b>	Alkohol-Volumenprozent
<b>w/w</b>	<i>weight per weight</i>
<b>yr(s)</b>	<i>year(s)</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Forensische Lebensaltersschätzung: Indikationsfelder .....	1
1.2	Anforderungen an Methoden zur Lebensaltersschätzung .....	2
1.3	Methoden zur Lebensaltersschätzung auf morphologischer Ebene .....	2
1.3.1	Kinder .....	3
1.3.2	Jugendliche.....	3
1.3.3	Erwachsene .....	3
1.4	Methoden zur Lebensaltersschätzung auf molekularer Ebene .....	3
1.4.1	DNA-Veränderungen.....	4
1.4.2	Posttranslationale Proteinmodifikationen.....	5
1.5	Zielsetzung .....	8
<b>2</b>	<b>Methodenentwicklung und Vorversuche</b> .....	<b>10</b>
2.1	Probenaufbereitung.....	10
2.2	Externer und interner Standard .....	11
2.3	Einstellen von Parametern.....	12
2.4	Reproduzierbarkeit .....	13
<b>3</b>	<b>Publikation</b>	
	<i>Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation?</i> <i>Greis F, Reckert A, Fischer K, Ritz-Timme S, International Journal of Legal Medicine: 1-7</i> <i>(2017)</i> .....	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>17</b>
4.1	Biologische Folgen einer Akkumulation von AGEs in menschlichen Geweben? .....	17
4.2	Wie ist der Befund der Akkumulation von Pentosidin in weitere Erkenntnisse der Altersforschung einzuordnen?.....	18
4.3	Akkumulation von Pentosidin/AGEs in Dentin: Nutzbarkeit für Lebensaltersschätzungen.....	22

4.4	Schlussfolgerungen .....	24
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>31</b>
6.1	Tabelle 1: Messwerte für die Pentosidin-Kalibrationsgerade.....	31
6.2	Tabellen 2a - 2c: Gemessene Pentosidinkonzentrationen über den externen und den internen Standard .....	32
6.3	Tabelle 3: Gemessene AAR-Werte und gemäß Ritz-Timme (1999) errechnetes Alter ... ..	35

# 1 Einleitung

## 1.1 Forensische Lebensaltersschätzung: Indikationsfelder

### Fallbeispiele:

- Die unbekannte Leiche einer erwachsenen Frau wurde gefunden; die Ermittlungen der Kriminalpolizei geraten ins Stocken, weil die Identität der Verstorbenen unklar ist.
- M. Y. hält sich illegal in Deutschland auf und hat eine Straftat begangen. Er gibt an, 16 Jahre alt zu sein; die Polizei schätzt sein Alter auf über 21 Jahre.
- Y. T. wurde vor 30 Jahren Asyl gewährt, nachdem er illegal und ohne Papiere nach Deutschland gekommen war. Heute möchte er Rentenansprüche geltend machen. Hierfür gibt er ein zehn Jahre früheres Geburtsdatum an als bei seiner Einreise.
- Das Jugendamt äußert Zweifel an der Minderjährigkeit von S. N., der unbegleitet als minderjähriger Flüchtling nach Deutschland kam.

Traditionell spielen Altersschätzungen in der forensischen Praxis bei der Untersuchung unbekannter Leichen und Skelette eine wichtige Rolle [1]. Durch Eingrenzung des erreichten Lebensalters dienen Altersschätzungen der Identifizierung Verstorbener nach Naturkatastrophen, Massenunfällen und Verbrechen [2]. Laut Bundeskriminalamt waren im März 2018 1.328 unbekannte Leichen in Deutschland registriert (Stand 07.03.2018, siehe Literatur- und Quellenverzeichnis).

Altersschätzungen können auch an lebenden Personen erforderlich sein, wenn rechtlich relevante Altersgrenzen beachtet werden müssen, z. B. im Kontext der Frage der Strafmündigkeit junger Straftäter, der Klärung von Rentenansprüchen ausländischer Bürger oder der Schätzung des Alters jugendlicher Asylbewerber [3]. Gesetzlich festgelegte Altersgrenzen in Deutschland sind z. B. 14 Jahre (Schuldunfähigkeit des Kindes, §19 Strafgesetzbuch [4]), 14, 18 und 21 Jahre (Anwendbarkeit des Jugendstrafrechts, §1(2) Jugendgerichtsgesetz [5]), 65/66 Jahre (Regelaltersrente, §235 Sozialgesetzbuch VI [6]), 18 Jahre (Handlungsfähigkeit im Asylverfahren, §12 Asylgesetz [7]), 21 Jahre (Aufenthaltsgewährung bei gut integrierten Jugendlichen und Heranwachsenden, §25a Aufenthaltsgesetz [8]), 18 Jahre (Familiennachzug zu Deutschen, §28 Aufenthaltsgesetz [9]) sowie 16 und 18 Jahre (Kindernachzug, §32 Aufenthaltsgesetz [10]).

In den deutschsprachigen und in anderen europäischen Ländern war in den letzten zwei Jahrzehnten ein erheblicher Anstieg der Fallzahlen in der forensischen Altersdiagnostik bei

Lebenden zu verzeichnen [1]. In Zeiten zunehmender Migrations- und Fluchtbewegungen stellt sich die Frage nach dem Lebensalter nicht selten, da Geflüchteten oft entsprechende Geburtsnachweise fehlen [11]. So ist der Anstieg der Fallzahlen größtenteils auf die Zunahme grenzüberschreitender Migrationen sowie die Entwicklung der Kinder- und Jugendkriminalität zurückzuführen [1]. Das Bundesamt für Migration und Flüchtlinge spricht von einem stetigen Anstieg der Zuzüge ausländischer Staatsbürger seit dem Jahr 2006. Während im Jahr 2007 574.752 Zuzüge nach Deutschland zu verzeichnen waren, stieg die Zahl im Jahr 2015 auf rund 2,02 Millionen. Dies entspricht einem Zuwachs von 251 %. Verursacht wird diese Entwicklung von Ereignissen in Krisengebieten wie Syrien, dem Hauptherkunftsland Schutzsuchender im Jahr 2015. Die Zahl zuziehender Syrer betrug 2015 326.900 und wuchs im Vergleich zum Vorjahr (2014: 65.000) um 403 % (Migrationsbericht 2015) [12].

### **1.2 Anforderungen an Methoden zur Lebensaltersschätzung**

Das Spektrum der in der Literatur vorgeschlagenen Untersuchungsmethoden zur forensischen Lebensaltersschätzung ist groß. Die richtige Wahl hängt u. a. von der Indikation und dem Lebensabschnitt (Kind/Erwachsener) der betroffenen Person ab. Aufgrund potentiell signifikanter rechtlicher und sozialer Auswirkungen für einzelne Personen und im Hinblick auf Rechtssicherheit und Verteilungsgerechtigkeit sollten Methoden zur Lebensaltersschätzung laut Ritz-Timme et al. [13] folgende Anforderungen erfüllen: Sie sollten (1) in einer wissenschaftlichen Zeitschrift (i.d.R. in einem renommierten Journal) veröffentlicht sein, (2) über klare Angaben zur Genauigkeit/Zuverlässigkeit der Altersschätzung verfügen, (3) präzise Ergebnisse erzielen und (4) zur Anwendung an Lebenden ethischen und rechtlichen Grundsätzen entsprechen (vgl. dazu auch die aktuelle Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin zum Einsatz epigenetischer Verfahren zur Altersschätzung bei jungen Migranten ohne valide Personaldokumente [14]).

### **1.3 Methoden zur Lebensaltersschätzung auf morphologischer Ebene**

Bei Kindern, Jugendlichen und jüngeren Erwachsenen bieten die morphologischen Veränderungen in der Wachstumsperiode eine relativ zuverlässige Grundlage zur Lebensaltersschätzung.

### **1.3.1 Kinder**

Im Kindesalter (Lebensalter unter 14 Jahren) stellt die radiologische Erfassung der Skelett- und Gebissentwicklung die zuverlässigste Methode dar (95 %-Vertrauensintervalle von +/- < 2 Jahren) [3].

### **1.3.2 Jugendliche**

Zum Ende der Wachstumsperiode (ca. 17-21 Jahre) nimmt die Genauigkeit morphologischer Verfahren ab [3]. Hier können neben der körperlichen Untersuchung Röntgenaufnahmen der Hände und der Kiefer sowie eine Dünnschicht-Computertomographie der Claviculae als Grundlage dienen. Voraussetzung für die Untersuchung Lebender ist dabei eine rechtliche Legitimierung der Durchführung von Röntgenuntersuchungen ohne medizinische Indikation. Zur Verbesserung der Präzision werden verschiedene Verfahren kombiniert angewandt [15].

### **1.3.3 Erwachsene**

Im Erwachsenenalter (nach Abschluss der Wachstumsperiode) sind morphologische Verfahren zur Lebensaltersschätzung vergleichsweise unzuverlässig. Eine gute Basis können hier Röntgenaufnahmen bieten, die bereits während der Wachstumsperiode angefertigt wurden (im Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter) [1]. Methoden auf Grundlage morphologischer Zahnmerkmale oder der Anzahl der Zuwachsringe im Zahnzement sind sehr ungenau. Laut Ritz-Timme [3] ist hier von 95 %-Vertrauensintervallen von +/- 10-24 Jahren auszugehen. An der Leiche bieten histo- und makromorphologische Knochenmerkmale eine zusätzliche Grundlage für Altersschätzungen im Erwachsenenalter. Hier ist die Zuverlässigkeit aber ebenfalls eher gering. Ein grundlegendes Problem morphologischer Verfahren ist, dass das biologische und nicht das juristisch relevante chronologische Alter ermittelt wird. Die Differenz dieser beiden Größen nimmt mit steigendem Lebensalter zu und ist bei Altersschätzungen auf morphologischer Ebene vergleichsweise groß [3].

## **1.4 Methoden zur Lebensaltersschätzung auf molekularer Ebene**

Vielversprechende Grundlagen für Lebensaltersschätzungen im Erwachsenenalter bieten Alterungsprozesse auf biochemisch-molekularer Ebene. Der „physiologische“ Alterungsprozess führt zu zahlreichen molekularen Veränderungen in Geweben und Organen. Ursache und/oder Konsequenz dieser Veränderungen sind „molekulare Uhren“ im menschlichen Organismus – molekulare Veränderungen, die mit zunehmendem Lebensalter akkumulieren. Besonders

interessante Ansätze für die Entwicklung von Verfahren zur Altersschätzung bieten in diesem Zusammenhang Veränderungen der *DNA* sowie posttranslationale Proteinmodifikationen [16].

#### **1.4.1 DNA-Veränderungen**

In der Vergangenheit wurden verschiedene molekulare Mechanismen, die auf *DNA*-Veränderungen basieren, im Hinblick auf die Nutzung zur Altersschätzung untersucht:

- (1) Ein Mechanismus basiert auf der Akkumulation von 4.977-bp-Gendeletionen mitochondrialer *DNA*, die durch hoch reaktive freie Radikale verursacht werden [16]. Aufgrund ihres häufigen Auftretens wird diese typischerweise 4.977 Basenpaare umfassende Deletion „*common deletion*“ genannt. Verschiedene Studien haben einen Zusammenhang zwischen der Anzahl dieser „*common deletions*“ und dem Lebensalter in verschiedenen Geweben nachgewiesen, z. B. im *Musculus iliopsoas* [17,18], in der Vorderwand des linken Ventrikels und in der *Substantia nigra* [19].
- (2) Ein zweiter Ansatz basiert auf der Länge von Telomeren – stabilisierenden Strukturelementen am Ende von linearen Chromosomen. Aufgrund des „Endreplikationsproblems“ der *DNA*-Polymerase kommt es bei jeder Zellteilung zu einer Kürzung der Telomere [16]. Das „Endreplikationsproblem“ entsteht durch die Eigenschaft der *DNA*-Polymerase, einen *DNA*-Tochterstrang nur in 5′-3′-Richtung und nur von einem *RNA*-Primer ausgehend synthetisieren zu können. Weil bei einer Replikation stets ein *RNA*-Primer die randständigen Basen am 5′-Ende des Tochterstrangs besetzt, wird dieser Teil nicht repliziert und das Telomer an dieser Stelle gekürzt [20]. Forensische Untersuchungen haben einen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Telomerlänge und dem Lebensalter gezeigt, z. B. in getrockneten Blutspuren [21] und in der Zahnpulpa [22].

Allerdings war der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß dieser Veränderungen und dem chronologischen Lebensalter zu gering, um Basis zuverlässiger Verfahren zur Altersschätzung zu werden [23]. Eine vielversprechendere Grundlage könnte hier ein dritter molekularer Mechanismus bieten, der aktuell stark beforscht wird [23-29]:

- (3) Die *DNA*-Methylierung, eine epigenetische Modifikation, spielt offenbar u. a. eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Alterungsprozessen. Während der Ontogenese eines Säugetiers wird 5-Methylcytosin in CpG-Dinukleotide (= *CpG-sites*: Zusammenschluss von zwei Nukleotiden mit den Nukleobasen Cytosin und Guanin) innerhalb der *DNA* eingebaut und kann während der Zellteilung durch die *DNA*-Methyltransferase repliziert werden. Die Aktivität dieses Enzyms lässt jedoch im Laufe

des Lebens nach, was generell zu einem Rückgang der *DNA*-Methylierung führt. Einige mit spezifischen Genen assoziierte Genloci bilden eine Ausnahme. Hier unterliegen viele *CpG-sites* einer altersabhängigen Hypermethylierung [23]. Freire-Aradas et al. [30] beschrieben die Entdeckung des Zusammenhanges zwischen *DNA*-Methylierungsgrad und Alter als Wendepunkt für Ansätze zur molekularen Altersschätzung. Durch einen deutlichen Anstieg von Publikationen zu altersabhängiger *DNA*-Methylierung in den letzten Jahren ist bereits ein beachtliches Spektrum von Methoden für forensische Lebensaltersschätzung vorgeschlagen worden. Die meisten dieser Verfahren basieren auf der Untersuchung von *DNA* aus Blut [30]. Horvath [25] untersuchte den Methylierungsgrad an 353 *CpG-sites* vieler verschiedener Gewebe und fand ebenfalls einen relativ engen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad in verschiedensten Geweben und dem Alter. Auch in Zahnmaterial wurde schon ein enger Zusammenhang beobachtet (Zement, Dentin, Pulpa,  $r = 0,97$ ) [24]. Allerdings sind noch viele Fragen zur Genauigkeit der Methoden unter forensischen Fragestellungen und zu möglichen Einflussfaktoren offen. So könnten Faktoren wie der Konsum von Zigaretten und Alkohol [26] oder Krankheiten (z. B. Krebserkrankungen [25]) einen Einfluss auf die *DNA*-Methylierung haben. Um das offenbar hohe Potential des methodischen Ansatzes für die forensische Altersdiagnostik nutzen zu können, bedarf es deshalb weiterer, umfangreicher und systematischer Untersuchungen, bevor entsprechende Verfahren unter forensischen Fragestellungen in Deutschland eingesetzt werden können (vgl. dazu die aktuelle Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin [14]) [30].

#### **1.4.2 Posttranslationale Proteinmodifikationen**

In der vorgelegten Arbeit stehen posttranslationale Proteinmodifikationen als Grundlage einer biochemisch-molekularen Altersschätzung im Vordergrund:

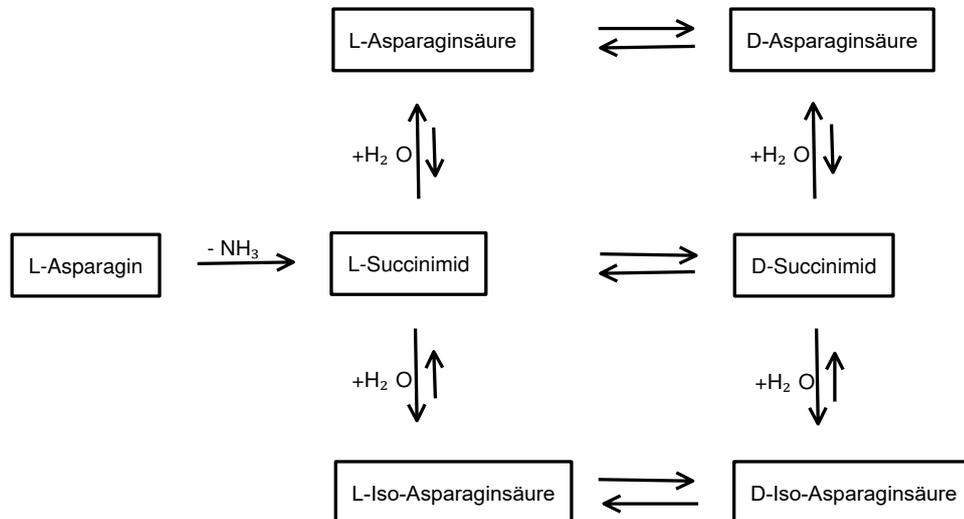
- (1) Eine der genauesten etablierten Altersschätzungsmethoden im Erwachsenenalter überhaupt basiert auf der ***in-vivo*-Razemisierung von L-Asparaginsäureresten (AAR)** in Wurzel dentin. Aufgrund ihrer Präzision und Praktikabilität gilt diese als Standardmethode biochemisch-molekularer Altersschätzung [3,13].

Die Methode nutzt folgenden Hintergrund: Aminosäuren sind durch (mindestens) eine Aminogruppe und (mindestens) eine Carboxygruppe gekennzeichnet. Bei den 20 proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren steht die Aminogruppe stets in  $\alpha$ -Stellung zur Carboxygruppe (bindet also am benachbarten C-Atom). Bei der einfachsten

Aminosäure (Glycin) sind am  $\alpha$ -C-Atom außerdem zwei Wasserstoff-Atome gebunden; bei allen anderen Aminosäuren binden hier ein Wasserstoff-Atom und eine verzweigte oder unverzweigte Kohlenstoff-Kette. Das  $\alpha$ -C-Atom trägt dann vier unterschiedliche Substituenten und bildet dadurch ein Asymmetriezentrum. Deshalb liegen  $\alpha$ -Aminosäuren als Enantiomere (Spiegelbildisomere mit einem Chiralitätszentrum) vor. D- und L-Enantiomere sind „spiegelbildlich“ strukturiert und können nicht zur Deckung gebracht werden. Sie weisen dennoch nahezu identische chemische Eigenschaften auf. D-Enantiomere besitzen in der Fischer-Projektion eine rechtsständige und L-Enantiomere eine linksständige Aminogruppe [31].

Der Körper verwendet zur Protein-Biosynthese fast ausschließlich L-Aminosäuren. Im Laufe des Lebens können diese L-Aminosäuren spontanen Modifikationen wie Razemisierung, Isomerisierung und Deamidierung unterliegen. Innerhalb der Aminosäuresequenz von Proteinen sind Asparagin und Asparaginsäure hierfür besonders anfällig. An diesen „Hot-Spots“ kommt es im Zuge der „physiologischen Alterung“ zur irreversiblen Bildung eines metastabilen L-D-Succinimid-Intermediats. Aus dem L-Succinimid kann durch Hydrolyse L-Asparaginsäure bzw. L-Iso-Asparaginsäure hervorgehen. Aus dem D-Succinimid kann dementsprechend D-Asparaginsäure und D-Iso-Asparaginsäure entstehen (Abb. 1) [32,33]. Durch diese spontanen Modifikationen kommt es in Proteinen zu einer altersabhängigen Akkumulation von D-Asparaginsäureresten. Der Umfang dieses biochemischen Alterungsprozesses hängt zum einen von der physikochemischen Umgebung ab. Diese ist in menschlichen Proteinen intravital weitgehend konstant, weil z. B. größere Schwankungen der Körpertemperatur oder des pH-Wertes nicht mit dem Leben vereinbar wären. Zum anderen ist auch die Lebenszeit der Proteine entscheidend. In Proteinen mit kurzer Lebensdauer besteht meist kein Zusammenhang zwischen dem Razemisierungsgrad der Asparaginsäure und dem Proteinalter. Durch den hohen „Turnover“ werden diese Proteine meist abgebaut, bevor es zu einer Akkumulation von D-Asparaginsäureresten kommen kann. In langlebigen und permanenten Proteinen (geringer/kein „Turnover“) dagegen ist der Zusammenhang sehr eng [3] und wurde bereits in einer Vielzahl von Geweben untersucht, wie z. B. in Dentin [34-37], Zahnschmelz [37], Zahnwurzelzement [38,39], der Bandscheibe [40], Rippenknorpel [41], nicht-kollagenen Proteinen aus Knochen [42], Elastin [43-45], Alveolarknochen [46] und Oberschenkelknochen [47]. Hier wurden fast ausschließlich Korrelationskoeffizienten zwischen  $r = 0,9$  und  $r = 0,997$  beschrieben, was einen sehr

engen Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und der Akkumulation veränderter Aminosäurereste belegt.



**Abb. 1: Posttranslationale Modifikationen von Asparagin- und Asparaginsäureresten** (modifiziert nach Geiger und Clarke [32]). Bildung von instabilem L-Succinimid durch Deamidierung von L-Asparagin. L-Succinimid kann sich durch Hydrolyse in L-Asparaginsäure bzw. L-Iso-Asparaginsäure und durch spontane Razemisierung in D-Succinimid umwandeln. Entsprechend kann aus D-Succinimid D-Asparaginsäure bzw. D-Iso-Asparaginsäure entstehen. L- und D-Asparaginsäure können zu L-Iso- bzw. D-Iso-Asparaginsäure isomerisiert werden

- (2) **Advanced glycation end products (AGEs)**, eine heterogene und komplexe Substanzgruppe, stellen ein weiteres Beispiel für posttranslationale Proteinmodifikationen dar. Sie werden über die sogenannte Maillard-Reaktion gebildet, einer irreversiblen nicht-enzymatischen Reaktion von reduzierenden Kohlenhydraten mit freien Aminosäuren von Proteinen, Fetten oder Nukleinsäuren [16]. In der Lebensmittelindustrie ist diese Reaktion als Bräunungsreaktion bekannt. Diese wird durch Erhitzen ausgelöst und ist hier für Eigenschaften wie Farbe, Aroma und Geschmack verantwortlich. Durch reversible Bindung einer Carbonylgruppe an eine Aminogruppe und anschließende Wasserabspaltung entsteht eine Schiffsche Base. Diese initiale Reaktion findet vornehmlich an den Aminosäuren Lysin und Arginin statt. Aus den relativ instabilen Schiffschen Basen entstehen durch irreversible Umlagerung stabilere Ketoamine, die Amadori-Produkte. Weitere Umlagerungen, Oxidationen und Eliminationen führen schließlich via Dicarboxyl-Intermediaten zur Bildung der AGEs (Abb. 2). Die Substanzgruppe der AGEs kann in drei Klassen unterteilt werden:

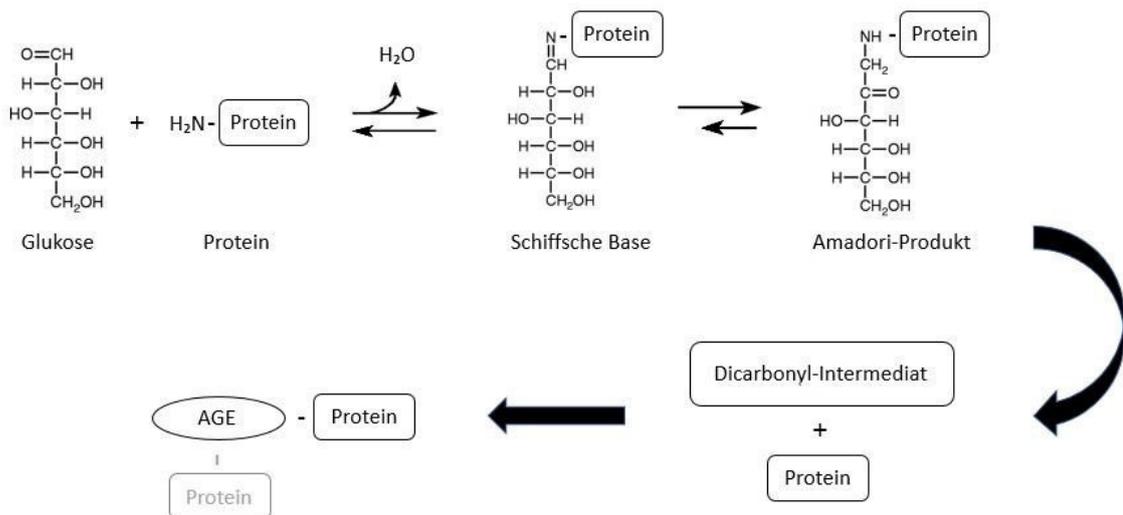
(1) fluoreszierende, (protein-) vernetzende AGEs,

(Das in unserer Studie untersuchte AGE Pentosidin vernetzt Proteine zwischen freien Aminogruppen von Lysin und Arginin.)

(2) nicht fluoreszierende, vernetzende AGEs und

(3) nicht vernetzende AGEs (z. B. N-Carboxymethyllysin (CML), Pyrralin) [48-50].

Es kann davon ausgegangen werden, dass AGEs im Laufe des Lebens – wie D-Asparaginsäurereste – in den Proteinen akkumulieren, die sehr langlebig sind. In verschiedenen Geweben wurde bereits nachgewiesen, dass die Konzentration von AGEs in langlebigen und permanenten Proteinen mit dem Lebensalter zunimmt, wie z. B. in Dentin [51], der Augenlinse [52], Gelenkknorpel ( $r = 0,88$ ) [53], Rippenknorpel ( $r = 0,9$ ), der Bandscheibe ( $r = 0,8$ ) [54], Kollagen und der Haut ( $r = 0,89$ ) [55].



**Abb. 2: Glykierung eines Proteins durch Glukose und anschließende Bildung von AGEs** (modifiziert nach Ahmed [49]). Die initiale Reaktion zwischen Glukose und einer Aminogruppe bildet eine reversible Schiffsche Base. Aus dieser entsteht ein Ketoamin (Amadori-Produkt). Aus Amadori-Produkten entstehen via Dicarboxyl-Intermediaten AGEs (verknüpft mit einem oder mehreren Proteinen)

### 1.5 Zielsetzung

Neben der Razemisierung von Asparaginsäure könnten AGEs eine weitere Grundlage für die Entwicklung molekularer Methoden zur forensischen Lebensaltersschätzung im Erwachsenenalter darstellen. Pilin et al. [54] nahmen bereits an, dass durch AGEs verursachte Farbveränderungen von Rippenknorpel ein interessanter Ansatz für Altersschätzungen sein

könnten. Miura et al. [51] beschrieben eine Akkumulation von *AGEs* in Dentin und leiteten daraus einen möglichen Nutzen für die forensische Altersschätzung ab. In jener Studie ging es jedoch primär um die Frage, ob *AGEs* generell in Dentin akkumulieren und ob diese einen Einfluss auf die Physiologie des Dentins haben. Bisher ist ungeklärt, ob der Zusammenhang zwischen der Konzentration von *AGEs* in Dentin und dem Lebensalter eng genug ist, um präzise Lebensaltersschätzung zu ermöglichen.

Deshalb haben wir untersucht,

- (1) ob das fluoreszierende *AGE* Pentosidin in Wurzel dentin zuverlässig detektiert und quantifiziert werden kann,
- (2) ob ein Zusammenhang zwischen der Pentosidinkonzentration in Wurzel dentin und dem chronologischen Lebensalter besteht,
- (3) ob dieser Zusammenhang eng genug ist, um in der forensischen Altersschätzung eingesetzt zu werden und
- (4) ob eine kombinierte Altersschätzung auf Basis von Asparaginsäure und Pentosidin ein sinnvoller Ansatz für die Weiterentwicklung des diagnostischen Repertoires für Altersschätzungen ist.

Für die durchgeführten Versuche lag ein positives Ethikvotum vor (Studennummer: 5.699, 16.11.2016).

## 2 Methodenentwicklung und Vorversuche

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode zur Lebensaltersschätzung entwickelt werden, die auf der Akkumulation von Pentosidin in Wurzeldentin basiert und mit der üblichen technischen Ausstattung forensischer Labore durchführbar ist.

In der Vergangenheit wurden *AGEs* über viele unterschiedliche Messverfahren detektiert, z. B. mittels

- Enzym-Immuntests (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) [56],
- Immunhistochemie [57],
- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*HPLC*) [58],
- Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (*GC-MS*) [59],
- Fluorimetrie auf Grundlage der autofluoreszierenden Eigenschaften von *AGEs* [60],
- matrixunterstützter Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitanalyse (*MALDI-TOF*) [61] und
- Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (*LC-MS*) [62].

Im Kontext der vorliegenden Arbeit waren die Nutzung der *HPLC* und der *GC-MS* zu bevorzugen – nicht zuletzt, weil die Mehrheit der rechtsmedizinischen Institute die entsprechende technische Ausstattung besitzt [16]. Die in dieser Arbeit etablierte und eingesetzte Methode basiert auf dem von Odetti et al. [63] beschriebenen Verfahren zur chromatographischen Quantifizierung von Pentosidin in Plasma und Erythrozyten mittels *HPLC*. Zur Anwendung dieser Methode an Wurzeldentin bedurfte es einiger Modifizierungen.

Die letztlich eingesetzte Methode wird bei Greis et al. [64] dargestellt. In den folgenden Abschnitten finden sich ergänzende Informationen zur Methodenentwicklung.

### 2.1 Probenaufbereitung

Während Odetti et al. [63] Plasma und Erythrozyten untersuchten, diente uns Wurzeldentin als Grundlage, das gemäß den Aufbereitungsschritten der *AAR*-Methode nach Ritz-Timme [3] präpariert, gewaschen und pulverisiert wurde. Die Einwaage von 50 mg Dentinpulver erwies sich als optimale Probenmenge, um aussagekräftige und gut reproduzierbare Pentosidin-Signale zu erhalten (Abb. 3). Eine Doppelbestimmung wurde standardisiert durchgeführt. 50 mg Dentinpulver stellen einen Bruchteil des aus einer Zahnwurzel gewonnenen Dentins dar,

sodass Material für zusätzliche Untersuchungen zur Verfügung stand (z. B. Altersschätzung auf Basis von AAR).

Odetti et al. [63] haben das eingewogene Material zunächst hydrolysiert (16 Std., 110 °C, in 2 ml 6 N HCl). Anschließend wurden die Proben mittels *Speed-Vac* getrocknet, in 0,01 M HFBA (Heptafluorbuttersäure) gelöst, filtriert und in die HPLC injiziert.

Für Dentin erwies sich eine um 2 Std. längere Hydrolyse (18 Std., 110 °C, in 1 ml 6 N HCl) als optimal. Nach der Hydrolyse wurden die Dentin-Proben ebenfalls getrocknet (mittels Exsikkator). Anschließend wurden die getrockneten Proben in 2 ml 0,01 M HFBA gelöst, filtriert (um unlösliches Material zu entfernen) und nochmals getrocknet. Erst dann wurden die Proben endgültig in 350 µl 0,01 M HFBA aufgenommen, um sie dann mit einem Injektionsvolumen von 50 µl pro Messdurchlauf in die HPLC zu injizieren. Hierdurch wurde gewährleistet, dass das Dentin in ausreichend Flüssigkeit und ohne bedeutenden Substanzverlust filtriert wurde. Das zweite Eintrocknen diente dem Aufkonzentrieren der Probe.

## **2.2 Externer und interner Standard**

Der Pentosidin-Gehalt der Proben wurde parallel über einen externen und einen internen Standard ermittelt (extern: Pentosidin, intern: Pyridoxin). Über beide Standards waren vergleichbare Resultate erzielbar.

Um die Pentosidinkonzentration über den externen Standard zu berechnen, wurde zuvor durch lineare Regression eine Kalibrationsgerade erstellt (Abb. 4). Über die Gleichung dieser Kalibrationsgerade kann mithilfe des Pentosidin-Integrals aus der Messung einer Probe (= x) die entsprechende Konzentration (= y) ermittelt werden. Die ermittelte Regressionsgleichung lautet:

$$y = 0,0014 \cdot x + 0,0016.$$

Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der HPLC-Analytik überprüft, indem der externe Standard (mit bekannter Konzentration) regelmäßig mitgeführt wurde.

Der interne Standard Pyridoxin wurde den Proben mit einer definierten Konzentration von  $c_1 = 2,068815 \mu\text{mol/ml}$  zugegeben. Über das Pyridoxin-Integral (=  $i_1$ ) und das Pentosidin-Integral (=  $i_2$ ) konnte die Pentosidinkonzentration (=  $c_2$ ) ermittelt werden:

$$c_1 = i_1 \text{ und } c_2 = i_2 \quad \rightarrow \quad c_1 \cdot i_2 = i_1 \cdot c_2 \Leftrightarrow c_2 = (c_1 \cdot i_2) / i_1.$$

Die Stabilität des verwendeten Pyridoxins wurde überprüft, indem es in jeder Messesequenz auch als Reinsubstanz in definierter Menge mitgeführt wurde.

Die Quantifizierung mithilfe des internen Standards wies eine etwas größere Streuung auf. Ein möglicher Grund ist, dass hierfür stets zwei Messergebnisse aus der Probe (Pentosidin- und Pyridoxin-Peak) als Grundlage dienten. Zur Berechnung mithilfe des externen Standards wurde nur der Pentosidin-Peak benötigt und das entsprechende Integral in die Kalibrationsgleichung eingesetzt (s. o.). Wenn wir davon ausgehen, dass jede Messung durch zufällige Fehler/zufällige Streuung kleinen Schwankungen unterliegen kann, nimmt die Wahrscheinlichkeit dafür mit steigender Anzahl der Messungen zu. Deshalb war bei der Anwendung unseres Messverfahrens der externe Standard Mittel der Wahl [64].

### **2.3 Einstellen von Parametern**

Durch Variation verschiedener Parameter wurde die *HPLC*-Analytik optimiert, um bestmögliche Reproduzierbarkeit und Intensität der Signale zu erreichen (Abb. 3):

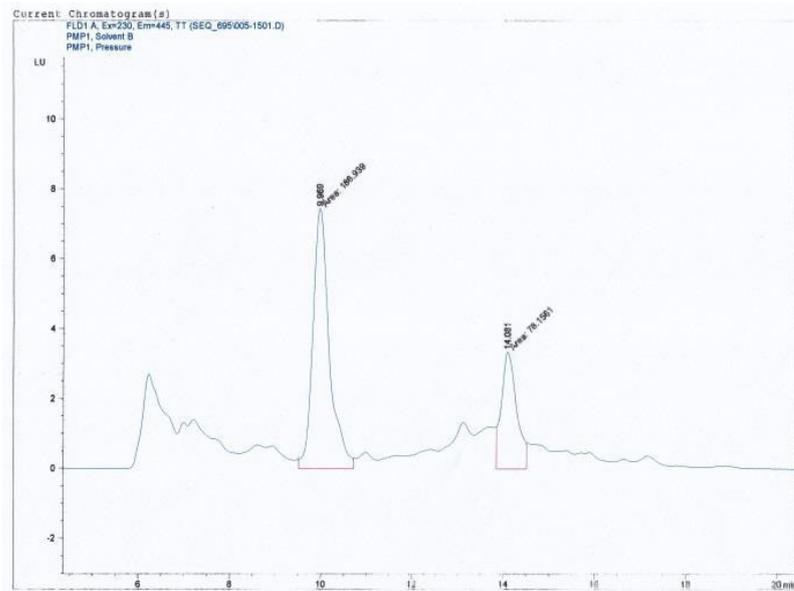
- Der Gradient (Eluent A: 0,1 % HFBA, Eluent B: Acetonitril) musste so eingestellt werden, dass das Pentosidin bzw. das Pyridoxin optimal separiert eluierten. Verschiedene organische und anorganische Bestandteile der Eluenten beeinflussen die Stärke der Wechselwirkungen von Pentosidin und Pyridoxin mit der Säule (HFBA in Eluent A verstärkt z. B. die Haftung von Pentosidin an der Säule).

Der für die Analytik optimale Gradient stellte sich als Stufengradient dar:

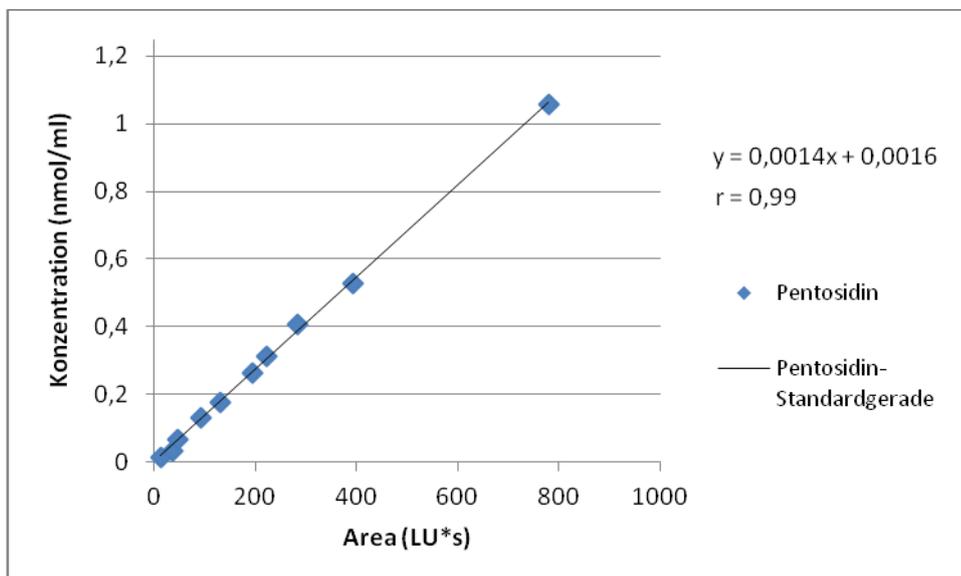
- 1.-32. Min.: linearer Anstieg von 10 % B auf 85 % B
- 33.-40. Min.: 85 % B
- 41. Min.: linearer Rückgang von 85 % B auf 10 % B
- 42.-46. Min.: 10 % B
- Durchflussgeschwindigkeit: 1 ml/min
- Fluoreszenzdetektor: 335 nm/385 nm (Exzitation/Emission)
- Injektionsvolumen: 50 µl
- Säulen-Thermostat: 25 °C

## **2.4 Reproduzierbarkeit**

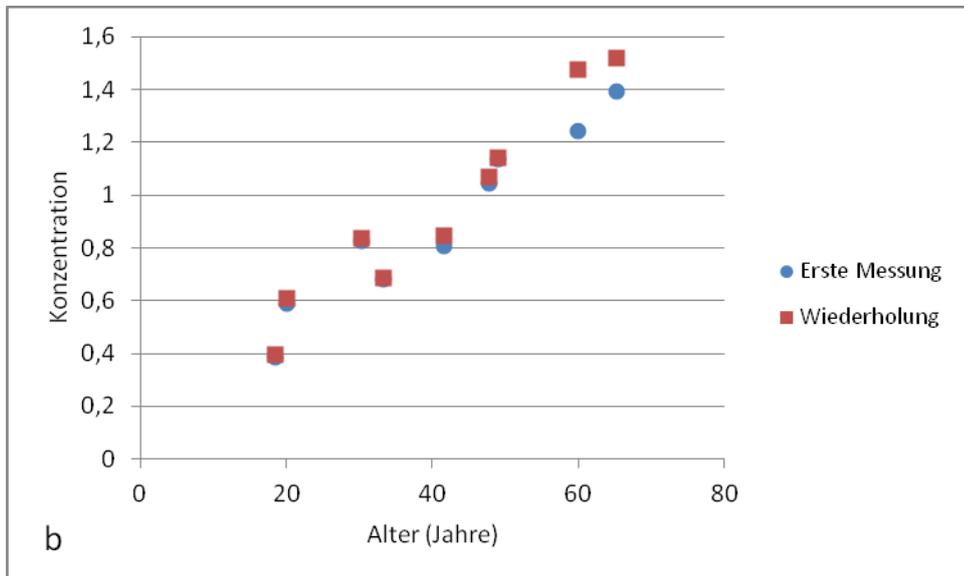
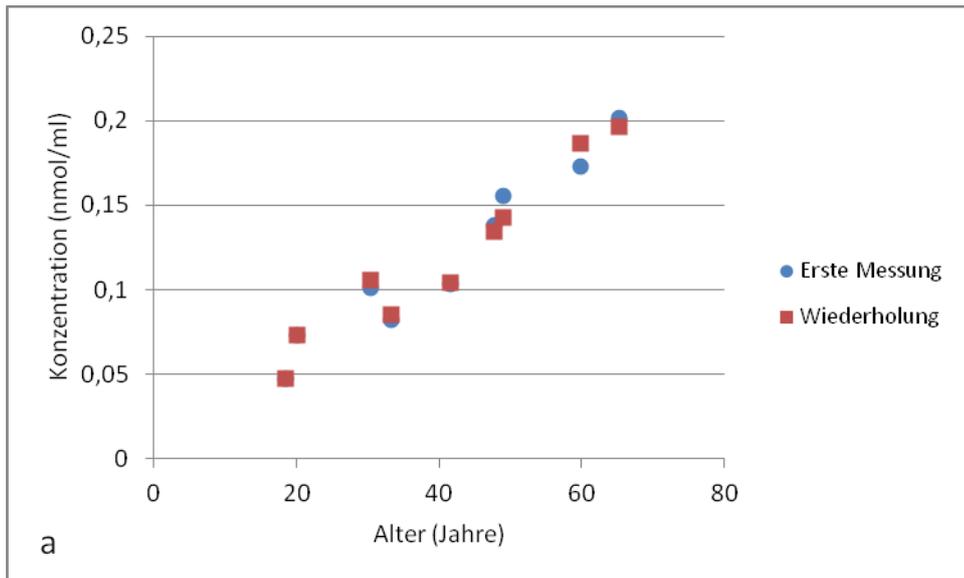
Die Ergebnisse der Messungen mit der entwickelten *HPLC*-Methode waren sehr gut reproduzierbar; Abb. 5 stellt beispielhaft Ergebnisse von Mehrfachmessungen aus unseren Vorversuchen im Vergleich dar.



**Abb. 3: Typisches HPLC-Chromatogramm.** Pyridoxin-Peak (nach ca. 10 Min.) und Pentosidin-Peak (nach ca. 14 Min.), jeweils mit Integration für die Quantifizierung



**Abb. 4: Kalibrationsgerade des externen Standards (Pentosidin)**



**Abb. 5: Pentosidinkonzentration in Wurzeldentin von 9 gesunden Zähnen im Alter von 19 bis 65 Jahren.** Je zweimal aufbereitet und gemessen; (a) über den externen Standard, (b) über den internen Standard

### 3 Publikation

#### **Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation?**

Florian Greis<sup>1\*</sup>, Alexandra Reckert<sup>1</sup>, Katinka Fischer<sup>2</sup>, Stefanie Ritz-Timme<sup>1</sup>

International Journal of Legal Medicine (2017) DOI 10.1007/s00414-017-1671-x

Received: 7 July 2017 / Accepted: 28 August 2017

© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

#### **Abstract**

Ageing of the human organism results in the accumulation of modified molecules. Some of these molecular changes may be used for age estimation, as already shown for aspartic acid racemization (AAR). Another example for an accumulation of damaged molecules is advanced glycation end products (AGEs). We examined, (1) if the correlation between the concentration of AGEs (pentosidine) in root dentine and age is close enough to be used as basis for age estimation, and (2) if the combined analysis of AGEs and AAR in dentine may be a useful approach to rule out or to detect relevant effects of confounding factors in age estimation. We determined the pentosidine content of root dentine samples of 64 healthy teeth as well as in carious, “pink”, diabetic and heated teeth, and in teeth after different storage times. In 23 teeth, the extent of aspartic acid racemization (AAR) was determined in parallel. We observed a close relationship between the concentration of pentosidine in dentine and chronological age ( $r = 0.94$ ) in healthy teeth. The analysis of pentosidine in dentine can theoretically be used as a basis for age estimation in healthy teeth of non-diabetic individuals; diabetic individuals may exhibit very high pentosidine levels in dentine. This finding limits the application of this method, since information regarding the question if an unidentified person suffered from diabetes mellitus or not are missing in most cases. Moreover, the method is not suitable to identify or rule out the influence of confounding factors in age estimation based on AAR, since both methods are sensible to the most relevant confounding factors (caries, heat).

<sup>1</sup>Institute of Legal Medicine, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>2</sup>Institute of Mathematics, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

\* Florian Greis: f.greis.oph@gmail.com

## Keywords

Age estimation - Advanced glycation end products - Pentosidine - Aspartic acid racemization - Root dentine

## Introduction

Ageing of the human organism produces molecular changes that can be used for age estimation. Examples for such changes are DNA methylation and other modifications of DNA, or posttranslational protein modifications as the accumulation of D-aspartic acid residues (aspartic acid racemization, AAR) and advanced glycation end products (AGEs) [1,2].

AGEs, heterogeneous and complex groups of compounds, are generated by the Maillard reaction, an irreversible non-enzymatic reaction of reducing sugars with free amino groups on proteins, lipids or nucleic acids [3]; well investigated AGEs are e.g. pentosidine, N-carboxymethyllysine (CML), pyralline and furosine [4-6]. AGEs accumulate in permanent and long-living proteins during lifetime. This has been demonstrated for pentosidine, CML, N-carboxyethyllysine (CEL) and/or furosine in dentine [7], crystalline lens [8], articular cartilage [9], rib cartilage, intervertebral disc [10] and skin collagen [11].

Rib cartilage and dentine have already been proposed to be used for age estimation based on the accumulation of AGEs. Pilin et al. (2007) suggested that colour changes of rib cartilage caused by AGE accumulation may be useful for age estimation [10]. Miura et al. (2014) compared six caries-free third molars of young (around 20 years) and old (around 70 years) individuals regarding mechanical characteristics, fluorescence spectra and immunohistochemical analyses of demineralized dentine sections. They described an accumulation of CML in old dentine, especially in the collagen fibrils around dentinal tubules; therefore they concluded that the extent of accumulated AGEs in dentinal collagen may be a basis for age estimation. This study was primarily focused on the question, if AGEs are generally formed in dentinal collagen and if there is any possible influence of AGEs on dentinal physiology [7]; it remains unclear, if the relationship between the content of AGEs in dentine and age is close enough to serve as basis for age estimation. Pentosidine, the AGE examined in our study, is a fluorescent AGE that is able to cross-link proteins between free amino groups of lysine and arginine [12].

One of the already established and most precise methods for molecular age estimation is based on AAR in dentine [13]. AAR results in an irreversible and age-dependent accumulation

of D-aspartic acid residues in long-living and permanent proteins during lifetime, which can be used as basis for age estimation. Though this method is very robust, few confounding factors may at least theoretically influence the precision of the method, e.g. protein degradation caused by caries [14,15], contaminating proteins in cases of “pink teeth” [16] and high temperatures in cases of burnt bodies [17]. Relevant effects of such confounding factors in the single case may be ruled out or detected by the combination of age estimation based on AAR in dentine samples with the analysis of the identical samples by another, completely independent method. The additional detection of AGEs may be a possible approach to improve age estimation based on AAR in cases in which confounding factors cannot be excluded. Cabo et al. (2017) already assumed that use of AGEs for age estimation of burnt bodies may have an advantage compared to heat-affected methods, e.g. based on AAR [18].

We examined,

- if the correlation between the concentration of AGEs (pentosidine) in root dentine and chronological age is close enough to be used as basis for age estimation, and
- if the combined analysis of AGEs and AAR in dentine may be a useful approach to rule out or to detect relevant effects of confounding factors in age estimation.

## **Materials and methods**

The contents of pentosidine and D-aspartic acid were determined in root dentine samples of third molars with known ages.

The teeth were extracted by dentists due to medical indications. After extraction, the teeth were washed with water, dried and stored at -20 °C (for up to 8 years). Table 1 gives an overview over the analyses performed.

The crowns of the analysed carious teeth were extensively destroyed (ICDAS-Code 5-6, International Caries Detection and Assessment System); their roots were at most slightly involved. Carious lesions of the roots were removed according to clinical standards; therefore, the samples themselves were caries-free.

The “pink teeth” exhibited the characteristic reddish/pink colour of dentine due to a “contamination” of dentinal tubules with haemoglobin, which obviously resulted from an insufficient washing after the extraction and the subsequent storage of the teeth.

**Table 1** Overview over the analyses performed: numbers, donor ages and storage times of teeth, numbers of analyses. *AGEs* advanced glycation end products, *AAR* aspartic acid racemization

	Numbers of teeth	Donor ages	AGEs (pentosidine), numbers of analyses	AAR, numbers of analyses	Storage time	
					<1 yr	5-8 yrs
Healthy teeth	64	15-65 yrs	64	8	18	50
"Pink teeth"	4	20-36 yrs	4	2		
Teeth with carious lesions	9 (incl. 1 diabetic tooth)	22-58 yrs	9	9		
Heated teeth	4	20-36 yrs	4	4		

### **Heating experiments**

To examine the influence of heat, four third molars were placed in Pyrex tubes with 500 µl double distilled water and heated at 130 °C for 1.5 h using an aluminium heating block (type 51388101, Liebig, Bielefeld).

### **Preparation of root dentine samples**

Root dentine was prepared with water-cooled instruments as described by Ritz-Timme (1999) [13]: After removal of soft tissue, the root was separated from the crown, and the distal third of the root was cut. Cementum was removed and the root canal was cleaned by extirpation of the dental pulp. The quality of preparation was evaluated using ultraviolet light (wavelength of 366 nm).

The prepared roots were washed at 4 °C, successively with each 7 ml 15 % sodium chloride (for 1 h), ethanol/ether (vol. 3:1; for 15 min) and 2 % sodium dodecyl sulphate (for 1 h). Between these steps, the roots were washed with double distilled water. After washing, they were lyophilized for 24 h and stored at -20 °C until further processing.

The lyophilized roots were pulverised by a hydraulic press (Mod. 8, Gr. III, ø 25 mm, P/O/Weber, Remshalden) at 20 kN.

### **Analysis of AGEs (pentosidine)**

Pentosidine concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), basically as described by Odetti et al. (1992) [19].

Dentine samples of 50 mg were transferred into Pyrex tubes and hydrolysed in 1 ml 6 N HCl for 18 h at 110 °C. Samples were dried overnight using a desiccator.

In a next step, samples were dissolved in 1 ml 0.01 M heptafluorobutyric acid (HFBA, Thermo Scientific, Rockford, IL, in HPLC-water, HiPerSolv Chromanorm, VWR International), then filtrated over 0.45- $\mu$ m pore diameter syringe filters ( $\varnothing$  25 mm, VWR International) and dried overnight in a desiccator again.

Dried samples were dissolved in 350  $\mu$ l pyridoxine-HFBA (pyridoxine 2.068815  $\mu$ mol/ml in 0.01 M HFBA). Pentosidine (Cayman Chemical) was used as external standard (pentosidine 0.03303 nmol/ml in 0.01 M HFBA).

Samples were injected into an HPLC system (HPLC 1100 Series, Agilent, CA). Separations were made with a semi-preparative column (Onyx Monolithic, Semi-Prep C18, Phenomenex, CA). A linear gradient program of 10-85 % acetonitrile (LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt) from 0 to 32 min with 0.1 % HFBA as counterion was used. The fluorescence detector was set at an excitation-emission wavelength of 335/385 nm. Pentosidine could be identified by its retention time.

The pentosidine concentrations of 63 analysed healthy teeth of non-diabetic individuals were used to describe the relationship between pentosidine concentration and age by linear regression. One healthy tooth was excluded, because it was identified as a sample with wrong information regarding the donor age (see below). The resulting equation was used for age estimation in carious (incl. diabetic), "pink" and heated teeth; a 95 % prediction interval was calculated for age estimation in healthy teeth [20].

### **Analysis of AAR**

In 23 teeth (8 healthy teeth, 9 carious teeth (incl. the diabetic tooth), 2 "pink" and 4 heated teeth), the extent of AAR was determined by gas chromatography (GC) [13] in parallel to the analysis of pentosidine.

Twenty milligrams of dentine was hydrolysed in 1 ml 6 N HCl at 100 °C for 6 h and then dried overnight in a desiccator. The hydrolysates were esterified with 1 ml isopropanol and 0.1 ml sulfuric acid (97 %, w/w) at 110 °C for 1 h, then dried by a nitrogen stream and alkalinized with 1 ml 4 N ammoniac, extracted with 1 ml dichloromethane and dried by a nitrogen stream again. The samples were acetylated with 0.05 ml trifluoroacetic anhydride in 1 ml dichloromethane at 60 °C for 1 h and dried by a nitrogen stream again.

After derivatization, amino acids were separated by GC (Shimadzu GC-2014, chiral capillary column: Chirasil-L-Val, Varian, CA). The ratio of D- and L-aspartic acid (D/L) was calculated and used for age estimation based on AAR according to Ritz-Timme (1999) [13].

## Results

### AGEs (pentosidine) in dentine

#### *Healthy teeth of non-diabetic individuals*

A close correlation between the concentration of pentosidine in healthy dentine and chronological age was observed ( $r = 0.94$ , Fig. 1a) that could be described by the following equation:

$$\text{age} = 4.342 + 314.445 * \text{pentosidine concentration}$$

A 95 % prediction interval of  $\pm 9.4$  years (for all examined concentrations) was calculated for age estimation.

#### *Carious teeth*

Compared to healthy teeth, the pentosidine levels of dentine samples from caries-affected teeth exhibited a slightly greater scattering (Fig. 1b). Using the equation derived from the data of the healthy teeth for age estimation, deviations of -14 to +9 years from real age were determined for these caries-affected teeth.

#### *Diabetic tooth*

The tooth of the individual with diabetes mellitus exhibited a considerably higher concentration of pentosidine than all other teeth of the same age (Fig. 1b), resulting in a deviation between estimated and real age of +23 years.

#### *"Pink teeth"*

The analysis of samples from three "pink teeth" resulted in age estimates differing between -1 to +2 years from the real ages. One "pink tooth" exhibited a deviation of +6 years between estimated and real age (Fig. 1b).

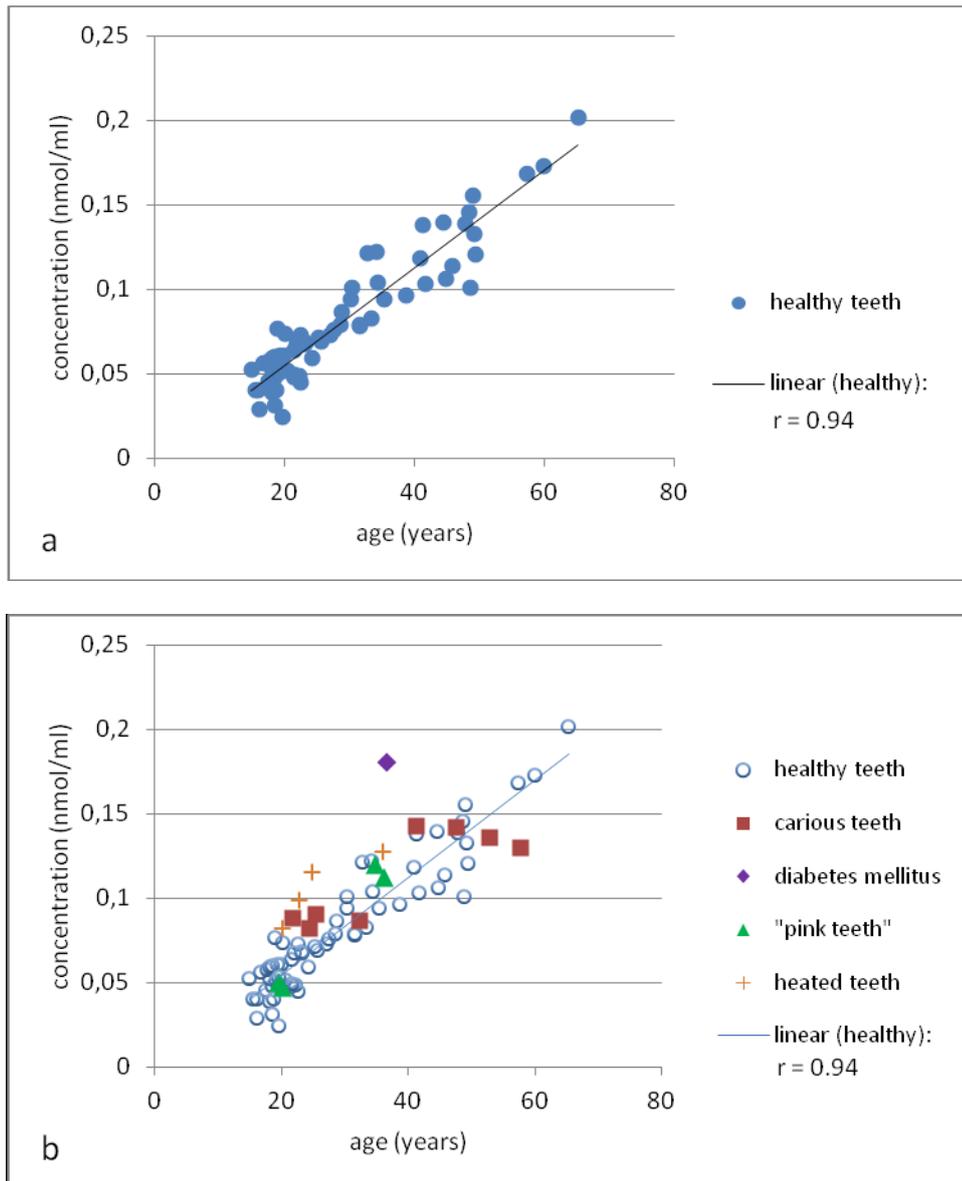
### *Teeth exposed to heat*

After heating, the teeth presented relatively high pentosidine levels (Fig. 1b). The estimated ages deviated +7 to +15 years from real age (only false high age estimates).

### *Different storage times*

There was no hint to a relevant influence of storage times between < 1 year and 5-8 years.

Both the correlation coefficients ( $r = 0.9374/r = 0.9418$ ) and the slopes of the trendlines for the two groups were nearly identical.



**Fig. 1**

**a** Concentration of pentosidine (nmol/ml) in root dentine of 63 healthy teeth from non-diabetic individuals (circle): relatively close correlation between pentosidine levels and ages ( $r = 0.94$ )

**b** Concentration of pentosidine (nmol/ml) in root dentine of teeth bearing the risk of confounding factors for age estimation, as compared to the results for healthy teeth: 9 carious (square) (incl. 1 diabetic (diamond)), 4 "pink" (up-pointing triangle) and 4 heated teeth (plus sign); data for healthy teeth (Figure 1a) and the corresponding regression line (white circle). The 9 caries-affected teeth exhibit a relatively large scattering; especially the one with diabetes mellitus deviates up. The "pink teeth" do not deviate considerably. The heated teeth present a relatively high pentosidine concentration

## **Additional analysis of AAR in selected cases**

### *Healthy teeth of non-diabetic individuals*

Dentine samples from healthy teeth exhibited a close relationship between AAR and age ( $r = 0.97$ , Fig. 2). Using the AAR equation published by Ritz-Timme (1999) [13], the estimated ages deviated -4 to +6 years from the real ages.

### *Carious teeth*

Age estimates based on AAR revealed deviations of +2 to +11 years between estimated age and real age (only false high age estimates).

### *Diabetic tooth*

The diabetic tooth did not reveal a relevant deviation of AAR, as compared to the teeth of the non-diabetic donors (Fig. 2). It exhibited a deviation between estimated and real age of +5 years. This finding contrasts the considerably high concentration of pentosidine (see above).

### *“Pink teeth”*

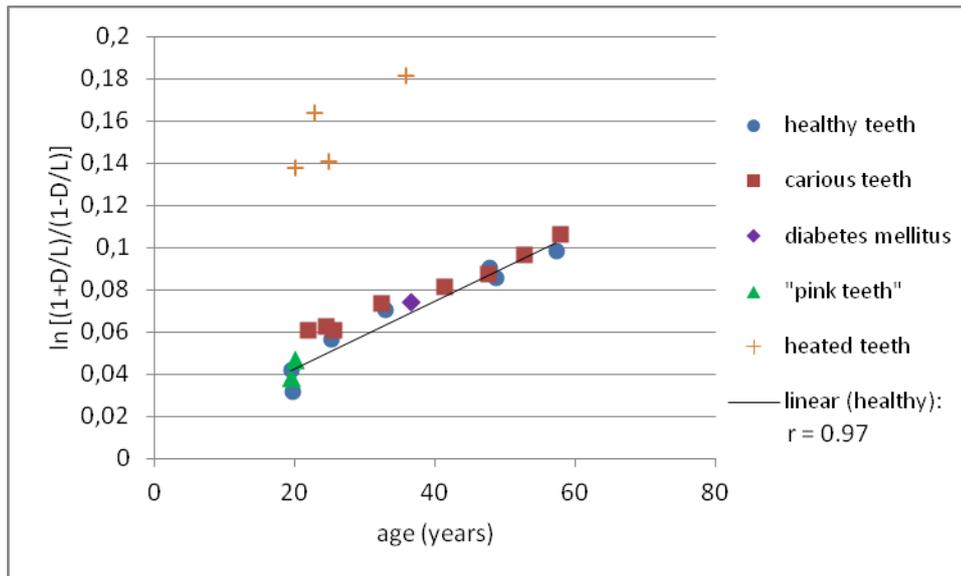
Age estimation based on AAR in samples from “pink teeth” revealed only small deviations (-1 and -3 years between estimated and real ages, Fig. 2).

### *Teeth exposed to heat*

Age estimation based on AAR resulted in deviations of +59 to +75 years between estimated ages and real ages. There was a much higher influence of heat, as compared to age estimation based on the concentration of pentosidine (Figs. 1b and 2).

### *Findings in a case with obviously wrong information about the donor age*

One healthy tooth exhibited an extremely high deviation from the trendline in both (!) methods. The donor age was firstly declared to be 13 years. The sample exhibited a very high D-aspartic acid content as well as a very high pentosidine level, resulting in estimated ages of 46 and 45 years, respectively.



**Fig. 2** Extent of aspartic acid racemization (as  $\ln[(1+D/L)/(1-D/L)]$ ) in root dentine of teeth bearing the risk of confounding factors for age estimation, as compared to the results for healthy teeth: 8 healthy (circle), 9 carious (square) (incl. 1 diabetic (diamond)), 2 "pink" (up-pointing triangle) and 4 heated (plus sign) teeth. There is a relatively close correlation between AAR values and ages. The correlation coefficient for healthy teeth is  $r = 0.97$ . The heated teeth deviate up considerably

## Discussion

### AGEs (pentosidine) accumulate in healthy root dentine of non-diabetic individuals with increasing age

This study was primarily focused on the question, if analysis of AGEs in dentine is an interesting approach for age estimation in forensic case work. Since our study merely aimed at proving the principle, we only used one tooth type (wisdom teeth).

Our results for 63 healthy teeth confirm that there is a strong correlation ( $r = 0.94$ ) between the accumulation of pentosidine in healthy root dentine from non-diabetic individuals and chronological age.

In theory, pentosidine can be used as basis for forensic age estimation using healthy teeth. The results also suggest that storage times of up to 8 years (at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and post-mortem changes in the sense of "pink teeth" do not influence pentosidine levels. The 95 % prediction interval of  $\pm 9.4$  years for age estimation should be treated with caution, since only 63 samples were used to calculate it. In addition, the age distribution of these samples was not uniform; more samples of young ages were examined (mostly 18-25 years, only 3 samples older than 50 years, Fig. 1a).

Even if the prediction intervals for healthy teeth would be suitable for sufficiently precise age estimation, the application of age estimation based on pentosidine levels in dentine to forensic case work may be difficult because of some confounding factors identified by our data.

**Age estimation based on the accumulation of AGEs in dentine may be affected by the confounding factors diabetes mellitus, caries and heat**

The one diabetic tooth in our sample set exhibited (expectedly) a very high pentosidine level (Fig. 1b), which would have resulted in a falsely high age estimate (+23 years). Despite the fact that we could analyse only one diabetic sample (which, in addition, was caries-affected), there is not any doubt about the impact of diabetes mellitus on the results of age estimation based on AGEs. Elevated blood sugar levels in patients with diabetes mellitus cause an increased production of AGEs. Therefore, excessive amounts of AGEs can be detected in many tissues of diabetic individuals [21], such as in skin collagen [11], blood vessel walls and interstitial connective tissue [22]. Undoubtedly, the analysis of samples from individuals with diabetes mellitus can result in false high age estimates. In cases of an unidentified deceased (one of the classical fields with an indication for age estimation) it is – of course – not known, if the deceased suffered from diabetes mellitus or not. This is a relevant limitation for the applicability of age estimation based on AGEs. In contrast, the analysed diabetic tooth did exhibit a “normal” AAR value (Fig. 2).

Compared to healthy teeth, the caries-affected teeth exhibited a slightly greater scattering of their pentosidine values (Fig. 1b). Higher levels of AGEs in caries-affected teeth have already been described and discussed in a clinical context. Kleter et al. (1998) analysed 20 carious third molars and determined higher AGE levels in carious sections than in healthy sections [23]. Armstrong et al. (1964) supposed that the Maillard reaction is responsible for the increased resistance of dentine collagen against collagenolytic breakdown and for browning of carious lesions [24]. We observed a slightly greater scattering of the pentosidine values in the caries-affected teeth though the visible carious lesions had been removed according to clinical standards. This may indicate caries-induced molecular changes even in distant tissue regions that appear clinically unaffected.

The results for the heated teeth indicate a heat-induced increase of the pentosidine concentration (Fig. 1b). This finding could be expected, since high temperatures accelerate the formation of AGEs, which can be observed also during food production and cooking [21]. Thus, the method may result in high deviations between estimated and true age when applied to burnt bodies.

**The combined analysis of AGEs and AAR in dentine samples is a useful approach for molecular age estimation – but only theoretically**

Age estimation based on AAR in dentine is one of the most precise methods for molecular age estimation. The additional analysis of pentosidine in dentine samples could make sense, if relevant effects of confounding factors may be ruled out or detected by this procedure.

There are only few confounding factors that may have an impact on the quality of age estimation based on AAR in dentine. It has been described that the “contamination” of dentinal tubules with haemoglobin in cases with “pink teeth” may have an impact on the results (false low age estimates); this impact may be reduced by adequate washing [16]. In our cases, age estimation with both methods (AGEs and AAR) did not reveal strikingly high deviations between estimated and real ages. However, it must be taken in mind that we did only analyse four and two “pink teeth”, respectively. In forensic practice, the most important confounding factors for age estimation based on AAR are caries [14,15] and heat (in cases of burnt bodies) [17]. According to our results, age estimation based on AGEs cannot provide more precise results than age estimation based on AAR in cases of carious and heated teeth; caries and heat do have an influence on both methods (Figs. 1b and 2). Thus, the combined analysis of AGEs and AAR in dentine samples is only theoretically a useful approach for molecular age estimation, since it will not help to overcome the influences of the most relevant confounding factors.

However, the combined analysis of pentosidine and AAR enabled us to identify wrong information about the donor age of one tooth. In this case, the donor age was firstly declared to be 13 years. Age estimation based on AAR revealed an age of 46 years. The accuracy of the AAR method is very high; in our hands, it works with 95 % prediction intervals of  $\pm 4$  years [13], and the results of other groups are very similar [25,26]. Thus, the reasonable suspicion of having wrong information regarding the donor age arose. The analysis of AGEs confirmed this suspicion since it revealed an age of 45 years – a nearly identical result as compared to that of the AAR analysis. Researchers dealing with the analysis of teeth extracted by dentists know about the risk of getting wrong information about the donor ages. Despite all efforts for quality assurance, this risk is reality and has to be considered. In future, we will use the tool of the combined analysis of pentosidine and AAR to identify wrong donor age data in any suspicious case.

## Compliance with ethical standards

### Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

### Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Meissner C, Ritz-Timme S (2010) Molecular pathology and age estimation. *Forensic science international* 203 (1):34-43
2. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Ż, Spas A, Parys-Proszek A, Kucharczyk K, Płoski R, Branicki W (2015) Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Science International: Genetics* 14:161-167
3. Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research* 56 (1):1-22
4. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44 (2):129-146
5. Schmidt AM, Du Yan S, Yan SF, Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1498 (2):99-111
6. Erbersdobler HF, Somoza V (2007) Forty years of furosine—Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Molecular nutrition & food research* 51 (4):423-430
7. Miura J, Nishikawa K, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto M, Takeshige F, Araki T (2014) Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Archives of oral biology* 59 (2):119-124
8. Ramalho J, Marques C, Pereira P, Mota M (1995) Role of glycation in human lens protein structure change. *European journal of ophthalmology* 6 (2):155-161
9. Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Thorpe SR, Baynes JW, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Tekoppele JM (2000) Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochemical Journal* 350 (2):381-387

10. Pilin A, Pudil F, Bencko V (2007) Changes in colour of different human tissues as a marker of age. *International journal of legal medicine* 121 (2):158-162
11. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *Journal of Clinical Investigation* 91 (6):2463
12. Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice* 67 (1):3-21
13. Ritz-Timme S (1999) Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche, vol 23. Schmidt-Romhild
14. Tiemeier H (2002) Razemisierung von Asparaginsäure in Schmelzproteinen: forensische Nutzbarkeit zur biochemischen Lebensaltersschätzung und grundlagenwissenschaftliche Aspekte.
15. Griffin R, Moody H, Penkman K, Collins M (2008) The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth. *Forensic science international* 175 (1):11-16
16. Ohtani S, Yamada Y, Yamamoto I (1998) Improvement of age estimation using amino acid racemization in a case of pink teeth. *The American journal of forensic medicine and pathology* 19 (1):77-79
17. Ohtani S, Yamada Y, Yamamoto I (1997) Age estimation from racemization rate using heated teeth. *The Journal of forensic odonto-stomatology* 15 (1):9-12
18. Cabo LL, Thomas C, Zapico SC (2017) Advanced glycation endproducts for age-at-death estimation. In: Zapico SC (ed) *Mechanisms linking aging, diseases and biological age estimation*, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, pp 122-127
19. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM (1992) Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 41 (2):153-159
20. Rencher AC, Schaalje GB (2008) *Linear models in statistics*. John Wiley & Sons
21. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel R, Bürgermann J, Silber R, Simm A (2007) Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 40 (5):349-356
22. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG (1997) Increased accumulation of the glycoxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *Journal of Clinical Investigation* 99 (3):457
23. Kleter G, Damen J, Buijs M, Ten Cate J (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. *Journal of dental research* 77 (3):488-495
24. Armstrong WG (1964) Modifications of the properties and composition of the dentin matrix caused by dental caries. *Adv Oral Biol* 1:309-332
25. Ohtani S, Yamamoto K (1991) Age estimation using the racemization of amino acid in human dentin. *Journal of Forensic Science* 36 (3):792-800
26. Fu S-J, Fan C-C, Song H-W, Wei F-Q (1995) Age estimation using a modified HPLC determination of ratio of aspartic acid in dentin. *Forensic science international* 73 (1):35-40

## 4 Diskussion

Die eingangs (siehe Kap. 1.5) formulierten Fragestellungen können unter Berücksichtigung der Ergebnisse unserer Untersuchungen wie folgt beantwortet werden:

- (1) Das AGE Pentosidin kann in Wurzel dentin mit der entwickelten und etablierten HPLC-Methode zuverlässig detektiert und quantifiziert werden.
- (2) Die Pentosidinkonzentration in Wurzel dentin nimmt mit zunehmendem chronologischen Lebensalter zu.
- (3) Der Zusammenhang zwischen der Pentosidinkonzentration in Wurzel dentin und dem chronologischen Lebensalter ist eng genug, um in der forensischen Altersschätzung eingesetzt werden zu können.
- (4) Eine kombinierte Altersschätzung auf Basis von Asparaginsäure und Pentosidin könnte ein sinnvoller Ansatz für die Weiterentwicklung des diagnostischen Repertoires für Altersschätzungen sein; allerdings werden beide Methoden von den beiden wichtigsten Störeinflüssen (Karies und Hitzeeinwirkung) gleichermaßen beeinflusst.

Diese Punkte wurden bereits intensiv bei Greis et al. [64] diskutiert. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einen größeren Zusammenhang gesetzt und u. a. unter Aspekten der Altersforschung diskutiert werden.

### 4.1 Biologische Folgen einer Akkumulation von AGEs in menschlichen Geweben?

Die Folgen der Akkumulation von AGEs sind überwiegend in Zusammenhang mit den Spätschäden des Diabetes mellitus beforscht. AGEs wurden in atherosklerotischen Plaques und Läsionen, Lipidablagerungen in glatten Gefäßmuskeln und in Makrophagen von Patienten mit Diabetes mellitus nachgewiesen [65]. AGE-vermittelte pathogenetische Mechanismen bei der Entstehung der Atherosklerose sind u. a. eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion, eine erhöhte LDL (*low density lipoprotein*)- und HDL (*high density lipoprotein*)-Glykierung und eine Aktivierung der inflammationsfördernden induzierbaren NO-Synthase. Außerdem fördern AGEs eine erhöhte Produktion von Zytokinen (z. B. *insulin-like growth factor-1*), die u. a. die Migration von Monozyten und Makrophagen und die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen steuern sowie die Exazerbation von oxidativem Stress fördern [65].

Durch die Quervernetzung von Proteinen spielen AGEs eine entscheidende Rolle bei dem im Alterungsprozess auftretenden Verlust der Gewebselastizität. Hiervon sind v. a. Gewebe bzw.

Strukturen betroffen, die reich an extrazellulärer Matrix und langlebigen Proteinen sind, wie z. B. Skelettmuskel, Sehnen, Gelenke, Knochen, Herz, Arterien, Lunge, Haut und Augenlinsen. Die Quervernetzung von Kollagen und anderen Proteinen verändert insbesondere die mechanischen Eigenschaften von Gefäßen: Die Aorta, Karotiden und andere elastische Arterien (reich an Kollagen und Elastin) verlieren ihre Elastizität, was zur Reduzierung ihrer Pufferfunktion in Herznähe, einer gesteigerten Pulswellengeschwindigkeit und damit zu einem erhöhten systolischen Druck und Pulsdruck führt. Proteine in der extrazellulären Matrix und in Basalmembranen von Gefäßen gehören zu den langlebigsten Proteinen und sind besonders anfällig für die Modifikation durch *AGEs* [66].

Die Akkumulation von *AGEs* in langlebigen Proteinen mit steigendem Lebensalter bedeutet also auch eine Zunahme der Beeinträchtigung wichtiger Proteinfunktionen im Alterungsprozess.

#### **4.2 Wie ist der Befund der Akkumulation von Pentosidin in weitere Erkenntnisse der Altersforschung einzuordnen?**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Pentosidin im Laufe des Lebens in Wurzeldentin akkumuliert. Sie belegen insbesondere auch, dass es nicht nur bei Menschen mit Diabetes mellitus zu einer Akkumulation von *AGEs* kommt, sondern auch bei gesunden Menschen mit normalen Blutzuckerspiegeln [64]. Und nicht nur in Dentin, auch in Proteinen zahlreicher anderer Gewebe des menschlichen Körpers steigt die Konzentration von *AGEs* mit dem Alter [52-55].

Eine altersabhängige Akkumulation von *AGEs*, wie auch die hier mituntersuchte Akkumulation von D-Asparaginsäure, ist nur dann möglich, wenn ein Protein einem nur sehr geringen oder (im Fall der permanenten Proteine) keinem Umsatz unterliegt [3]. Unsere Ergebnisse zeigen also – auch im Kontext früherer Untersuchungen zur altersabhängigen Akkumulation von *AGEs* und *AAR* –, dass solche langlebigen/permanenten Proteine im menschlichen Körper vorliegen und im Laufe des Lebens posttranslationalen Proteinmodifikationen unterliegen [34-47,51-55,64].

Die Akkumulation von *AGEs* in langlebigen Proteinen tritt im Rahmen des „physiologischen Alterungsprozesses“ auf. Aus den oben aufgeführten Auswirkungen von *AGEs* auf den menschlichen Organismus schlussfolgerten Semba et al. [66] bereits, dass die Akkumulation von *AGEs* die multisystemische Funktionalitätsabnahme beschleunigt und so zum Alterungsphänotyp beiträgt.

Neben den genannten Auswirkungen unterliegt der Körper im Alterungsprozess weiteren unzähligen Veränderungen. Die AGE-Akkumulation und ihre Folgen sind nur ein kleiner Teilaspekt eines sehr komplexen Vorgangs, der eine Vielzahl simultaner Prozesse umfasst. Zahlreiche Theorien auf z. B. evolutionärer, molekularer, zellulärer oder systemischer Ebene versuchen sich an der Definition des Alterns; hierbei hat die Einschätzung des Alterns als eine multifaktorielle Entwicklung mittlerweile die Suche nach einer einzelnen Ursache (z. B. einem bestimmten „Alterungs-Gen“) ersetzt [67].

Der Alterungsprozess ist durch die Ansammlung von schädlichen Veränderungen in Zellen und Geweben und der fortschreitenden Verschlechterung struktureller Integrität und physiologischer Funktion in zahlreichen Organsystemen gekennzeichnet. Er ist verbunden mit reduzierter Belastbarkeit, Krankheiten und einem erhöhten Sterberisiko. Studien zur Genexpression haben gezeigt, dass hohes Alter mit fortschreitender Beeinträchtigung mitochondrialer Funktion, erhöhtem oxidativen Stress und Immunaktivierung einhergeht [66].

Die Akkumulation von AGEs ist hier nur eine Ursache aus einem riesigen Pool zugrundeliegender Veränderungen des menschlichen Organismus. Sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren und zufällige Schädigung von Molekülen können das Auftreten von phänotypischen Charakteristika des Alterungsprozesses beeinflussen. Die Heterogenität von Altersphänotypen zwischen verschiedenen Individuen derselben Spezies und unterschiedliche Lebensdauern innerhalb einer Spezies unterstreichen diese Interaktion [66,67].

Bis heute ist der Mechanismus des Alterungsprozesses weitgehend ungeklärt [66]. Eine Vielzahl von Alterstheorien liefern unterschiedliche Erklärungsansätze, die in der Regel einen Teilaspekt dieses komplexen Themas aufgreifen und sich dadurch eher ergänzen als widersprechen. Die am meisten verbreiteten Theorien gehen von einer „Programmierung“ des Alterungsprozesses („*programmed theories*“) oder von fortschreitender Schädigung des Organismus („*error theories*“) aus. Die „*programmed theories*“ beziehen sich auf eine Regulation des Lebenszyklus durch eine „biologische Uhr“, die durch Genregulation des Nerven-, Hormon- und Immunsystems für die Aufrechterhaltung der Homöostase und Aktivierung von Abwehrreaktionen verantwortlich ist. Bei den „*error theories*“ stehen Umwelteinflüsse (wie durch Nahrung oder Rauchen zugeführte exogene AGEs oder aufgenommene Kohlenhydrate als Edukt endogener AGEs [65]) als Ursache für fortschreitende Schädigung lebender Organismen im Vordergrund. Hierzu zählen u. a. die Schädigung mitochondrialer DNA, die Entstehung von freien Radikalen und die Quervernetzung von Proteinen [67]. Die Akkumulation von AGEs und damit verbundene Folgen sind beiden Ansätzen zuzuordnen: Durch die anlagebedingte Langlebigkeit von Proteinen ist sie i. S. der

„programmed theories“ „programmiert“; allerdings kann sie durch exogene Einflüsse i. S. der „error theories“ beeinflusst werden.

Für eine weitere Einordnung der Akkumulation der AGEs in Erkenntnisse der Altersforschung seien im folgenden Exkurs einzelne Erklärungsansätze des Alterungsprozesses auf molekularer, zellulärer und systemischer Ebene näher erläutert. Diese Ansätze verdeutlichen, dass die Akkumulation von AGEs lediglich eine kleine Rolle in einem sehr komplexen Vorgang spielt:

Genetischen Faktoren wird ein hoher Stellenwert im Alterungsprozess zugewiesen. So wurden Gene identifiziert, die Langlebigkeit fördern sollen. Durch Reduzierung eines insulinähnlichen Signalweges bei Würmern, Fliegen und Mäusen konnte über die Aktivierung eines konservierten Transkriptionsfaktors die Lebensdauer der Tiere verlängert werden. Dies spricht dafür, dass Genexpression die Lebensdauer regulieren kann [67,68]. Des Weiteren haben Untersuchungen Hundertjähriger und ihrer Verwandten einen signifikanten genetischen Einfluss auf die Fähigkeit, ein solch hohes Alter zu erreichen, gezeigt. Die Ergebnisse legen nahe, dass hier genetische Faktoren eine größere Rolle spielten als Umwelteinflüsse oder sozioökonomische Faktoren [67,69]. Eine weitere Studie bekräftigt diese Vermutung: Hier wurde auf Chromosom 4 ein Genlocus identifiziert, der ein oder mehrere Gene enthalten könnte, die zu außergewöhnlicher Langlebigkeit beitragen [70].

Eine Alterstheorie, die die zelluläre Seneszenz in den Mittelpunkt rückt, stellt die begrenzte Teilungskapazität von Zellen in den Vordergrund: Die Anzahl der möglichen Zellteilungen menschlicher Zellen ist i.d.R. begrenzt. Danach unterliegen Zellen einer veränderten Physiologie und verfallen in die Seneszenz. Zelluläre Seneszenz kann als Folge molekularer Ereignisse auftreten; in diesem Zusammenhang kann zwischen replikativer und stressinduzierter Seneszenz unterschieden werden: Die replikative Seneszenz resultiert aus einem Verlust von Telomeren bei jeder Zellteilung (siehe Kap. 1.5.1). Das Enzym Telomerase kann Telomere regenerieren und so der replikativen Seneszenz entgegenwirken. Untersuchungen in Zellkulturen haben gezeigt, dass die Zellteilungskapazität mit zunehmendem Alter abnimmt. Außerdem tritt die Seneszenz in Zellen von Organismen mit kürzerer Lebensdauer schneller auf als in Zellen von Organismen mit längerer Lebensdauer [67,71]. Da andere Studien Zweifel an diesen Beobachtungen

hervorgerufen haben, sind hier jedoch weitere Untersuchungen erforderlich [67,72-74]. Die stressinduzierte Seneszenz tritt als Folge von Stressfaktoren auf, wie z. B. *DNA*-Schädigung, Modifikationen in der Heterochromatin-Struktur oder mitogene Signale durch onkogene Expression [71]. In vielen Geweben wurde eine mit dem Alter auftretende Akkumulation von Zellen nachgewiesen, die stressinduzierte Marker (welche in seneszenten Zellen gefunden wurden) exprimieren [75,76].

Eine der bekanntesten zellulären Alterstheorien basiert auf der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*ROS*), deren Freisetzung u. a. durch *AGEs* gefördert wird. Diese sogenannten freien Radikale entstehen bei der mitochondrialen Respiration im Zuge der Zellatmung, die die Energiebasis aller Eukaryoten darstellt [65,67,77]. Die hohe Reaktivität von freien Radikalen führt zu oxidativen Modifikationen an Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen und verursacht dadurch eine zunehmende Schädigung dieser Moleküle und die zelluläre Seneszenz. Es wurde bereits ein erhöhtes Vorkommen von oxidativ geschädigter *DNA* und oxidativ geschädigten Proteinen in älteren Organismen nachgewiesen [67,78,79].

Alterstheorien auf systemischer Ebene beziehen sich auf die Degeneration von Organsystemen, die essentiell sind für (1) die Kontrolle und Erhaltung anderer Systeme innerhalb eines Organismus und (2) die Kommunikationsfähigkeit mit der Umwelt bzw. die Anpassungsfähigkeit an diese. Bei der Koordinierung der Systeme und bei der Reaktionsfähigkeit auf externe und interne Stimuli spielen das Nerven-, Hormon- und Immunsystem eine entscheidende Rolle [67].

Die neuroendokrine Theorie sieht Veränderungen von neuronalen und endokrinen Funktionen als Ursache für das Altern. Diese Funktionen sind unabdingbar für (1) die Koordinierung von Kommunikation und Reaktionsfähigkeit aller Körpersysteme mit der Umwelt, (2) das Programmieren physiologischer Antworten auf Umweltstimuli und (3) die Aufrechterhaltung einer optimalen Funktionalität für Überleben und Fortpflanzung. Auftretende Veränderungen beeinträchtigen Neurone und Hormone mit evolutionär signifikanten Funktionen (Wachstum, Fortpflanzung etc.), aber auch solche, die durch Stressbearbeitung das Überleben regulieren. Laut Theorie wird die Lebensdauer durch eine „biologische Uhr“ reguliert und unterliegt einem Kontinuum von aufeinanderfolgenden Phasen, die neuronal

und hormonell gesteuert werden. Eine verminderte Reaktionsfähigkeit auf Stimuli oder eine übermäßige/unzureichende Koordination von Reaktionen können diese „biologische Uhr“ und die mit ihr verbundene Ordnung stören [67,80-83]. Eine zentrale Rolle in dieser Theorie spielt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (*HPA*-Achse), die die physiologischen Anpassungen für eine Aufrechterhaltung der Homöostase trotz ständiger Umweltveränderungen reguliert [67,84,85]. Im Laufe des Lebens kann diese Adaptionsfähigkeit durch chronische Stress-Exposition (durch eine Vielzahl von physikalischen, biologischen oder emotionalen Stimuli) geschwächt werden. Dies kann zu sogenannten „*diseases of adaption*“ und schließlich zum Tod führen. Das Altern resultiert hier also aus der nachlassenden Fähigkeit des Körpers, Stress zu bewältigen [67,86].

Die neuroendokrin-immunologische Alterstheorie beschäftigt sich mit der Interaktion zwischen neuroendokrinen und Immunsystem über Neuropeptide, Cytokine und verschiedene Hypophysen-Hormone. Neben den neuroendokrinen Funktionen hat das Immunsystem die Aufgabe, Fremdkörper zu eliminieren und dabei körpereigene Zellen zu erkennen und zu verschonen. Bei älteren Menschen tritt eine Immunoseneszenz mit nachlassender Resistenz gegenüber Infektionen, abnehmendem Schutz gegen Krebserkrankungen und zunehmenden Fehlern beim Erkennen körpereigener Zellen auf. Auch die Fähigkeit des neuroendokrinen und des Immunsystems, ihre Funktion dem Bedarf des Organismus anzupassen, ist im fortgeschrittenen Alter weniger effizient [67,87].

Diesem Exkurs ist leicht zu entnehmen, dass Altersforschung vor allem belegt, wie komplex die Mechanismen sind, die uns altern und sterben lassen. Die Akkumulation posttranslatonaler Proteinmodifikationen (wie *AGEs* oder D-Asparaginsäureresten) in wichtigen Proteinen spielt hier sicher eine – allerdings noch schwer einzuordnende – Rolle.

#### **4.3 Akkumulation von Pentosidin/*AGEs* in Dentin: Nutzbarkeit für Lebensaltersschätzungen**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation von *AGEs* in Wurzeldentin theoretisch als Grundlage für forensische Altersschätzungen genutzt werden kann (vgl. dazu ausführlich Greis et al. [64]).

Cabo et al. [88] nahmen an, dass eine auf *AGEs* basierte Altersschätzungsmethode im Zusammenhang mit Brandleichen genauere Ergebnisse erzielen könnte als hitzeempfindliche Methoden (z. B. *AAR*-basiert). Tatsächlich wäre eine kombinierte Anwendung der aktuellen *AAR*-basierten Standardmethode mit einer zweiten, unabhängigen *AGE*-basierten Methode sinnvoll, wenn dadurch methodenspezifische Schwächen bzw. mögliche Störfaktoren beider Methoden erkannt bzw. ausgeschlossen werden könnten. Allerdings zeigen die erhobenen Befunde, dass sowohl die *AAR*- als auch die *AGE*-basierte Methode durch Hitze und Karies beeinflussbar sind. Darüber hinaus stellt der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Produktion von *AGEs* eine weitere Limitation dieser Substanzgruppe in der Lebensaltersschätzung dar [64].

Nach Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit haben sich – jenseits der forensischen Praxis – dennoch Hinweise auf ein sehr relevantes Indikationsfeld für *AGE*-basierte Altersschätzungen ergeben. Bei extrem langen Liegezeiten über Tausende von Jahren sind Altersschätzungen aufgrund der *AAR* wegen einer postmortalen Nachrazemisierung durch Proteindegradation nicht mehr zielführend. In einem konkreten Fall konnten hier vielversprechende Ergebnisse über die *AGE*-basierte Methode erzielt werden. Offenbar sind *AGEs* im Dentin über Tausende von Jahren stabil (noch unveröffentlichte Daten, pers. Mitteilung Ritz-Timme).

Zahnhartgewebe hat sich als Untersuchungsmaterial für molekulare Lebensaltersschätzungen als besonders zuverlässig erwiesen, da es als das stabilste Gewebe des Körpers den geringsten Veränderungen der natürlichen Struktur unterliegt. So bleibt es sogar über den Tod hinaus bis zu Tausende von Jahren relativ unverändert [89]. Bei unbekanntem Leichen bietet es wegen seiner hohen Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse eine wichtige Möglichkeit für Untersuchungen zur Identifizierung [2].

Diese Stabilität wird durch die Zusammensetzung des Zahnhartgewebes ermöglicht. Dentin bildet den größten Teil des menschlichen Zahnes und besteht zu 70 Gew.% aus anorganischem Material. Dieses wird hauptsächlich aus Phosphat und Kalzium zusammengesetzt und liegt je nach Art des Dentins mehr oder weniger dicht gepackt in kristalliner Form vor (als Apatit bzw. amorphes Kalziumphosphat). Außerdem bestehen 20 Gew.% aus organischem Material und 10 Gew.% aus Wasser. Der organische Anteil besteht zu 91-92 % aus Kollagen (hauptsächlich fibrilläres Kollagen (Typ I)) und kollagenartigen Verbindungen [90].

Aus der *AAR*-Forschung ist bekannt, dass sowohl in der kollagenen als auch in der nicht-kollagenen Fraktion der organischen Dentinmatrix permanente Proteine vorliegen, an denen im Laufe des Lebens posttranslationale Modifikationen stattfinden. Dabei zeigte sich in der kleineren nicht-kollagenen Fraktion eine höhere Razemisierungsrate von Asparaginsäure als in

der kollagenen Fraktion. Obwohl die genaue Zusammensetzung der permanenten Proteine in der nicht-kollagenen Fraktion bisher noch nicht im Einzelnen bekannt ist, können sowohl unfraktioniertes Gesamtdentin als auch die nicht-kollagene Fraktion als zuverlässige Basis zur Lebensaltersschätzung auf Basis der AAR verwendet werden [3].

Während die genaue Verteilung der AGE-Akkumulation in Dentin bislang noch unbekannt ist, haben sich bisherige Untersuchungen oftmals auf die kollagene Proteinfraction der organischen Dentinmatrix bezogen [51,91-93]. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Trennung der Proteinfractionen verzichtet und dennoch eine enge Beziehung zwischen der Pentosidkonzentration des unfraktionierten Gesamtdentins gesunder Zähne und dem Lebensalter nachgewiesen [64]. Es ist davon auszugehen, dass die AGE-Akkumulation überwiegend die kollagene Fraktion betrifft. Der großen Homogenität des „Spezialgewebes“ Dentin ist es zu verdanken, dass auch ohne Proteinaufreinigung ein enger Zusammenhang zwischen AGE-Akkumulation und Lebensalter feststellbar war. Dies entspricht – wie bereits ausgeführt – den Erfahrungen aus der AAR-Forschung.

Ein Nachteil von Lebensaltersschätzungen durch die Analyse von Dentin ist, dass ein gesunder extrahierter Zahn benötigt wird. Während dies bei unbekanntem Leichen meist kein Problem darstellt, darf die Extraktion bei Lebenden nur mit medizinischer Indikation durchgeführt werden [1]. Diese liegt i.d.R. nicht bei gesunden Zähnen vor. Eine Ausnahme bietet die kieferorthopädische Indikation; hier sind aber vornehmlich Patienten in der Wachstumsphase betroffen, deren Alter meist auch auf morphologischer Ebene ermittelt werden kann. Aus diesem Grund finden forensische Lebensaltersschätzungen auf der Basis von Dentin hauptsächlich bei der Identifizierung unbekannter Leichen Anwendung.

Die Quantifizierung von Pentosidin mit der etablierten Methode erfolgte bislang nur an Dentin; eine altersabhängige Akkumulation von AGEs wurde aber bereits auch in anderen Geweben nachgewiesen [52-55]. Das etablierte analytische Verfahren könnte gut dafür eingesetzt werden, die Akkumulation von AGEs auch in weiteren Geweben systematisch zu untersuchen.

#### **4.4 Schlussfolgerungen**

Entsprechend unserer Zielsetzung haben wir die Basis einer Methode zur Lebensaltersschätzung auf biochemisch-molekularer Ebene geschaffen, die auf der Akkumulation von Pentosidin in Dentin basiert und mit der üblichen technischen Ausrüstung forensischer Labore durchführbar ist. Die Methode ermöglicht jedoch keine präzisere Altersschätzung als die bereits etablierte AAR-basierte Standardmethode. In Fällen, in denen

stark (von erwartbaren Werten) abweichende AAR-Messergebnisse vorliegen, bietet die entwickelte Methode allerdings eine interessante Möglichkeit der Absicherung (z. B. bei sehr langen Liegezeiten oder im Hinblick auf eine mögliche Zahnverwechslung) [64]. Zudem zeichnet sich aktuell ein wichtiges Indikationsfeld für die Methode bei der Untersuchung sehr alter Skelettfunde unter anthropologischen/archäologischen Fragestellungen ab (pers. Mitteilung Ritz-Timme, s. o.).

Die etablierte Methode stellt einen relevanten Beitrag zum Methoden-Repertoire für Lebensaltersschätzungen dar; die damit erhobenen Daten liefern außerdem einen (kleinen) Beitrag für das Verständnis des Alterns.

Rechtsmedizin und Alternsforschung haben hier eine interessante Schnittmenge: Auch wenn die tatsächlichen Mechanismen des „Mysteriums Altern“ bis heute unerschlossen bleiben [66], bieten die im Zuge des Alterungsprozesses auftretenden Veränderungen vielversprechende Möglichkeiten für die forensische Lebensaltersschätzung. Die Alternsforschung ist Quelle für die (Weiter-) Entwicklung von Verfahren zur Lebensaltersschätzung; umgekehrt kann die Entwicklung neuer (molekularer) Methoden zur Lebensaltersschätzung zum Verständnis des Alterungsprozesses beitragen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Geserick G, Schmeling A (2011) Quality assurance in forensic age diagnostics of living persons. *Rechtsmedizin* 21 (1):22-25
2. Olze A (2005) Forensisch-odontologische Altersdiagnostik bei Lebenden und Toten (Habil.). Freie Universität Berlin
3. Ritz-Timme S (1999) Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche, vol 23. Schmidt-Romhild
4. [https://www.gesetze-im-internet.de/stgb/\\_\\_19.html](https://www.gesetze-im-internet.de/stgb/__19.html) (Zugriffsdatum: 12.03.2018)
5. [https://www.gesetze-im-internet.de/jgg/\\_\\_1.html](https://www.gesetze-im-internet.de/jgg/__1.html) (Zugriffsdatum: 12.03.2018)
6. <http://www.sozialgesetzbuch-sgb.de/sgbvi/235.html> (Zugriffsdatum: 12.03.2018)
7. [https://www.gesetze-im-internet.de/asylvfg\\_1992/\\_\\_12.html](https://www.gesetze-im-internet.de/asylvfg_1992/__12.html) (Zugriffsdatum: 12.03.2018)
8. [https://www.gesetze-im-internet.de/aufenthg\\_2004/\\_\\_25a.html](https://www.gesetze-im-internet.de/aufenthg_2004/__25a.html) (Zugriffsdatum: 12.03.2018)
9. [https://www.gesetze-im-internet.de/aufenthg\\_2004/\\_\\_28.html](https://www.gesetze-im-internet.de/aufenthg_2004/__28.html) (Zugriffsdatum: 12.03.2018)
10. [https://www.gesetze-im-internet.de/aufenthg\\_2004/\\_\\_32.html](https://www.gesetze-im-internet.de/aufenthg_2004/__32.html) (Zugriffsdatum: 12.03.2018)
11. Melo M, Ata-Ali J (2017) Accuracy of the estimation of dental age in comparison with chronological age in a Spanish sample of 2641 living subjects using the Demirjian and Nolla methods. *Forensic Science International* 270:276. e271-276. e277
12. [https://www.bamf.de/SharedDocs/Anlagen/DE/Publikationen/Migrationsberichte/migrationsbericht-2015-zentrale-ergebnisse.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.bamf.de/SharedDocs/Anlagen/DE/Publikationen/Migrationsberichte/migrationsbericht-2015-zentrale-ergebnisse.pdf?__blob=publicationFile) (Zugriffsdatum: 02.11.2017)
13. Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch H-J, Borrman HIM (2000) Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *International Journal of Legal Medicine* 113 (3):129-136
14. [https://www.dgrm.de/fileadmin/PDF/PDF\\_Essen/Alterssch%C3%A4tzung.Methylierung\\_Ste llungnahme.pdf](https://www.dgrm.de/fileadmin/PDF/PDF_Essen/Alterssch%C3%A4tzung.Methylierung_Ste llungnahme.pdf) (Zugriffsdatum: 17.02.2018)
15. Schmeling A, Dettmeyer R, Rudolf E, Vieth V, Geserick G (2016) Forensic age estimation: methods, certainty, and the law. *Deutsches Ärzteblatt International* 113 (4):44
16. Meissner C, Ritz-Timme S (2010) Molecular pathology and age estimation. *Forensic science international* 203 (1):34-43
17. Meissner C, von Wurmb N, Schimansky B, Oehmichen M (1999) Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle. *Forensic science international* 105 (2):115-124
18. von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech A, Elfstroem C, Meissner C, Oehmichen M, Cortopassi GA (2002) Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic science international* 126 (1):34-39
19. Meissner C, Bruse P, Mohamed SA, Schulz A, Warnk H, Storm T, Oehmichen M (2008) The 4977bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more? *Experimental gerontology* 43 (7):645-652
20. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of molecular biology* 225 (4):951-960
21. Tsuji A, Ishiko A, Takasaki T, Ikeda N (2002) Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Science International* 126 (3):197-199
22. Takasaki T, Tsuji A, Ikeda N, Ohishi M (2003) Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *International journal of legal medicine* 117 (4):232-234
23. Yi SH, Xu LC, Mei K, Yang RZ, Huang DX (2014) Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction. *Forensic Science International: Genetics* 11:117-125

24. Giuliani C, Cilli E, Bacalini MG, Pirazzini C, Sazzini M, Gruppioni G, Franceschi C, Garagnani P, Luiselli D (2016) Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth. *American journal of physical anthropology* 159 (4):585-595
25. Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology* 14 (10):3156
26. Lee HY, Lee SD, Shin K-J (2016) Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB reports* 49 (7):359
27. Vidaki A, Daniel B, Court DS (2013) Forensic DNA methylation profiling—Potential opportunities and challenges. *Forensic Science International: Genetics* 7 (5):499-507
28. Spolnicka M, Pośpiech E, Pepłońska B, Zbieć-Piekarska R, Makowska Ż, Pięta A, Karłowska-Pik J, Ziemkiewicz B, Wężyk M, Gasperowicz P (2017) DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. *International journal of legal medicine*:1-11
29. Mawlood SK, Dennany L, Watson N, Pickard BS (2016) The EpiTect Methyl qPCR Assay as novel age estimation method in forensic biology. *Forensic science international* 264:132-138
30. Freire-Aradas A, Phillips C, Lareu M (2017) Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. *Forensic science review* 29 (2)
31. Karlson P, Doenecke D (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Thieme Verlag
32. Geiger T, Clarke S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *Journal of Biological Chemistry* 262 (2):785-794
33. Ritz-Timme S, Collins MJ (2002) Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing research reviews* 1 (1):43-59
34. Fu S-J, Fan C-C, Song H-W, Wei F-Q (1995) Age estimation using a modified HPLC determination of ratio of aspartic acid in dentin. *Forensic science international* 73 (1):35-40
35. Ritz S, Schütz H-W, Schwarzer B (1990) The extent of aspartic acid racemization in dentin: a possible method for a more accurate determination of age at death? *International Journal of Legal Medicine* 103 (6):457-462
36. Ohtani S, Yamamoto K (1991) Age estimation using the racemization of amino acid in human dentin. *Journal of Forensic Science* 36 (3):792-800
37. Ohtani S, Yamamoto K (1992) Estimation of age from a tooth by means of racemization of an amino acid, especially aspartic acid—comparison of enamel and dentin. *Journal of Forensic Science* 37 (4):1061-1067
38. Ohtani S, Sugimoto H, Sugeno H, Yamamoto S, Yamamoto K (1995) Racemization of aspartic acid in human cementum with age. *Archives of oral biology* 40 (2):91-95
39. Ohtani S (1995) Studies on age estimation using racemization of aspartic acid in cementum. *Journal of Forensic Science* 40 (5):805-807
40. Ritz S, Schütz H (1993) Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to postmortem estimation of age at death. *Journal of Forensic Science* 38 (3):633-640
41. Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A (1995) Estimation of chronologic age using the aspartic acid racemization method. I. On human rib cartilage. *International journal of legal medicine* 108 (1):19-23
42. Ritz S, Turzynski A, Schütz H (1994) Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in noncollagenous bone proteins. *Forensic science international* 69 (2):149-159
43. Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins M (2003) Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *International journal of legal medicine* 117 (2):96-101
44. Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins MJ (2003) Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *British Journal of Dermatology* 149 (5):951-959

45. Dobberstein R, Tung S-M, Ritz-Timme S (2010) Aspartic acid racemisation in purified elastin from arteries as basis for age estimation. *International journal of legal medicine* 124 (4):269-275
46. Ohtani S, Yamamoto T, Abe I, Kinoshita Y (2007) Age-dependent changes in the racemisation ratio of aspartic acid in human alveolar bone. *Archives of oral biology* 52 (3):233-236
47. Ohtani S, Matsushima Y, Kobayashi Y, Kishi K (1998) Evaluation of aspartic acid racemization ratios in the human femur for age estimation. *Journal of Forensic Science* 43 (5):949-953
48. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel R, Börgermann J, Silber R, Simm A (2007) Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 40 (5):349-356
49. Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice* 67 (1):3-21
50. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H (2004) Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association* 104 (8):1287-1291
51. Miura J, Nishikawa K, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto M, Takeshige F, Araki T (2014) Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Archives of oral biology* 59 (2):119-124
52. Ramalho J, Marques C, Pereira P, Mota M (1995) Role of glycation in human lens protein structure change. *European journal of ophthalmology* 6 (2):155-161
53. Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Thorpe SR, Baynes JW, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Tekoppele JM (2000) Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochemical Journal* 350 (2):381-387
54. Pilin A, Pudil F, Bencko V (2007) Changes in colour of different human tissues as a marker of age. *International journal of legal medicine* 121 (2):158-162
55. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *Journal of Clinical Investigation* 91 (6):2463
56. Zhang X, Frischmann M, Kientsch-Engel R, Steinmann K, Stopper H, Niwa T, Pischetsrieder M (2005) Two immunochemical assays to measure advanced glycation end-products in serum from dialysis patients. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 43 (5):503-511
57. Sato Y, Kondo T, Ohshima T (2001) Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the hippocampus. *Histopathology* 38 (3):217-220
58. Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, Vienken J (2001) Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16 (5):999-1008
59. Petrovič R, Futas J, Chandoga J, Jakuš V (2005) Rapid and simple method for determination of Nε-(carboxymethyl) lysine and Nε-(carboxyethyl) lysine in urine using gas chromatography [sol] mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 19 (9):649-654
60. Hartog JW, Vries AP, Lutgers HL, Meerwaldt R, Huisman RM, Son WJ, Jong PE, Smit AJ (2005) Accumulation of advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence, in renal disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043 (1):299-307
61. Zhang Y, Cocklin RR, Bidasee KR, Wang M (2003) Rapid determination of advanced glycation end products of proteins using MALDI-TOF-MS and PERL script peptide searching algorithm. *Journal of biomolecular techniques: JBT* 14 (3):224
62. Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Curran M, Newhook LA, Grant M, Hagerty D, Schneider C (2009) Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Clinical biochemistry* 42 (7):562-569

63. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM (1992) Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 41 (2):153-159
64. Greis F, Reckert A, Fischer K, Ritz-Timme S (2017) Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation? *International Journal of Legal Medicine*:1-7
65. Stirban A (2011) Pathogenetische Rolle der advanced glycation endproducts. *Diabetes, Stoffwechsel und Herz*
66. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L (2010) Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences* 65 (9):963-975
67. Weinert BT, Timiras PS (2003) Physiology of Aging. *Journal of Applied Physiology* 95:1706-1716
68. Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299 (5611):1346-1351
69. Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, Joyce E, Brewster S, Kunkel L, Puca A (2002) Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (12):8442-8447
70. Puca AA, Daly MJ, Brewster SJ, Matisse TC, Barrett J, Shea-Drinkwater M, Kang S, Joyce E, Nicoli J, Benson E (2001) A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (18):10505-10508
71. Campisi J (2003) Cellular senescence and cell death. *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*:47-59
72. Blackburn EH (2000) Telomere states and cell fates. *Nature* 408 (6808):53-56
73. Rubin H (2002) The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nature biotechnology* 20 (7):675-681
74. Wright WE, Shay JW (2002) Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nature biotechnology* 20 (7):682-688
75. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (20):9363-9367
76. Krtolica A, Campisi J (2002) Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 (11):1401-1414
77. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (6809):239-247
78. Shringarpure R, Davies KJ (2002) Protein turnover by the proteasome in aging and disease 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine* 32 (11):1084-1089
79. Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* 78 (2):547-581
80. Finch C (1990) *Longevity, Senescence, and the Genome*. Chicago: Univ. Chicago Press
81. Finch CE (1976) The regulation of physiological changes during mammalian aging. *The Quarterly Review of Biology* 51 (1):49-83
82. Timiras P (1989) Neuroendocrine models regulating lifespan. *Development, Maturation and Senescence of Neuroendocrine Systems: A Comparative Approach*
83. Timiras PS (1978) Biological perspectives on aging: Does a genetically programmed brain-endocrine master plan code for aging processes? *American scientist* 66 (5):605-613
84. Bernard C (1973) *Lecons sur les Phenomenes de la Vie Communs aux Animaux et aux Vegetaux*. Paris: Balliere, 1878. Best, CH *The coronary circulation* In: Best & Taylor's *Physiological Basis of Medical Practice* (9th ed), edited by JR Brobeck Baltimore, MD: Williams & Wilkins:3-141
85. Cannon WB (1932) *Homeostasis. The wisdom of the body* Norton, New York
86. McEwen BS, Lasley EN (2002) *The end of stress as we know it*. Joseph Henry Press

87. Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin A, Monti D, De Benedictis G (2000) The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Experimental gerontology* 35 (6):879-896
88. Cabo LL, Thomas C, Zapico SC (2017) Advanced Glycation Endproducts for Age-at-Death Estimation. *Mechanisms Linking Aging, Diseases and Biological Age Estimation*:122
89. Panchbhai A (2014) Dental radiographic indicators, a key to age estimation. *Dentomaxillofacial Radiology*
90. Hellwig E KJ, Attin T (2013) Einführung in die Zahnerhaltung. Deutscher Zahnärzte Verlag
91. Fukushima S, Shimizu M, Miura J, Matsuda Y, Kubo M, Hashimoto M, Aoki T, Takeshige F, Araki T (2015) Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin. *Biomed Opt Express* 6 (5):1844-1856
92. Kleter GA, Damen JJ, Buijs MJ, Ten Cate J (1997) The Maillard reaction in demineralized dentin in vitro. *European journal of oral sciences* 105 (3):278-284
93. Kleter G, Damen J, Buijs M, Ten Cate J (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. *Journal of dental research* 77 (3):488-495

E-Mail vom 08.03.2018

Von: oeffentlichkeitsarbeit@bka.bund.de

Betreff: Ihre Anfrage an das BKA, V 2018-0005103600

Sehr geehrter Herr Greis,

vielen Dank, dass Sie sich an das Bundeskriminalamt (BKA) gewandt haben.

Zu Ihrer Anfrage kann ich Ihnen mitteilen, dass mit Stand vom 07.03.2018 beim BKA insgesamt 1.328 nicht identifizierte Leichen für das Bundesgebiet Deutschland registriert waren.

Davon wurden 51 im Jahr 2017, und bislang 16 im Jahr 2018 aufgefunden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Justen

## 6 Anhang

### 6.1 Tabelle 1: Messwerte für die Pentosidin-Kalibrationsgerade

Konz. (nmol/ml)	Area 1 (LU*s)	Area 2 (LU*s)	Mittelwert (LU*s)	
0,01554	12,64149	12,68000	12,66075	
0,03303	35,68622	35,70564	35,69593	
0,06606	45,60745	45,4107	45,50908	
0,13212	93,69215	91,29517	92,49366	
0,17616	129,64056	128,54099	129,09078	
0,26424	192,47597	193,17561	192,82579	
0,3108706	221,96606	220,82205	221,39406	
0,4065231	284,10199	282,09015	283,09607	
0,52848	393,08615	390,18796	391,63706	
1,05696	780,12415	777,40485	778,76450	

**Tabelle 1:** Messwerte für die Pentosidin-Kalibrationsgerade

**6.2 Tabellen 2a - 2c: Gemessene Pentosidinkonzentrationen über den externen und den internen Standard**

Sequenz	Lagerungs- dauer	Nr.	Zahn	Alter (Jahre)	Geschlecht	Externer Standard (Pentosidin)				Interner Standard (Pyridoxin)				Konz. Pento (nmol/ml)	Konz. Pyri (µmol/ml)	Konz. Pento	Kommentar	
						Area 1 (LU*s)	Area 2 (LU*s)	Mittelwert (LU*s)	Konz. Pento (nmol/ml)	Area 1 (LU*s)	Area 2 (LU*s)	Mittelwert (LU*s)	Konz. Pyri (µmol/ml)					
689	< 1 Jahr	Probe p	28	19,9166667	w	42,17311	42,14075	42,15693	0,0606197	175,258	175,80872	175,53336	2,068815	0,49685649				
		Probe o	38	18,5222222	m	32,49893	33,14371	32,82132	0,04754985	176,2975	176,25998	176,27874	2,068815	0,38519245				
		Probe a	28	20,0583333	w	51,41921	51,14974	51,28475	0,07339827	180,90292	180,14648	180,5247	2,068815	0,58772063				
		Probe f	18	47,7305556	m	98,28593	97,20293	97,74443	0,1384422	192,63666	195,6709	194,15378	2,068815	1,0415205				
		Probe h	28	49,2111111	w	93,81169	93,40862	93,610155	0,13265422	198,34009	198,3463	198,343195	2,068815	0,97639898				
		Probe k	18	65,2222222	m	143,66718	142,13609	142,901635	0,20166229	213,85416	211,00546	212,42981	2,068815	1,39169284				
		Probe 143	28	19,3500000	w	42,78437	41,15557	41,96997	0,06035796	177,74718	178,53935	178,143265	2,068815	0,48740604				
		Probe 151	18	20,4472222	w	35,22134	35,77693	35,499135	0,05129879	174,94388	175,25537	175,099625	2,068815	0,4194249				
		Probe 4	28	41,6361111	w	72,25745	72,9441	72,600775	0,10324109	187,36264	184,61	185,98632	2,068815	0,80757323				
		Probe 88	18	48,9555556	w	110,22154	109,82121	110,021375	0,15562993	200,17841	199,7596	199,969005	2,068815	1,13824575				
Probe 17	48	59,8916667	m	122,77467	121,49636	122,135515	0,17258972	203,29091	203,67531	203,48311	2,068815	1,24175311						
Probe 35	28	16,1222222	w	19,18807	19,37652	19,282295	0,02859521	168,28886	168,23865	168,263755	2,068815	0,23707721						
Probe 50	18	17,4027778	w	31,01976	31,65641	31,338085	0,04547332	168,68526	168,19742	168,44134	2,068815	0,38489779						
Probe 16	48	22,2472222	w	33,36259	33,48373	33,42316	0,04839242	170,4093	169,69934	170,05432	2,068815	0,40661322						
Probe 59	38	24,1972222	m	40,78294	40,95942	40,87118	0,05881965	170,31807	171,0235	170,670785	2,068815	0,49542697						
Probe 18	48	26,9277778	m	50,91327	50,41277	50,66302	0,07252823	172,40503	173,46776	172,936395	2,068815	0,60607494						
Probe 213	18	31,5000000	w	54,28322	54,70836	54,49579	0,07789411	175,03514	175,38135	175,208245	2,068815	0,64347262						
Probe 58	48	33,2583333	w	58,65162	56,97681	57,814215	0,08253399	175,52211	176,44296	175,982535	2,068815	0,67965219						
Probe 218	18	35,3611111	w	65,91475	65,94666	65,930705	0,09390299	176,09927	177,77	176,934635	2,068815	0,77089729						
Probe 108	28	38,6888889	w	67,6274	67,27191	67,449655	0,09602952	177,75409	178,03148	177,892785	2,068815	0,78440988						
Probe 208	18	45,7805556	m	79,20218	80,99637	80,099275	0,11373899	175,81401	176,15132	175,982665	2,068815	0,94163014						
Probe 68	38	48,6694444	w	70,39458	70,89264	70,64361	0,10050105	171,09979	171,08324	171,091515	2,068815	0,85421279						
Probe 85	18	15,9638889	w	27,61335	27,22069	27,41702	0,03998383	184,34624	186,67676	185,5115	2,068815	0,30575324						
Probe 196	18	21,5000000	w	33,37821	32,76457	33,07139	0,04789995	172,05721	172,70032	172,378765	2,068815	0,39690845						
Probe 158	18	22,5000000	m	30,05966	31,23019	30,644925	0,0445029	174,89871	174,33707	174,61789	2,068815	0,36307093						

**Tabelle 2a:** Gemessene Pentosidinkonzentrationen über den externen und den internen Standard (gelb hinterlegt = AAR-Messung parallel durchgeführt, siehe Tabelle 3)





**6.3 Tabelle 3: Gemessene AAR-Werte und gemäß Ritz-Timme (1999) errechnetes Alter**

Nr.	Zahn	Alter (Jahre)	Geschlecht	D-Area 1	D-Area 2	D-Area Mittelwert	L-Area 1	L-Area 2	L-Area Mittelwert	D/L	ln((1+D)/L)	Alter nach AAR (Jahre)	Kommentar
Probe 127		38	13,250000 w	849	823	836	20720	20862	20791	0,04020971	0,0804628	45,6642472	← ungew. gelb für 13 J.,
Probe 68		38	48,6694444 w	874	636	755	20211	15082	17646,5	0,04278469	0,08562165	48,8885289	Zahnverwechslung
Probe 75		38	32,7972222 m	646	913	779,5	18765	25360	22062,5	0,03533144	0,07069231	39,5576967	
Probe B5		28	19,6055556 w	820	820	820	51381	52887	52134	0,0157287	0,03145999	15,0374955	
Probe B4		18	19,4083333 w	732	832	782	34340	40579	37459,5	0,02087588	0,04175783	21,4736408	
Probe 256		18	57,2777778 m	749	707	728	15166	14473	14819,5	0,04912446	0,09832808	56,830047	
Probe 160		38	25,1527778 m	881	874	877,5	30948	30974	30961	0,02834211	0,0566994	30,8121254	
Probe f		18	47,7305556 m	702	727	714,5	15486	16073	15779,5	0,04528027	0,09062251	52,0140661	
Probe 141		38	19,5000000 w	794	773	783,5	40775	40911	40843	0,01918321	0,03837113	19,3569593	pink verfärbt
Probe 194		18	20,0583333 m	592	657	624,5	25257	28437	26847	0,02326144	0,04653128	24,4570517	pink verfärbt
Probe b		18	24,4388889 m	619	678	648,5	19340	22213	20776,5	0,03121315	0,06244658	34,404115	kariös
Probe g		28	52,7333333 m	976	552	764	20247	11413	15830	0,04826279	0,09660063	55,7503968	kariös
Probe i		18	57,7805556 w	662	568	615	12369	10882	11625,5	0,05290095	0,10590076	61,5629768	kariös
Probe l		28	25,4722222	696	698	697	22703	23120	22911,5	0,0304214	0,06086159	33,4134924	kariös
Probe T2	8er	47	51,66667 m	981	589	785	22463	13464	17963,5	0,04369972	0,08745515	50,0344671	kariös
Probe T4		38	36,5833333 w	558	757	657,5	15623	19977	17800	0,0369382	0,07391003	41,5687699	Diabetes, kariös
Probe 221		48	32,3138889 m	785	801	793	21437	21941	21689	0,03656231	0,07315724	41,0982725	kariös
Probe 238		48	21,7750000 m	603	790	696,5	20333	25687	23010	0,03026945	0,0605574	33,2233723	kariös
Probe 239		38	41,2444444 m	789	1012	900,5	19542	24624	22083	0,04077797	0,0816012	46,3757488	kariös
Probe B12		48	24,7138889 w	798	1118	958	11317	15967	13642	0,07022431	0,14068017	83,3001075	erhitzt
Probe B13		38	20,0166667 w	682	707	694,5	9936	10268	10102	0,06874876	0,13771476	81,4467275	erhitzt
Probe B14		38	22,6944444 w	873	872	872,5	10777	10602	10689,5	0,08162215	0,16360828	97,6301762	erhitzt
Probe B15	8er	35	8638889 m	1060	1085	1072,5	11638	12113	11875,5	0,09031199	0,18111746	108,573414	erhitzt

**Tabelle 3:** Gemessene AAR-Werte und gemäß Ritz-Timme (1999) errechnetes Alter

## Danksagung

Ganz herzlich möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme für die Bereitstellung des Themas und ihre intensive Unterstützung danken. Ob aus ihrem Büro oder von Teneriffa, mit hilfreichen Ideen und kompetentem Rat stand sie mir jederzeit zur Seite. Regelmäßiger Gedankenaustausch und konstruktive Gespräche kamen mir bei der Fertigstellung dieser Dissertation sehr zugute.

Frau Dr. Alexandra Reckert danke ich für ihre sachkundige und sehr wertvolle Hilfe in allen Bereichen der Projektdurchführung. Seien es zielführende Ideen bei der Methodenentwicklung oder ein neuer Stapel wissenschaftlicher Arbeiten auf meinem Schreibtisch; von ihrem Mitwirken habe ich sowohl im Labor als auch beim Verfassen der Publikation stets profitiert.

Mein besonderer Dank gilt Frau Bärbel Seeling, die mir als „gute Seele des Hauses“ vorgestellt und diesem Titel mehr als gerecht wurde. Mit Erfahrung und unermüdlichem Engagement hat sie mich optimal in alle laborseitigen Arbeitsschritte eingeführt. Ihre tatkräftige und herzliche Unterstützung war mir in jeder Phase des Projekts eine große Hilfe.

An dieser Stelle möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Rechtsmedizin Düsseldorf für seine Mitwirkung und Unterstützung danken. In einer sehr angenehmen und kollegialen Atmosphäre hat mir das Arbeiten hier von Beginn an viel Freude bereitet.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Katinka Fischer, die uns für die statistische Auswertung der Messergebnisse ihr mathematisches Fachwissen zur Verfügung gestellt hat.

Ganz großer Dank geht an alle Kolleginnen und Kollegen, die für meine Arbeit tatkräftig Weisheitszähne extrahiert und gesammelt haben. Allen voran möchte ich hier meiner Tante, Frau Dr. Silvia Ophoff, und meinem Onkel, Herrn Dr. Dr. Bernhard Ophoff, für die besonders große Zahn-Ausbeute danken.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Ein ganz besonderer Dank geht hier an meine Eltern, dass sie mir das Studium der Zahnmedizin (und so viel mehr) ermöglicht haben. Für jedwede Unterstützung bin ich ihnen und meinen Geschwistern sehr dankbar.