

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

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

**Knochen ist nicht gleich Knochen – auch nicht bei der molekularen  
Lebensalterschätzung auf Basis posttranslationaler  
Proteinmodifikationen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Lisa Maria König

(2024)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der 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. med. Pascal Jungbluth

Für meine Oma Gisela

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

König, L., Becker, J., Reckert, A., Ritz-Timme, S. *Molecular age estimation based on post-translational protein modifications in bone: why the type of bone matters*. Int J Legal Med, 2023. **137**(2): p. 437-443. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-02948-9> [1]

## Zusammenfassung

Die Identifikation unbekannter Verstorbener ist für die Ermittlungsbehörden von zentraler Bedeutung. In einschlägigen Fällen geht es häufig um (teil-)skelettierte Leichen. Neben Merkmalen wie Körperlänge und Geschlecht kann die Schätzung des erreichten Lebensalters hier wichtige und oft entscheidende Hinweise zur Identität der verstorbenen Person liefern. Bei skelettierten Leichen können zur Altersschätzung sowohl Zähne als auch Knochen zur Verfügung stehen, bei Zahnverlust nicht selten auch nur Knochen; oft liegen auch nur Skeletteile oder sogar lediglich einzelne Knochen vor.

Im Erwachsenenalter sind mit konventionellen, morphologischen Verfahren im Allgemeinen keine zuverlässigen Altersschätzungen mehr möglich. Die Nutzung molekularer Parameter zur Altersschätzung eröffnet hier deutlich bessere Möglichkeiten. Dies gilt insbesondere für die Bestimmung des D-Asparaginsäuregehaltes (D-Asp) und der Konzentration des advanced glycation end products (AGE) Pentosidin (Pen) in langlebigen Proteinen.

Aufgrund ihres bradytrophen Stoffwechsels eignen sich Zähne ideal zur molekularen Altersschätzung auf Basis von D-Asp und Pen, allerdings liegen sie nicht immer vor. Knochen dagegen ist deutlich stoffwechselaktiver und insoweit als eher ungünstiges Gewebe für molekulare Altersschätzungen zu bezeichnen. Dennoch wurden auch Knochen bereits erfolgreich zur Altersschätzung genutzt; dazu gibt es aber bislang vergleichsweise wenige Daten. Es ist insbesondere noch unklar, ob Daten, die anhand von Proben einer spezifischen Skelettregion erhoben wurden auch zur Altersschätzung von Proben anderer Regionen genutzt werden können und ob bestimmte Regionen für die Analysen zu bevorzugen sind.

Unter diesem Aspekt wurden D-Asp und Pen in Knochenproben aus drei unterschiedlichen Skelettregionen (Kalotte, Clavicula, Rippe) des jeweils selben Individuums untersucht und die jeweiligen Unterschiede zwischen den Knochenarten mittels t-Test und Korrelationskoeffizienten ( $\rho$ ) nach Spearman berechnet.

Für beide Parameter (D-Asp und Pen) wurden relevante Unterschiede zwischen den Knochenarten festgestellt. Die besten Ergebnisse wurden mit Pen in Kalottenproben ( $\rho=0,95$ ) erzielt, die schlechtesten für D-Asp in Kalotten- und Rippenproben ( $\rho=0,84$ ). Die jeweils festgestellten Unterschiede sind durch Variationen hinsichtlich Belastung, Aufbau und Stoffwechsel der untersuchten Knochenarten erklärbar.

Aus den erhobenen Daten ergibt sich die Notwendigkeit der Etablierung knochen(art)spezifischer Modelle zur molekularen Lebensaltersschätzung auf Basis von D-Asp und Pen.

## Abstract

In cases of (partially) skeletonised bodies, the identification of unknown deceased persons is of central importance for the investigating authorities. In addition to characteristics such as body length and sex, the estimation of the age at death can provide important clues to the identity of the deceased person. In some cases of advanced decomposition and (mostly) skeletonised bodies, both teeth and bones are available for age estimation. However, if the teeth are missing, only bones or bone fragments are left to examine.

In adulthood, conventional morphological methods may not be applicable for age estimation. The use of molecular parameters for age estimation, especially the determination of the D-aspartic acid content (D-Asp) and of the concentration of the advanced glycation end product (AGE) pentosidine (Pen) in long-living proteins opens up much better possibilities.

Due to their bradytrophic metabolism, teeth are ideally suited for molecular age estimation based on D-Asp and Pen; however, teeth are not always available. Bone is metabolically active and therefore not an ideal tissue for molecular age estimation. Nevertheless, bone tissue has already been successfully used for molecular age estimation; however, there are comparatively few data on this. In particular, it has not yet been established, whether data gained from samples of one specific bone type can be used for age estimation using samples of other bone types and whether certain skeletal parts yield better analytical results than others.

To look into these unknowns, both D-Asp and Pen were analysed in bone samples of different anatomical origin (skull, clavicle, rib) taken from the same individual. The respective difference between each bone type was calculated using t-test and Spearman's correlation coefficients ( $\rho$ ).

For both parameters (D-Asp and Pen), differences between samples from different anatomical regions were observed. The best results were obtained with Pen in skull samples ( $\rho=0.95$ ), and the worst for D-Asp in skull and rib samples ( $\rho=0.84$ ). The differences between different bone types can be explained by variations in physical exposure, structure and metabolism.

The presented data indicate a need for further research to establish bone (type) specific models for molecular age at death estimation based on D-Asp and Pen.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AGE</b>	Advanced glycation end product
<b>BKA</b>	Bundeskriminalamt
<b>BestG</b>	Bestattungsgesetz
<b>C</b>	Kohlenstoff
<b>D-Asp</b>	D-Asparaginsäure
<b>D-Iso-Asp</b>	D-Iso-Asparaginsäure
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNA<sub>m</sub></b>	DNA-Methylierung
<b>GH</b>	Wachstumshormon
<b>H</b>	Wasserstoff
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Schwefelwasserstoff
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatograph
<b>L-Asn</b>	L-Asparagin
<b>L-Asp</b>	L-Asparaginsäure
<b>L-Iso-Asp</b>	L-Iso-Asparaginsäure
<b>nm</b>	Nanometer
<b>MAE</b>	mean absolute error
<b>O</b>	Sauerstoff
<b>OH</b>	Hydroxid
<b>PHT</b>	Parathormon
<b>r</b>	Korrelationskoeffizient
<b>StPO</b>	Strafprozessordnung

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Identifizierung unbekannter Verstorbener: Eine wichtige Aufgabe für Ermittlungsbehörden und Rechtsmedizin .....	1
1.2	Postmortale Veränderungen zerstören für eine Identifizierung wichtige Befunde .....	4
1.3	Gang der Identifizierung einer/eines unbekanntem Verstorbenen .....	5
1.4	Morphologische Lebensaltersschätzung: Grenzen im Erwachsenenalter .....	7
1.5	Molekulare Lebensaltersschätzung auf Basis posttranslati- onaler Proteinmodifikationen: Neue Möglichkeiten für das Erwachsenenalter .....	8
1.5.1	Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp) .....	8
1.5.2	Akkumulation von advanced glycation end product (AGEs) .....	10
1.5.3	Knochen als Untersuchungsgut .....	12
1.6	Ziel der Arbeit .....	12
<b>2</b>	<b>Publikation:</b> König, L., Becker, J., Reckert, A., Ritz-Timme, S. <i>Molecular age estimation based on posttranslational protein modifications in bone: why the type of bone matters</i> . Int J Legal Med, 2023. 137(2): p. 437-443. ....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>15</b>
3.1	Knochen ist nicht gleich Knochen – Was bedeutet das für die molekulare Altersschätzung auf Basis von D-Asp und Pen? .....	15
3.2	Optimierung der Lebensaltersschätzung über multivariate Ansätze .....	21
3.3	Nutzung der Pen Konzentration in Knochen (und anderen Geweben) im Kontext anderer (forensisch relevanter) Fragestellungen? .....	22
3.4	Pen in Knochen: Ein auch im historischen/archäologischen Kontext interessanter Parameter? .....	23
3.5	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	24
<b>4</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>34</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Identifizierung unbekannter Verstorbener: Eine wichtige Aufgabe für Ermittlungsbehörden und Rechtsmedizin

Kann die Identität einer verstorbenen Person bei der ärztlichen Leichenschau nicht sicher festgestellt werden, ist gemäß § 9 (6) BestG [2] die Polizeibehörde zu unterrichten. Wird seitens der leichenschauenden Ärztin bzw. des leichenschauenden Arztes bei Feststellung des Todes einer unbekannt Person die Polizei entsprechend informiert, ist diese sodann nach § 159 Abs. 1 StPO [3] „zur sofortigen Anzeige an die Staatsanwaltschaft oder das Amtsgericht verpflichtet“. In § 88 Abs. 1 StPO [3] ist festgehalten, dass „[v]or der Leichenöffnung [...] die Identität des Verstorbenen festgestellt werden [soll]. Zu diesem Zweck können insbesondere Personen, die den Verstorbenen [oder die Verstorbene] gekannt haben, befragt und Maßnahmen erkennungsdienstlicher Art durchgeführt werden.“ Als gängige Methode ist hier in erster Linie die Daktyloskopie [4] zu nennen. Hinweisend auf die Identität der verstorbenen Person können z.B. Narben nach medizinischen Eingriffen, auffällige oder individuelle Tätowierungen oder sonstige auffällige körperliche bzw. anatomische Merkmale sein [5-7]. Ist die sichere Feststellung der Identität trotz Ermittlungsarbeit seitens der Polizeibehörde weiterhin nicht möglich, kann eine Obduktion angeordnet werden.

Laut Angabe des Bundeskriminalamtes (BKA) gab es in Deutschland im Jahr 2023 1.535 (Stand 07.07.2023) unbekannte Verstorbene, d. h. verstorbene Personen, die seit ihrer Auffindung – also einer variablen, möglicherweise jahrelangen Zeitspanne – nicht sicher identifiziert werden konnten.

Die Identifikation unbekannter Verstorbener ist insbesondere nach langen postmortalen Liegezeiten oft eine Herausforderung. Auch Skelett- oder Knochenfunde, die per Definition zwar dann nicht mehr als *Leichnam* zu bezeichnen sind, können „forensisch relevant“ sein [8]. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn es sich sicher um menschliche Knochen handelt und sie eine maximale Liegezeit von 50 Jahren (i.d.R. als forensisch relevantes Intervall gesehen) nicht überschritten haben. In diesen Fällen könnte eine noch zu verfolgende Straftat Hintergrund des Todes der verstorbenen Person sein und

die Ermittlungsbehörden sind gefordert, die Todesumstände zu klären. Ohne Kenntnis der Identität der/des Verstorbenen gibt es für die Kriminalpolizei allerdings kaum Ermittlungsansätze. Erst eine gelungene Identifikation eröffnet optimale Ermittlungsmöglichkeiten zum Umfeld der/des Verstorbenen und die Klärung von Vermisstenfällen.

Im Folgenden wird ein konstruierter, fiktiver und durchaus typischer Fall beschrieben. Dieses Fallbeispiel wird zur Veranschaulichung der entsprechenden Inhalte in den jeweiligen Kapiteln fortgeführt.

#### Fallbeispiel (Abschnitt 1):

In einem Waldstück nahe eines Industriegebietes wird durch eine Pilzsammlerin ein vermeintlich menschlicher Oberschenkelknochen aufgefunden. Die Auffinderin informiert umgehend die Polizei. Durch die Einsatzkräfte wird unweit des Auffindeortes des Oberschenkelknochens zeltähnliches Kunststoffmaterial aufgefunden. Darin befinden sich zahlreiche weitere, offenbar menschliche Knochen. Bekleidungsreste sind ebenfalls noch zu erkennen; weitere persönliche Gegenstände oder Wertsachen sind nicht auffindbar.

Insbesondere aufgrund der Auffindsituation kann ein strafrechtlich relevantes Gewaltverbrechen (Tötungsdelikt) nicht ausgeschlossen werden. Die Feststellung der Identität ist jetzt von besonderer Bedeutung für die Polizei, die ansonsten keine Ermittlungsansätze hat. Identifikationsmaßnahmen, die beim weniger stark postmortal veränderten Leichnam durchgeführt werden können, wie die Daktyloskopie, sind hier naturgemäß nicht mehr möglich. Der Skelettfund wird zur weiteren Begutachtung in das nächstgelegene Institut für Rechtsmedizin überführt.

In der Rechtsmedizin können folgende Knochen benannt und beurteilt werden:

- Vollständig erhaltener Hirn- und Gesichtsschädel ohne Verletzungen.
- Verknöcherter Schildknorpel des Kehlkopfes. Die Oberflächen teils etwas aufgelockert, wie bei postmortalen Defekten.

- Sieben Halswirbelkörper, fünf Brustwirbelkörper, zwei osteophytisch miteinander verbundene Lendenwirbelkörper mit teils oberflächlichen Defekten der Gelenkflächen, am ehesten im Sinne postmortaler Defekte.
- Intakter Brustbeinkörper.
- Zwei Schlüsselbeine, 14 unterschiedlich große Rippen ohne perimortale Verletzungen. Zwei Rippen weisen knöcherne Deformitäten, wie nach Frakturen vor längerer Zeit, auf.
- Ein Schulterblatt, linker Oberarmknochen sowie linke Elle und Speiche. Sechs Handwurzelknochen, vier Mittelhandknochen, drei Fingergrundglieder, fünf Fingermittelglieder und zwei Fingerendglieder. Die Knochen der oberen Extremität(en) sind unverletzt.
- Zwei Oberschenkelknochen, ein Wadenbein, acht Fußwurzelknochen, vier Mittelfußknochen, sieben Zehengrundglieder und zwei Zehenmittelglieder. Die Knochen der unteren Extremitäten sind unverletzt.

Hinweise auf die Todesursache können nicht festgestellt werden. Die zu beurteilenden Knochen bieten keine Hinweise auf um den Todeszeitpunkt herum entstandene Verletzungen, insbesondere Schädel und die noch vorhandenen Anteile des Kehlkopfes sind intakt. Für die weitere Beurteilung relevante Befunde sind die genannten degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule und die Hinweise auf alte Rippenfrakturen.

Die Schätzung der Liegezeit ist im vorliegenden Fall schwierig, da sich einschlägige Referenzdaten zu postmortalen Veränderungen auf eine durchgehende Lagerung im Erdgrab [9] beziehen. Da die Knochen außerdem eher schwer und nicht auffallend brüchig sind und frische Sägeschnittflächen des linken Humerus eine deutliche, flächige, kräftige bläuliche UV-Fluoreszenz bei 365 nm zeigen, sprechen die Befunde insgesamt für eine Liegezeit im forensisch relevanten Bereich von bis zu 50 Jahren.

## **1.2 Postmortale Veränderungen zerstören für eine Identifizierung wichtige Befunde**

Autolyse- und Fäulnisprozesse führen nach Eintritt des Todes zur Zerstörung von Weichgeweben und Organen – im Extremfall bis hin zur völligen Skelettierung. Die Geschwindigkeit dieser Prozesse hängt jeweils in nicht unerheblichen Maßen von den Umgebungsbedingungen (vor allem von Temperatur und Feuchtigkeit) ab.

Als Autolyse wird die Zersetzung organischer Strukturen durch körpereigene Enzyme bezeichnet (z.B. Enzyme des Pankreas, später auch weiterer innerer Organe). Fäulnisprozesse sind hingegen bakterielle (teils aerobe und teils anaerobe) Abbauvorgänge mit Freisetzung von Wasserstoff- (v.a. Kohlenwasserstoffen) und Sauerstoffprodukten. Verantwortlich hierfür sind u.a. physiologische Bakterien der Hautoberfläche, der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes. Durch diese Prozesse kommt es zunächst zu den typischen spät-postmortalen Veränderungen, wie z.B. der Grünfärbung des Hautmantels, flüssigkeitsgefüllten Fäulnisblasen, der Ausbildung eines sog. durchschlagenden Venennetzes infolge von Imbibitionen der Gefäßwände, der Entwicklung von Fäulnisgasen im Bereich der Haut und den Körperhöhlen bis hin zur Gasdunsung des Abdomens. Außerdem führen derartige Prozesse zur erleichterten Ausziehbarkeit der Körperbehaarung, Finger- und Zehennägel bis hin zur Erweichung und Zersetzung des Weichgewebes sowie der inneren Organe und schließlich zur Skelettierung. Unter gewissen Umgebungsbedingungen kann es auch zu selteneren Phänomenen wie Fettwachsbildung (feuchte, anaerobe Bedingungen) oder Mumifizierungen (unter trockenem, kaltem oder heißem Luftzug) kommen. Als weitere Faktoren der postmortalen Leichenveränderungen sind Insektenbesiedelungen sowie (weitere) Tierfraßdefekte zu nennen, die jeweils bereits in der frühen postmortalen Phase einsetzen können und ebenfalls maßgeblich von den Umgebungsbedingungen abhängen [10].

Liegt ein Leichnam im Freien, ist im Sommer, also bei hohen Außentemperaturen, selbst in Mitteleuropa eine vollständige Skelettierung innerhalb weniger Wochen möglich [11]. Kommt es jedoch unter trockenen, heißen Bedingungen zu Mumifizierungen, können selbst nach Jahrzehnten noch Weichgewebsreste erkennbar sein; insbesondere Sehnen, Bänder und knorpelige Strukturen sind verhältnismäßig robust [12]. Im Wasser verläuft der Verwesungsprozess langsamer als an der Luft. Nach der sog. Casper-Regel entspricht

der Fäulnisgrad eines Leichnams, der eine Woche an der Luft liegt etwa zwei Wochen im Wasser und acht Wochen im Erdgrab.

Für die Identifizierung liegen in diesen Fällen, bei Auffindung von (teil-)skelettierten Leichen oder aber auch bei Auffindung einzelner Knochen, deutlich erschwerte Bedingungen vor. Funde vollständiger Skelette, die bei Fehlen von Weichgewebe per Definition formell nicht als *Leichnam* gelten [8], sind im rechtsmedizinischen Alltag eher als Seltenheit zu bezeichnen. Sehr viel häufiger werden einzelne oder auch mehrere Knochen (-fragmente) aufgefunden. Auch hier ist – sofern festgestellt werden kann, dass es sich um menschliche Knochen handelt – die Identifizierung von Bedeutung.

### Fallbeispiel (Abschnitt 2):

Im vorliegenden Fall liegt eine vollständige Skelettierung vor. Das Fehlen zahlreicher Knochen könnte zwar theoretisch auch durch prä- oder perimortale Verletzungen entstanden sein, bei Auffindung im Wald liegt jedoch ein Verschleppen durch Wildtiere nahe.

### **1.3 Gang der Identifizierung einer/eines unbekanntem Verstorbenen**

Die Identifizierung erfordert eine enge Zusammenarbeit zwischen Ermittlungsbehörden und Rechtsmedizin. Die Ermittlungsbehörden haben Zugriff auf Vermisstendatenbanken, die Rechtsmedizin „liefert“ die Parameter, die für das Herausfiltern infrage kommender Personen nötig sind.

Basisinformationen für die Klärung der Identität sind Aussagen zu Geschlecht, Körperhöhe und erreichtem Lebensalter [13-16].

Erste Aussagen zum Geschlecht stützen sich auf geschlechtsdimorphe Merkmale, insbesondere am Schädel und am Becken. Nicht immer gelingt damit eine eindeutige Zuordnung, weil es eine erhebliche Variationsbreite dieser Merkmale bei Frauen und Männern gibt – und zudem nur Schlussfolgerungen auf das biologische Geschlecht möglich sind [17].

Die Körperlänge kann selbst bei völliger Skelettierung anhand der Maße der langen Röhrenknochen abgeschätzt werden. Je mehr Knochen hier zur Verfügung stehen, desto präziser ist die Schätzung [18-20].

Während die Kenntnis des Geschlechtes nur die Zuordnung in zwei Kategorien ermöglicht (weiblich/männlich) und die Körperhöhenschätzung auch relativ wenig zur Eingrenzung infrage kommender Personen in den Vermisstendateien beitragen kann, besitzt das Lebensalter den größten diskriminierenden Wert und leistet sehr oft den entscheidenden Beitrag. Die Schätzung des Lebensalters ist allerdings eine methodische Herausforderung (s. dazu unten, Abschnitte 1.4 und 1.5).

Über die Kenntnis von Geschlecht, Körperhöhe und insbesondere des Lebensalters können – im optimalen Fall – infrage kommende Personen in den Vermisstendateien gefunden werden. Gibt es dann erste Erkenntnisse zu Personen, die in Betracht kommen, kann eine Identifikation durch Vergleich versucht werden. Dafür kommen (je nach postmortalem Zustand) eine Vielzahl von Methoden in Betracht. Außer den bereits erwähnten Ansätzen über Daktyloskopie sind vor allem DNA-Abgleiche (z.B. mit Angehörigen) von großer Bedeutung. Auch die odontologische Identifizierung über den Zahnstatus [7, 21, 22] spielt in der Praxis eine große Rolle. Die Identifizierung kann auch anhand implantierten (nummerierten) medizinischen Materials (Prothesen, Schrittmacher etc.) gelingen. Als weitere Formen der sicheren Identifizierung ist die Röntgenvergleichsanalyse des Schädels zu nennen; die Sinus frontales und maxillares weisen jeweils ein hochindividuelles Muster in der anterior-posterior Aufnahme des Schädels auf [7].

Die Identifizierung durch Vergleich setzt natürlich die Verfügbarkeit entsprechenden Vergleichsmaterials voraus, wie DNA-Proben naher Angehöriger, möglichst aktuelle zahnärztliche Unterlagen und/oder alte Röntgenaufnahmen [7, 21].

### Fallbeispiel (Abschnitt 3):

Im Institut für Rechtsmedizin kann im Felsenbein und im linken Fersenbein molekulargenetisch ein (identisches) männliches DNA-Profil festgestellt werden. Implantiertes medizinisches Material zeigt sich nicht.

Morphologisch können am Schädel, passend zu dem DNA-Profil, typisch männliche Merkmale festgestellt werden. Die Beckenknochen sind nicht vorhanden. Die Körperlänge kann anhand der langen Röhrenknochen abgeschätzt werden (hier durch Humerus, Femur und Fibula). Es ergibt sich nach Olivier [18] eine ungefähre Körperhöhe von 175-182 cm.

#### **1.4 Morphologische Lebensaltersschätzung: Grenzen im Erwachsenenalter**

Morphologische Ansätze zur Lebensaltersschätzung am Knochen eignen sich vor allem beim kindlichen und jugendlichen Skelett. Im jüngeren Lebensalter stützt sich die morphologische Lebensaltersschätzung vor allem auf die Skelettentwicklung (z.B. Schluss der Epiphysenfugen, Verknöcherung knorpeliger Strukturen). Die Genauigkeit nimmt jedoch mit zunehmendem Lebensalter ab und ist grundsätzlich von vielen Faktoren, z. B. sozioökonomischen Einflüssen, abhängig [23]. Bei jüngeren Erwachsenen kann zusätzlich die Morphologie der Schambeingelenksfläche zur Lebensaltersschätzung herangezogen werden [23]. Ist das Skelettwachstum allerdings abgeschlossen, lassen sich makromorphologisch wie histologisch lediglich degenerative Veränderungen zur Lebensaltersschätzung nutzen. Histologische Methoden stützen sich beispielsweise auf die Anzahl verschiedener Typen Osteone, Osteonfragmente und Resorptionsräume in definierten Abschnitten von untersuchten Knochen [24-27]. Derartige Veränderungen sind allerdings hochindividuell und von vielerlei Faktoren abhängig. Zwar nehmen Verschleißerscheinungen im höheren Lebensalter zu, allerdings ist hier die Streuung ausgesprochen groß und maßgeblich abhängig von den Lebensumständen, sodass eine präzise Lebensaltersschätzung am Knochen im Erwachsenenalter rein morphologisch kaum möglich ist [7, 11, 28].

#### Fallbeispiel (Abschnitt 4):

Der noch vorhandene Oberkiefer stellt sich zahnlos und mit überwiegend verschlossenen Zahnfächern dar. Zwei Zahnfächer (Position 14 und 25) sind offen, die Zähne fehlen jedoch. Das zumindest zum großen Teil bereits seit längerer Zeit vor dem Versterben bestandene Fehlen der Zähne im Oberkiefer und die degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule legen ein höheres Lebensalter nahe.

Die erhobenen morphologischen Befunde reichen nicht aus, um einen infrage kommenden Personenkreis in den Vermisstendatenbanken herauszufiltern; bei den weiteren kriminalpolizeilichen Ermittlungen findet sich weiterhin keine vermisste Person, auf die die bisher ermittelten Angaben (männlich, Körperlänge von ca. 175-182 cm [18], höheres Lebensalter) zutrifft.

### **1.5 Molekulare Lebensaltersschätzung auf Basis posttranslationaler Proteinmodifikationen: Neue Möglichkeiten für das Erwachsenenalter**

In den vergangenen Jahrzehnten wurden teils auch für das Erwachsenenalter vielversprechende molekulare Methoden zur Lebensaltersschätzung entwickelt, die altersabhängige Veränderungen von Proteinen und der DNA nutzen [1, 28-30]. Als relevante proteinbasierte Methoden sind hier die Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp) und die Pentosidinkonzentration (Pen) in verschiedenen Geweben – auch im Knochen – zu nennen [31-40].

#### *1.5.1 Akkumulation von D-Asparaginsäure (D-Asp)*

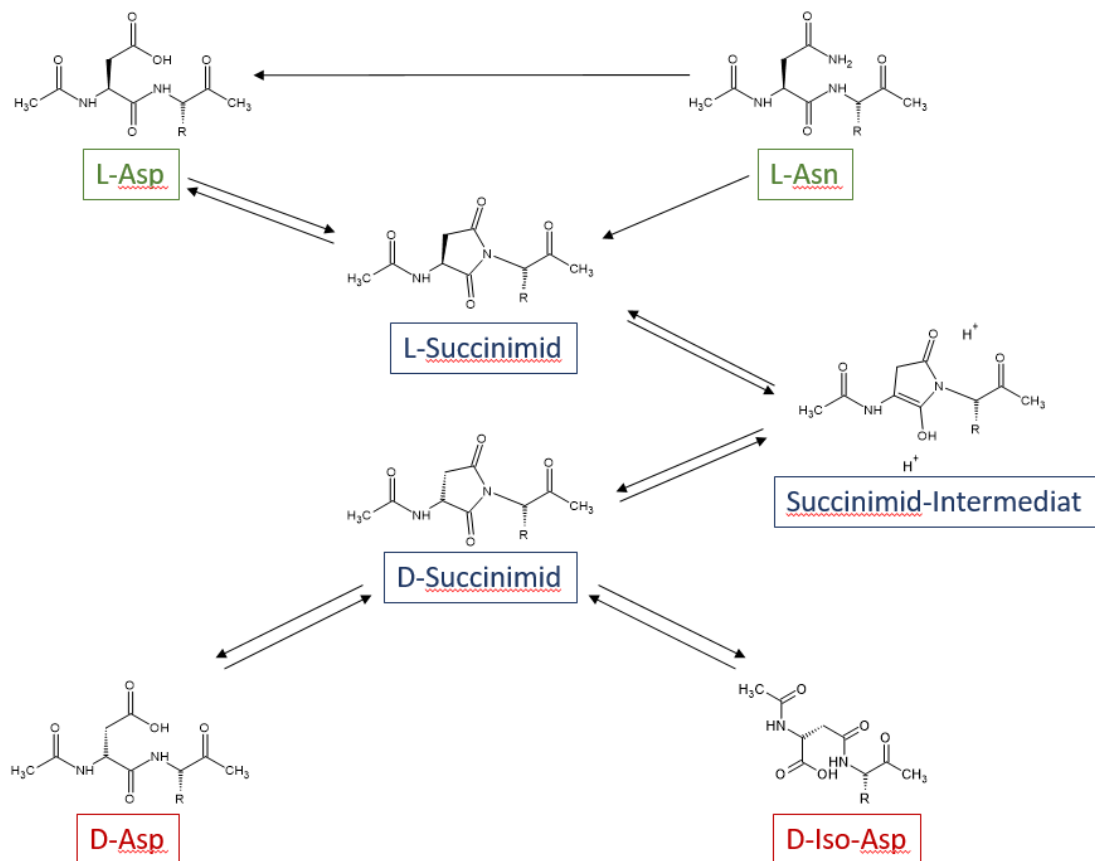
Organische Verbindungen eines zentralen Kohlenstoffatoms mit einer Aminogruppe, einer Carboxylgruppe und einer Restgruppe werden als Aminosäuren bezeichnet. Durch unterschiedliche räumliche Anordnung der vier Substituenten um das zentrale  $\alpha$ -Kohlenstoffatom können Aminosäuren in zwei, sich spiegelbildlich zueinander verhaltenen Formen vorliegen, die als D- (dexter= rechtsdrehend) bzw. L- (laevus= linksdrehend) Enantiomere bezeichnet werden. Ihr Aufbau ist also – mit Ausnahme von Glycin – chiral [41].

Eine im Rahmen der molekularen Lebensaltersschätzung vielfältig untersuchte und eingesetzte Aminosäure ist die proteinogene Asparaginsäure [29-31, 33, 34, 36-38, 40, 42-44], die als nicht-essentielle Aminosäure in nahezu allen menschlichen Proteinen vorkommt [41].

Im Rahmen der Proteinbiosynthese wird ausschließlich die L-Form der Aminosäuren eingebaut [28, 45, 46]. Im weiteren Verlauf kommt es bei vielen Proteinen zu unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise Isomerisierung, Deamidierung oder Oxidationen [42, 47]. Nach Deamidierung von L-Asparagin



(L-Asn) kann ebenso wie direkt aus L-Asparaginsäure (L-Asp) ein L-Succinimid entstehen (s. Abb. 1). Aus dem metastabilen L-Succinimid kann es durch Hydrolyse wiederum zur Entstehung von L-Asparaginsäure (L-Asp) kommen, die sich in L-Iso-Asparaginsäure (L-Iso-Asp) umwandeln (Isomerisierung) kann; es kann jedoch auch zur spontanen Umwandlung von L-Succinimid in sein D-Enantiomer D-Succinimid kommen. Letzteres wird zum Teil wieder zu L-Succinimid und/oder bildet D-Asp (bzw. D-Iso-Asp). Hierbei zeigt jedoch die Reaktion zu D-Asp im Vergleich zu L-Asp eine höhere Geschwindigkeitskonstante, sodass D-Asp in „alternden“ Proteinen akkumulieren kann [48] (Abb. 1).



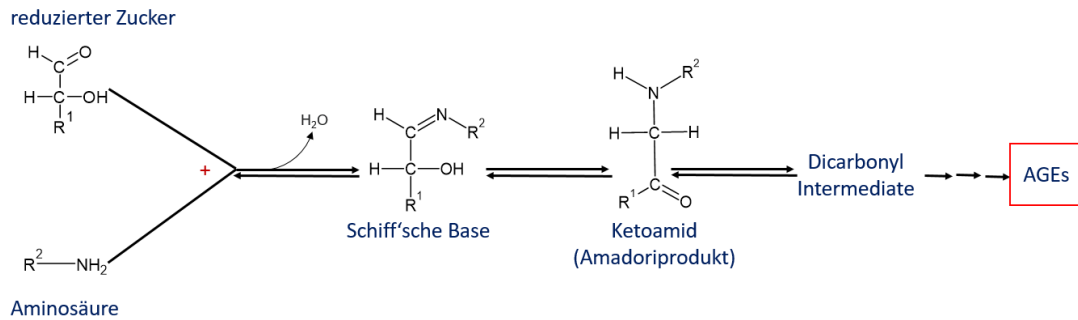
**Abb. 1 Bildung von D-Asp** (modifiziert nach Geiger und Clarke [47]; Strukturformeln mit *ChemSketch* generiert): Reaktionen von L-Asparaginsäure (L-Asp) und L-Asparagin (L-Asn) [grün] via L- und D-Succinimid [blau] zu D-Asparaginsäure (D-Asp) und D-Iso-Asparaginsäure (D-Iso-Asp) [rot]; L = laevus (linksdrehend); D = dexter (rechtsdrehend).

Die Bestimmung des D-Asp-Gehaltes im Verhältnis zum L-Asp-Gehalt kann dann zur molekularen Lebensaltersschätzung genutzt werden, wenn – wie in permanenten und langlebigen Proteinen – nur wenig oder gar kein *Turnover*, also Gewebsumsatz, stattfindet [28].

Wird ein homogenes Gewebe wie Zahnbein oder ein aufgereinigtes Protein (wie Osteocalcin aus Knochen) untersucht, liefert der Ansatz sehr präzise Ergebnisse der Altersschätzungen [28, 49]. Werden allerdings nicht weiter aufgereinigte Proteinfractionen oder gar Gesamtgewebeproben untersucht, werden insbesondere im höheren Lebensalter größere Streuungen beobachtet, die auf eine zunehmende Inhomogenität der Probenzusammensetzung durch alters- oder krankheitsbedingte Degradation von Proteinen zurückzuführen sind [44, 50]. Bei Brandleichen ist der Einfluss von Hitze zu berücksichtigen, der die Entstehung von D-Asp beschleunigt [28, 44].

#### 1.5.2 *Akkumulation von advanced glycation end product (AGEs)*

Grundlage für die Entstehung von advanced glycation end products (AGEs) ist die erstmals von Maillard und Gautier (1912) beschriebene Maillard-Reaktion (s. auch Abb. 2) [51, 52]. Hierbei kommt es zur Reaktion von Proteinen und Lipiden mit reduzierten Zuckern wie Glukose, Fruktose oder Galaktose und letztlich zur Entstehung von AGEs. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die eine gelb-bräunliche Farbe aufweisen. Dieser bei Lebensmitteln als Bräunungsreaktion bekannte Prozess ist beim Braten von Nahrungsmitteln für die bräunliche Farbe verantwortlich [51, 53]. Die nicht-enzymatische Reaktion findet auch *in vivo* statt (Abb. 2): Durch die Reaktion einer Aminosäure mit einem Zucker (Aldose oder Ketose) entsteht eine Schiff'sche Base und über eine Amadori- bzw. Heyns-Umlagerung, Oxidationen und Eliminationen mit Entstehung von Dicarbonyl-Intermediaten, kommt es letztlich zu Bildung irreversibler Endprodukte, den *advanced glycation end products* (AGEs) [39, 51, 54]. Es handelt sich daher hierbei – ebenso wie bei der Entstehung von D-Asp – um post-translationale Proteinmodifikationen [39, 55-57]. Die Entstehung von AGEs führt in zahlreichen Geweben zu entzündlichen Reaktionen, zur Bildung freier Radikale, Gewebsversteifung durch Quervernetzungen der Proteine und Veränderungen der Proteinfunktion [54].



**Abb. 2 Bildung von advanced glycation end products (AGEs) durch Maillard-Reaktion** (modifiziert nach Ahmed [58], Strukturformeln mit *ChemSketch* generiert): Entstehung von AGEs durch Reaktion einer Aminosäure und einem reduzierenden Zucker (unter Abspaltung von Wasser) zu einer Schiff'schen Base zu Ketoamid und Dicarbonyl Intermediaten.

Ein sehr kleiner Anteil der AGEs, etwa 1%, sind fluoreszierend, was zur Folge hat, dass diese Moleküle leicht zu detektieren sind und sich damit gut für Untersuchungen eignen [51]. Ein bereits untersuchtes AGE dieser Gruppe ist Pentosidin (Pen), das im Rahmen einer Reaktion von Aminosäuren und Ribose (reduzierter Zucker) entsteht und zu einer Quervernetzung von Proteinen zwischen Lysin- und Arginin-Resten führt. Wie auch der D-Asp-Gehalt nimmt die Konzentration von AGEs wie Pen in permanenten Proteinen mit steigendem Lebensalter zu, sodass sie sich zur Lebensalterschätzung nutzen lassen [32]. Die meisten Untersuchungen beruhen daher auf der Akkumulation von Pen in Geweben mit geringem *Turnover* [51, 59], u. a. in Dentin [39, 55, 60, 61], Knorpel [32] und Bandscheibe [59]; es existieren aber auch bereits Studien in denen Knochen untersucht wurden [39].

Bei Hitzeeinfluss kommt es zur schnelleren Akkumulation von AGEs, sodass es hier zu falsch hohen Werten kommen kann [39, 55]. Als weitere wichtige Einflussgröße ist die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus zu nennen, sofern die Erkrankung unzureichend behandelt ist. Bei chronisch erhöhter Exposition mit Glukose und damit höheren Glukosekonzentrationen im Blut, wie bei z. B. durch Lebensstil oder medikamentös „schlecht eingestelltem“ Diabetes mellitus, kann es zu erhöhten AGE-Kon-

zentrationen und damit bei der auf der Akkumulation von AGEs basierenden Altersschätzung bei an Diabetes erkrankten Personen zu falsch hohen Ergebnissen kommen [39, 51, 53, 54, 59].

### *1.5.3 Knochen als Untersuchungsgut*

Die Knochenmatrix besteht – bezogen auf das Trockengewicht – aus etwa 35 % organischen und 65 % anorganischen Bestandteilen. Zu den anorganischen Anteilen gehören vor allen Hydroxylapatitkristalle, aber auch Kalium, Chlor, Eisen, Magnesium und Karbonat [62]. Als organischer Bestandteil ist in erster Linie Kollagen Typ I (90 %) zu nennen; 10 % machen nicht-kollagene Proteine, wie Osteonectin, Osteocalcin, Sialoprotein, Phosphoproteine, Glykoproteine, Proteoglykane, Albumin und weitere aus.

Sowohl D-Asp als auch Pen akkumulieren altersabhängig nur in langlebigen Proteinen, sodass sich insbesondere bradytrophe Gewebe wie Dentin, ideal zur Altersschätzung eignen [30, 43]. Knochen ist zwar nicht als bradytroph zu bezeichnen [63], enthält jedoch als inhomogenes Gewebe auch langlebige Proteine, wie Osteocalcin, wodurch bei Proteinaufreinigung ebenfalls präzise Ergebnisse erzielt werden [28, 49]. Eine entsprechende Aufreinigung ist allerdings mit großem Aufwand verbunden und lässt sich nur schwer in die rechtsmedizinische Routine integrieren. Die Konzentration dieser alternden Proteine ist jedoch so hoch, dass auch bei der Analyse des Gesamtproteins – wie sie auch in der vorliegenden Arbeit [1] durchgeführt wurde – eine Altersabhängigkeit festgestellt werden kann [42, 44].

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Knochen sind zwar deutlich stoffwechselaktiver als Dentin und insoweit eigentlich das ungünstigere Untersuchungsmaterial für molekulare Altersschätzungen, allerdings stehen Zähne in Identifikationsfällen nicht immer zur Verfügung – entweder, weil die verstorbene Person zum Todeszeitpunkt zahnlos war, weil Zähne postmortal verloren gingen oder weil ein isolierter Knochen zu untersuchen ist.

Hinzu kommt, dass in der forensischen Praxis nicht jeder Knochenfund auch ein Skelettfund ist; es hängt von vielerlei Faktoren ab, welche Skeletteile bzw. Knochentypen für die Untersuchung verfügbar sind.

Bislang gibt es nur relativ wenige Studien [28, 31, 39, 64] zur Anwendbarkeit der proteinbasierten Methoden zur molekularen Lebensaltersschätzung an Knochen, insbesondere für Pen. Ein systematischer Vergleich von Knochen unterschiedlichen anatomischen Ursprungs ist bislang noch nicht durchgeführt worden. Es ist also bisher nicht bekannt, ob z.B. an Kalottenproben erhobene Daten für eine Lebensaltersschätzung an einer Rippe genutzt werden können.

Diese Forschungslücke sollte durch die vorgelegte Arbeit [1] geschlossen werden. Dazu wurde untersucht, ob für beide analysierten Parameter (D-Asp und Pen) Unterschiede zwischen Knochenproben aus unterschiedlichen Skelettregionen (Proben aus Kalotte, Clavicula, Rippe) festgestellt werden können und – falls dies der Fall ist –, ob eine bestimmte Skelettregion zu bevorzugen ist.

Es lag ein positives Ethikvotum für die durchgeführten Versuche vor (Studennummer: 6191R).

- 2 **Publikation:** König, L., Becker, J., Reckert, A., Ritz-Timme, S. *Molecular age estimation based on posttranslational protein modifications in bone: why the type of bone matters.* Int J Legal Med, 2023. 137(2): p. 437-443.



# Molecular age estimation based on posttranslational protein modifications in bone: why the type of bone matters

Lisa König<sup>1</sup> · Julia Becker<sup>1</sup> · Alexandra Reckert<sup>1</sup> · Stefanie Ritz-Timme<sup>1</sup>

Received: 21 September 2022 / Accepted: 9 January 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

Age-at-death estimation is of great relevance for the identification of unknown deceased individuals. In skeletonised corpses, teeth and bones are theoretically available for age estimation, but in many cases, only single bones or even only bone fragments are available for examination. In these cases, conventional morphological methods may not be applicable, and the application of molecular methods may be considered. Protein-based molecular methods based on the D-aspartic acid (D-Asp) or pentosidine (Pen) content have already been successfully applied to bone samples. However, the impact of the analysed type of bone has not yet been systematically investigated, and it is still unclear whether data from samples of one skeletal region (e.g. skull) can also be used for age estimation for samples of other regions (e.g. femur). To address this question, D-Asp and Pen were analysed in bone samples from three skeletal regions (skull, clavicle, and rib), each from the same individual. Differences between the bone types were tested by t-test, and correlation coefficients ( $\rho$ ) were calculated according to Spearman. In all types of bone, an age-dependent accumulation of D-Asp and Pen was observed. However, both parameters (D-Asp and Pen) exhibited significant differences between bone samples from different anatomical regions. These differences can be explained by differences in structure and metabolism in the examined bone types and have to be addressed in age estimation based on D-Asp and Pen. In future studies, bone type-specific training and test data have to be collected, and bone type-specific models have to be established.

**Keywords** Age estimation · Pentosidine · Aspartic acid · Bone

## Introduction

In the identification of human remains, age estimation is of key importance. To date, a great repertoire of morphological, molecular, and physicochemical methods is available for age estimation [1–4]. The selection of the most suitable method in a specific case depends on the type and condition of the available samples. The most relevant entity of sample type is bone. The available material for analysis can range from an entire skeleton to a sample of only one isolated bone or bone fragment.

In adult age, a sufficiently accurate age estimation based on morphological findings may be difficult or even impossible, e.g. in cases of isolated bones or bone fragments. The analysis of bone samples via molecular methods based on posttranslational protein modifications and DNA methylation opens up new possibilities for age estimation.

Protein-based approaches for molecular age estimation can be based on the age-dependent accumulation of D-aspartic acid (D-Asp) and pentosidine (Pen) in long-living proteins of various tissues [5–14].

The accumulation of D-Asp is the result of spontaneous conversion of L-aspartic acid into its D-form at c. 37 °C body temperature (for details, see [15, 16]). The kinetics of this process depends on the structure of the affected proteins; the fewer steric hindrances hinder the process, the faster the conversion of L-residues in their D-form may occur. That means that every protein has its own kinetics of D-Asp accumulation. The process is temperature

✉ Lisa König  
lisa.koenig@med.uni-duesseldorf.de

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

dependent. After death, it ceases in lower ambient temperatures (as compared to an *in vivo* body temperature of 37 °C). Given forensically relevant post-mortem intervals of up to several decades and no extreme surrounding conditions (as in the case of burnt bodies), no relevant impact of a post-mortem conversion of L-Asp into D-Asp on age estimation is to be expected [17].

The Pen is an advanced glycation product that accumulates in an age-dependent manner in long-living proteins under healthy conditions (for details, see [18]) and seems to be extremely stable after death; Mahlke et al. (2021) report plausible age estimates based on Pen in dentine even after millennia [19]. Since the formation of a Pen depends on—among other factors—protein structure, every affected protein has its own kinetics of Pen accumulation. Pathological metabolic conditions such as long-lasting hyperglycaemic states or renal failure may result in elevated Pen levels and thus in false high age estimates [20–24]. A combined analysis of D-Asp and Pen (and DNA methylation) is recommended to detect such errors caused by metabolic diseases [14].

D-Asp and Pen accumulate in an age-dependent manner only in long-living proteins. Highly bradytrophic and homogenous tissues are optimal for the application of these methods. Especially dentine is an ideal tissue for age estimation based on D-Asp and Pen [25, 26]. Bone tissue, however, is neither bradytrophic nor homogenous, but it does contain long-living proteins like osteocalcin [1, 27]. If such long-living bone proteins are purified, age estimation based on posttranslational protein modifications may be very accurate [1, 27]. The analysis of such purified protein samples is highly sophisticated, and the applicability of such methods in forensic practise is therefore limited. However, bone tissue contains long-living proteins in such high concentrations that the detection of an age-dependent accumulation of D-Asp and Pen is possible even if the long-living proteins are not purified [2, 28, 29]. Admittedly, the accuracy of age estimation based on D-Asp and Pen in non-purified bone samples (total protein or non-collagenous samples) is much lower compared to purified bone protein or dentine samples. Nevertheless, accuracy appears to be high enough for an application of these molecular methods to non-purified bone and seems to be superior to morphological methods (at least in adult age), especially if applied in a combined model [3, 14].

The potential of these protein-based approaches for age estimation by analysis of bone samples has to be further explored. One important question yet to be answered

is the impact of the anatomical origin of the analysed bone sample; this aspect has not yet been systematically investigated. So far, most studies on bone have focused on samples of skull or femur [1, 5, 29, 30], and it is unclear if data from one of these skeletal regions can be used for age estimation by analysis of another, e.g. a rib sample.

An impact of the type of bone sample on age estimation based on D-Asp and Pen can be expected since different types of bone vary in tissue structure and kinetics of turnover [31–33]. If not purified bone proteins, but total tissue samples or extracted protein fractions (e.g. the non-collagenous protein fraction after acid extraction) are analysed, the composition of these mixed protein samples is of relevance for the results of D-Asp and Pen analysis. Somewhat simplified, one could assume the following: the more long-living proteins in a sample, the higher the D-Asp and Pen concentrations. Accordingly, D-Asp and Pen concentrations can be expected to vary in samples of bones from different anatomical origins.

A better understanding of the impact of the type of bone on age estimation based on D-Asp and Pen is of utmost importance for forensic casework as well as for the planning of further research.

Therefore, we tested the hypothesis that the anatomical origin of bone samples has an impact on age estimation based on D-Asp and Pen by analysing and comparing bone samples from skull, rib, and clavicle of 58 individuals.

## Material and methods

### Bone samples

Samples from the skull, one clavicle, and one rib of 58 individuals with known ages between 0.21 and 94 years were collected during routine forensic autopsies. Individuals with known diabetes mellitus or advanced kidney disease were excluded from Pen analyses. The post-mortem intervals were between approx. 5 h and 8 days. Samples for all three bone types were available for 51 individuals for at least one parameter; in 6 cases, only skull samples and in one case, only clavicle samples could be analysed. In some cases, the Pen concentrations were under the detection limit. Table 1 in the supplementary material gives an overview of the available material and data (Table 1).



## Preparation of bone samples

From each individual, samples from the skull, one clavicle, and one rib were analysed. Skull samples were taken from the left parietal bone, close to the usual saw cut for opening the skull during autopsies, clavicle samples were dissected from the medial half of the left clavicle, and rib samples were collected from the middle third of the fourth rib on the left-hand side.

Soft tissue and the cancellous parts of the bone samples were removed mechanically. The bone samples were sawn into approx.  $1 \times 1 \times 0.5$  cm large fragments and pulverised by Ika Tube Mill Control (17,000 rpm). The resulting powder was washed in distilled water, 15% sodium chloride, 2% sodium dodecyl sulphate, and ethanol/ether (vol. 3:1), respectively, lyophilised and stored at  $-20$  °C until further analysis.

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

The D-Asp content of bone was determined in total protein (TP) samples as well as in the non-collagenous bone fraction (NCP). The NCP was prepared by acid extraction: 7 ml of 0.6 N HCl was added to 200 mg of bone powder, the sample was shaken for 15 min, centrifuged, and an aliquot of 1.4 ml of the supernatant was dried.

Bone powder samples (TP and NCP) were hydrolysed for 6 h with 1 ml of 6 N HCl at 100 °C.

D-aspartic acid and L-aspartic acid were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Becker et al. 2020 [14] with minor modifications (shortened gradient). Samples were dissolved in 1 ml sample buffer (0.01 M HCL with 1.5 mM sodium azide and 0.03 mM L-homo-arginine). For HPLC analysis, a C18 column from Thermo Scientific (Hypersil BDS C18, 250 × 3 mm, particle size 5 µm) was used as the stationary phase. The mobile phase included eluents A (23 mM sodium acetate, 1.5 mM sodium azide, and 1 mM EDTA) and B (92.3% methanol, 7.7% acetonitrile). The amino acid enantiomers were detected by a gradient over a period of 49 min at a constant flow rate of 0.56 ml/min. Amino acids were detected at an excitation wavelength of  $\lambda = 230$  nm and a detection wavelength of  $\lambda = 445$  nm. D- aspartic acid and L-aspartic acid) were identified by their retention times.

The D-Asp content was expressed as  $\ln \left( \frac{1 + D/L}{1 - D/L} \right)$ , with D = D-aspartic acid and L = L-aspartic acid).

## Determination of the Pen content

The Pen content of the bone samples (TP) was analysed by HPLC as described by Greis et al. [34], with several modifications (introduction of a solid phase extraction, shortened gradient in HPLC). A total of 100 mg of bone powder were hydrolysed with 1 ml of 6 N HCl at 110 °C for 18 h. After drying, 1 ml of 0.01 M heptafluorobutyric acid (HFBA) was added. The solution was filtered through syringe filters ( $\varnothing$  25 mm and 0.45 µm pore diameter), and solid phase extraction was performed (Phenomenex, Strata-X 33 µm Polymeric Reversed Phase). The dried samples were dissolved in 200 µl of pyridoxine-HFBA buffer. A total of 50 µl of each sample were injected into the HPLC system. The stationary phase was a semi-preparative column (Onyx™ Monolithic Semi-PREP C18, 100 × 4.6 mm) by Phenomenex. A linear gradient of acetonitrile (eluent B) and 0.1% HFBA in HPLC water (eluent A) was used as mobile phase with a flow rate of 1 ml/min over a period of 37 min, an extinction/emission wavelength of 335/385 nm for detection of pentosidine. Pen was identified by its retention time. A pentosidine standard (pentosidine 0.03303 nmol/ml in 0.01 M HFBA, Cayman Chemical) was used to establish a calibration curve.

## Statistics

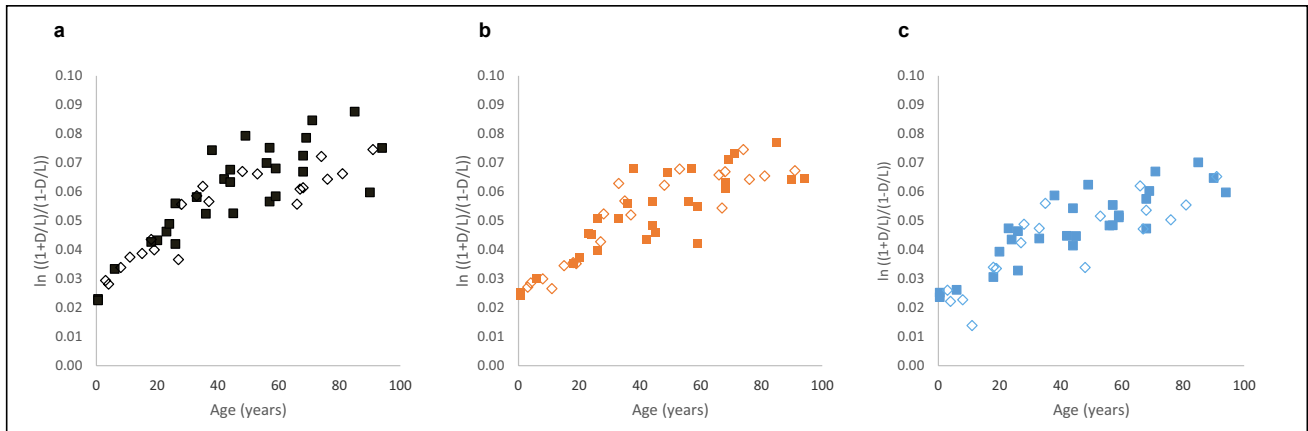
Spearman correlation coefficients ( $\rho$ ) were calculated for both parameters (D-Asp and Pen) and all three types of bone. To test whether the D-Asp and Pen contents differ between the types of bone, *t*-test was performed for dependent samples. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

## Results

### D-Asp in samples of different types of bone

All types of bone exhibited an age-dependent accumulation of D-Asp in TP samples as well as in the non-collagenous NCP fraction (Figs. 1a–c and 2a–c). The scattering of data increased significantly with increasing age; this is most obvious in the skull and clavicle samples; by contrast, they exhibit a very strong relationship between D-Asp and age in younger ages.

In the TP samples, the correlation of D-Asp concentration and age was very similar in all bone types analysed



**Fig. 1** D-aspartic acid (D-Asp) content (as  $\ln [(1 + D/L)/(1 - D/L)]$ ; D= D-aspartic acid; L= L-aspartic acid) in total protein (TP) of female ( $\diamond$ ) and male ( $\blacksquare$ ) bone samples, related to the age at death: **a**

skull;  $n=50$  (21 females, 29 males), **b** clavicle;  $n=50$  (21 females, 29 males), and **c** rib;  $n=46$  (18 females, 28 males)

(clavicle:  $\rho=0.85$ , skull:  $\rho=0.84$ , and rib:  $\rho=0.84$ ). In the NCP samples, the correlation was strongest in skull samples ( $\rho=0.85$ ), followed by the clavicle ( $\rho=0.76$ ) and rib samples ( $\rho=0.72$ ).

T-test of dependent samples revealed statistically significant differences of D-Asp concentrations in skull v. in rib ( $p=0.000000000014$ ), in clavicle v. in rib ( $p=0.00000017$ ), and in skull v. in clavicle samples ( $p=0.0000399$ ).

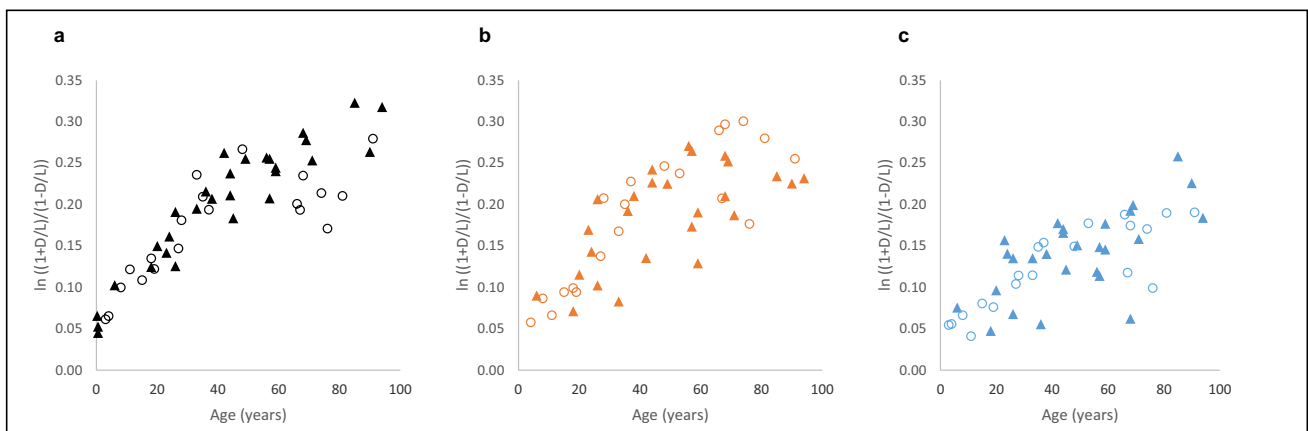
Due to the low number of individuals, differences between female and male individuals could not be statistically tested; as shown by the highlighted female and male samples in Figs. 1a–c and 2a–c, there was no clear indication of relevant differences between the sexes.

### Pen in samples of different types of bone

Pen concentrations accumulated with increasing ages in all examined types of bone. In the rib samples, Pen concentrations exhibit very high values in older ages and a much higher scattering, as compared to the other bone types (Fig. 3a–c). The clavicle and rib samples showed a markedly increasing scattering of data with increasing ages.

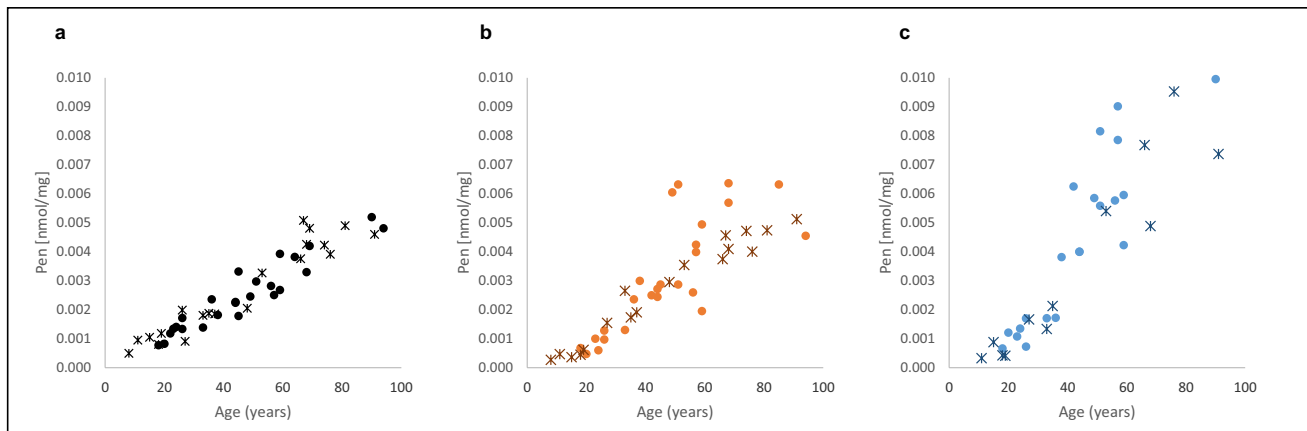
The relationship between Pen concentration and age was closest in skull samples ( $\rho=0.95$ ), followed by rib ( $\rho=0.93$ ) and clavicle samples ( $\rho=0.90$ ).

T-test of dependent samples revealed significant differences in Pen concentrations in skull v. in rib ( $p=0.00013$ ) and in clavicle v. in rib samples ( $p=0.00018$ ). There was



**Fig. 2** D-aspartic acid (D-Asp) content (as  $\ln [(1 + D/L)/(1 - D/L)]$ ; D= D-aspartic acid; L= L-aspartic acid) in  $\ln [(1 + D/L)/(1 - D/L)]$  in non-collagenous total protein (NCP) of female ( $\circ$ ) and male ( $\blacktriangle$ )

bone samples, related to the age at death: **a** skull;  $n=49$  (20 females, 29 males), **b** clavicle;  $n=46$  (20 females, 26 males), and **c** rib;  $n=47$  (20 females, 27 males)



**Fig. 3** Pentosidine (Pen) concentration [nmol/mg] of female (✕) and male (●) bone samples, related to the age at death: **a** skull;  $n=45$  (20 females, 25 males), **b** clavicle;  $n=43$  (18 females, 25 males), and **c** rib;  $n=37$  (13 females, 24 males)

no statistically significant difference in Pen concentrations in skull v. in clavicle samples ( $p=0.07$ ).

Again, differences between female and male individuals could not be statistically tested (due to the low number of individuals); the highlighted female and male samples in Fig. 3a–c also do not indicate clear differences between the sexes.

## Discussion

For the first time, D-Asp and Pen were analysed in different types of bone in direct comparison (different types of bones from each individual included in the study, all analyses in one lab). The results of these analyses confirm the hypothesis that the type of bone used has an impact on age estimation based on D-Asp and Pen.

For the interpretation of the presented data, it is of particular importance to understand the influence of the protein composition on the D-Asp and Pen concentrations in a mixed protein sample (TP and NCP samples); in such mixed samples, D-Asp and Pen levels are summary values consisting of D-Asp and Pen concentrations of every single protein in the sample. Each of these proteins has its own kinetics of D-Asp and Pen accumulation, especially depending on protein structure and metabolism (usually: no accumulation in proteins with very high turnover, low accumulation in proteins with slow turnover as well as in proteins with a complex structure and steric hindrances, and fast accumulation in long-living and small proteins [1]). Therefore, changes in the protein composition of a sample will have strong effects on the D-Asp and Pen concentrations in mixed protein samples.

*T*-test for dependent samples revealed significant differences between all types of bone analysed and all parameters

examined, except for Pen in skull and clavicle samples. Differences concern both the kinetics of accumulation of D-Asp and Pen and the scattering of data.

These findings can be explained by differences in structure and metabolism in bones from other anatomical sites, resulting in varying protein compositions of the samples. The rib samples exhibited the most striking differences (especially for Pen) as compared to samples of skull and clavicle. This may be explained by a possibly higher rate of remodelling due to individual load and higher stress in ribs [35–37] as well as by the bone structure of the ribs with a high proportion of cancellous bone that possibly could not be removed in total.

A further explanation for the observed differences in the accumulation of D-Asp and Pen in the bone types examined may be variations in tissue ageing at a molecular level. The significantly wider scattering of data with increasing age in all bone types is typical for many biomarkers of ageing and due to an increasing destabilisation of the tissues and their functionality during ageing. Bone structure and metabolism are changing with increasing age; this process may result in loss of bone mass, decreasing thickness, and osteoporosis [31–33, 38, 39]. These structural and metabolic changes of bone with age may cause significant changes in the protein composition of bone samples, resulting in a significantly wider scattering of D-Asp and Pen concentrations with increasing age in mixed protein samples. It can be assumed that the effect of ageing processes on bone proteins varies in bones from different skeletal sites, and this might be another cause for the varying scattering patterns of data for TP and NCP samples of different bone types.

A stronger or weaker correlation of D-Asp and Pen with age has a direct impact on the accuracy of age estimation by these approaches. It was not the aim of this

study to establish definitive models for age estimation, and we did not investigate an independent test sample to determine the errors of age estimation for the different bone types. Nevertheless, our data allow the conclusion that different errors in age estimation are to be assumed for different bone types.

## Conclusions: what do the presented data mean for age estimation based on D-Asp and Pen in bone?

D-Asp and Pen levels in skull, clavicle, and rib samples differed significantly from each other. Therefore, the results of age estimation based on D-Asp or Pen in samples from one specific bone type may become significantly worse if training data from other bone types are used (e.g. rib sample—skull training data). Optimal and valid results can only be expected if age estimation can be based on a bone type-specific model. Efforts to establish such bone type-specific models should be made to address different kinetics in age-dependent accumulation of D-Asp and Pen as well as different errors in age estimation.

The presented data confirm an age-dependent accumulation of D-Asp and Pen in bone samples that can be used for age estimation if sufficient training data are available for the type of bone to be analysed. Skull and clavicle samples appear to reveal more precise results than rib samples. The analysis of more than one bone type and more than one parameter may be useful if multivariate models based on training data for all bone types are available.

In principle, the use of multivariate approaches that use information from different biological contexts by including diverse parameters is recommended to address the significantly lower accuracy of age estimation in older ages as well as problems with confounding factors (e.g. long-lasting hyperglycaemic states or renal failure for Pen) [14].

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00414-023-02948-9>.

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

**Data availability** Not applicable.

## Declarations

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

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

**Consent to participate** Not applicable.

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Research involving human participants and/or animals** The ethical committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf approved the study, including human tissues. Animal experiments were not performed.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Ritz-Timme S (1999) Age estimation based on the degree of racemization of aspartic acid: principles, methodology, possibilities, limitations, areas of application. Vol 23 Schmidt-Romhild
- Meißner C, Ritz-Timme S (2010) Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int* 203:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.010>
- Böhme P, Reckert A, Becker J, Ritz-Timme S (2021) Molecular methods for age estimation. *Rechtsmedizin* 31:177–182. <https://doi.org/10.1007/s00194-021-00490-9>
- Pillalamarri M, Manyam R, Pasupuleti S, Birajdar S, Akula ST (2022) Biochemical analyses for dental age estimation: a review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 12. <https://doi.org/10.1186/s41935-021-00260-4>
- Ohtani SMY, Kobayashi Y (1998) Evaluation of aspartic acid racemization ratios in the human femur for age estimation. *J Forensic Sci* 43:949–953
- Verzijl NDJ, Oldehinkel E (2000) Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J* 350(Pt 2):81–87
- Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins M (2003) Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *Int J Legal Med* 117:96–101. <https://doi.org/10.1007/s00414-002-0355-2>
- Ohtani S, Ito R, Yamamoto T (2003) Differences in the D/L aspartic acid ratios in dentin among different types of teeth from the same individual and estimated age. *Int J Legal Med* 117:149–152. <https://doi.org/10.1007/s00414-003-0365-8>
- Sivan SS, Tsitron E, Wachtel E et al (2006) Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs. *Biochem J* 399:29–35. <https://doi.org/10.1042/BJ20060579>
- Ohtani S, Yamamoto T, Abe I, Kinoshita Y (2007) Age-dependent changes in the racemisation ratio of aspartic acid in human alveolar bone. *Arch Oral Biol* 52:233–236. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.08.011>

11. Dobberstein RC, Tung SM, Ritz-Timme S (2010) Aspartic acid racemisation in purified elastin from arteries as basis for age estimation. *Int J Legal Med* 124:269–275. <https://doi.org/10.1007/s00414-009-0392-1>
12. Klumb K, Matzenauer C, Reckert A, Lehmann K, Ritz-Timme S (2016) Age estimation based on aspartic acid racemization in human sclera. *Int J Legal Med* 130:207–211. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1255-6>
13. Valenzuela A, Guerra-Hernandez E, Rufian-Henares JA, Marquez-Ruiz AB, Hougen HP, Garcia-Villanova B (2018) Differences in non-enzymatic glycation products in human dentine and clavicle: changes with aging. *Int J Legal Med* 132:1749–1758. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1908-3>
14. Becker J, Mahlke NS, Reckert A, Eickhoff SB, Ritz-Timme S (2020) Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study. *Int J Legal Med* 134:721–733. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02054-9>
15. Geiger T, Clarke S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J Biol Chem* 262:785–794. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)75855-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)75855-4)
16. Stephenson RC, Clarke S (1989) Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *J Biol Chem* 264:6164–6170. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83327-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83327-0)
17. Ogino THO, Nagy B (1985) Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age at death. *Forensic Sci Int*
18. Li H, Yu SJ (2018) Review of pentosidine and pyrroline in food and chemical models: formation, potential risks and determination. *J Sci Food Agric* 98:3225–3233. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8853>
19. Mahlke NS, Renhart S, Talaa D, Reckert A, Ritz-Timme S (2021) Molecular clocks in ancient proteins: do they reflect the age at death even after millennia? *Int J Legal Med* 135:1225–1233. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02522-1>
20. Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research* 56(1):1–22
21. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A et al (2007) Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr* 40:349–356. <https://doi.org/10.1007/s00391-007-0484-9>
22. Mitome J, Yamamoto H, Saito M, Yokoyama K, Marumo K, Hosoya T (2011) Nonenzymatic cross-linking pentosidine increase in bone collagen and are associated with disorders of bone mineralization in dialysis patients. *Calcif Tissue Int* 88:521–529. <https://doi.org/10.1007/s00223-011-9488-y>
23. O'Grady KL, Khosla S, Farr JN et al (2020) Development and application of mass spectroscopy assays for nepsilon-(1-carboxymethyl)-L-lysine and pentosidine in renal failure and diabetes. *J Appl Lab Med* 5:558–568. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa023>
24. Steenbeke M, Speeckaert R, Desmedt S, Glorieux G, Delanghe JR, Speeckaert MM (2022) The role of advanced glycation end products and its soluble receptor in kidney diseases. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23073439>
25. Siahaan T, Reckert A, Becker J et al (2021) Molecular and morphological findings in a sample of oral surgery patients: what can we learn for multivariate concepts for age estimation? *J Forensic Sci* 66:1524–1532. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14704>
26. Cz S, Ubelaker DH (2013) Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. *Estimation age-at-death Ageing Res Rev* 12:605–617. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.02.002>
27. Ritz STA, Schütz HW, Hollmann A, Rochholz G (1996) Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: basis for an accurate age at death determination. *Forensic Sci Int* 77(1–2):13–26. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01834-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01834-4)
28. Ritz-Timme S, Collins MJ (2002) Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Res Rev* 1:43–59. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00363-3)
29. Ritz STA, Schütz HW (1994) Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in noncollagenous bone proteins. *Forensic Sci Int* 69:149–159. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(94\)90251-8](https://doi.org/10.1016/0379-0738(94)90251-8)
30. Monum T, Jaikang C, Sinthubua A, Prasitwattanaseree S, Mahakkanukrauh P (2019) Age estimation using aspartic amino acid racemization from a femur. *Aust J Forensic Sci* 51:417–425
31. Boskey AL, Coleman R (2010) Aging and bone. *J Dent Res* 89:1333–1348. <https://doi.org/10.1177/0022034510377791>
32. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV (2016) Bone turnover markers: emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian J Endocrinol Metab* 20:846–852. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.192914>
33. Corrado A, Cici D, Rotondo C, Maruotti N, Cantatore FP (2020) Molecular basis of bone aging. *Int J Mol Sci* 21:3679
34. Greis F, Reckert A, Fischer K, Ritz-Timme S (2018) Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation? *Int J Legal Med* 132:799–805. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1671-x>
35. Warden SJ, Burr DB, Brukner PD (2006) Stress fractures: pathophysiology, epidemiology, and risk factors. *Curr Osteoporos Rep* 4:103–109
36. Warden SJ, Gutschlag FR, Wajswelner H, Crossley KM (2002) Aetiology of rib stress fractures in rowers. *Sports Med* 32:819–836
37. Hasani M, Razaghi R, Hassani K, Rahmati SM, Tehrani P, Karimi A (2020) A patient-specific finite element model of the smoker's lung during breathing. *Proc Inst Mech Eng Part E: J Process Mech Eng* 235:879–886. <https://doi.org/10.1177/0954408920974814>
38. Seibel MJ (2005) Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *The Clinical biochemist. Reviews/Australian Association of Clinical Biochemists* 26:97
39. Holcombe SA, Derstine BA (2022) Rib cortical bone thickness variation in adults by age and sex. *J Anat*. <https://doi.org/10.1111/joa.13751>

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

### 3 Diskussion

#### 3.1 Knochen ist nicht gleich Knochen – Was bedeutet das für die molekulare Altersschätzung auf Basis von D-Asp und Pen?

Die in der Publikation [1] präsentierten Daten zeigen, dass sowohl der D-Asp-Gehalt als auch die Pen Konzentration sich abhängig von dem anatomischen Ursprung des Knochens signifikant unterscheiden. Die engste Korrelation mit dem Lebensalter zeigte sich bei der Pen Konzentration in den Proben aus der Schädelkalotte. Dies dürfte in Zusammenhang mit einem geringeren *Turnover* des verhältnismäßig wenig belasteten Schädelknochens [65] sowie möglicherweise unzureichend entfernten spongiösen Knochenanteilen bei Clavicula und Rippe stehen. Insbesondere bei den Proben aus der Rippe war die Streuung besonders hoch, was auf einen höheren *Turnover* bei größerer Belastung zurückzuführen sein könnte [66-68].

Die Aktivität der Zellen in der Knochenmatrix (Osteozyten, Osteoklasten, Osteoblasten) beeinflusst den Auf- und Abbau und damit den Knochenumsatz (den *Turnover* des Knochengewebes). Die Gewebemöostase wird durch verschiedene Einflüsse bzw. Regulationsmechanismen bestimmt: z. B. biomechanische Faktoren durch auf den Knochen wirkende Kräfte, Hormone (z. B. Parathormon (PTH), Wachstumshormon (GH)) und Zytokine. Zumindest teilweise wird die Zell-Aktivierung durch Osteozyten gesteuert, die mechanische Belastungen erkennen und auf diese reagieren. Osteoklasten werden rekrutiert und aktivierte Osteoklasten fusionieren zu mehrkernigen Osteoklasten. Diese wiederum sorgen für die Resorption des Knochens. Anschließend werden Osteoblasten in die Resorptionshöhle rekrutiert und lagern neues Osteoid ab, das schließlich verkalkt. Die Geschwindigkeit des *Turnovers* variiert abhängig von verschiedenen Faktoren (Erkrankungen, Belastung, hormonelle Einflüsse) je nach Knochentyp; er ist am höchsten an Lokalisationen, an denen trabekulärer Knochen vorherrscht und am niedrigsten an Stellen mit viel kortikalem Knochen [66, 69-72].

Die Ergebnisse der Arbeit [1] zeigen insgesamt, dass Daten, die z.B. an der Schädelkalotte erhoben wurden, nicht für die Altersschätzung einer Probe einer anderen Region (z.B. Femur) verwendet werden können [1]. Dies bedeutet, dass es für eine zuverlässige

molekulare Altersschätzung immer eines entsprechenden, knochentyp-spezifischen Trainingsdatensatzes für den zu untersuchenden Knochen bedarf. Entsprechende, dann ausreichend umfangreiche Datensätze (die Gesamtanzahl der im Rahmen der Arbeit [1] bereits untersuchten Knochen für die Etablierung valider Modelle zur Altersschätzung ist zu gering) müssen erhoben werden, um den sehr unterschiedlichen Fund-Situationen der forensischen Praxis zu genügen.

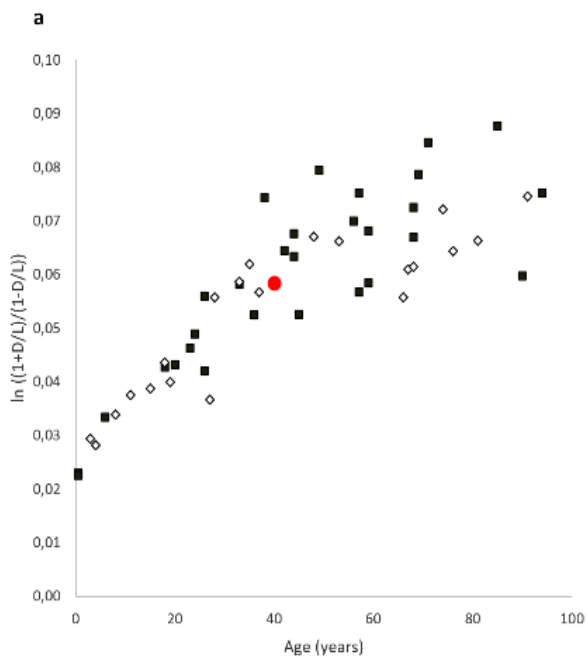
Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit erhobenen Daten beziehen sich auf Proben, die aus streng standardisierten Arealen entnommen wurden. Es ist theoretisch denkbar, dass auch innerhalb eines Knochens (beispielsweise einer Brustbeinnahen und einer Wirbelsäulennahen Probe derselben Rippe) Unterschiede und gewisse Schwankungen vorliegen können. Auch hier könnten zwischen verschiedenen Knochentypen Unterschiede vorliegen – beispielsweise könnten zwischen dem stark belasteten Oberschenkelkopf und dem weniger belasteten Oberschenkelchaft größere Unterschiede vorliegen als an verschiedenen Lokalisationen der Schädelbasis. Auch diesbezüglich bedarf es weiterer Untersuchungen.

Systematisch erhobene Daten für jeweils verschiedene Knochentypen sollten in die Etablierung multivariater Modelle eingehen, die immer dann zum Einsatz kommen könnten, wenn ein Fund mehrere Knochentypen umfasst. So dürfte eine höhere Präzision der Altersschätzung erreichbar sein. Solche Modelle könnten auch mehrere Parameter (hier ist als vielversprechender Parameter neben den untersuchten D-Asp und Pen Konzentrationen insbesondere die DNA-Methylierung (mDNA) zu nennen [29]) berücksichtigen, wie auch noch weitere Gewebe, die verhältnismäßig robust gegenüber postmortalen Veränderungen sind, wie beispielsweise Achillessehngewebe [40]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Etablierung multivariater Modelle unter Einbeziehung mehrerer Gewebsarten und unterschiedlicher Parameter ein potentes Konzept zum Ausgleich biologischer Variabilität der genutzten Parameter ist [40].



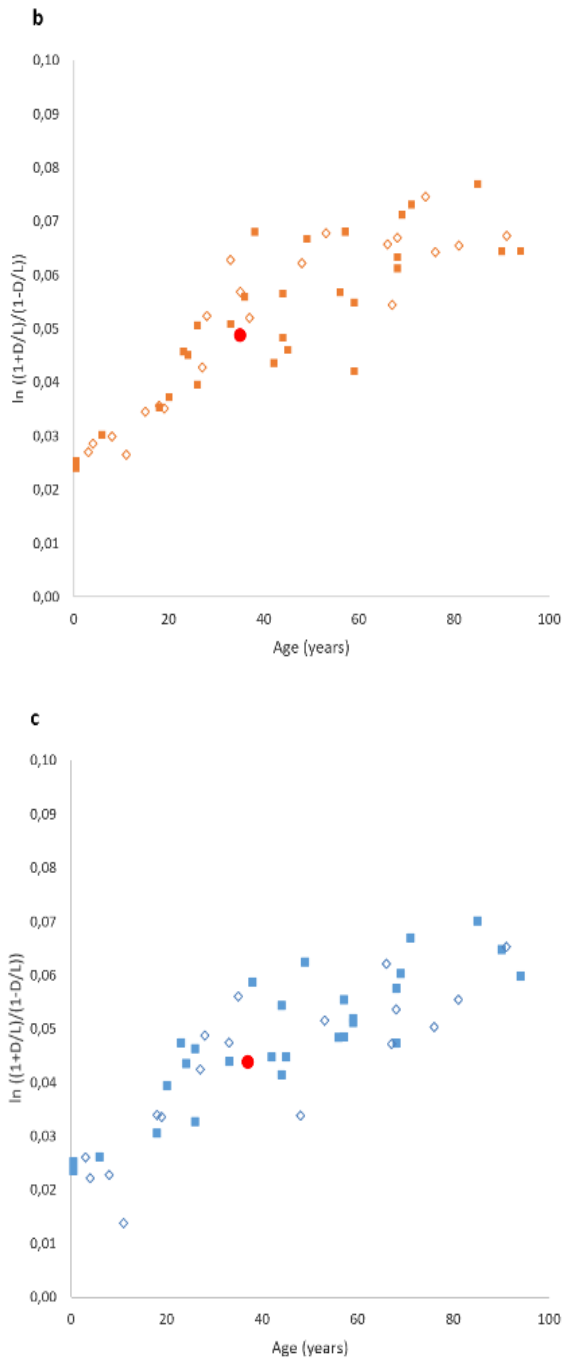
### Fallbeispiel (Abschnitt 5):

Da seitens der Kriminalpolizei weiterhin kein Ermittlungserfolg erzielt werden konnte, wünscht sie eine möglichst präzise Altersschätzung. Nachdem die morphologische Altersschätzung zu keinen hilfreichen Ergebnissen geführt hatte, bitten die Ermittlungsbehörden um eine Altersschätzung auf Basis von D-Asp und Pen – dies, obwohl auf die noch geringe Fallzahl des Datensatzes und eine damit verbundene Unsicherheit der Abschätzung der Fehlerbreite hingewiesen wurde. Es wurden sodann der D-Asp-Gehalt und die Pen Konzentration von Kalotte, Schlüsselbein und einer Rippe bestimmt. Der Betrag des Messwertes des D-Asp-Gehalt für Kalotte lag bei 0,0584001, der des Schlüsselbeins bei 0,0488013 und der der Rippe bei 0,04380102 (Abb. 3). Mit diesen Messwerten ergaben sich unter Nutzung von aus dem Trainingsdatensatz, also den an Proben von Kalotte, Clavicula und Rippen erhobenen Daten [1], abgeleiteten Regressionsgleichungen Schätzwerte für das Lebensalter von 40 Jahren (Kalotte), 35 Jahren (Clavicula) bzw. 37 Jahren (Rippe) (s. auch Abb. 3).



**Abb. 3 (Legende s. Seite 18)**





**Abb. 3 D-Asp in Kalotte, Clavicula und Rippe mit Messpunkten (rot) der Knochen aus dem Fallbeispiel:** D-Asparaginsäure (D-Asp)-Gehalt (als  $\ln \left[ \frac{1+D/L}{1-D/L} \right]$ ); D=D-Asparaginsäure, L = L-Asparaginsäure) im Gesamtprotein (TP) weiblicher ( $\diamond$ ) und männlicher ( $\blacksquare$ ) Knochenproben in Abhängigkeit zum erreichten Lebensalter: in (a) Kalotte, (b) Clavicula, (c) Rippe mit den jeweiligen Messpunkten (roter Punkt) der entsprechenden Knochen des Fallbeispiels in Abhängigkeit von dem mittels linearer Regressionsgleichungen ermitteltem Lebensalter (modifiziert nach König et al.[1]).

Als Pen Konzentration wurden in der Kalotte ein Betrag von 0,0065201, im Schlüsselbein von 0,00765012 und in der Rippe von 0,00765012 gemessen (Abb. 4). Mit diesen Messwerten ergaben sich unter Nutzung von aus dem Trainingsdatensatz abgeleiteten Regressionsgleichungen Schätzwerte für das Lebensalter von 110 Jahren (Kalotte), 115 Jahren (Clavicula), 117 Jahren (Rippe) (s. auch Abb. 4).

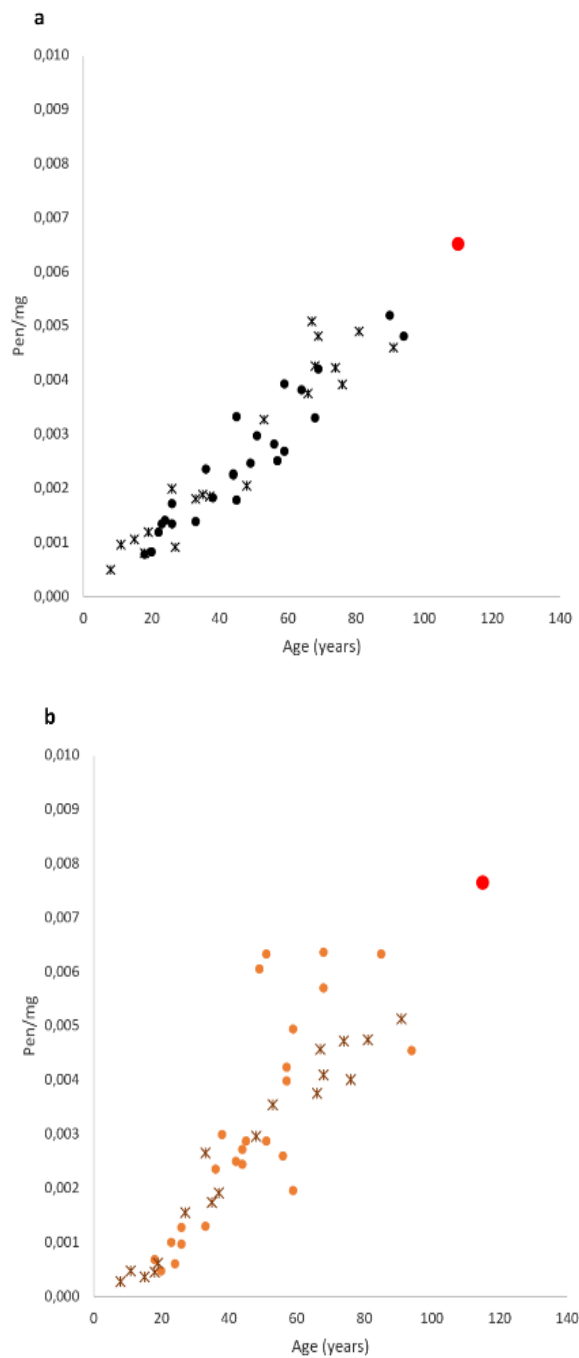
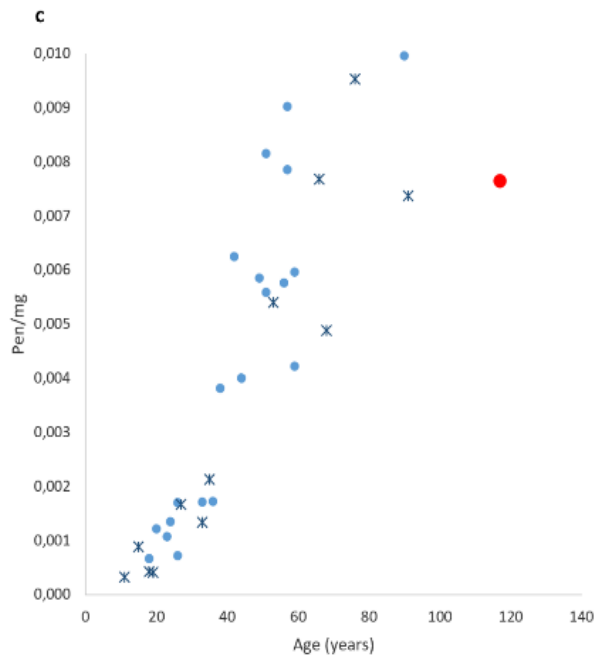


Abb. 4 (Legende s. Seite 20)



**Abb. 4 Pen Konzentration in Kalotte, Clavicula und Rippe mit Messpunkten (rot) der Knochen aus dem Fallbeispiel:** Pentosidin (Pen) Konzentration [nmol/mg] weiblicher (\*) und männlicher (●) Knochenproben in Abhängigkeit zum erreichten Lebensalter: in (a) Kalotte, (b) Clavicula, (c) Rippe mit den jeweiligen Messpunkten (roter Punkt) der entsprechenden Knochen des Fallbeispiels in Abhängigkeit von dem mittels linearer Regressionsformal ermitteltem Lebensalter (modifiziert nach König et al.[1]).

Die Werte des D-Asp-Gehaltes sprachen bei allen drei untersuchten Knochenarten für einen mittleren Altersbereich zwischen 35 und 40 Jahren. Es musste allerdings darauf hingewiesen werden, dass der D-Asp-Gehalt im nicht aufgereinigten Gesamtprotein, wie auch in der vorliegenden Arbeit [1] aufgezeigt, zumindest in höherem Lebensalter stark streuen kann [28, 49] und der vorliegende Datensatz [1] noch nicht umfangreich genug und lediglich Basis eines Trainingsdatensatzes war (während ein Testdatensatz noch völlig fehlte), sodass keine belastbaren Aussagen zu Fehlerbreiten möglich waren. Die Tatsache, dass zumindest alle drei untersuchten Knochen in einem ähnlichen Altersbereich lagen, sprach jedoch dafür, dass das wahre Alter tatsächlich im ermittelten Bereich lag. Aus den Pen Konzentrationen wurde dagegen ein extrem hohes und unrealistisches Lebensalter (Schätzwerte zwischen 110 und 117 Jahren) abgeleitet. Die hier gemessenen sehr hohen Pen Konzentrationen waren am ehesten auf eine längere Zeit bestandene Erkrankung mit Einfluss auf die Entstehung von AGEs zurückzuführen, z.B. einen schlecht eingestellten Diabetes mellitus.

### 3.2 Optimierung der Lebensaltersschätzung über multivariate Ansätze

Mittlerweile existieren zahlreiche Modelle zur Lebensaltersschätzung auf Basis unterschiedlicher morphologischer und molekularer Verfahren [29]. Durch individuelle Unterschiede, u. a. hinsichtlich Alterung und Entwicklung, kommt es allerdings insbesondere im höheren Erwachsenenalter zu Einschränkungen der Genauigkeit von Lebensaltersschätzungen. Auch die Verfügbarkeit der für Untersuchungen zur Verfügung stehenden Gewebe ist fallabhängig sehr unterschiedlich.

Multivariate Ansätze zur präziseren Lebensaltersschätzung wurden bereits 1985 von Lovejoy und Brooks [73] empfohlen. Dabei wurden morphologisch neben der knöchernen Entwicklung (Schambeinfuge, Ileum, proximaler Femur) die Zahnabnutzung und die Schädelsuturen untersucht; eine Kombination der Merkmale führte hierbei zu genaueren Ergebnissen als einzelne Merkmale [73], d. h., dass die Variabilität einzelner Parameter durch die Kombination ausglich wurde, und somit insgesamt präzisere Schätzungen möglich werden [30, 74]. Durch die Entwicklung neuer vielversprechender molekularer Verfahren nimmt die Anzahl einschließbarer und im Erwachsenenalter zuverlässiger Parameter zu [29].

In multivariaten Ansätzen von Becker et al. [40] wurden D-Asp, Pen sowie DNAm in unterschiedlichen Gewebe untersucht und mittels *machine learning* entsprechende Modelle erstellt, die den mittleren absoluten Fehler (engl. mean absolute error=MAE) der Altersschätzung im Vergleich zu univariaten Modellen erheblich verringern konnten (MAE univariat: 7,5-11,0 Jahre, MAE multivariat: 4,0-6,3 Jahre) [40].

Dieser Ansatz ist insgesamt – auch mit Blick auf die Möglichkeiten des Einsatzes von *machine-learning* – für weitere Forschungsperspektiven sehr interessant. Die Zukunftsvision für möglichst optimale Altersschätzungen liegt in einer möglichst intelligenten Nutzung sämtlicher biologischer Informationen zum Lebensalter in allen verfügbaren geeigneten Geweben. Dazu bedarf es umfangreicher Datensätze zu entsprechend geeigneten Parametern für möglichst viele verschiedene Asservate. Auf Basis dieser Daten können dann *machine learning*-basierte multivariate Modelle entwickelt werden, die eine möglichst präzise Altersschätzung durch die Kombination aller für die vorhandenen Asservate erhebbaren Parameter ermöglichen. So könnten für jeden Fall der forensischen Praxis „maßgeschneiderte“ Modelle verfügbar werden, die

möglichst viele biologische Information nutzen, so präzisere Schätzungen ermöglichen und das gesamte Spektrum vom Fund eines einzelnen Knochens bis zur Untersuchung eines „nur“ fäulnisveränderten Leichnams (unter Erhalt von Weichgewebe wie Sehnen oder Bandscheiben) abdecken.

### **3.3 Nutzung der Pen Konzentration in Knochen (und anderen Geweben) im Kontext anderer (forensisch relevanter) Fragestellungen?**

Wie bereits in der Einleitung erläutert, kommt es bei länger anhaltenden Phasen von Hyperglykämien zur Erhöhung der Pen Konzentration in langlebigen Geweben [54, 57, 58].

Im Umkehrschluss können auffällige, nicht altersentsprechende Pen Konzentrationen in Geweben (z.B. Dentin oder Knochen) Hinweise auf länger bestandene pathologische Stoffwechsellagen geben. Dies kann im forensisch relevanten Kontext auch zu entsprechenden diagnostischen Zwecken – beispielsweise bei postmortalen Untersuchungen im Rahmen einer Vernachlässigung von Schutzbefohlenen oder Behandlungsfehlervorwürfen – genutzt werden.

Liegt die postmortal im Gewebe gemessene Pen Konzentration deutlich über dem Altersschnitt, ist eine Beeinflussung durch die endogene Stoffwechsellage – v. a. durch einen Diabetes mellitus, aber auch beispielsweise durch Nierenerkrankungen [75] – zu diskutieren. Stellt man als Todesursache beispielsweise eine diabetische Stoffwechselentgleisung fest oder ergibt sich der Verdacht auf eine solche akute Entgleisung, könnte die Frage auftauchen, ob eher eine einmalige und dann tödliche Entgleisung vorlag, oder ob über einen längeren Zeitraum erhöhte Blutzuckerwerte vorgelegen haben könnten. Diese Frage kann beispielsweise von großer Bedeutung sein, wenn Vorwürfe wegen einer länger andauernde Vernachlässigung z.B. eines Kindes oder einer hilflosen älteren Person im Raum stehen. Pen Gewebskonzentrationen, die unter Berücksichtigung des (dann ja bekannten) Lebensalters und auch unter Berücksichtigung der Streuung der Bezugsdaten massiv erhöht sind, können als Hinweis auf eine chronisch schlechte Stoffwechsellage vor dem Tod gewertet werden.

Allerdings fehlen noch systematische Daten zur Kinetik der Pen Akkumulation in Abhängigkeit von pathologischen Stoffwechsellagen. Aussagen dazu, wie lange und wie massiv eine Stoffwechselentgleisung vor dem Tod bestanden haben muss, um erhöhte Pen

Konzentrationen in verschiedenen Geweben zu provozieren, sind aktuell daher nicht möglich. Diesbezüglich wäre die systematische Untersuchung von Geweben Verstorbener interessant, für die antemortale klinische Daten, insbesondere zur Einstellung eines Diabetes mellitus und zu weiteren Vorerkrankungen (wie Niereninsuffizienz), vorhanden sind. Solche Daten dürften auch grundlagenwissenschaftlich interessant sein, weil den AGEs unter anderem auch in der Genese von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen eine große Rolle zugemessen wird [76-80].

### **3.4 Pen in Knochen: Ein auch im historischen/archäologischen Kontext interessanter Parameter?**

Es ist bekannt, dass es bei längeren postmortalen Intervallen – je nach Umgebungsbedingungen – zum Anstieg des D-Asp-Gehaltes kommen kann [28], sodass sich dieser Parameter zwar zur Lebensaltersschätzung im Bereich forensisch relevanter postmortaler Intervalle eignet, es bei archäologischen Asservaten jedoch zu „falsch hohen“ Ergebnissen der Altersschätzung über diesen Parameter kommen kann. Durch die Ausbildung von Quervernetzungen von Proteinen zwischen Lysin- und Arginin-Resten gilt Pen hingegen als verhältnismäßig stabiler Parameter. Mahlke et al. [81] konnten Pen im Dentin von Zähnen mit postmortalen Intervallen von bis zu mehreren Jahrtausenden nicht nur nachweisen; das aus den Pen Konzentration geschätzte Lebensalter stimmte in allen untersuchten Fällen sehr gut mit dem anthropologisch-morphologisch geschätzten Alter überein. Bislang wurden allerdings nur einige wenige solcher sehr alten Proben untersucht. Sollte es aber möglich sein, auch in anthropologisch/archäologisch relevanten Kontexten solche molekularen Altersschätzungen durchzuführen, wäre dies eine sehr wertvolle Ergänzung des Repertoires der Methoden, die an sehr alten Proben noch einsetzbar sind. Da insbesondere auch bei archäologischem Material häufig Zähne fehlen (z.B. durch prä- oder postmortalen Verlust oder auch bei fehlendem Schädel/Kiefern), wäre auch hier eine systematische Untersuchung von Knochenmaterial interessant.

### 3.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Unter optimalen Bedingungen (z.B. Vorliegen von Zähnen, zu Lebzeiten gesunde Person) können mittels molekularer Lebensaltersschätzung auf Basis posttranslationaler Proteinmodifikationen in aller Regel präzise Ergebnisse erzielt werden; jedenfalls gehören diese Methoden zu den derzeit präzisesten Verfahren zur Altersschätzung [29]. Im forensischen Kontext sind ungünstige Bedingungen jedoch nicht selten bzw. können zumeist im Vorfeld zumindest nicht ausgeschlossen werden. Sowohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit [1] als auch das geschilderte, konstruierte, jedoch praxisnahe Fallbeispiel zeigen, dass die Lebensaltersschätzung in derartigen Fällen komplex sein kann und es insbesondere auf die Wahl des für den Einzelfall „passenden“ Ansatzes (Untersuchungsmaterial, Parameter, Modelle, Bezugsdaten) ankommt. Das Fallbeispiel betont auch die Relevanz der Verknüpfung mehrerer Parameter, sodass die Auswirkungen der Einflussfaktoren (im Fallbeispiel der mutmaßliche Einfluss eines Diabetes mellitus auf die Pen Konzentration) verringert bzw. erkannt werden können.

Um möglichst allen Fallkonstellationen der forensischen Praxis zu begegnen, wären Modelle unter Einbeziehung verschiedener Parameter und Asservate nötig. Die ersten Schritte zur Etablierung eines solchen Ansatzes wurden bereits von Becker et al. präsentiert [40]. Es bedarf jedoch weiterer Forschung hinsichtlich multivariater, optimalerweise *machine learning*-basierter Modelle unter Einbeziehung verschiedener Parameter und möglichst vielen verschiedenen, für die forensische Fallarbeit relevanten Geweben.

Da Knochen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit [1] eben nicht gleich Knochen ist, müssen in solche Modelle knochentypspezifische Daten eingehen und (möglicherweise) auch präzise Informationen zu den Entnahmeorten vorliegen. Zur Etablierung in der rechtsmedizinischen Praxis bedarf es außerdem größerer Datensätze und Bestimmung der Schätzfehler durch Erhebung entsprechender Testdaten.

Auch die Fragen des Potentials der Nutzung der Pen Konzentration in Knochen zur Altersschätzung an archäologischem Material und zum Nachweis einer chronischen diabetischen Stoffwechselentgleisung sollte weiterverfolgt werden, wobei auch hier zu beachten gilt, dass Knochen nicht gleich Knochen ist.

### Fallbeispiel (Abschnitt 6):

Durch den Hinweis, dass die gesuchte Person möglicherweise jünger sein könnte, als zunächst vermutet und möglicherweise an Diabetes mellitus erkrankt gewesen sein könnte, ergaben sich für die Ermittlungsbehörde neue Ansatzpunkte. Über die Eingabe des deutlich jünger geschätzten Lebensalters (35-40 Jahre nach den D-Asp-Daten) kamen andere vermisste Personen in den Fokus und eine Identifikation durch DNA-Vergleich (über die Eltern eines vermissten Mannes) gelang.

Es stellte sich letztlich heraus, dass es sich bei dem Verstorbenen um einen zu Lebzeiten alkohol- und drogenabhängigen und zuletzt mutmaßlich obdachlosen Mann gehandelt hat. Er sei juveniler Diabetiker gewesen, aufgrund der Suchtproblematik und seiner Lebensumstände sei der Diabetes mellitus chronisch schlecht eingestellt gewesen.

Bekannte des Verstorbenen hätten ihn seit ca. 5-7 Jahren nicht mehr gesehen. Zu diesem Zeitpunkt sei er ca. 40 Jahre alt gewesen. Weitere Ermittlungen ergaben keine eindeutigen Hinweise auf ein Gewaltverbrechen, allerdings konnte ein solches letztlich auch nicht ausgeschlossen werden.



## 4 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. König L, Becker J, Reckert A, Ritz-Timme S (2023) Molecular age estimation based on posttranslational protein modifications in bone: why the type of bone matters. *Int J Legal Med* 137: 437-43. doi: 10.1007/s00414-023-02948-9
2. Gesetz über das Friedhofs- und Bestattungswesen. Bestattungsgesetz - BestG NRW. [https://recht.nrw.de/lmi/owa/br\\_bes\\_detail?sg=0&menu=0&bes\\_id=5166&anw\\_nr=2&aufgehoben=N&det\\_id=557075](https://recht.nrw.de/lmi/owa/br_bes_detail?sg=0&menu=0&bes_id=5166&anw_nr=2&aufgehoben=N&det_id=557075).
3. Bundesministerium der Justiz. Strafprozessordnung. <https://www.gesetze-im-internet.de/stpo/index.html#BJNR006290950BJNE015103311>.
4. Bundeskriminalamt. Spurendaktyloskopie. [https://www.bka.de/DE/UnsereAufgaben/Ermittlungsunterstuetzung/Kriminaltechnik/Biometrie/Daktyloskopie/daktyloskopie\\_node.html#:~:text=Die%20Daktyloskopie%20ist%20ein%20kriminalistisches,seltenen%20F%C3%A4llen%20auch%20von%20Fu%C3%9Fsohlen](https://www.bka.de/DE/UnsereAufgaben/Ermittlungsunterstuetzung/Kriminaltechnik/Biometrie/Daktyloskopie/daktyloskopie_node.html#:~:text=Die%20Daktyloskopie%20ist%20ein%20kriminalistisches,seltenen%20F%C3%A4llen%20auch%20von%20Fu%C3%9Fsohlen).
5. Klotzbach H, Benedix KP, Beutler G, Lubnau T, Schneider K, Klein S (2005) Identifizierung der Tsunami-Opfer im Einsatzabschnitt Sri Lanka. *Rechtsmedizin* 15: 467-72. doi: 10.1007/s00194-005-0355-x
6. Ondruschka B, Ramsthaler F, Birngruber CG (2017) Forensische Bedeutung von Körpermodifikationen. *Rechtsmedizin* 27: 443-51. doi: 10.1007/s00194-017-0183-9
7. Dettmeyer R, Verhoff M, Dettmeyer R, Verhoff M (2011) Identifizierung. *Rechtsmedizin*: 239-46.
8. Madea B. WK (2020) Was ist eine menschliche Leiche? . Todesfeststellung und Leichenschau für Hausärzte Springer, Berlin, Heidelberg. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-61111-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-61111-1_4)
9. Hunger H, Leopold D. (2013) Identifikation. Springer-Verlag. Heidelberg.
10. Dettmeyer RB, Schütz HF, Verhoff MA. (2014) Thanatologie. *Rechtsmedizin*. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg. pp. 7-22.
11. Verhoff MA, Kreutz K (2005) Forensische Osteologie.

12. Dettmeyer RB, Schütz HF, Verhoff MA. (2014) Forensische Osteologie. In: Dettmeyer RB, Schütz HF, Verhoff MA, eds. Rechtsmedizin. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg. pp. 239-47.
13. Krogman WM, Isçan MY (1986) The human skeleton in forensic medicine, Charles C. Thomas, Springfield, IL 15: 202-08.
14. Ferembach D, Schwidetzky I, Stloukal M (1979) Empfehlungen für die Alters-und Geschlechtsdiagnose am Skelett.(Recommandations pour le diagnostic de l'âge et du sexe sur les squelettes). Homo Gottingen 30: 1-32.
15. Saunders SR, Katzenberg MA. (1992) The skeletal biology of past peoples: Research methods. Wiley. New York.
16. Schleyer F, Ihm P, Bensch W (1971) Über die Geschlechtsverschiedenheit des Umrisses der knöchernen Orbita. Zeitschrift für Rechtsmedizin 69: 168-72. doi: 10.1007/BF02078960
17. Grosskopf B, Gramsch A (2004) Leichenbrand-biologische Quelle für Genderforschung. Anthropologischer Anzeiger: 281-9.
18. Olivier G, Aaron C, Fully G, Tissier G (1978) New estimations of stature and cranial capacity in modern man. Journal of Human Evolution 7: 513-8.
19. Bach H (1965) Zur Berechnung der Körperhöhe aus den langen Röhrenknochen weiblicher Skelette. Anthropol Anz, Jg 29.
20. Rother P, Hunger H, Vahle H, Rother B (1973) Über die Rekonstruktion der Körperhöhe aus den Maßen langer Röhrenknochen sowie über den Einfluß des Alters und der Akzeleration auf die Körperhöhe und die vertikalen Proportionen des Menschen. Gegenbaurs Morph Jahrb 5: 767-95.
21. Petju M, Suteerayongprasert A, Thongpud R, Hassiri K (2007) Importance of dental records for victim identification following the Indian Ocean tsunami disaster in Thailand. Public health 121: 251-7. doi: 10.1016/j.puhe.2006.12.003
22. Butler JM (2007) Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. BioTechniques 43: Sii-Sv. doi: 10.2144/000112582
23. Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ et al (2000) Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. International Journal of Legal Medicine 113: 129-36. doi: 10.1007/s004140050283

24. Kerley ER (1965) The microscopic determination of age in human bone. *Am J Phys Anthropol* 23: 149-63. doi: 10.1002/ajpa.1330230215
25. Ericksen MF (1991) Histologic estimation of age at death using the anterior cortex of the femur. *Am J Phys Anthropol* 84: 171-9. doi: 10.1002/ajpa.1330840207
26. Kerley ER, Ubelaker DH (1978) Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. *Am J Phys Anthropol* 49: 545-6. doi: 10.1002/ajpa.1330490414
27. Stout SD, Paine RR (1992) Brief communication: histological age estimation using rib and clavicle. *Am J Phys Anthropol* 87: 111-5. doi: 10.1002/ajpa.1330870110
28. Ritz-Timme S. (1999) Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure: Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche. Schmidt-Romhild. Lübeck.
29. Böhme P, Reckert A, Becker J, Ritz-Timme S (2021) Molecular methods for age estimation: The current state of the art in relation to specific demands of forensic practice. *Rechtsmedizin* 31: 177-82.
30. Siahaan T, Reckert A, Becker J et al (2021) Molecular and morphological findings in a sample of oral surgery patients: What can we learn for multivariate concepts for age estimation? *J Forensic Sci* 66: 1524-32. doi: 10.1111/1556-4029.14704
31. Ohtani S MY, Kobayashi Y (1998) Evaluation of aspartic acid racemization ratios in the human femur for age estimation. *J Forensic Sci* 43: 949–53.
32. Verzijl N. DJ, Oldehinkel E. (2000) Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. . *The Biochemical journal*: 350 Pt 2: 81–87.
33. Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins M (2003) Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *Int J Legal Med* 117: 96-101. doi: 10.1007/s00414-002-0355-2
34. Ohtani S, Ito R, Yamamoto T (2003) Differences in the D/L aspartic acid ratios in dentin among different types of teeth from the same individual and estimated age. *Int J Legal Med* 117: 149-52. doi: 10.1007/s00414-003-0365-8
35. Sivan SS, Tsitron E, Wachtel E et al (2006) Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs. *Biochem J* 399: 29-35. doi: 10.1042/BJ20060579

36. Ohtani S, Yamamoto T, Abe I, Kinoshita Y (2007) Age-dependent changes in the racemisation ratio of aspartic acid in human alveolar bone. *Arch Oral Biol* 52: 233-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.08.011
37. Dobberstein RC, Tung SM, Ritz-Timme S (2010) Aspartic acid racemisation in purified elastin from arteries as basis for age estimation. *Int J Legal Med* 124: 269-75. doi: 10.1007/s00414-009-0392-1
38. Klumb K, Matzenauer C, Reckert A, Lehmann K, Ritz-Timme S (2016) Age estimation based on aspartic acid racemization in human sclera. *Int J Legal Med* 130: 207-11. doi: 10.1007/s00414-015-1255-6
39. Valenzuela A, Guerra-Hernandez E, Rufian-Henares JA, Marquez-Ruiz AB, Hougen HP, Garcia-Villanova B (2018) Differences in non-enzymatic glycation products in human dentine and clavicle: changes with aging. *Int J Legal Med* 132: 1749-58. doi: 10.1007/s00414-018-1908-3
40. Becker J, Mahlke NS, Reckert A, Eickhoff SB, Ritz-Timme S (2020) Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study. *Int J Legal Med* 134: 721-33. doi: 10.1007/s00414-019-02054-9
41. Zeeck A FS, Papastavrou I, Zeeck SC. (2020) *Chemie für Mediziner*. Urban & Fischer Verlag München.
42. Ritz-Timme S, Collins MJ (2002) Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Research Reviews* 1: 43-59. doi: [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00363-3)
43. S CZ, Ubelaker DH (2013) Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Res Rev* 12: 605-17. doi: 10.1016/j.arr.2013.02.002
44. Meissner C, Ritz-Timme S (2010) Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int* 203: 34-43. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.010
45. Bada JL, Schroeder RA (1975) Amino acid racemization reactions and their geochemical implications. *Naturwissenschaften* 62: 71-9. doi: 10.1007/BF00592179
46. Schroeder RA, Bada JL (1976) A review of the geochemical applications of the amino acid racemization reaction. *Earth Science Reviews* 12: 347-91. doi: 10.1016/0012-8252(76)90011-8

47. Geiger T, Clarke S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *The Journal of biological chemistry* 262: 785-94.
48. Fujii N, Takata T, Fujii N, Aki K, Sakaue H (2018) D-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging. *Biochimica et biophysica acta Proteins and proteomics* 1866: 840-7. doi: 10.1016/j.bbapap.2018.03.001
49. Ritz S, Turzynski A, Schütz HW, Hollmann A, Rochholz G (1996) Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: basis for an accurate age at death determination. *Forensic Sci Int* 77: 13-26. doi: 10.1016/0379-0738(95)01834-4
50. Sirin N, Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S (2018) Age estimation based on aspartic acid racemization in dentine: what about caries-affected teeth? *Int J Legal Med* 132: 623-8. doi: 10.1007/s00414-017-1667-6
51. Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research* 56: 1-21. doi: 10.1210/rp.56.1.1
52. Maillard LC (1912) Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidies par voie methodique. *CR Acad Sci* 154: 66-8.
53. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-46. doi: 10.1007/s001250051591
54. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A et al (2007) Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitschrift fur Gerontologie und Geriatrie* 40: 349-56. doi: 10.1007/s00391-007-0484-9
55. Greis F, Reckert A, Fischer K, Ritz-Timme S (2018) Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation? *Int J Legal Med* 132: 799-805. doi: 10.1007/s00414-017-1671-x
56. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM (1992) Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 41: 153-9. doi: 10.2337/diab.41.2.153
57. Simm A (2013) Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *Journal of proteomics* 92: 248-59. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.012

58. Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice* 67: 3-21. doi: 10.1016/j.diabres.2004.09.004
59. Pillin A, Pudil F, Bencko V, Bezdícková D (2007) Contents of pentosidine in the tissue of the intervertebral disc as an indicator of the human age. *Soudni lekarstvi* 52: 60-4.
60. Miura J, Nishikawa K, Kubo M et al (2014) Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Archives of oral biology* 59: 119-24. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.10.012
61. Fukushima S, Shimizu M, Miura J et al (2015) Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin. *Biomedical optics express* 6: 1844-56. doi: 10.1364/boe.6.001844
62. Gorski JP (1998) Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Critical reviews in oral biology and medicine* : an official publication of the American Association of Oral Biologists 9: 201-23. doi: 10.1177/10454411980090020401
63. Junqueira L, Carneiro J, Junqueira L, Carneiro J (1996) Knochen und Knochenverbindungen. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen Unter Berücksichtigung der Histophysiologie*: 190-217.
64. Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A (1995) Estimation of chronologic age using the aspartic acid racemization method. II. On human cortical bone. *Int J Legal Med* 108: 24-6. doi: 10.1007/bf01845612
65. Zhao H, Feng J, Ho T-V, Grimes W, Urata M, Chai Y (2015) The suture provides a niche for mesenchymal stem cells of craniofacial bones. *Nature cell biology* 17: 386-96.
66. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS (2008) The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* 61: 577-87. doi: 10.1136/jcp.2007.048868
67. Warden SJ, Burr DB, Brukner PD (2006) Stress fractures: pathophysiology, epidemiology, and risk factors. *Current osteoporosis reports* 4: 103-9. doi: 10.1007/s11914-996-0029-y

68. Warden SJ, Gutschlag FR, Wajswelner H, Crossley KM (2002) Aetiology of rib stress fractures in rowers. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 32: 819-36. doi: 10.2165/00007256-200232130-00002
69. Park-Min KH (2019) Metabolic reprogramming in osteoclasts. *Seminars in immunopathology* 41: 565-72. doi: 10.1007/s00281-019-00757-0
70. Feigl S (2021) Hormone und Knochenstoffwechsel. *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel* 14: 48-54. doi: 10.1007/s41969-021-00134-z
71. Boskey AL, Coleman R (2010) Aging and bone. *Journal of dental research* 89: 1333-48.
72. Corrado A, Cici D, Rotondo C, Maruotti N, Cantatore FP (2020) Molecular basis of bone aging. *International journal of molecular sciences* 21: 3679.
73. Lovejoy CO, Meindl RS, Mensforth RP, Barton TJ (1985) Multifactorial determination of skeletal age at death: a method and blind tests of its accuracy. *Am J Phys Anthropol* 68: 1-14. doi: 10.1002/ajpa.1330680102
74. Thevissen PW, Kaur J, Willems G (2012) Human age estimation combining third molar and skeletal development. *Int J Legal Med* 126: 285-92. doi: 10.1007/s00414-011-0639-5
75. Dawnay A, Millar D (1998) The pathogenesis and consequences of AGE formation in uraemia and its treatment. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 44: 1081-94.
76. Stitt AW, He C, Friedman S et al (1997) Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. *Molecular Medicine* 3: 617-27.
77. Nakamura Y, Horii Y, Nishino T et al (1993) Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *The American journal of pathology* 143: 1649.
78. Sima A, Popov D, Starodub O et al (1997) Pathobiology of the heart in experimental diabetes: immunolocalization of lipoproteins, immunoglobulin G, and advanced glycation endproducts proteins in diabetic and/or hyperlipidemic hamster. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 77: 3-18.

79. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S et al (1997) Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *The Journal of clinical investigation* 99: 1272-80.
80. Horiuchi S, Sano H, Higashi T et al (1996) Extra-and intracellular localization of advanced glycation end-products in human atherosclerotic lesions. *Nephrology Dialysis Transplantation* 11: 81-6.
81. Mahlke NS, Renhart S, Talaa D, Reckert A, Ritz-Timme S (2021) Molecular clocks in ancient proteins: Do they reflect the age at death even after millennia? *International Journal of Legal Medicine* 135: 1225-33.



## 5 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Chefin Prof. Ritz-Timme für die Idee zu der Arbeit und Forschungsinspiration, ihre Motivation und Begeisterungsfähigkeit für das Thema sowie ihre Betreuung und Unterstützung – auch abseits der Dissertation.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken: bei Bärbel Seeling, der „guten Seele“ des Labors für die Einarbeitung, ihre stete Unterstützung und ihren unermüdlichen Einsatz, bei Alex Reckert für zahlreiche Ratschläge, wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Unterstützung, bei Julia Becker, Felix Mayer und Melanie Schröder.

Prof. Dr. med. Eickhoff danke ich für die statistische Beratung im Rahmen des Projekts.

Danke auch an Isabell Busch, Sonja Siegel und Valerie Bühnen fürs Gegenlesen und Ausmerzen letzter Fehler.

Mein persönlicher Dank geht an Lou, meine Mutter, meinen Vater und meine Oma, die mich allzeit unterstützen.