

Entwicklung neuer Markersysteme für die *ancient* DNA-Analyse

Erweiterung des molekulargenetischen Zugangs zu kultur- und sozialgeschichtlichen Fragestellungen der Prähistorischen Anthropologie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Diane Manuela Schmidt

aus Hatzfeld

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. B. Herrmann

Korreferent: Prof. Dr. W. Engel

Termin der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2004

1	Einleitung	1
1.1	Molekulargenetische Marker zur Rekonstruktion sozialer Strukturen historischer Bevölkerungen	2
1.2	Molekulargenetische Marker zur Überprüfung epidemiologischer Hypothesen an historischen Individuen	7
1.3	Molekulargenetische Marker zur Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes	12
2	Analyse von aDNA - Strategien und Methoden	15
2.1	DNA-Degradierung und Strategien bei der Analyse von aDNA	15
2.2	Verwendete Methoden zur DNA-Analyse	20
3	Untersuchtes Skelettmaterial	48
3.1	Individuen aus der Lichtensteinhöhle	48
3.2	Individuen aus Goslar/Rammelsberg	50
3.3	Individuen aus Alia	51
3.4	Individuen aus Stiftskirche Enger	52
4	aDNA-Untersuchungen zur Rekonstruktion sozialer Strukturen (prä)historischer Bevölkerungen	55
4.1	Molekulargenetische Geschlechtsbestimmung durch Koamplifikation X/Y-chromosomaler Marker	55
4.2	Erweiterung der Möglichkeiten der Verwandtschaftsrekonstruktion durch X-chromosomale STRs	62
4.3	Rekonstruktion von Residenzverhalten in der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle	93
5	aDNA-Untersuchungen zur Prüfung epidemiologischer Hypothesen	105
5.1	Prüfung von Hypothesen bezüglich des Verbreitungszeitpunktes der ccr5 Δ 32-Variante	105

5.2	Entwicklung von Analysesystemen für die Prüfung der Hypothese eines singulären Ursprungs der <i>ccr5Δ32</i> -Variante	115
5.3	Entwicklung eines Analysesystems für die Prüfung von Hypothesen zu ABO-Blutgruppenverteilungsunterschieden	122
6	Molekulargenetische Marker zur Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes	132
6.1	Entwicklung von Analysesystemen zur molekulargenetischen Identifikation von Haarfarbe und Hauttyp	132
7	Abschließende Diskussion und Ausblick	158
8	Zusammenfassung	166
9	Tabellenverzeichnis	168
10	Abbildungsverzeichnis	173
11	Literaturverzeichnis	178
12	Anhang	196
12.1	Typisierungskriterien	196
12.2	Typisierungsergebnisse	198
12.3	Allelleiter für X-STR-Multiplex	220
12.4	Einheiten und Abkürzungen	222
12.5	Verwendete Geräte und Chemikalien	225

1 Einleitung

Die Prähistorische Anthropologie befaßt sich mit der Rekonstruktion der Lebensbedingungen von Individuen und Bevölkerungen vergangener Zeiträume. Ein wichtiges Quellenmaterial stellen die körperlichen Überreste vor- und frühgeschichtlicher Menschen dar, welche mit morphologischen, molekularen, biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht werden. Die gewonnenen biologischen Kenngrößen können dazu herangezogen werden, kultur- und sozialgeschichtliche Daten über historische Populationen zu gewinnen. So wird eine einzigartige Möglichkeit geschaffen, einen Einblick in die Lebensweise von Menschen vergangener Zeiträume zu erhalten. Anhand dieser Untersuchungen können z.B. paläodemographische Erkenntnisse zur Alters- und Geschlechterverteilung in historischen Populationen sowie zur Lebenserwartung der damals lebenden Menschen gewonnen werden. Es können Einblicke in die Lebens- und Umweltbedingungen von Menschen vergangener Zeiträume erlangt werden, z.B. durch Rekonstruktion von Ernährungssituationen durch die Analyse von Nutzpflanzen- und Nahrungsmittelresten. Auch paläoepidemiologische Beiträge zur Abschätzung von Krankheitsbelastungen prähistorischer Populationen können geleistet werden.

Auf dem Gebiet der Analyse biologischer Quellenmaterialien sind in den letzten Jahren in starkem Maße durch die Entwicklung molekularbiologischer Techniken deutliche Fortschritte erzielt worden, so daß die Bearbeitung von Fragestellungen möglich ist bzw. werden wird, zu denen bislang ein wissenschaftlicher Zugang schwierig war oder gar unmöglich schien. Besonders die in den letzten Jahren etablierte *ancient* DNA-Analytik (aDNA-Analytik, vgl. Kapitel 2.1.1) eröffnet hier neue Möglichkeiten und ist derzeit noch nicht an ihre Grenzen als Werkzeug zur Untersuchung historischer Individuen gestoßen. Ihre Anwendung für die molekulargenetische Geschlechtsbestimmung sowie die Analyse biologischer Verwandtschaftsverhältnisse (vgl. Kapitel 1.1) ist ein wichtiges Mittel bei der Untersuchung von Skelettfunden. Das Potential dieser Analysen wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit erweitert (Kapitel 4). Darüber hinaus kann aDNA-Analytik ein wichtiges Werkzeug für die aktuelle

epidemiologische Forschung darstellen. Dementsprechend fragestellungsorientiert entwickelte Analysesysteme werden ebenfalls in der vorliegenden Arbeit vorgestellt (vgl. Kapitel 1.2 und Kapitel 5).

Auch auf dem Gebiet eines weiteren Forschungsfeldes bietet die Typisierung von aDNA einen Zugang, den andere Untersuchungsmethoden nicht bieten können, denen als Substrat nur menschliche Überreste zu Verfügung stehen - einen Aufschluß über das äußere Erscheinungsbild der untersuchten Person über die klassischen anthropologischen Kenngrößen Alter, Geschlecht und Körperhöhe hinaus zu erlangen. Mit dieser Fragestellung und der Entwicklung eines entsprechenden Analysesystems beschäftigt sich ein weiterer Teil dieser Arbeit (vgl. Kapitel 1.3 und Kapitel 6).

Im folgenden (Kapitel 1.1 bis 1.3) werden die Fragestellungen, auf denen die hier durchgeführten Untersuchungen bestimmter Abschnitte des humanen Genoms historischer und prähistorischer Individuen beruhen, ausführlich dargestellt.

1.1 Molekulargenetische Marker zur Rekonstruktion sozialer Strukturen historischer Bevölkerungen

Geschlechterverhältnis

Eines der grundlegenden Merkmale, die bei dem Befund menschlicher Überreste beurteilt werden, ist das biologische Geschlecht. Neben der Altersverteilung ist das Geschlechterverhältnis in einer Bevölkerung ein basales Datum für Rekonstruktionen ihrer demographischen und sozialen Strukturen. Ein solcher rekonstruierbarer sozialer Parameter ist z.B. eine differentielle Verhaltensweise der Gesellschaft gegenüber einem Geschlecht, die unter anderem durch die Geltung bestimmter Erbgelne verursacht werden kann. Einen biologischen Zugang zu dieser kulturellen Information bietet unter anderem die Untersuchung der Kindersterblichkeit hinsichtlich einer möglichen geschlechtsdifferentiellen Sterberate. Die biologische Kenngröße „Geschlecht“ ist somit ein wichtiger Parameter zur Rekonstruktion kultureller Zusammenhänge in einer Gesellschaft und die verlässliche Bestimmung dieses

Merkmals entscheidend für die Qualität der darauf fußenden gedanklichen Konstrukte. Morphologische und morphometrische Methoden der Geschlechtsbestimmung (Herrmann et al. 1990) zeigen bei guter Skeletterhaltung eine hohe Bestimmungssicherheit für erwachsene Individuen. Bei der Bestimmung des Geschlechtes von Skelettresten von Kindern stößt die morphologische Determinierung jedoch an ihre Grenzen (Schutkowski 1993). Gleiches gilt für stark fragmentiert überlieferte Skelette, an denen die geschlechtsanzeigenden Merkmale nicht beurteilt werden können.

In diesem Kontext hat die Entwicklung molekulargenetischer Methoden, insbesondere der PCR (*polymerase chain reaction*), zu entscheidenden Verbesserungen bei der Sicherheit der Geschlechtsbestimmung an Skelettmaterial geführt. Die PCR-gestützte Geschlechtsbestimmung hat sich als wichtiges Mittel zur Datengewinnung an (prä)historischen Proben etabliert. Ein Beispiel für den erfolgreichen Einsatz dieser Technik ist die Studie von (Faerman et al. 1997), in der Skelettreste von vermutlich durch Infantizid getöteten Kindern eines römischen Bordells untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, daß sich unter den getöteten Kindern mehr Jungen als Mädchen befanden und aus diesem Ergebnis ein geschlechtsabhängiges, differentiell Verhalten gegenüber Knaben abgeleitet werden. Neben dieser ansatzfreien Untersuchung kann eine molekulare Geschlechtsbestimmung als Prüfinstrument für Hypothesen dienen, deren Grundlage Daten sind, die mit anderen Methoden gewonnenen wurden. Diese Möglichkeit konnte in einer anderen Untersuchung, der Typisierung von Skeletten des frühneuzeitlichen Friedhofs Aegerten (Schweiz), demonstriert werden. In der Studie wurden Überreste früh- und neugeborener Kinder untersucht, die entlang der Nord- und Südfassade der Kirche unter der Traufe (sog. Traufkinder) bestattet worden waren. Die morphometrische Geschlechtsbestimmung zeigte eine höhere Sterblichkeit weiblicher Individuen (Bacher et al. 1990), was Interpretationen dieser Verteilung z.B. als Ergebnis reduzierten Elterninvestments oder Infantizids zur selektiven Bevölkerungsregulierung zuließ. Diese Hypothese konnte jedoch durch molekulargenetische Analysen widerlegt werden (Lassen et al. 1997, Lassen et al. 2000). Es zeichnete sich eine differentielle Sterblichkeit ab, die vom dem 7. Lunarmonat an eine höhere Mortalität für männliche Individuen

zeigt, wie man sie auch von Kindersterblichkeitsuntersuchungen heutiger Populationen kennt (Bartels et al. 1990).

Diese Studien zeigen deutlich, welche wichtige Rolle die sichere Klärung von Geschlechterrelationen in historischen Bevölkerungen zur Beantwortung kultureller Fragestellungen spielt. Genetische Marker gewinnen daher bei der Absicherung der morphologischen Bestimmungen an Wichtigkeit und ermöglichen darüber hinaus Untersuchungen auch an stark fragmentiertem Skelettmaterial, an dem keine Merkmale erhalten sind, die eine morphologische Geschlechtsdetermination zulassen. Da degradierte DNA hohe Anforderungen an ein molekulargenetisches Analysesystem stellt, wird in dieser Arbeit eine Möglichkeit vorgestellt, auch für Proben mit vergleichsweise schlechter DNA-Erhaltung Geschlechtsdeterminationen sicher durchführen zu können. Im hierzu neu entwickelten System werden X- und Y-chromosomale Marker kombiniert, um eine höchstmögliche Sicherheit bei der Geschlechtsbestimmung zu gewährleisten (Kapitel 4.1).

Verwandtschaft und Residenzverhalten

Mit der Ermittlung des Geschlechterverhältnisses sind die Möglichkeiten noch nicht erschöpft, über biologische Daten Rückschlüsse auf soziale Beziehungen zwischen den Individuen einer Gesellschaft zu ziehen. Weitere wichtige Parameter, welche die Interaktion von Mitgliedern einer Gruppe beeinflussen, sind der Grad ihrer Verwandtschaft untereinander sowie die Regeln, denen die Wahl des Lebenspartners unterliegt. Verwandtschaft stellt das wichtigste Organisationsprinzip nicht-staatlicher Gesellschaften dar (z.B. Holy 1996) und bildet die Grundlage für Gruppenzuordnung und Partnerwahl, Landrechte und Erbrecht, Siedlung und Wohnen sowie viele andere Bereiche. Die Aufdeckung von Verwandtschaftsverhältnissen nimmt demnach eine zentrale Stellung ein, wenn die sozialen Beziehungen von Menschen untereinander rekonstruiert werden sollen und ist daher eines der Desiderate anthropologischer Forschung.

Welche Personen in einer Gesellschaft als miteinander verwandt gelten, ist kulturell und historisch außerordentlich variabel. Die verwirklichten Konzepte von Verwandtschaft sind teils in der Biologie, teils in der Ideologie begründet,

doch scheinen Mutter-Kind-Relationen eine stabile kleinste gesellschaftliche Einheit darzustellen (z.B. Barnes 1973, Schneider 1984, Holy 1996).

Will man sich komplexen Verwandtschaftssystemen nähern, bietet sich daher der Zugang induktiv über das Teilsystem „Familie“ an, das Eltern-Kind-Beziehungen erfaßt (z.B. Murdock 1966). Grundsätzlich lassen sich zwei Arten von Verwandtschaft unterscheiden, die durch Abstammung (Deszendenz, Filiation) und solche durch Heirat (Affinalität) (z.B. Hill & Kopp 1995). Ein direkter molekulargenetischer Nachweis kann nur für Deszendenzen gelingen, doch können bei der Rekonstruktion umfassender Genealogien bzw. einer statistischen Auswertung (größerer) Gruppen auch Affinalitäten erkannt werden, die eine wichtige Rolle im Gefüge sozialer Interaktionen spielen (Wagner & Schütze 1998). Sie geben Aufschluß über die praktizierten Muster der Partnerwahl (Heiratsmuster) und die damit zusammenhängenden Residenzregeln (Wohnfolge) in einer Bevölkerung. Diese legen fest, an welchem Ort ein Mensch nach seiner Heirat lebt (Schmitz 1964, Viveló 1981). Hier kann man zwei Hauptformen unterscheiden; zum einen patrilokale Residenz, bei der ein Paar bei der Familie des Ehemannes lebt, während bei praktizierter Matrilocalität in der Nähe der Familie der Frau gewohnt wird (Levi-Strauss 1981).

In vielen Kulturen war und ist das partnerschaftliche Zusammenleben im System Ehe institutionalisiert. Diese hat den Charakter eines sozialen Vertrages und reguliert persönliche Bedürfnisse der Beteiligten wie z.B. Fortpflanzung, Versorgung von Nachkommen und deren rechtliche Anerkennung sowie die Verteilung der Aufgaben zwischen den Geschlechtern (Barnard & Good 1984). Darüber hinaus stellen Eheschließungen auch ein Mittel zur Allianzbildung innerhalb einer und zwischen verschiedenen sozialen Gruppen dar. In vielen Kulturen ist die Partnerwahl strikten Regeln unterworfen, die sich z.B. im Residenzverhalten heiratsfähiger Individuen äußern, das durch molekulargenetische Untersuchungen im Zuge der Rekonstruktion von Familienlinien erfaßt werden kann.

Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Individuen sowie praktiziertes Residenzverhalten stellen daher wichtige soziale Kenngrößen einer Bevöl-

kerung dar und können die Rekonstruktion gesellschaftlicher Regeln der untersuchten Gruppe ermöglichen. Da bei Familien im Regelfall biologische Verwandtschaften vorliegen, können auf erbliche Merkmale fokussierende Untersuchungen zur Rekonstruktion der sozialen Beziehungsgefüge beitragen. Bis vor einiger Zeit waren nur Ansätze realisierbar, die sich räumliche Nähe von Bestattungen oder am Skelett erfaßbare morphologische Ähnlichkeiten zwischen Individuen zunutze machten (z.B. Rösing 1986, Alt et al. 1997). Diese Methoden reichen in ihrer Präzision jedoch nicht an die Aussagekraft genetischer Marker heran, die inzwischen bereits erfolgreich auf Skelettmaterial aus unterschiedlichen Zeitstellungen angewendet wurden (z.B. Schultes 2000, Scholz et al. 2001, Gerstenberger et al. 2002, Keyser-Tracqui et al. 2003). DNA-Untersuchungen stellen somit einen Zugang einerseits zur Rekonstruktion verwandtschaftlicher Beziehungen innerhalb eines Skelettkollektivs und andererseits zur Erkennung von aus der Befolgung von Heiratsregeln resultierendem Residenzverhalten dar, wie ihn keine andere Analyse-methode bietet. Das Potential dieser Methodik sollte daher bestmöglich ausgeschöpft werden, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Spektrum der bislang in diesen Zusammenhängen verwendeten molekulargenetischen Marker um ein wichtiges Element erweitert wird. Die Analyse X-chromosomaler STRs (*short tandem repeats*) ermöglicht es, die Identifizierung familiärer Strukturen aus (prä)historischen Skelettfunden zu optimieren und den biologischen Zugang zum praktizierten Residenzverhalten einer Bevölkerung zu erweitern.

1.2 Molekulargenetische Marker zur Überprüfung epidemiologischer Hypothesen an historischen Individuen

Als Darwin 1859 mit „*On the Origin of Species*“ die natürliche Selektion als treibende Kraft der Evolution benannte, kannte und schätzte er zwar die vor allem Louis Pasteur und Robert Koch zu verdankenden Fortschritte der Erforschung von Infektionskrankheiten und deren Erregern. Darwin nahm jedoch in seinen Arbeiten nicht die Rolle von Infektionskrankheiten als eine der Hauptkräfte der natürlichen Selektion wahr. Heute erscheint die Herstellung dieses Zusammenhangs jedoch plausibel, da der ständige Einfluß von Viren, Bakterien, Protozoen oder Pilzen auf die unterschiedlichsten Spezies inklusive unserer eigenen zu beobachten und zu erfahren ist.

Mit der Geschichte des Menschen ist daher die Geschichte der ihn befallenden Infektionskrankheiten, die sowohl die biologische als auch die soziale Komponente des menschlichen Lebens und Zusammenlebens beeinflussen, untrennbar verbunden (z.B. Inhorn & Brown 1990, Fischer et al. 1998). Der Einfluß von Pathogenen auf (prä)historische Populationen ist schwer abschätzbar. Seine Rekonstruktion hängt in der Regel von der Verfügbarkeit der über das überlieferte Skelett hinausgehenden Quellenlage (schriftliche Aufzeichnungen, Gemälde) ab, da viele Infektionen am Skelettfund keine rekonstruierbaren Spuren hinterlassen. Für einige dieser Krankheiten jedoch, z.B. Epidemien wie die im Mittelalter grassierende Pest, aber auch das erst seit 1959 bekannte AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), sind massive Dezimierungen der betroffenen Bevölkerungen und damit ein deutlicher regulierender Einfluß auf die betroffene Population belegt.

Beim Kontakt einer Population mit einem Krankheitserreger infizieren sich jedoch normalerweise nicht alle dem Pathogen exponierten Menschen, und auch unter den Infizierten sind differentielle Krankheitsverläufe und Mortalitätsraten erkennbar (z.B. Cooke & Hill 2001). Schon früh wurde ein Zusammenhang zwischen individueller genetischer Ausstattung und der zu beobachtenden Variabilität hinsichtlich der Reaktion verschiedener Individuen auf den gleichen Krankheitserreger vermutet (Haldane 1949). Träger bestimmter genetischer Varianten haben demnach einen vollständigen oder partiellen

Schutz vor dem Pathogen und damit einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mitgliedern der Population. Hochinfektiöse Pathogene mit hoher Mortalitätsrate könnten daher innerhalb kurzer Zeit zur Anhäufung bestimmter genetischer Varianten - auch solchen, die vorher sehr selten waren - in einer Bevölkerung führen. Im Rückschluß kann die genetische Variabilität einer Bevölkerung einen Hinweis darauf geben, in welche Richtung Selektionsfaktoren auf sie eingewirkt haben und damit auch zur Rekonstruktion von historischen Infektionsereignissen durch Prüfung bestimmter Hypothesen beitragen. Diese Information kann einerseits zur Charakterisierung der Geschichte der untersuchten Bevölkerung verwendet werden, stellt andererseits auch einen Zugang zur Geschichte - Ursprung, Verbreitungsgeschwindigkeit, Vektoren, Änderung der Eigenschaften - des identifizierten Pathogens dar und kann damit einen wichtigen Beitrag zur Seuchengeschichte leisten.

Vergleicht man die genetischen Eigenschaften verschiedener Bevölkerungen, zeigen sich in der Tat Unterschiede in der Ausprägung und Repräsentanz bestimmter Sequenzvarianten. Für einige dieser Varianten, z.B. Sichelzellenanämie und verschiedene Thalassämien, konnte bereits erfolgreich ein Heterozygotenvorteil in Form eines partiellen Schutzes vor Malariainfektionen nachgewiesen und damit der zur Persistenz bzw. regionalen Verbreitung dieser Genvarianten beitragende Selektionsfaktor aufgedeckt werden (z.B. Laser 1979, Luzzatto 1979, Friedman & Trager 1981). Für die differentielle Verteilung anderer genetischer Polymorphismen existieren Hypothesen, die vor allem auf der Grundlage der Beobachtung heutiger Allelverteilungen aufgestellt werden. Zielen diese Theorien jedoch auf historische Krankheitsereignisse ab, sind die postulierten Ursachen sowie die zeitlichen Dimensionen bezüglich des Ursprungs bestimmter Allele in der Regel mit großen Fehlern behaftet. Dadurch wird die Ermittlung der betreffenden historischen Ereignisse, wie z.B. den Pandemien des Mittelalters und der frühen Neuzeit, als Ursachen der heute zu beobachtenden Verteilungsmuster bestimmter genetischer Merkmale erschwert.

ABO-Blutgruppen und ihre weltweite Verteilung

Bei den ABO-Blutgruppen handelt es sich um ein polymorphes genetisches System, dessen verschiedene Varianten zwar in allen Populationen weltweit zu finden sind, allerdings mit höchst unterschiedlichen Frequenzen (balancierter Polymorphismus). Als Ursache für die sehr stark differierenden heutigen ABO-Alleldistributionen kommen sowohl Ereignisse wie *bottleneck*-Situationen oder *founder*-Effekte als auch Selektionsdrücke in Form von Krankheiten in Frage, die den Reproduktionserfolg eines Individuums beeinflussen. Für die ABO-Varianten und das aus ihnen resultierende ABH-Antigensystem wird seit ihrer Entdeckung Anfang des 20. Jahrhunderts vermutet, daß sie einen Einfluß auf die Empfänglichkeit ihres Trägers sowohl gegenüber nichtinfektiösen Erkrankungen als auch gegenüber Infektionskrankheiten haben. Oft sind es Träger der Blutgruppe O, die ein erhöhtes Risiko einer schwereren Erkrankung mit solchen Pathogenen aufweisen, weil deren Antigene den körpereigenen H-Antigenen stark ähneln und vom Immunsystem nicht erkannt werden (z.B. Glass et al. 1985, Swerdlow et al. 1994, Hennessy et al. 2003). Einige Studien benennen aufgrund moderner Populationsstudien als Auslöser des Selektionsdrucks gegen Blutgruppe O den Choleraerreger *Vibrio cholerae* (Glass et al. 1985, Swerdlow et al. 1994, Lagos et al. 1995, Tacket et al. 1995), andere das Bakterium *Escherichia coli* (Black et al. 1987), während dieser Einfluß von *E. coli* von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt wird (van Loon et al. 1991, Blackwell et al. 2002). Bislang existieren sehr unterschiedliche und kontrovers diskutierte Hypothesen, die nicht direkt geprüft werden können.

Darüber hinaus werden ABO Blutgruppen als Einflußfaktoren auf die Immunantwort und damit auf die Disposition eines Individuums gegenüber dem Ausbruch nicht-infektiöser Krankheiten, wie z.B. verschiedenen Krebsarten oder Coronarerkrankungen, diskutiert. Diese Phänomene sollten aber eher ältere Individuen einer Population betreffen und daher nicht in ausreichend starkem Maße die Reproduktionsfähigkeit der Träger verschiedener Blutgruppen beeinflussen, um die beobachtbaren regionalen Unterschiede in den verschiedenen ABO-Blutgruppenfrequenzen herbeizuführen.

In anthropologischen Zusammenhängen eröffnet die Kenntnis der ABO-Blutgruppen historischer Individuen z.B. die Möglichkeit, durch entsprechende Untersuchungen der heute beobachteten ABO-Verteilung eine zeitliche Dimension hinzuzufügen und Änderungen dieser Verteilung über die Zeit und damit historische Selektionsdrücke zu entdecken. Darüber hinaus können konkrete Hypothesen, wie z.B. die Benachteiligung von Trägern einer Blutgruppe bei bestimmten Infektionskrankheiten, wie Pest oder Cholera, direkt an historischem Skelettmaterial geprüft werden.

Daher wird im Rahmen dieser Arbeit ein PCR-basiertes Analysesystem etabliert, das eine ABO-Blutgruppengenotypisierung an historischem Skelettmaterial ermöglicht und damit ein Werkzeug zur Durchführung systematischer Untersuchungen an (prä)historischen Populationen zur Verfügung stellt (Kapitel 5.3). Solche aDNA-Untersuchungen eröffnen eine einzigartige Möglichkeit zur Überprüfung epidemiologischer Theorien, da hier die zeitliche Dimension zugänglich wird: Zeitpunkte bzw. Zeiträume der Änderungen der Verteilung bestimmter genetischer Varianten können experimentell erfaßt werden und epidemiologische Hypothesen direkt geprüft werden.

ccr5 Δ 32-Distributionen in Europa

Der Chemokinrezeptor 5 (ccr5), lokalisiert auf Chromosom 3p21, wurde 1996 als Korezeptor für das *human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) entdeckt (z.B. Deng et al. 1996, Dragic et al. 1996). Im selben Jahr identifizierten Forscher den molekularen Mechanismus, der hinter der Beobachtung steht, daß sich einige Menschen nicht mit dem Virus infizieren lassen, auch wenn sie ihm wiederholt exponiert waren (Liu et al. 1996, Samson et al. 1996). Eine 32 bp umfassende Deletion im ccr5-Gen (ccr5 Δ 32) konnte bei homozygoten Trägern dieser Mutation als Verursacher der HIV-Resistenz ausgemacht werden (z.B. Dean et al. 1996). Weitere Studien zeigten auf, daß die ccr5 Δ 32-Variante bei Kaukasiern und damit ursprünglich in Europa vorkommt, dort aber ein deutlicher Nordost-Südwest-Gradient (16–2%) in der Verbreitung dieses mutierten Gens zu beobachten ist (z.B. Martinson et al. 1997, Libert et al. 1998, Stephens et al. 1998). Da das durch den HI-Virus verursachte AIDS

(*acquired immunodeficiency syndrome*) erst seit ca. 40 Jahren auftritt, kann es nicht den Selektionsfaktor für die bereits Mitte der 1990er Jahre beobachtete - zum Teil recht hohe - Distribution des mutierten *ccr5Δ32*-Allels in der europäischen Bevölkerung darstellen. Die Ursache hierfür muß demnach in mindestens einem anderen (historischen) Selektionsfaktor gesucht werden.

Daraufhin wurden Hypothesen zum zeitlichen Ursprung der Mutation (Libert et al. 1998, Stephens et al. 1998, Klitz et al. 2001) sowie potentiellen Selektionsdrücken zur Begünstigung der Verbreitung des *ccr5Δ32*-Allels formuliert (Lalani et al. 1999, Altschuler 2000, Blanpain et al. 2000, Galvani & Slatkin 2003). Aufgrund der heutigen Verteilung des mutierten Allels werden seit bzw. vor langer Zeit auf die *ccr5Δ32*-Variante wirkende Selektionsfaktoren angenommen. In diesem Zusammenhang werden sowohl Vorteile der Mutations-träger gegenüber inflammatorischen Krankheiten, bakteriellen Infektionen (z.B. mit *Yersinia pestis*, *Shigella*, *Salmonella* und *Mycobacterium*) sowie Virusinfektionen (besonders im Fokus: *Variola major*) diskutiert.

Über den Ursprungsort in Nordosteuropa existieren recht einheitliche Hypothesen, während der Zeitpunkt der Entstehung und Verbreitung der mutierten Genvariante sehr kontrovers berechnet und diskutiert wird. Das erstmalige Auftreten der *ccr5Δ32*-Variante (als singuläres Mutationsereignis) wird in den Studien von Libert et al. 1998, Stephens et al. 1998 und Klitz et al. 2001 untersucht: Libert postuliert ein Erstauftreten der Mutation im Neolithikum vor mehreren Tausend Jahren (3500 Jahre mit einem Konfidenzintervall von 400-13.000 Jahren) bei einem finno-ugrischen Stamm in Gebiet des heutigen Rußland. Die Arbeitsgruppe von Stephens errechnet das Alter der *ccr5Δ32*-Variante mit ca. 700 Jahren und einer Spanne von 275 bis 1,875 Jahren. Klitz untersucht u.a. die genetisch isolierte Gruppe der Ashkenazi und kommt zum Schluß, daß die Mutation nach dem Entstehen dieser Gruppe entstanden sein muß und nennt einen Zeitraum von 700-1000 Jahren.

In den genannten Arbeiten wird das Alter der Mutation über STR-Linkage-Analysen an rezenten Individuen berechnet. Hierbei werden heute zu beobachtende Korrelationen zwischen dem Auftreten der *ccr5Δ32*-Variante und bestimmten Ausprägungen (Allele) in flankierender STRs untersucht (vgl.

Kapitel 5.2). Zwar kommen die Studien zu abweichenden Ergebnissen in der Abschätzung des Alters der Mutation, doch finden die Autoren hohe Korrelationen bestimmter Allele in den untersuchten STRs und der *ccr5Δ32*-Variante und postulieren einen *ancient* Haplotypen: die Allelausprägung der untersuchten STRs auf jenem Chromosom 3, auf dem die 32 Basenpaare im *ccr5*-Gen ursprünglich deletiert wurden.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden PCR-basierte Analysesysteme entwickelt, die es ermöglichen, diese aus Untersuchungen rezenter DNA heraus aufgestellten Hypothesen nach dem Verbreitungszeitraum der Mutation und ihrem einmaligen Ursprung direkt an historischem und prähistorischem Skelettmaterial zu überprüfen (Kapitel 5.1 und 5.2).

1.3 Molekulargenetische Marker zur Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes

Geschlecht, Alter, Attraktivität, Stimmung, Müdigkeit, Gesundheit - ein einziger Blick auf ein Gesicht verrät viel über einen anderen Menschen. Vermutlich aus diesem Grund bilden Rekonstruktionen des äußeren Erscheinungsbildes unserer Vorfahren einen attraktiven Bestandteil von Ausstellungen und Museen. Der moderne Mensch möchte sich ein möglichst genaues Bild von (prä)historischen Personen machen können - die Betrachtung der Nachbildung des Gesichtes längst verstorbener Menschen wird als Möglichkeit begriffen, der Vergangenheit im wörtlichen Sinne ins Angesicht schauen zu können. Dieses Bedürfnis basiert sicher zu einem großen Teil auf dem irrationalen Gedanken, durch eine lebensecht wirkende Rekonstruktion etwas über Charakter, Motivation, vielleicht auch Gedanken unserer Ahnen zu erfahren. Dennoch ist diese Neigung vorhanden, wie sowohl historische Versuche der Herstellung von Korrelationen zwischen Physiognomie und Charakter eines Menschen (z.B. Lavater 1772) als auch ein Blick auf die unzähligen arbeits- und kostenintensiven Versuche bereits durchgeführter Rekonstruktionen zeigt. Rekonstruiert wird dabei das Aussehen von berühmten Personen wie Dichtern (z.B. Friedrich Schiller, Joseph Mohr), Pharaonen (z.B. Ramses II, Amenophis III., Tutanchamun), aber auch ganz „gewöhnlicher“

Menschen (z.B. Opfer der Varusschlacht) und solcher Individuen, die eine besondere Stellung für uns verkörpern, wie es z.B. für frühe Hominiden gilt. Einige diese Darstellungen werden zum Zweck der Identifizierung historischer Persönlichkeiten vorgenommen, wie die mutmaßliche Identifizierung der Pharaonengattin Nofretete zeigt (Abb. 1).

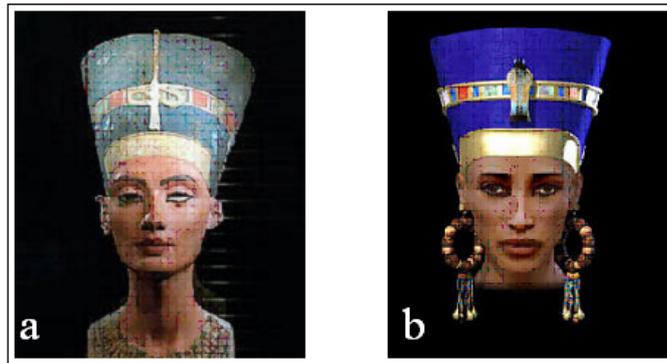


Abb. 1 Rekonstruktion des Gesichtes einer Mumie, für die Identität mit Nofretete vermutet wird. a: die berühmte Büste, die Nofretete abbildet. b: Mumie Nr. 61072, rekonstruiert von britischen Wissenschaftlern (Dr. Damian Schofield, Universität Nottingham). Die Rekonstruktionen wurden nach Angaben der Forschungsgruppe computergestützt durchgeführt, um subjektive Einflüsse gering zu halten.

Ein Problem bei der üblicherweise vorgenommenen manuellen Rekonstruktion liegt darin, daß sie viele Fehlerquellen enthält, die durch subjektive Einschätzungen und Erfahrungen der Bearbeiter bedingt sind. Im schlimmsten Fall spielen ideologische Einflüsse eine entscheidende, wenn nicht die größte Rolle. Am Beispiel der im letzten Jahrhundert vorgenommenen Nachbildungen von Neanderthalern (die selber in dieser Arbeit nicht im Zentrum stehen) wird besonders deutlich, wie viel Einfluß der Zeitgeist und die damit verbundenen modernen Ideen auf die Arbeit des Präparators haben und wie wichtig mit naturwissenschaftlichen Methoden erfaßbare Marker für die Gewährleistung einer möglichst objektiven Rekonstruktionsarbeit sind. Meischner 2001 vergleicht in seinem kurzen, aber treffenden Aufsatz einige solcher Neanderthaler-Rekonstruktionen, die im Prinzip auf den gleichen Fossilfunden und somit gleichen Merkmalen beruhen, auch wenn sich die schiere Anzahl geborgener Knochenfragmente inzwischen vermehrt haben mag (zwei der besprochenen Rekonstruktionen sind in Abb. 2 dargestellt).

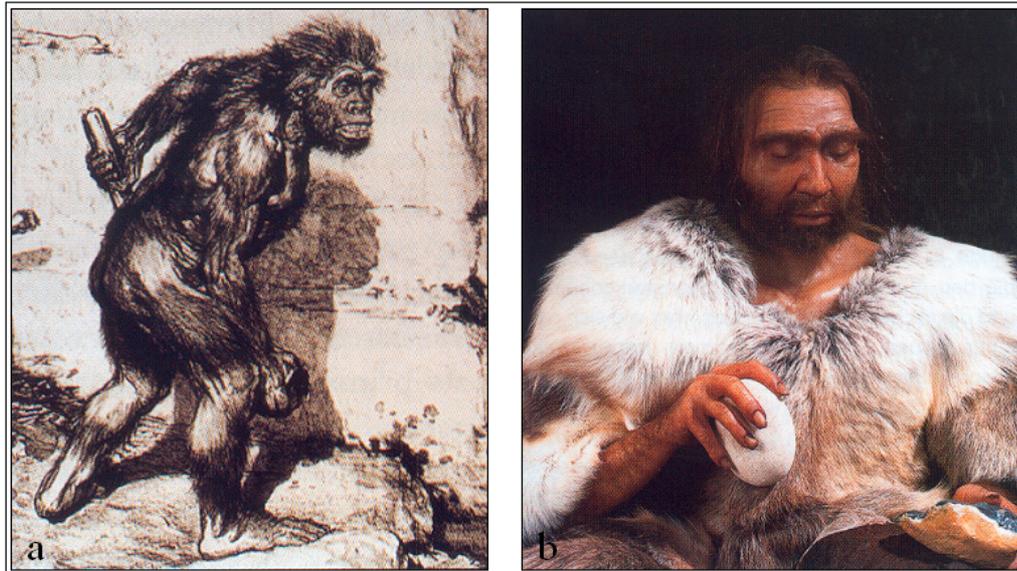


Abb. 2 Zwei Darstellungen von Neanderthalern. a: Darstellung nach F. Krupka als keulenschwingender Wilder aus (Schuchhardt 1936). b: Dermoplastische Rekonstruktion eines Neandertalers als werkzeugherstellender Mensch im Neanderthal-Museum, Mettmann, von Elisabeth Daynes, Paris. (Bildquelle: Auffermann & Orschiedt 2002)

Da Rekonstruktionen also offenbar ideologiebeeinflusst sein können, ist anzustreben, daß der Katalog objektiverer Daten wie bestimmter Meßpunkte durch die Erhebung molekulargenetischer Marker erweitert wird, um die Verlässlichkeit von Gesichtsrekonstruktionen zur Identifizierung zu steigern. Dies gilt sowohl für historische Personen aus archäologischen Zusammenhängen als auch für Skelettfunde oder Tatortspuren aus forensischen Zusammenhängen. Hier werden ebenfalls Rekonstruktionen menschlicher Gesichter eingesetzt, da häufig unbekannte Tote, von denen oft nur Skelettfragmente vorliegen, identifiziert werden sollen. Für eine möglichst genaue Darstellung wären Informationen über phänotypische Merkmale wie Haar- und Augenfarbe sowie den Hauttyp hilfreich, um die Ähnlichkeit der erstellten Rekonstruktion zum Opfer zu erhöhen und die Chancen einer Identifizierung zu steigern. Doch auch bei der Aufklärung von kriminellen Handlungen, die ohne Zeugen verübt wurden, wäre jede Information bezüglich physischer Charakteristika wie z.B. Haarfarbe oder Hauttyp nützlich, um eine Hilfestellung für Ermittlungen und Fahndungen zu bieten, eine Art „genetisches Phantombild“, das Augenzeugenberichte ersetzt oder unterstützt, zu generieren (Grimes et al. 2001).

Sowohl in anthropologischen als auch forensischen Zusammenhängen besteht demnach ein Bedarf an Markern, die mit dem äußeren Erscheinungsbild einer Person korrelieren und auch aus fragmentierten menschlichen Überresten bestimmt werden können. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit molekulargenetische Marker bezüglich ihrer Eignung zur Phänotypenrekonstruktion an mitteleuropäischen Individuen evaluiert. Ziel der Untersuchung ist es, Aussagen über Aspekte des Erscheinungsbildes (prä)historischer Individuen auf Basis einer DNA-Analyse treffen zu können (Kapitel 6.1).

2 Analyse von aDNA - Strategien und Methoden

2.1 DNA-Degradierung und Strategien bei der Analyse von aDNA

DNA, die in archäologischem oder forensischem Skelettmaterial überdauert, ist durch Einflüsse des Liegemilieus degradiert (z.B. Höss et al. 1996, Burger et al. 1999), was neben einer Verringerung der Zahl intakter Zielsequenzen für die PCR (Hummel et al. 1995, Krings et al. 1997) auch zu liegezeitbedingten Änderungen der Basenabfolge führen kann (Höss et al. 1996, Hofreiter et al. 2001a, Gilbert et al. 2003a). Zusätzlich werden bei der Isolierung von DNA aus archäologischen Knochenfunden oft Stoffe koextrahiert, welche die PCR hemmen. Diese PCR-Inhibitoren (z.B. Pääbo 1990, Cooper 1992, Hummel 2003a) können nicht immer restlos aus den DNA-Extrakten beseitigt werden und erschweren die molekulargenetische Analyse besonders von bodengelagertem Skelettmaterial, in das während der Liegezeit oft sehr potente PCR-Inhibitoren, wie z.B. Huminsäuren, einwandern.

Aufgrund all dieser für aDNA charakteristischen Probleme ist die Sicherung der Authentizität der molekulargenetischen Ergebnisse essentiell. Hierzu müssen kontaminationsvermeidende Maßnahmen in der Probenbearbeitung eingehalten werden und eine Reproduktion der molekulargenetischen Daten gewährleistet werden. Eine umfassende Zusammenfassung solcher Degradationsphänomene, ihrer Ursachen sowie Strategien zu ihrer Begrenzung findet sich in Hummel 2003a und Hummel 2003b.

Kontaminationsvermeidung: Um eine Verfälschung der Typisierungsergebnisse aus archäologischem Skelettmaterial durch moderne DNA zu vermeiden, wurden für die aDNA-Analytik etablierte Laborstandards beim Handhaben der Proben eingehalten (z.B. strikte Trennung von prä- und post-PCR-Bereichen, Tragen von Handschuhen, Gesichtsmasken etc.). Diese sind detailliert in Publikationen der Arbeitsgruppe beschrieben (z.B. Gerstenberger 2002 Kapitel 3.2.1, Hummel 2003a Kap. 6). Stichprobenartig wurden Leerkontrollen mitgeführt, um die Beeinflussung der Ergebnisse durch Kontaminationen z.B. über PCR-Reaktionsgefäße (Schmidt et al. 1995) abschätzen zu können.

Sicherung der Authentizität der Ergebnisse: Die Analyse von aDNA kann in unterschiedlichem Ausmaß durch Artefakte erschwert werden, die sich aus der Degradierung der Nukleinsäuren ergeben. Bei gehäuften Auftreten von Artefakten kann die korrekte Alleldetermination für eine Probe erschwert sein (z.B. Schmerer et al. 2000, Bramanti et al. 2000) und erfordert daher ein stringentes Auswerteverfahren der Einzeltypisierungsergebnisse, um Artefakte gegen authentische Allele abzugrenzen und den tatsächlichen Genotyp eines Individuums festzustellen (Schultes et al. 1997, Schultes 2000). Das hier angewendete Verfahren entspricht im wesentlichen dem von Schultes und ist in Anhangskapitel 12.1.1 aufgeführt.

2.1.1 Multiplex-Analysen

Erleichtert wird die Sicherung der Authentizität von genetischen Daten einer Probe, wenn Marker analysiert werden, die hochpolymorph sind und von denen nach Möglichkeit mehrere simultan amplifiziert werden können (Multiplex-PCR). Diese Anforderung wird beispielsweise von autosomalen STRs (genetischer Fingerabdruck) erfüllt. Der Etablierung von Multiplex-PCR Systemen kommt daher in der Analyse degradiertes DNA und der Authentizitätsabsicherung größte Bedeutung zu. Diese Strategie kann im Prinzip auf die unterschiedlichsten Loci angewendet werden. Der entscheidende Vorteil von Multiplex-Amplifikationen liegt in einer Steigerung der Diskriminierungsstärke eines Amplifikationsergebnisses und damit der Authentizitätssiche-

rung, da bei der Untersuchung hochpolymorpher Loci das Typisierungsergebnis auf eine einzelne Probe zurückgeführt werden kann. Ein Abgleich der aus den Skelettproben gewonnenen genetischen Daten mit denen der Bearbeiter läßt einen Eintrag rezenter DNA erkennen (Hummel et al. 2000, Schultes 2000, Gerstenberger 2002). Durch Vergleich mit den Allelprofilen anderer Proben können Kreuzkontaminationen erkannt werden, weil dann mehrere Proben den selben genetischen Fingerabdruck aufweisen würden. In gleicher Weise lassen sich systematische Kontaminationen, z.B. der Reaktionschemikalien erkennen. Multiplex-STR-Analysen stellen also ein Werkzeug zur Selbstkontrolle der Experimente hinsichtlich etwaig auftretender Kontaminationen und zur Authentizitätssicherung der Ergebnisse dar.

Auch bei der Analyse weniger polymorpher Sequenzen, die in ihrer Merkmalskombination nicht auf ein Individuum beschränkt sind, wie Y-chromosomale oder mitochondriale Haplotypen (Schultes 2000, Gerstenberger 2002) oder mutationstragende Gene, sind Multiplex-Reaktionen sinnvoll. Je mehr genetische Informationen simultan aus einer Probe gewonnen werden können, desto höher ist die Diskriminierungsstärke des Ergebnisses und um so sicherer kann ausgeschlossen werden, daß ein gewonnenes Ergebnis einer Kontamination entspringt. Darüber hinaus können die einzelnen, gleichzeitig gewonnenen PCR-Produkte wie eine Einheit behandelt werden und erhalten im Algorithmus der Ergebnisreproduktion eine höhere Aussagekraft.

Werden nicht-individualisierbare Merkmale untersucht, kann durch zwei Verfahrensweisen die Authentizität der gewonnenen Ergebnisse gesichert werden. Es kann parallel zur Amplifikation der wenig polymorphen Marker aus dem selben DNA-Extrakt der genetische Fingerabdruck bestimmt werden (vgl. Kapitel 5.3). Eine andere Strategie liegt darin, in die Amplifikation eines genetischen Fingerabdrucks den Nachweis eines wenig polymorphen und daher *a priori* nicht einem bestimmten Individuum zuzuschreibenden Markers zu integrieren. Können beide simultan amplifiziert werden (vgl. Kapitel 5.1), kann die Authentizität der Typisierungsergebnisse dieses „eingeschleusten“ Markers optimal gesichert werden (Bramanti et al. 2003, Hummel 2003a, Hummel 2003b).

Weitere Vorteile der Multiplex-Analysestrategie liegen auf der Hand: es wird weniger Probenmaterial benötigt, wenn es gelingt, mit einer Untersuchung mehrere genetische Merkmale erfassen. Das Verhältnis zwischen Informationsausbeute zu Probeneinsatz kann erhöht werden. Darüber hinaus werden Reaktionschemikalien und Analyseaufwand reduziert. Aus diesen Gründen werden in dieser Arbeit nach Möglichkeit Multiplex-PCR-Systeme entwickelt und angewendet.

2.1.2 SNP-Analyse

Bei SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) handelt es sich um oft biallelische Merkmale, d.h. es werden nur zwei (der potentiell vier) Basen am betreffenden Locus realisiert. SNPs sind die häufigsten Mutationen im humanen Genom und treten mit einem durchschnittlichen Abstand von 1000-2000 Nukleotiden auf (Stoneking 2001, Marth et al. 2003). Für die Klärung anthropologischer Fragestellungen wie z.B. die Ermittlung der Spezieszugehörigkeit unbekannter historischer Überreste wie Skelettfragmente, Pergamente, Nahrungsbestandteile, pflanzlichen Reste (z.B. Amici & Rollo 1992, Burger et al. 2000, Rollo 2000) bietet die Analyse von SNPs einen einzigartigen Zugang. Darüber hinaus kann im Prinzip die Untersuchung von einer ausreichend großen Anzahl von SNPs die Identifizierung eines Individuums ermöglichen (Gill 2001) sowie die Möglichkeiten der Analyse Y-chromosomaler (Gusmao et al. 2002) und mitochondrialer Haplotypen (Brandstatter et al. 2003) erweitern. Auch zur Beantwortung populationsgenetischer Fragestellungen wie z.B. nach dem Auftreten und der Datierung von *bottleneck*-Situationen in der Geschichte des Menschen können SNP-Untersuchungen herangezogen werden (Marth et al. 2003). In der DNA eines Menschen ist außerdem ein Teil seines äußeren Erscheinungsbildes festgelegt. Auch hier erweisen sich Sequenzpolymorphismen als Ursache bestimmter phänotypischer Ausprägungen (z.B. Valverde et al. 1995, Marklund et al. 1996, Kapitel 6).

Bei der Untersuchung von SNPs wird auf Sequenzen fokussiert, die *a priori* nicht individualisierbar sind. Dies gilt besonders, wenn sich die untersuchten Sequenzpolymorphismen auf funktionstragenden Abschnitten der DNA

befinden, auf die hohe Selektionsdrücke wirken. Das bedeutet für die Authentifizierung eines aus degradiertem DNA gewonnenen SNP-Resultates, daß es in unabhängigen Reaktionsansätzen reproduziert werden muß, da postmortale Schäden und Veränderungen an den untersuchten Sequenzen für möglich gehalten werden müssen. Die originäre Sequenz kann während der Liegezeit durch Basenpaarverluste und –austausche verändert werden (Lindahl 1993, Höss et al. 1996, Krings et al. 1997, Hofreiter et al. 2001a, Gilbert et al. 2003a, Gilbert et al. 2003b). Arbeiten, die auf die Untersuchung (prä)historischer DNA-Sequenzpolymorphismen fokussieren, beschäftigten sich bislang mit der Analyse mitochondrialer DNA (z.B. Hauswirth et al. 1994, Oota et al. 1995), weshalb für diesen DNA-Typ auch die umfassendsten Untersuchungen bezüglich postmortal auftretender, liegemilieubedingter Sequenzmodifikationen vorliegen. Ob die Rate der postmortalen Basenmodifikationen humaner chromosomaler Sequenzen, wie sie Fokus dieser Arbeit sind (Kapitel 5.3.1 und Kapitel 6) ähnlich der mitochondrialen (Hofreiter et al. 2001a, Gilbert et al. 2003a, Gilbert et al. 2003b) oder bakterieller DNA (Lindahl 1993) ist, wurde bislang nicht systematisch untersucht. Nukleare DNA ist durch Kondensation zu Chromosomen und Assoziation an Histone im Kern möglicherweise besser vor den für mtDNA gut dokumentierten Desaminierungen geschützt. Gilbert et al. 2003b finden in ihrer Studie, in der Verteilungsmuster postmortaler Sequenzschäden (an mtDNA) untersucht werden, unter anderem, daß funktionale Gene weniger von solchen Schäden betroffen sind als selektionsneutrale Abschnitte. Als Ursachen hierfür werden u.a. unterschiedliche Sekundärstrukturen verschiedener DNA-Abschnitte und protektive, auch in archäologischem Skelettmaterial persistierende DNA-Protein-Bindungen diskutiert. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nukleare, auf funktionalen Genen befindliche SNPs untersucht werden, wird an dieser Stelle angenommen, daß günstige Randbedingungen für eine niedrige Rate liegemilieubedingter Artefakte auf den untersuchten Loci vorliegen. Durch ein geeignetes Auswerteverfahren muß gewährleistet werden, daß Artefakte gegen authentische Allele abgrenzbar sind und der tatsächliche Genotyp eines Individuums feststellbar ist. Diese Kriterien orientieren sich ebenfalls an denen von Schultes 2000 und sind in Kapitel 12.1.2 aufgeführt.

Auch wenn nur wenig polymorphe Loci untersucht werden können, bietet die SNP-Analyse einen klaren Vorteil für die Untersuchung von aDNA. Er liegt eben in ihrer Eigenschaft als Sequenzpolymorphismus im Gegensatz zum STR-Längenunterschied. Da die Eigenschaft genau einer Base untersucht wird, können die Analyseprodukte extrem kurz ausfallen. Dadurch gelingt der Zugang zu genetischen Informationen auch dann noch, wenn nur noch kleine DNA-Fragmente in einer Probe erhalten sind, die keine Generierung großer Amplifikate mehr zulassen. Aus diesen Gründen wird diese Strategie in dieser Arbeit angewandt und, wo es möglich ist (Kapitel 6), mit einem Multiplex-Assay verknüpft.

2.2 Verwendete Methoden zur DNA-Analyse

Im folgenden werden die methodischen Grundlagen für die durchgeführten Arbeiten der anschließenden Kapitel dargestellt.

2.2.1 Probennahme und Probenvorbereitung

Für Phenol-Chloroform-Extraktion: Die Probenentnahme von etwa 1-2 g schweren Knochenstücken erfolgte mit einer Diamantsäge (Typ K10). Bei der Beprobung von Zähnen wurden diese mit einer kleinen Zange aus der Alveole gelöst. Um potentielle Kontamination der Proben durch an der Oberfläche anhaftende Fremd-DNA zu vermeiden, wurden die Oberflächen der Proben mit einem Skalpell abgetragen. Zum Erreichen einer maximalen Oberflächenvergrößerung wurden die Proben nach manueller Zerkleinerung in einem Stahlmörser in einer Kugelschwingmühle (MM2, Retsch) homogenisiert. Das so gewonnene Knochenmehl wurde in Plastik-Gefäßen bis zur weiteren Bearbeitung tiefgefroren. Für den Einsatz in das Extraktionsgerät (Typ 341 A, Applied Biosystems) wurden 0,3 g Knochenpulver mit 1,4 ml EDTA (0,5 M, pH = 8,3) und 50 µl Proteinase K (Applied Biosystems) versetzt und 24 h bei 56°C unter Rotation inkubiert. Das Knochenmehl wurde danach durch Zentrifugation drei Minuten bei 6000 rpm pelletiert und der Überstand für die DNA-Extraktion eingesetzt. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl.

Für Magnetic-Beads-Extraktion Für den Einsatz in den Extraktionsroboter wurden 0,1-0,2 g Knochenpulver mit 0,5 ml EDTA (0,5 M, pH = 8,3) und 10 µl Proteinase K (Qiagen) versetzt und 24 h bei 56 °C unter Rotation inkubiert. Das Knochenmehl wurde danach durch Zentrifugation zwei Minuten bei 3000 rpm pelletiert und 250 µl des Überstandes für die DNA-Extraktion eingesetzt. Das Elutionsvolumen betrug 50 bzw. 100 µl.

2.2.2 DNA-Extraktion aus rezenten Proben

Extraktion aus Mundschleimhautabstrichen: Die DNA für die rezenten Kontrollproben zur Etablierung der in dieser Arbeit entwickelten PCR-Systeme wurde aus Mundschleimhautabstrichen mit Chelex100™ nach dem Protokoll von Walsh et al. 1991 extrahiert.

Extraktion aus Blut: Die DNA für weitere rezente Kontrollproben (Kapitel 6) wurde in der Universitätshautklinik aus Vollblut nach dem Protokoll von Reich et al. 1999 extrahiert.

2.2.3 DNA-Extraktion aus (prä)-historischem Skelettmaterial

Automatisierte Phenol-Chloroform-Extraktion: Die DNA eines Teils der bearbeiteten historischen Skelettproben wurde durch eine automatisierte Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender silicatgestützter alkoholischer Fällung gewonnen. Die Prozedur wurde unverändert nach dem von der Arbeitsgruppe publizierten Protokoll durchgeführt (z.B. Baron et al. 1995, Lassen et al. 1995).

Automatisierte Magnetic-Beads-Extraktion: Im Verlauf der Arbeit wurde neben der Phenol/Chloroform-Extraktion ein weiteres Extraktionsverfahren für die Isolierung von DNA aus historischem Skelettmaterial getestet und verwendet: die im Biorobot EZ1 (Qiagen) realisierte Variante einer automatisierten Extraktion unter Benutzung von silicabeschichteten Magnetpartikeln (Magnetic Beads). Die mit dieser Methode extrahierten Proben tragen die Bezeichnung „EZ1“. Die Wirkungsweise dieses Verfahrens ist in Abb. 3

schematisch dargestellt. Die durchgeführten Schritte und verwendeten Reagenzien (Angaben von Qiagen) sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

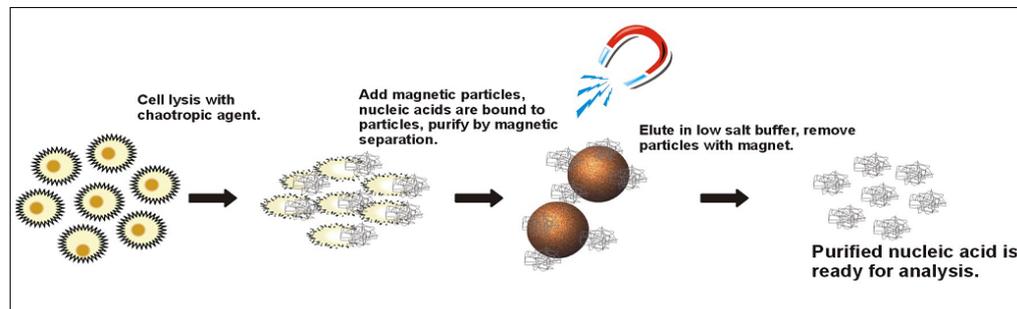


Abb. 3 Prinzip der im EZ1 Biorobot angewendeten Extraktionsmethode. Das Verfahren beruht auf einer Zellyse in chaotropem Milieu, der Bindung von DNA an silicabeschichtete magnetische Partikel, die samt der daran haftenden DNA über magnetische Separation abgetrennt werden können. Nach einigen Waschschrten wird die DNA wieder von den Magnetic Beads eluiert und steht für den Einsatz in die PCR zur Verfügung (Bildquelle: Fa. Qiagen).

Tab. 1 Arbeitsabläufe und verwendete Reagenzien im EZ1 Biorobot (verändert nach Angaben von Qiagen)

Schritt	Reagenz	Wirkung
Zellyse und Binden	Chaotrope Lösung (GTC) + silicabeschichtete Magnetic Beads	DNA bindet an Magnetic Beads
Waschen	Chaotrope Lösung	entfernt nicht an Beads gebundene Stoffe
Waschen	EtOH	entfernt GTC-Rückstände
Spülen	Wasser (kalt)	entfernt EtOH-Rückstände
Eluieren	Wasser oder niederkonzentrierte Puffer (warm)	

GTC: Guanidiumthiocyanat, EtOH: Ethanol (Datenquelle: Fa. Qiagen)

Die Reaktionschemikalien werden vom Hersteller in verblisterten Einweg-Kartuschen (Abb. 4) geliefert, die jeweils alle Reagenzien für die Extraktion einer Probe enthalten. Dadurch und im Zusammenspiel mit der vollautomatisierten Extraktionsmethode kann sehr kontaminationsrisikoarm gearbeitet werden.

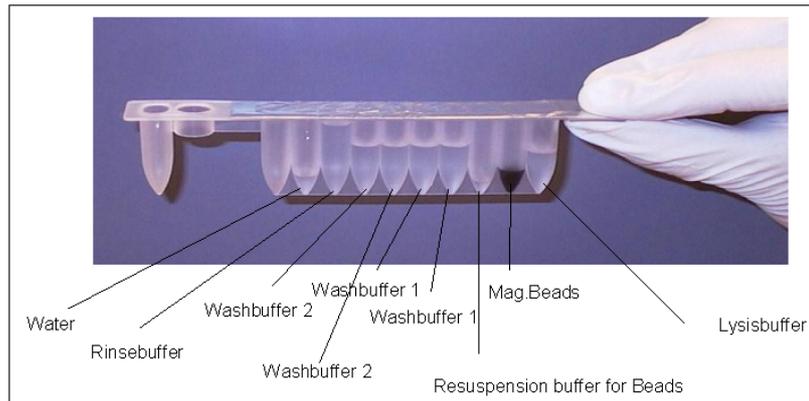


Abb. 4 Mit den benötigten Reaktionschemikalien vorgefüllte und verblisterte Kartusche, für die DNA-Extraktion einer Probe. (Bildquelle: Fa. Qiagen)

Extraktion: Drei für den Biorobot angebotene Protokolle wurden für die Extraktion von DNA aus historischem Skelettmaterial getestet: das *tissue protocol*, das *forensic protocol* für *reference samples* und das *forensic protocol* für *trace samples*. Mit allen drei Varianten konnten im Biorobot EZ1 DNA aus Knochenproben gewonnen werden. Es konnten keine systematischen Unterschiede bezüglich des DNA-Extraktionserfolges zwischen den einzelnen Protokollen beobachtet werden, die sich in der benutzten Chemie (Reagenzien) gar nicht und in den vollzogenen Arbeitsabläufen nur geringfügig unterscheiden. Ein Unterschied im Ablauf zwischen dem *forensic protocol* für *trace samples* und den beiden anderen Protokollen könnte dazu benutzt werden, auch Proben mit sehr wenig erhaltener DNA erfolgreich zu extrahieren: während beim *tissue protocol* und *forensic protocol* für *reference samples* eine für den Benutzer unveränderbare Menge von eingesetztem Überstand aufgenommen und für die DNA-Bindung zu den Magnetic Beads transportiert und dort die DNA gebunden wird, verläuft dieser Schritt beim *forensic protocol* für *trace samples* umgekehrt. Damit erhält der Benutzer die Möglichkeit, etwas mehr DNA-haltigen Überstand in die Extraktion einzusetzen und somit den Extraktionserfolg positiv zu beeinflussen.

Obwohl die DNA-Ausbeute im Einzelfall nicht an die aus der Phenol-Chloroform-Extraktion heranreicht, wie Vergleichsextraktionen zeigten, ist der Biorobot ein geeignetes Gerät zur Extraktion von aDNA. Neben der Automatisierung des Systems, welche die Handhabung der Proben durch den Bearbeiter und damit auch Kontaminationsrisiken stark reduziert sowie der sehr schnellen

Arbeitsweise des Gerätes – der Durchsatz beträgt 6 Proben in ca. 15 Minuten – zeichnen sich die Extrakte auch durch hohe Reinheit aus. Die Extrakte sind durchgehend farblos, was zeigt, daß gelblich färbende Huminstoffe erfolgreich entfernt wurden. Auch bei den mit diesen Extrakten durchgeführten PCRs konnten keine Anzeichen für die Anwesenheit von Inhibitoren festgestellt werden. Dieser Eigenschaft ist bei der Analyse von im Spurenbereich vorliegender, degradierter DNA große Bedeutung beizumessen, da auf weitere Schritte zur Aufreinigung des Extraktes, bei denen immer auch mit DNA-Verlusten zu rechnen ist, verzichtet werden kann.

2.2.4 Primersequenzen, PCR-Protokolle und PCR-Parameter

2.2.4.1 Amplifikation X-chromosomaler STRs

Im folgenden Unterkapitel werden die methodischen Aspekte der Untersuchung X-chromosomaler STRs, die im Rahmen dieser Arbeit in zwei Zusammenhängen durchgeführt wird, dargestellt. Im Kapitel 4.2 werden mit diesem Analysewerkzeug untersuchten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen (prä)historischen Individuen beschrieben. Ebenfalls Verwendung finden diese X-chromosomalen Marker bei der Bestimmung des praktiziertem Residenzverhalten einer bronzezeitlichen Menschengruppe (Kapitel 4.3).

Die für die Untersuchungen ausgewählten Marker Amelogenin, DXS6789, DXS9898, DXS101, DXS6800, GATA172D05 und DXS7424 (zu den Auswahlkriterien vgl. Kap. 4.2.1) wurden in einer Multiplex-PCR gemeinsam amplifiziert. In Abb. 5 wird der Aufbau der neu entwickelten X-STR-Multiplex-PCR schematisch dargestellt.

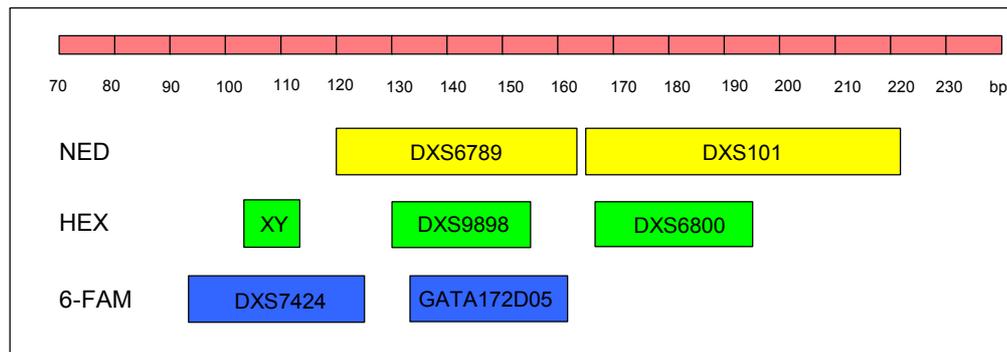


Abb. 5 Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen X-STR-Multiplex-PCR. Die farbigen Balken symbolisieren den Größenbereich (in Basenpaaren, bp), die jedes System nach den Berechnungen einnimmt. NED (gelb), HEX (grün) und 6-FAM (blau) bezeichnen die Farbmarkierung der PCR-Produkte für die Detektion.

Weitere Angaben zu den verwendeten Systemen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2 X-STR Multiplex PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allele und Allelgrößen

Primer	Sequenz (5' - 3')	Farbmarkierung	Allele	Allelgrößen (bp)
DXS7424 f	CCTGGGAAACACAGGAAGAC	6-FAM	9 - 20	94 - 127
DXS7424 r	CATTCAGCATTACAGCTAAGAAG	-		
GATA172D05 f	CAGGTGGTTAGTGGTGATGGT	6-FAM	5 - 12	134 - 162
GATA172D05 r	TCTGGGTTTATACCCCAAATAAT	-		
Amelogenin f	CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGT	HEX	X Y	106 - 112
Amelogenin r	ATCAGAGCTTACTGGGAAGCTG	-		
DXS9898 f	CACACCTACAAAAGCTGAGATATA	HEX	8.3 - 15	130 - 155
DXS9898 r	CATCCAGATAGACAGATCAATAGATT	-		
DXS6800 f	TGATTGTGTGAGTTTAATACTCCTTAATA	HEX	16 - 22	171 - 195
DXS6800 r	GAAAATAGAAAAGAACCTACGTTGAA	-		
DXS6789 f	GTTGGTACTTAATAAACCTCTTTT	NED	14 - 25	120 - 164
DXS6789 r	GGATCCCTAGAGGGACAGAA	-		
DXS101 f	CGCTACAGGAAATATACTATTACAT	NED	14 - 32	167 - 221
DXS101 r	CATATTCTGCGCATGTATCC	-		

bp: Basenpaare, f: *forward* Primer, r: *reverse* Primer, Farbmarkierungen: NED: gelb, HEX: grün, 6-FAM: blau, Primer Amelogenin nach Sullivan et al. 1993, in Amelogenin r wurde ein Mismatch gegenüber der Zielsequenz eingebaut, um die Annealtemperatur des Primers zu senken

Die Amplifikationen wurden im 25 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt:

12,5 µl QIAGEN Multiplex-PCR-Kit (Qiagen), 0,136 µM je Primer DXS6789 *forward* und *reverse*, 0,04 µM je Primer DXS7424 *forward* und *reverse*, 0,12

μM je Primer GATA172D05 *forward* und *reverse*, 0,12 μM je Primer DXS9898 *forward* und *reverse*, 0,32 μM je Primer DXS101 *forward* und *reverse*, 0,068 μM je Primer Amelogenin *forward* und *reverse*, 0,32 μM je Primer DXS6800 *forward* und *reverse*, 1 - 9,5 μl DNA-Extrakt. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 95°C 15 min, 40 Zyklen von 1 min 94°C, 3 min 58°C, 2 min 68°C.

Einstellung der PCR-Parameter:

Die Verlängerung der Annealzeit von standardmäßig einer auf drei Minuten verbesserte die Intensität der Produkte. Das Herabsetzen der Elongationstemperatur vom Startwert 72°C auf 68°C (Schmerer 1999, Hummel 2003a) verringerte die Stotterartefakte bei den beiden integrierten Trinukleotidrepeat-Systemen DXS 7424 und DXS 101. Die Verlängerung der Elongationszeit auf zwei Minuten bewirkte, daß ein zusätzlicher Inkubationsschritt zum gleichmäßigen Anhängen eines dATP an alle PCR-Produkte überflüssig wurde.

Zur Einstellung der optimalen Mg^{2+} -Konzentration wurde eine Mg^{2+} -Titerreihe (1-3 mM in 0,25 mM-Abständen) mit MgCl_2 und Puffer II (ABI) durchgeführt. Es zeigte sich, daß eine Konzentration von 1,5 mM den besten Kompromiß für die Multiplexreaktion darstellt. Bei niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen (1 und 1,25 mM) amplifizierten die Systeme DXS101 und DXS 6800 nur schwach, deren Optimum bei einer Konzentration von 2,5-3 mM Mg^{2+} liegt. Diese Konzentration wurde jedoch nicht gewählt, weil bei ihr im System GATA172D05 systematisch ein unspezifisches Produkt der Länge 161 bp auftritt, das zwischen den möglichen Allelausprägungen 11 und 12 für dieses System liegt. Das Auftreten dieses unspezifischen Produktes konnte zwar durch die Absenkung der Primerkonzentration für das betreffende System reduziert werden, wurde jedoch erst bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 1,5 mM mit der getesteten Reaktionschemie von ABI nicht mehr beobachtet. Da mit dieser Mg^{2+} -Einstellung eine gleichmäßige Amplifikation aller beteiligter Systeme ohne unspezifische Nebenprodukte gelang, wurden keine weiteren

Optimierungstests an diesem Parameter vorgenommen (z.B. um das bei vielen Reaktionen vorhandene zweite Mg^{2+} -Optimum zu finden).

Im Verlauf der Arbeit wurde eine weitere Reaktionschemie getestet - das Multiplex-PCR-Kit der Firma Qiagen, das ein gebrauchsfertiges Gemisch u.a. aus einem optimierter Puffer, dNTPs, HotStart-TaqPolymerase und Mg^{2+} -Ionen darstellt. Einzelheiten bezüglich der Zusammensetzung sowie verwendeter Additive sind nicht veröffentlicht. Die im Handbuch empfohlene PCR-Einsatzmenge für dieses Kit führt zu einer Mg^{2+} -Konzentration von 3 mM und liegt damit im Bereich der Generierung des unspezifischen Produktes im System GATA172D05. Dies entsteht tatsächlich bei Einsatz des Kits, jedoch mit gegenüber der ABI-Chemie reduzierter Peakhöhe und nur noch sporadisch im Zusammenhang mit einem schlechten Amplifikationserfolg auch für andere Systeme, wenn Proben mit sehr schlechtem DNA-Erhalt typisiert wurden. Es kann vermutet werden, daß im Reaktionskit enthaltene, (vom Hersteller nicht bekanntgegebene) Komponenten antagonistisch zum Effekt der hohen Mg^{2+} -Konzentration wirken und die Reaktionsspezifität erhöhen. Die Entscheidung, für die durchzuführenden Analysen an historischem Skelettmaterial trotz der sporadischen Koamplifikation des unspezifischen Produktes für dieses PCR-System das Multiplex-PCR-Kit zu benutzen, beruht vor allem auf dem Vergleich der Amplifikationsausbeute zwischen den bislang verwendeten Reagenzien (ABI) und dem Multiplex-PCR-Kit (Qiagen). Dieser zeigt, daß der Amplifikationserfolg sowohl für rezente als auch für historische Proben mit dem Multiplex-PCR-Kit wesentlich höher ist (Abb. 6), wovon in besonderem Maße der erfolgreiche Nachweis von Allelen im größten System (DXS101) profitiert (Abb. 7).

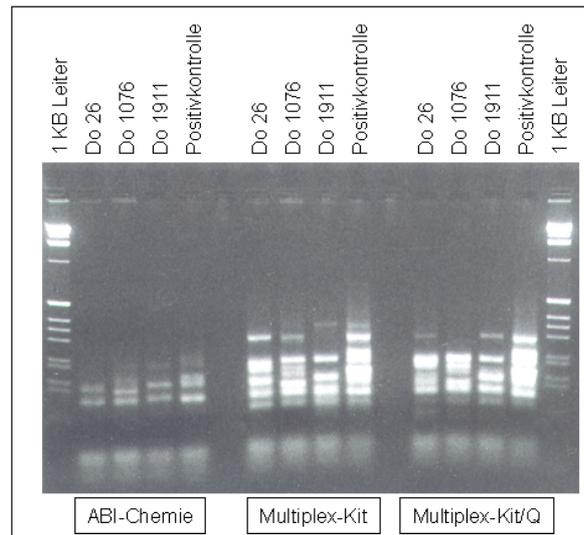


Abb. 6 Agarosegel zum Vergleich des Amplifikationserfolges mit drei verschiedenen Reaktionszusammensetzungen jeweils für drei historische Proben aus der Lichtensteinhöhle Do 26, Do 1076 und Do 1911 sowie eine rezente Probe. Es wurden jeweils gleiche Mengen DNA-Extrakt in alle drei Versuche eingesetzt und gleiche PCR-Zyklenzahlen durchlaufen. ABI-Chemie, links: PCR-Chemikalien der Firma Applied Biosystems (Puffer II, $MgCl_2$, AmpliTaq Gold®), die zu Beginn der Arbeit verwendet wurden. Multiplex-Kit, Mitte: gebrauchsfertiges Kit (Qiagen), das alle nötigen PCR-Reagenzien enthält, dessen genaue Zusammensetzung jedoch nicht veröffentlicht ist. Die Verwendung des Multiplex-PCR-Kits führt zu einer deutlichen Steigerung des Amplifikationserfolges für alle Proben. Multiplex-Kit/Q, rechts: PCR-Kit (Qiagen) mit Additiv Q-Solution zur Überprüfung der Möglichkeit der Steigerung des Amplifikationserfolges und/oder der Spezifität der Reaktion. Die Zugabe des Additivs bewirkt bei dieser PCR keine Veränderungen im Vergleich zum Ansatz ohne Q-Solution.

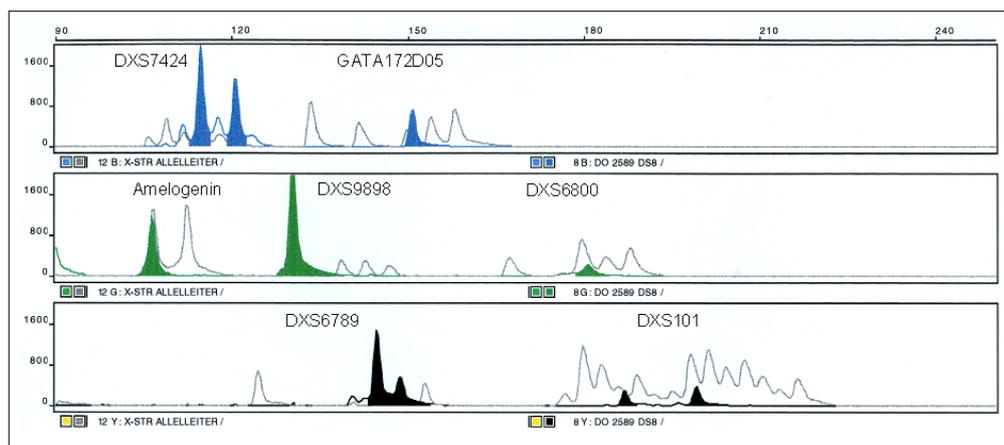


Abb. 7 Elektropherogramm eines Amplifikationsergebnisses einer historischen Probe aus der Lichtensteinhöhle (Do 2589) mit dem Multiplex-PCR-Kit (Qiagen). Auch das X-STR-System mit den größten Allelen, DXS101, wird regelhaft erfolgreich amplifiziert.

2.2.4.2 Amplifikation genetischer Fingerabdrücke

Die Amplifikation genetischer Fingerabdrücke von historischen Individuen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit als Mittel zur Authentizitätsabsicherung (vgl.

Kapitel 2.1.1 und Kapitel 4.2.1.1) von mit anderen, weniger polymorphen Markern gewonnenen Ergebnissen. Anwendung erfuhr dieser Ansatz bei der Analyse X-chromosomaler STRs (vgl. Kapitel 4.2) und ABO-Blutgruppenmerkmalen (vgl. Kapitel 5.3).

Die Reaktionen wurden im 25 µl-Ansatz mit folgenden Komponenten durchgeführt:

10 µl Profiler Plus Amp F /STR PCR Reaction Mix™, 5 µl Amp F /STR Profiler Plus Primer Set™, 2 U AmpliTaq Gold™, 1-10 µl DNA-Extrakt, wobei das Endvolumen durch Auffüllen mit der entsprechenden Menge Ampuwa® (Fresenius) erreicht wurde.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 94°C 11 min, 40 Zyklen von 1 min 94°C, 1,5 min 59°C, 2 min 72°C, anschließendes Delay 60°C 45 min.

2.2.4.3 Amplifikation X/Y- chromosomaler STRs

Im folgenden Unterkapitel werden die methodischen Aspekte der Untersuchung X- und Y-chromosomaler STRs dargestellt. Mit diesem Analysewerkzeug wird eine verbesserte molekulargenetische Geschlechtsbestimmung an degradiertes DNA historischer menschlicher Überreste ermöglicht. Die durchgeführte Untersuchung ist in Kapitel 4.1 dargestellt.

Die ausgewählten Marker Amelogenin, DXS6789, DXS9898, DYS391 und DYS392 (zur Auswahl der Marker vgl. Kapitel 4.1.1) wurden in einer Multiplex-PCR gemeinsam amplifiziert. Die Primer für die Y-STRs wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Müller 2002) zur Generierung von Y-Haplotypen aus degradiertes DNA entwickelt und von dort unverändert übernommen. Die Eigenschaften der verwendeten X-chromosomalen Systeme und des Amelogenin sind in Kapitel 4.2.1, Tab. 12 beschrieben.

In der folgenden Abbildung wird der Aufbau der neu entwickelten X/Y-STR-Multiplex-PCR schematisch dargestellt.

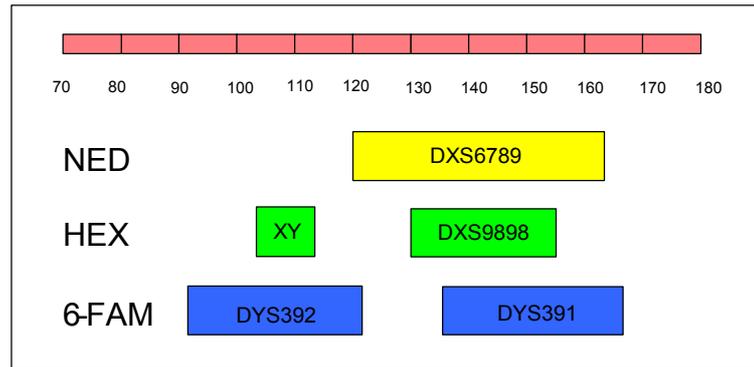


Abb. 8 Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen X/Y-STR-Multiplex-PCR. Die farbigen Balken symbolisieren den Range (in Basenpaaren, bp), die jedes System nach den Berechnungen einnimmt. NED (gelb), HEX (grün) und 6-FAM (blau) bezeichnen die Farbmarkierung der PCR-Produkte für die Detektion.

Weitere Angaben zu den verwendeten Systemen sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3 X/Y-STR-Multiplex-PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allele und Allelgrößen

Primer	Sequenz (5' - 3')	Farbmarkierung	Allele	Allelgröße (bp)
Amelogenin f	CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGT	HEX	X Y	106 - 112
Amelogenin r	ATCAGAGCTTACACTGGGAAGCTG	-		
DXS9898 f	CACACCTACAAAAGCTGAGATATA	HEX	8.3 - 15	130 - 155
DXS9898 r	CATCCAGATAGACAGATCAATAGATT	-		
DXS6789 f	GTTGGTACTTAATAAACCTCTTTT	NED	14 - 25	120 - 164
DXS6789 r	GGATCCCTAGAGGGACAGAA	-		
DYS391 f	TTGTGTATCTATTCAATCATA	-	7 - 14	138 - 166
DYS391 r	GGAATAAAATCTCCCTGG T	6-FAM		
DYS392 f	CAAGAAGGAAAACAAATTTTTT	-	6 - 16	91 - 121
DYS392r	GGATCATTAACCTACCAATC	6-FAM		

bp: Basenpaare, f: forward Primer, r: reverse Primer, Farbmarkierungen: NED: gelb, HEX: grün, 6-FAM: blau, Primer Amelogenin nach Sullivan et al. 1993, in Amelogenin r wurde ein Mismatch gegenüber der Zielsequenz eingebaut, um die Annealtemperatur des Primers zu senken.

Die Reaktionen wurden im 25 µl-Ansatz mit folgenden Komponenten durchgeführt:

50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (GeneAmp 10xPCR Buffer II, Applied Biosystems), 2 mM MgCl₂, 2,5 U AmpliTaq GoldTM, 200 µM je dNTP, 0,4 µM Primer DXS6789 *forward* und *reverse*, 0,2 µM Primer DXS989 *forward* und *reverse*, 0,35 µM Primer DYS391 *forward* und *reverse*, 0,2 µM Primer

DYS392 *forward* und *reverse*, 0,2 µM Primer Amelogenin *forward* und *reverse*, 1-5 µl DNA-Extrakt. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 94°C 11 min, 50-55 Zyklen von 40 sec 94°C, 40 sec 50°C, 40 sec 72°C. Finaler Extensionsschritt: 60°C 30 min.

Einstellung der PCR-Parameter:

Die Reaktionsparameter für die X/Y-STR-Multiplex-PCR wurden in experimentellen Reihen ermittelt. Die optimale Annealtemperatur der Primer wurde als diejenige Temperatur festgelegt, in der alle beteiligten Systeme noch effizient amplifiziert werden. Limitierend waren die Y-chromosomalen STRs, die bei weiterer Erhöhung der Annealtemperatur nur noch schwache Amplifikationsprodukte zeigten, während die X-STRs auch bei 58 °C unverändert gute Signale zeigen. Auch die Zyklenzahl der PCR für das Erreichen einer auswertbaren Signalstärke wurde von der geringeren Effizienz der Amplifikation der Y-STRs gegenüber den X-STRs bestimmt.

2.2.4.4 Amplifikation von *ccr5* zusammen mit autosomalen STRs (*ccr5*-fingerprint-Multiplex-PCR)

Im folgenden Unterkapitel werden die methodischen Aspekte der Untersuchung des *ccr5*-Locus zusammen mit autosomalen STRs dargestellt. Mit diesem Analysewerkzeug wird die Häufigkeit des Auftretens einer bestimmten Variante dieses Gens (*ccr5*Δ32) in (prä)historischen Bevölkerungen untersucht, um Aussagen über den Verbreitungszeitpunkt der Variante treffen zu können. Die durchgeführte Analyse ist in Kapitel 5.1 dargestellt.

Die ausgewählten Marker Amelogenin, TPOX, D5S818, VWA und TH01 wurden in einer Multiplex-PCR gemeinsam amplifiziert. In Abb. 9 wird der Aufbau der neu entwickelten *ccr5*-fingerprint-Multiplex-PCR schematisch dargestellt.

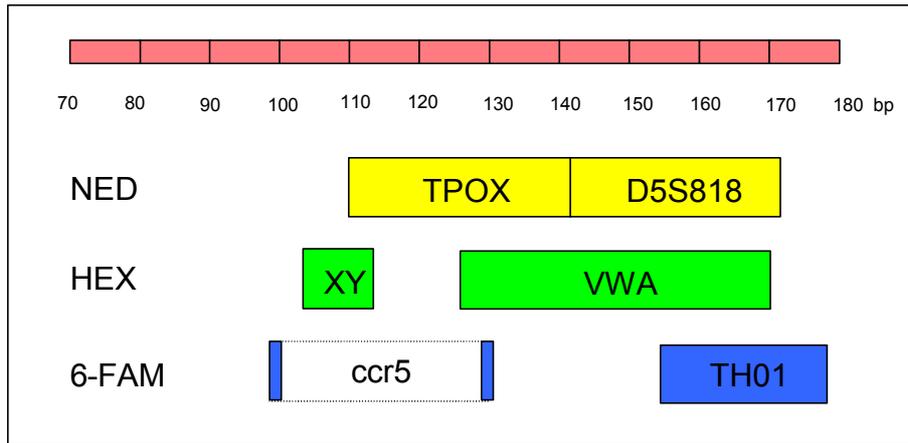


Abb. 9 Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen ccr5-fingerprint-Multiplex-PCR. Die farbigen Balken symbolisieren den Range (in Basenpaaren, bp), die jedes System nach den Berechnungen einnimmt. NED (gelb), HEX (grün) und 6-FAM (blau) bezeichnen die Farbmarkierung der PCR-Produkte für die Detektion.

Weitere Angaben zu den verwendeten Systemen sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4 ccr5-fingerprint-STR Multiplex PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allele und Allelgrößen

Primer	Sequenz (5' - 3')	Farbmarkierung	Allele	Allelgröße (bp)
ccr5 f	CCAGGAATCATCTTTACCAGATCTC	6-FAM	ccr5 - ccr5 Δ 32	106 - 112
ccr5 r	GGACCAGCCCCAAGATGACTA	-		
Amelogenin f	CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGT	HEX	X Y	106 - 112
Amelogenin r	ATCAGAGCTTACACTGGGAAGCTG	-		
TPOX f	GAACCGTCGACTGGCACAG	NED	6 - 14	110-142
TPOX r	CGCTAGGCCCTTCTGTCC T	-		
D5S818 r	CAAGGGTGATTTTCCTCTTTGGTAT	NED	7 - 15	140 - 172
D5S818 r	GTGATTCCAATCATAGCCACAGTT			
TH01 f	GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT	6-FAM	5 - 11	154 - 178
TH01 f	GTGATTCCCATTGGCCTGTTCTC			
VWA f	CCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATG	HEX	13 - 21	126 - 170
VWA r	GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG			

bp: Basenpaare, f: *forward* Primer, r: *reverse* Primer, Farbmarkierungen: NED: gelb, HEX: grün, 6-FAM: blau, Primer Amelogenin nach Sullivan et al. 1993, in Amelogenin r wurde ein Mismatch gegenüber der Zielsequenz eingebaut, um die Annealtemperatur des Primers zu senken, Primer TH01 nach Polymeropoulos et al. 1991, Primer VWA nach Kimpton et al. 1992.

Die Amplifikationen wurden im 25 μ l-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt:

50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM je dNTP, 2,5 U AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems), 0,28 µM je Primer *ccr5 forward* und *reverse*, 0,20 µM je Primer *VWA forward* und *reverse*, 0,24 µM je Primer *TPOX forward* und *reverse*, 0,20 µM je Primer *TH01 forward* und *reverse*, 0,22 µM je Primer *D5S818 forward* und *reverse*, 0,25 µM je Primer *Amelogenin forward* und *reverse*, 2-10 µl DNA-Extrakt, wobei das Endvolumen durch Auffüllen mit der entsprechenden Menge Ampuwa® (Fresenius) erreicht wurde.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 94°C 11 min, 40 Zyklen von 1 min 94°C, 1 min 54°C, 1 min 72°C, finaler Extensionsschritt: 30 min 60 °C.

Einstellung der PCR-Parameter:

Zur Einstellung der optimalen Mg²⁺-Konzentration wurde eine Mg²⁺-Titerreihe (1-3 mM in 0,25 mM-Abständen) mit MgCl₂ und Puffer II (Applied Biosystems) durchgeführt. Ein finaler Extensionsschritt wurde angefügt, um ein gleichmäßiges polymerasespezifisches Anhängen eines dATPs an alle PCR-Produkte zu gewährleisten.

2.2.4.5 Amplifikation von *ccr5* zusammen mit gelinkten STRs (*ccr5*-linked-STR-Multiplex-PCR)

Im folgenden Unterkapitel werden die methodischen Aspekte der Etablierung eines Analysewerkzeuges vorgestellt, mit dem die Prüfung der Hypothese eines singulären Ursprungs der *ccr5*Δ32-Variante ermöglicht wird. Die entsprechenden Untersuchungen sind in Kapitel 5.2 dargestellt.

In der folgenden Abb. 10 wird der Aufbau der neu entwickelten *ccr5*-linked-STR-Multiplex-PCR mit den empirisch ermittelten Allelgrößenbereichen schematisch dargestellt.

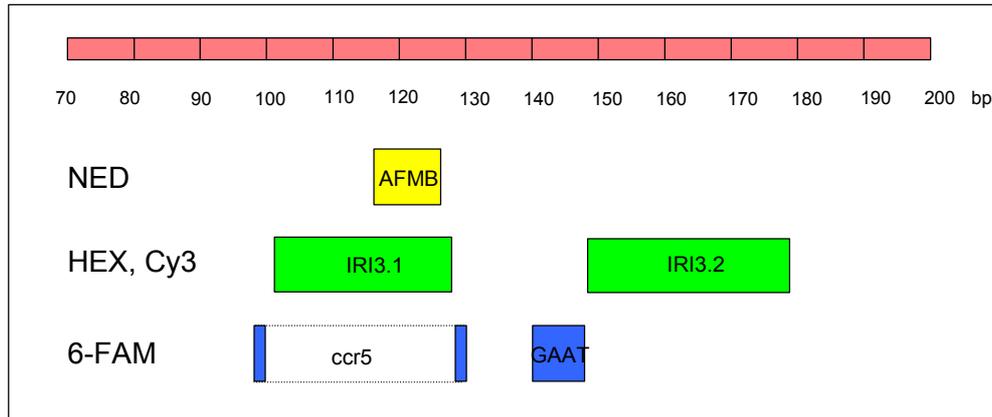


Abb. 10 Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen *ccr5*-linked-STR-Multiplex-PCR. Die farbigen Balken symbolisieren den Range (in Basenpaaren, bp), die jedes System nach den Berechnungen einnimmt. NED (gelb), HEX, Cy3 (grün) und 6-FAM (blau) bezeichnen die Farbmarkierung der PCR-Produkte für die Detektion. GAAT: GAAT12D11, AFMB: AFMB362_{wb9}.

Weitere Angaben zu den verwendeten Systemen sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Tab. 5 *ccr5*-linked-STR Multiplex PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allelrange und Allelgrößen

Primer	Sequenz (5' - 3')	Farbmarkierung	Allele	Allelgröße (bp)
IRI3.1 f	GCTGGAAATTTCTTCAGACATTG	HEX	1 - 14	102 - 128
IRI3.1 r	CGGACCTTGCATTACAGGACT	-		
IRI3.2 f	CACTTCCAAGTAAATGATGAAACTGT	Cy3	1 - 16	134 - 162
IRI3.2 r	CCAAACTGTCTGCCAGTAATGTAA	-		
ccr5 f	CCAGGAATCATCTTTACCAGATCTC	6-FAM	<i>ccr5</i> - <i>ccr5</i> Δ32	106 - 112
ccr5 r	GGACCAGCCCCAAGATGACTA	-		
GAAT f	GTTGGTACTTAATAAACCCCTCTTTT	6-FAM	1.2 - 3	120 - 164
GAAT r	GGATCCCTAGAGGGACAGAA	-		
AFMB f	CGCTACAGGAAATATACTATTACAT	NED	1 - 4	167 - 221
AFMB r	CATATTCTGCGCATGTATCC	-		

bp: Basenpaare, f: *forward* Primer, r: *reverse* Primer, Farbmarkierungen: NED: gelb, HEX: grün, 6-FAM: blau. GAAT: GAAT12D11, AFMB: AFMB362_{wb9}. Daten der Allelgrößen aus (Bertermann 2004, Ancillotti Perilli 2004)

Die Amplifikationen wurden in zwei Triplex-Reaktionen im 25 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt:

Triplex A: 12,5 µl QIAGEN Multiplex-PCR-Kit (Qiagen), 0,16 µM je Primer IRI3.1 *forward* und *reverse*, 0,20 µM je Primer IRI3.2 *forward* und *reverse*, 0,08 µM je Primer *ccr5 forward* und *reverse*, 1-5 µl DNA-Extrakt.

Triplex B: 12,5 µl QIAGEN Multiplex-PCR-Kit (Qiagen), 0,08 µM je Primer *ccr5 forward* und *reverse*, 0,16 µM je Primer *GAAT forward* und *reverse*, 0,16 µM je Primer *AFMB forward* und *reverse*, 1-5 µl DNA-Extrakt.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Triplex A: Initialschritt: 95°C 15 min, 40 Zyklen von 40 sec 94°C, 20 sec 52°C, 30 min 60°C.

Triplex B: Initialschritt: 95°C 15 min, 40 Zyklen von 40 sec 94°C, 20 sec 58°C, 30 min 60°C.

Einstellung der PCR-Parameter:

Das Herabsetzen der Elongationstemperatur vom Standardwert 72°C auf 52 bzw. 58°C und das Verkürzen des kombinierten Anneal/Elongationsschrittes auf 20 Sekunden verringerte die Stotterartefakte bei den integrierten Dinukleotidrepeat-Systemen, da auf diese Weise ein *waving* der Primer während der Elongationsphase vermindert wurde (vgl. Hummel 2003a).

2.2.4.6 Amplifikation und Reamplifikation von *ccr5* Singleplex-Produkten in einer Booster-PCR

Im Rahmen der Untersuchungen zur Klärung des Zeitpunktes der Verbreitung der *ccr5*Δ32-Variante (Kapitel 5.1) wurden zur Sicherstellung der Amplifikation des richtigen Locus aus den verwendeten Extrakten (prä)historischer Individuen einige Amplifikate sequenziert.

Es wurden Singleplex-Amplifikationen des *ccr5*-Locus durchgeführt (der Primer für den *ccr5*-Nachweis ist in Kapitel 2.2.4.4, Tab. 4 gelistet). Die Reaktionen wurden im 25 µl-Ansatz mit folgenden Komponenten durchgeführt:

50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (GeneAmp 10xPCR Buffer II, Applied Biosystems), 2,5 mM MgCl₂, 2,5 U AmpliTaq Gold™, 200 µM je dNTP, je 0,20 µM Primer *ccr5 forward* und *reverse*, 1-10 µl DNA. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 94 °C 11 min, 40 Zyklen von 1 min 94 °C, 1 min 54 °C, 1 min 72°C. Finaler Extensionsschritt: 60 °C 30 min.

Anschließend wurden die Proben auf ein 5%iges Agarosegel aufgetragen (2.2.9.1), elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert, wodurch eine Trennung der Allele bei heterozygoten Individuen gelang (2.2.5).

Mit den mittels Gelextraktion gewonnen und von der Wildtyp-Ausprägung abgetrennten Allelen wurde eine Booster-PCR vorgenommen (Ruano et al. 1989). Die Reaktionen wurden im 25 µl-Ansatz mit folgenden Komponenten durchgeführt:

50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (GeneAmp 10xPCR Buffer II, Applied Biosystems), 2,5 mM MgCl₂, 2,5 U AmpliTaq GoldTM, 200 µM je dNTP, je 0,20 µM Primer *ccr5 forward* und *reverse*, 0,5 µl DNA aus der Gelextraktion. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter für die Booster PCR für *ccr5*-Allele waren wie folgt:

Initialschritt: 94 °C 11 min, 30 Zyklen von 1 min 94 °C, 1 min 54 °C, 1 min 72°C. Finaler Extensionsschritt: 60 °C 30 min.

2.2.4.7 Amplifikation von phänotypassoziierten SNPs

Im Rahmen der Untersuchung von SNPs, die mit humanen Haarfarben und Hauttypen assoziiert sind (vgl. Kapitel 6), wurden die im folgenden dargestellten Protokolle und Parameter verwendet. Der an dieser Stelle aufgeführten PCR (Primer und Größenbereiche in Tab. 6) folgt ein weiterer Analyseschritt, der in Kapitel 2.2.7 beschrieben wird.

Tab. 6 Phänotyp-SNP-PCRs: verwendete Primer und Produktgrößen

System	Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktgrößen (bp)
System A	<i>ASIP</i> f	CCCACTCCCGGCCGCGAGC	44
	<i>ASIP</i> r	GCCCCGCGTCCCCGAAGC	
	<i>codon</i> 151 f	GGACCRCTACATCTCCATCTTCTACGCACTG	89
	<i>codon</i> 160 r	CCCAGATGGCCGCAACGGCTC	
	<i>codon</i> 60 f	TGGGGCTGGTGAGCTTGGTGGAGAAC	63
	<i>codon</i> 60 r	GGTTCGTTCTTGGCGATGGTGG	
System B	<i>codon</i> 142 f	GGGCGCCATCGCCGTGGA	73
	<i>codon</i> 151 r	GCGGCAGGGTCACGATGCTGTG	
	<i>codon</i> 84 f	CATCTGCTGCCTGGCCTTGTCGGA	70
	<i>codon</i> 92 r	GAGGATGACGGCCGTCTCCAGCA	
	<i>codon</i> 294 f	GCCCTCATCATCTGCAATGCCATCATC	60
	<i>codon</i> 294 r	CTCCTGGCTGTGGAAGGCGTAGATGAGG	

bp: Basenpaare, f: *forward* Primer, r: *reverse* Primer.

Die Amplifikationen wurden im 25 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt:

System A: 11 µl QIAGEN Multiplex-PCR-Kit (Qiagen), 0,30 µM je Primer 151 *forward* und 160 *reverse*, 0,20 µM je Primer 60 *forward* und *reverse*, 0,24 µM je Primer *ASIP forward* und *reverse*, 1 - 9,5 µl DNA-Extrakt. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

System B: 11 µl QIAGEN Multiplex-PCR-Kit (Qiagen), 0,20 µM je Primer 84 *forward* und 92 *reverse*, 0,30 µM je Primer 294 *forward* und *reverse*, 0,2 µM je Primer 142 *forward* und 151 *reverse*, 1 - 9,5 µl DNA-Extrakt. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter für beide Systeme waren wie folgt:

Initialschritt: 95°C 15 min, 15 Zyklen von 1 min 94°C, 1 min 72°C, 25 Zyklen von 40 sec 94°C, 20 sec 72°C.

Einstellung der PCR-Parameter:

Aus der Lage der Primerbindungsstellen in G- und C-reichen Sequenzabschnitten resultiert die hohe Annealtemperatur von 72 °C für beide Triplexsysteme. Dadurch wird eine Zweischnitt-PCR möglich, in der die Schritte Primerannealing und Elongation zusammenfallen.

Generierung eines Zweipunkte-Standards: Zur sicheren *MC1R*/Agouti-Allelbestimmung der durch die Fragmentlängenanalyse aufgetrennten SBE-Produkte (Kapitel 2.2.7) der historischen Proben wurde ein Zweipunkte-Standard generiert. Hierzu wurde im 40 µl-Ansatz aus einer Rezentprobe (DS) als Matrize ein PCR-Produkt mit den Primern *codon 142 forward* und *codon 160 reverse* generiert.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 95°C 15 min, 15 Zyklen von 1 min 94°C, 1 min 72°C, 25 Zyklen von 40 sec 94°C, 20 sec 72°C.

2.2.4.8 Amplifikation von *ASIP* Singleplex-Produkten

Im Rahmen der Untersuchungen phänotypenassoziierter Marker wurden zur Sicherstellung der Amplifikation des richtigen Locus aus den verwendeten Extrakten (prä)historischer Individuen einige Amplifikate sequenziert.

Es wurden Singleplex-Amplifikationen des *ASIP*-Locus durchgeführt (der Primer für den *ASIP*-Nachweis ist in Kapitel 2.2.4.7, Tab. 6 gelistet). Die Reaktionen wurden im 50 µl-Ansatz mit folgenden Komponenten durchgeführt:

50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (GeneAmp 10xPCR Buffer II, Applied Biosystems), 2,5 mM MgCl₂, 2,5 U AmpliTaq GoldTM, 200 µM je dNTP, je 0,20 µM Primer *ASIP forward* und *reverse*, 1 µl DNA. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 94°C 11 min, 35 Zyklen von 1 min 94°C, 1 min 72°C.

2.2.4.9 Amplifikation von ABO-Blutgruppenmerkmalen

Im folgenden Unterkapitel werden die methodischen Aspekte der Etablierung eines Analysewerkzeuges, mit dem die ABO-Genotypisierung (prä)historischer

Individuen ermöglicht wird. Die entsprechenden Untersuchungen sind in Kapitel 5.3 dargestellt.

Tab. 7 ABO-Typisierungs-PCRs: verwendete Primer, nachgewiesene relevante Nukleotidpositionen und Produktgrößen

System	Primer ¹	Sequenz (5' - 3')	relevante np	Produktgrößen (bp)
Ex6	224-237 f	CTCTCTCCATGTGCAGTAGGAAGG	261	103*/104
	224-237 r	GAACGCTCGTTGAGGATGTCG	297	
Ex7	772-835 f	AAGGACGAGGGCGATTTCTA	796	64
	772-835 r	GCTGCAACTCTTGCACCGACC	802	

bp: Basenpaare, f: *forward* Primer, r: *reverse* Primer. np: Nukleotidpositionen, 1 Die Primerbezeichnung zeigt die Nukleotidpositionen der ersten und letzten Base des Primers an, * : für die O-Varianten mit Deletion an np 261 beträgt die Länge 103 bp.

Die Amplifikationen wurden im 50 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt:

System Ex6: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM je dNTP, 2,5 U AmpliTaqGold, 0,12 µM je Primer Ex6 *forward* und *reverse*, 2 - 10 µl DNA-Extrakt. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

Initialschritt: 94°C 11 min, 45 Zyklen von 1 min 94°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C.

System Ex7: Der Ansatz erfolgte analog zu Ex6 unter Verwendung des entsprechenden Primerpaars Ex7 *forward* und *reverse*. Die Cyclingbedingungen wichen nur in der Annealtemperatur (53 °C) von denen des Ex6-Systems ab.

2.2.5 Gel-Extraktion von Banden zur Reamplifikation

Nach Auftrennung der entsprechenden Banden (vgl. Kapitel 2.2.4.6) auf dem Agarosegel wurden die zu sequenzierenden Fragmente unter UV-Licht (254 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Masse dieser isolierten Agarose/Banden-Stückchen wurde bestimmt und eine Extraktion der DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

(Qiagen) nach den Angaben des Herstellers vorgenommen. Das Elutionsvolumen entsprach dem Ausgangsvolumen.

2.2.6 Taq-Cycle-Sequencing

Aufreinigung der PCR-Produkte: Für einen Einsatz in die Sequenzierreaktion wurden die PCR-Produkte (vgl. Kapitel 2.2.4.6 und 2.2.4.8) von den übrigen Komponenten des PCR-Reaktionsgemisches (freie Primer, dNTPs, Taq-Polymerase) abgetrennt. Zur Aufreinigung wurde dabei der QIAquick PCR MinElute Kit (Qiagen) verwendet, mit dem PCR-Produkte, die größer als 70 bp sind, reversibel an eine Silicamembran gebunden werden. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Elutionsvolumen entsprach dem Ausgangsvolumen.

Cycle Sequencing: Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in eine Cycle Sequencing Reaction eingesetzt. Diese beruht auf der enzymatischen Replikation eines DNA-Stranges mit einem von Sanger etablierten System (Sanger et al. 1977). Der Reaktionsansatz beinhaltet neben einem Sequenzierprimer, Taq-Polymerase, Tris-HCl, MgCl₂ und dNTPs fluoreszenzfarbstoffmarkierte Dideoxynukleotide (ddNTPs). Bei der Elongation werden neben den unmarkierten dNTPs stochastisch die markierten ddNTPs in den neu zu synthetisierenden DNA-Strang eingebaut und bewirken einen Kettenabbruch.

Je nach Signalintensität auf dem Agarosegel wurden 2 bis 6 µl aufgereinigtes PCR-Produkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit dem *forward* Primer (3 pmol/Ansatz) durchgeführt. DNA und Primer wurden mit 4 µl BigDye™ Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) versetzt und mit HPLC-Wasser auf 20 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt.

Die Cyclingparameter für die Sequenzierung von *ccr5*-Allelen waren wie folgt:

30 Zyklen von 30 sec 96°C, 15 sec 55°C, 4 min 60°C.

Die Cyclingparameter für die Sequenzierung von *ASIP*-Allelen waren wie folgt: 30 Zyklen von 30 sec 96°C, 15 sec 56°C, 4 min 60°C.

Fällung der Sequenzierprodukte: Anschließend an die Cycle Sequencing Reaction werden die Sequenzierprodukte von überschüssigen Komponenten,

v.a. nicht inkorporierten ddNTPs befreit, welche die nachfolgende Analyse stören könnten. Hierzu wurde eine ethanolische Fällung durchgeführt: 18 µl des Reaktionsansatzes werden mit 50 µl Ethanol (abs) und 2 µl 3 M NaOAc (pH 4,6) gefällt und danach zur Pelletierung zentrifugiert. Es folgt ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol und erneute Pelletierung. Das Pellet wird nach Trocknung in 10 µl HPLC-Wasser aufgenommen. Die Analyse (5 µl Probe + 15 µl HPLC-Wasser) erfolgt über Kapillargelelektrophorese (Kapitel 2.2.9.3).

2.2.7 SBE-Analyse

Prinzip: Eine Möglichkeit zum Nachweis von SNPs ist das Minisequencing, auch treffender „Single Base Extension“ Protokoll (SBE) genannt (Jalanko et al. 1992, Syvanen et al. 1992). Das Prinzip der Methode besteht aus zwei Schritten. Zuerst wird eine PCR durchgeführt, bei der sich die Primer sehr nahe an der zu untersuchenden Stelle befinden können. Im Idealfall kann man sich hier ein Primerpaar vorstellen, das auf beiden Seiten die SNP-Stelle flankiert. In der Praxis ist dies oft wegen des Aufbaus der den SNP flankierenden Regionen nicht realisierbar. Das entstandene PCR-Produkt wird aufgereinigt und in die SBE-Reaktion eingesetzt, die eine spezielle Variante der Taq-Cycle-Sequencing-Reaktion (vgl. Kapitel 2.2.6) darstellt. Im Unterschied zu dieser werden in die SBE-Reaktion nur ddNTPs gegeben, die nach dem Einbau jeweils eines Nukleotids zum Kettenabbruch führen. Entsprechend müssen die Extensionsprimer für die Reaktion speziell gestaltet werden.

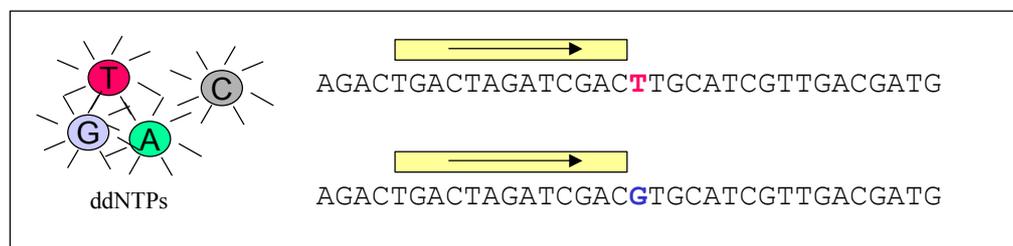


Abb. 11 Single Base Extension Reaktion. Dargestellt ist jeweils der obere DNA-Strang für zwei Allele eines Locus mit einem SNP in biallelischer Ausprägung (T>G). Der verwendete Extensionsprimer endet mit seinem 3'-Ende direkt vor der zu analysierenden Nukleotidposition. Die an SBE-Reaktion beteiligten ddNTPs sind basenspezifisch fluoreszenzmarkiert. Bei Elongation wird das entsprechende ddNTP eingebaut, danach erfolgt ein Kettenabbruch.

Als Ende dieser Reaktion steht die Generierung von Produkten, die aus dem SBE-Primer und einem spezifischen fluoreszenzmarkierten ddNTP (in Abb. 11 T oder G) bestehen und elektrophoretisch durch Fragmentlängenanalyse (FLA) aufgetrennt werden können. Hier wird der Umstand ausgenutzt, daß gleich lange, doch mit unterschiedlichen Farbstoffen versehenen Produkte ein etwas voneinander abweichendes Laufverhalten zeigen (vgl. Abb. 59 und Abb. 60). Bei heterozygoter Ausprägung im untersuchten Locus sind daher die allelspezifischen Peaks nicht uninterpretierbar übereinander dargestellt, sondern erscheinen diskret nebeneinander. Ein weiterer Unterschied zur Taq-Cycle-Sequencing-Reaktion besteht darin, daß die SBE-Reaktion auch als Multiplex-Ansatz verlaufen kann, d.h. es können simultan mehrere Extensionsprimer eingesetzt werden, die verschiedene auf dem PCR-Produkt lokalisierte SNPs nachweisen. Um die entstehenden SBE-Produkte sicher auftrennen zu können, müssen diese einen Längenunterschied von mindestens vier Basen aufweisen. Beim Simultaneinsatz vieler SBE-Primer würde dies zu Primerlängen von 60 oder mehr Basen und daraus resultierend zu ungleichen Reaktionsbedingungen wie z.B. Annealtemperaturen führen. Um eine solche Imbalance zu vermeiden, kann dieser Längenpolymorphismus auch durch Anhängen eines sogenannten *tags*, einer nichthybridisierenden Sequenz in Form eines $(T)_n$ oder $(GACT)_n$ Repeats erreicht werden (vgl. Abb. 12).

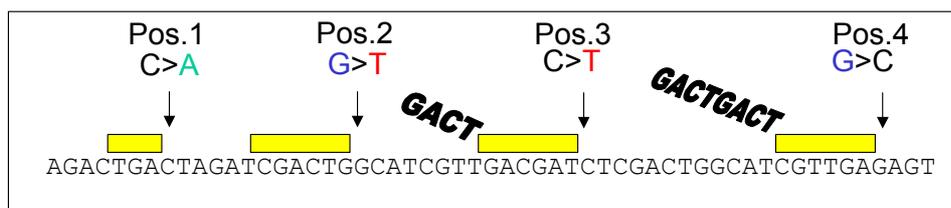


Abb. 12 Schema einer simultanen SBE-Analyse von vier SNP-Stellen (Pos.1-4), die auf einem oder auf mehreren PCR-Produkten verschiedenen lokalisiert sein können. Die Primer für den Nachweis von Pos.3 und 4 sind durch Anhängen eines GACT-Repeats verlängert, um eine Trennung der generierten Fragmente beim nachfolgenden Detektionsschritt zu ermöglichen.

Durchführung

Aufreinigung der PCR-Produkte: Um die DNA-Fragmente aus Kapitel 2.2.4.7 von den übrigen Komponenten des PCR-Reaktionsgemisches (freie Primer, dNTPs) abzutrennen, wird eine enzymatische Aufreinigung durchgeführt. Hierzu wird einerseits die Exonuklease Exo I zur Zerstörung

einzelsträngiger DNA und damit der nichtverbrauchten freien Primer benutzt. Ein weiteres Enzym, SAP (shrimp alkaline phosphatase), katalysiert die Dephosphorylierung der 5'-Phosphatgruppen der nicht inkorporierten dNTPs und macht sie für eine weitere Reaktion unbrauchbar. Zur Durchführung werden 15 µl des PCR-Produktes mit 2 U Exo I und 5 U SAP versetzt. Es folgt eine Inkubation (2 h 37 °C) und Inaktivierung der Enzyme (45 min 82 °C).

SBE-Reaktion: Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde das kommerziell erhältliche SNaPshot-Kit (Applied Biosystems) verwendet, das die Reaktionskomponenten Puffer, Taq-Polymerase und fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthält. Das Produkt wurde bereits von anderen Forschergruppen erfolgreich für die SNP-Analyse in forensischen Zusammenhängen benutzt und ist validiert (Morley et al. 1999, Grimes et al. 2001, Brandstatter et al. 2003, Bender et al. 2003). Die SBE-Analysen wurden ebenfalls in Multiplex-Reaktionen durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tab. 8 SBE-Multiplexsysteme: verwendete Primer, amplifizierte relevante SNP-Positionen und Produktgrößen

	Primer	SNP	Sequenz (5' to 3')	Produktlänge
SBE Multiplex A	SBE <i>ASIP</i> f	A > G	CCCACTCCCGGCCGCGAG	19
	SBE 160 f	C > T	ACCACAGCATCGTGACCCTGCCG	24
	SBE 151 f	C > T	GGACCRCTACATCTCCATCTTCTACGCACTG	32
	SBE 60 f	G > T	(GACT) ₉ TGGTGGAGAACGCGCTGGTG	56
SBE Multiplex B	SBE 84 f	C > A	ACTCATCTGCTGCCTGGCCTTGTCGGA	28
	SBE 142 f	G > A	(GACT) ₄ GACGCCATCGCCGTGGACC	36
	SBE 294 f	C > G	(T) ₁₅ CCTCATCATCTGCAATGCCATCATC	41
	SBE 92 r*	C > T	(GACT) ₆ GATGACGGCCGTCTCCAGCA	45

bp: Basenpaare, f: *forward* Primer, r: *reverse* Primer. * Reverser Primer weist den reversen Basenaustausch als in Tab. 6 notiert nach.

Die Amplifikationen wurden im 5 µl-Ansatz (Ansatz auf Eis, da die im SNaPshot Reaction Mix enthaltene Taq-Polymerase nicht inhibiert ist) mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt:

System A: 2,5 µl SNaPshot Reaction Mix (Applied Biosystems), 0,09 µM Primer SBE 160 f, 0,11 µM Primer SBE 151 f, 0,09 µM Primer SBE 60 f, 0,09

μM Primer SBE *ASIP* f, 1 μl Exo/SAP gereinigte DNA aus Multiplex-PCR A. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

System B: 2,5 μl SNaPshot Reaction Mix (Applied Biosystems), 0,16 μM Primer SBE 84 f, 0,15 μM Primer SBE 142 f, 0,35 μM Primer SBE 92 r, 0,03 μM Primer SBE 294 f, 1 μl Exo/SAP gereinigte DNA aus Multiplex-PCR B. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit Ampuwa® (Fresenius) erreicht.

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

32 Zyklen von 96°C 15 sec, 60°C 35 sec.

Generierung eines Zweipunkte-Standards: Das für den Zweipunkte-Standard generierte PCR-Produkt dient als Matrize für eine Duplex-SBE-Reaktion zur Generierung zweier Marker, die als probeninterner Standard (2 μl) den zu typisierenden *MC1R/Agouti*-SBE-Produkten zugesetzt wird.

Tab. 9 SBE-Duplexsystem zur Generierung eines Zweipunkte-Standards, verwendete Primer und Produktgrößen

Primer	SNP	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge
17 + T	T	CCATCGCCGTGGACCGC	18
39 + T	T	GTGACCCTGCCGCGGGCGCGGCGAGCCGTTGCGGCCATC	40

bp: Basenpaare,

Die generierten Produkte weisen nach derzeitigem Kenntnisstand nicht- oder nur wenig polymorphe Stellen auf dem *MC1R*-Gen nach (muß bei DNA-Donor geprüft werden) und sind rot fluoreszenzmarkiert (Nachweis von Thymin).

Die Cyclingparameter waren wie folgt:

32 Zyklen von 96 °C 15 sec, 60 °C 35 sec.

Aufreinigung des SBE-Produktes: Zur Abtrennung der nicht inkorporierten ddNTPs wurde eine Behandlung des Reaktionsansatzes mit 1 U SAP vorgenommen. Es folgte eine Inkubation (1 h 37°C) und anschließend die Inaktivierung des Enzyms (25 min 75°C). Zur Fragmenttrennung werden 5 μl des SBE-Produktes mit 12 μl Formamid vermischt, 2 Minuten bei 95°C

denaturiert, gekühlt und in die Kapillargelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 2.2.9.3).

2.2.8 RFLP-Verdau

Die Analyse der mit den PCR-Produkten amplifizierten ABO Sequenzpolymorphismen (vgl. Kapitel 2.2.4.9) erfolgte durch Nachweis eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus. Die Reaktion wird im folgenden beschrieben:

Analyse des Exon 6: Für die Untersuchung der Nukleotidposition 261 wurde das Ex6-Produkt mit Rsa I (Erkennungssequenz: GT!AC) verdaut. Die Reaktion wurde im 14 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt: 2 µl Rsa I (New England Biolabs), 2 µl NEB1 Puffer, 3 µl Ampuwa, 7 µl Ex6-Amplifikationsprodukt. Inkubation: 2 h 37 °C.

Für die Analyse der Nukleotidposition 297 wurde das Ex6-Produkt mit HpyCH4IV (Erkennungssequenz: A!CGT) verdaut. Die Reaktion wurde im 14 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt: 2 µl HpyCH4IV (New England Biolabs), 2 µl NEB1 Puffer, 3 µl Ampuwa, 7 µl Ex6-Amplifikationsprodukt. Inkubation: 2 h 37 °C.

Analyse des Exon 7: Für die Untersuchung der Nukleotidposition 796 wurde das Ex7-Produkt mit Nla III (Erkennungssequenz: CATG!) verdaut. Die Reaktion wurde im 15,5 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt: 2 µl Nla III, 2 µl NEB4 Puffer, 3 µl Ampuwa, 1,5 µl BSA (10 mg/ml), 7 µl Ex7-Amplifikationsprodukt. Inkubation: 2 h 37 °C.

Für die Analyse der Nukleotidposition 802 wurde das Ex7-Produkt mit Mnl (Erkennungssequenz: !NNNNNNNGGAG) verdaut. Die Reaktion wurde im 15,5 µl-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten durchgeführt: Mnl I: 2 µl Mnl, 2 µl NEB2 Puffer, 3 µl Ampuwa, 1,5 µl BSA (10 mg/ml), 7 µl Ex7-Amplifikationsprodukt. Inkubation: 2 h 37 °C, Enzymdeaktivierung 1 h 65 °C.

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf 3,8 - 4,4%igen Agarosegelen (2.2.9.1).

2.2.9 Elektrophoresen

2.2.9.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Amplifikationserfolges der durchgeführten PCRs (vgl. Kapitel 2.2.4.1 bis 2.2.4.9) diente eine Agarose-Gelelektrophorese auf 2,5%igen Gelen mit Ethidiumbromidfärbung. Es wurden jeweils 9 µl des PCR-Produktes, versetzt mit 2 µl Schwerelösung, auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Längen der generierten Fragmente wurde ein molekularer Gewichtsstandard auf jedem Gel mitgeführt (1 Kb-Leiter (Life Technologies)). Die durch das im Gel befindliche Ethidiumbromid angefärbte DNA wurde auf einem UV-Transilluminator bei $\lambda = 254$ nm sichtbar gemacht und auf Polaroid-Film 667 (s/w) dokumentiert (für Details siehe Schultes 2000, Gerstenberger 2002, Hummel 2003a).

Zur Auftrennung kürzerer PCR/RFLP-Produkte (≤ 100 bp) aus den ABO-Untersuchungen, der *ccr5*-Sequenzierung und den Haarfarb-Typisierungen wurden 3,8–5%ige Agarosegele verwendet und zur Abschätzung der Längen der generierten Fragmente der molekulare Gewichtsstandard LSV (Roche) verwendet.

2.2.9.2 PAGE-Gelelektrophorese

Die Bestimmung der Allele, die mit den PCRs aus Kapitel 2.2.4.1, 2.2.4.2, 2.2.4.3, 2.2.4.4 und 2.2.4.5 amplifiziert wurden, erfolgte durch Fragmentlängenanalyse auf einem denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel. Jede Probe wurde mit dem spurinternen Längenstandard GS500 ROX versetzt. Die eingesetzte Produktmenge richtete sich nach der Signalstärke der produktspezifischen Banden auf dem Agarosegel und betrug 0,1 bis 2,5 µl. Die PCR-Produkte wurden auf einem 373A *Stretch* Sequenzer, Laufstrecke 12 cm, (Applied Biosystems) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Daten wurden mit der Software GENESCAN-Analysis 2.0.2 ausgewertet (für Details siehe Gerstenberger 2002, Hummel 2003a).

Die Bestimmung der Allele für die mit dem AmpF/STR Profiler Plus PCR Amplification Kit (PE Applied Biosystems) generierten genetischen Fingerab-

drücke wurde mit der im Kit enthaltenen Allelleiter durchgeführt. Für die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Systeme wurden eigene Allelleitern gefertigt und verwendet.

2.2.9.3 Kapillar-Gelelektrophorese

Sequenzierprodukte: Die Auftrennung und Detektion der Sequenzierprodukte (vgl. Kapitel 2.2.6) erfolgte durch Kapillargelelektrophorese auf einem ABI 310 (Applied Biosystems) mit 6%igem Polyacrylamidgel (POP6, Laufzeit längenabhängig 18-28 min/Probe, 20-30 sec Injektionszeit). Die Daten wurden mit der Software Sequencing-Analysis 3.0 (Applied Biosystems) ausgewertet und eine Vorbestimmung der Basen durchgeführt (Details siehe Gerstenberger 2002, Hummel 2003a). Eine weitere Bearbeitung (Editierung und Alignment) erfolgte softwaregestützt mit den Programmen SeqMan, EditSeq und MegAlign des Lasergene™ Paketes.

SBE-Produkte: Die Auftrennung der SBE-Produkte (vgl. Kapitel 2.2.4.7) wurde ebenfalls auf einem ABI 310 (Applied Biosystems) mit 4%igen Polyacrylamidgel (POP4) mit folgenden Parametern vorgenommen: 5 µl Probe in 12 µl Formamid, Laufzeit 17 min/Probe, 10-20 sec Injektionszeit. Die Daten wurden mit der Software Genescan-Analysis 2.1 ausgewertet.

3 Untersuchtes Skelettmaterial

3.1 Individuen aus der Lichtensteinhöhle

Die frühbronzezeitliche Lichtensteinhöhle (Unstrut-Gruppe, Nutzungsphase der Höhle ca. 1000 – 800 v. Chr.) befindet sich am Südwestrand des Harzes bei Dorste. In der Höhle wurden 1980 menschliche Knochen entdeckt, die später aufgrund von Keramiken und Bronzen auf die Urnenfelder-Bronzezeit datiert wurden. Seit 1993 werden die Funde der Lichtensteinhöhle systematisch ergraben (Flindt & Leiber 1998).

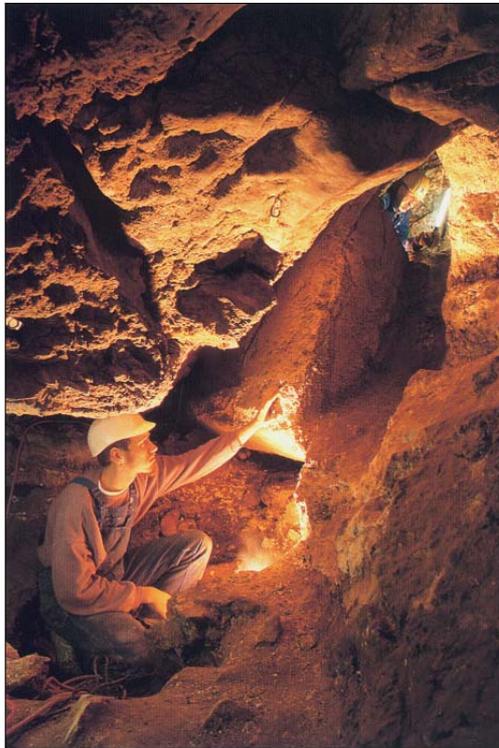


Abb. 13 Blick in einen Teil der Lichtensteinhöhle. Die Höhle ist extrem eng und wird als Raum kultischer Handlungen interpretiert (Abb. aus Flindt & Leiber 1998).

An dem mindestens 39 Individuen umfassenden Skelettkollektiv, das eine sehr gute DNA-Erhaltung aufweist, wurden bereits umfangreiche genetische Analysen im Hinblick auf die Feststellung von Verwandtschaftsbeziehungen durchgeführt (Schultes 2000), um zur Klärung der Frage nach der Art der Nutzung der Höhle (Opfer- oder Bestattungsplatz) beizutragen.



Abb. 14 Menschliche Überreste in der Lichtensteinhöhle (Reinhardsgrotte). Die Fundsituation war gestört, viele Skelettelemente waren von einer Gipsinterschicht überdeckt (Abb. aus Flindt & Leiber 1998).

Ein großer Teil der von Schultes untersuchten Individuen konnte erfolgreich in einen vermutlich drei Generationen umfassenden genealogischen Bezug eingliedert werden. Grundlage hierfür war die Untersuchung autosomaler STRs zur Prüfung von Eltern-Kind-Beziehungen, mitochondrialer DNA (mtDNA) zur Aufdeckung von Matrilinien und Y-chromosomaler STRs zur Identifizierung von Patrilinien. Schultes gelang der Nachweis umfangreicher Verwandtschaftsbeziehungen zwischen 14 in der Höhle bestatteten Individuen (vgl. Abb. 15) sowie einer weiteren potentiellen Vater-Kind-Beziehung (Do 902 und Do 2589, vgl. Kapitel 4.2.3.1, Abb. 31). Durch die engen verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen diesen Individuen wird die Interpretation der Bedeutung des Fundplatzes als die eines Bestattungsortes bestärkt.

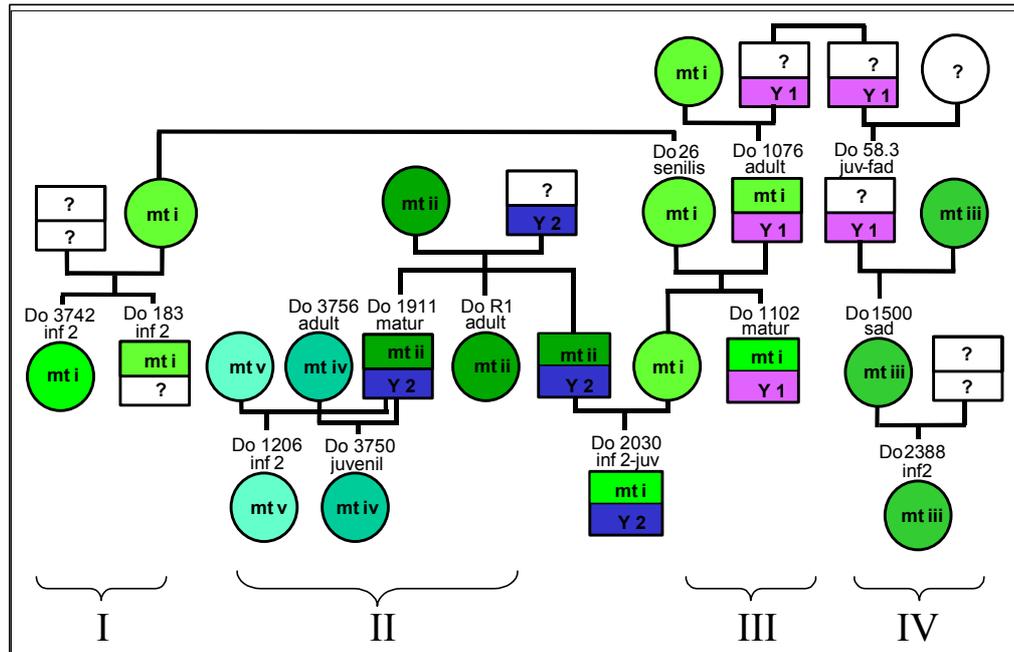


Abb. 15 Rekonstruktion biologischer Verwandtschaft eines Teils der Individuen aus der Lichtensteinhöhle (Kreise: weibliche Individuen, Quadrate: männliche Individuen). Es können vier Familienzweige (I-IV) identifiziert werden, die über drei Generationen durch Individuen belegt sind (repräsentiert durch Quadrate und Kreise mit Bezeichnungen darüber: Zeile 1: Fundnummer, Zeile 2: Sterbealter. Symbole ohne Bezeichnung sind Platzhalter für noch nicht identifizierte Individuen, für die zum Teil genetische Merkmale (farbig), wie z.B. das mt-Muster für die Mutter von Do 3742 (ganz links), rekonstruiert werden können). Die Gruppierung der Individuen basiert auf der Analyse mitochondrialer Haplotypen (mt, gleiche Farben und Bezeichnungen repräsentieren gleiche mt-Muster), Y-Haplotypen (Y, gleiche Farben und Numerierungen repräsentieren gleiche Y-Muster) und autosomaler STRs (Anordnung der Individuen zueinander, Einzeldaten hier nicht abgebildet). Zusammenfassung eines Teils der Ergebnisse nach Schultes 2000.

3.2 Individuen aus Goslar/Rammelsberg

Weitere im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Individuen entstammen einem etwa einhundert Individuen umfassenden Skelettkollektiv aus dem 18. Jahrhundert, das 1993 in der Grabung aus dem Klosterfriedhof „Hinter den Brüdern 6-8“ in Goslar gesichert wurde. Es handelt sich vermutlich um Hüttenleute des sogenannten Frankenberger Viertels (Klappauf 1996). Auch an diesen Skeletten sind bereits neben der morphologischen Befundung (Finke 1999) umfangreiche genetische Untersuchungen durchgeführt worden, um z.B. die Art der Tradierung der handwerklichen Expertise zu rekonstruieren (Bramanti 2000). Mehrere Individuen (Abb. 16) stehen in einem engen verwandtschaftlichen Verhältnis zueinander (Presciuttini et al. 2002), welches im

Rahmen der Studie von Johannsen 2002 genauer untersucht und erweitert wurde (vgl. Kapitel 4.2.3 Abb. 40).

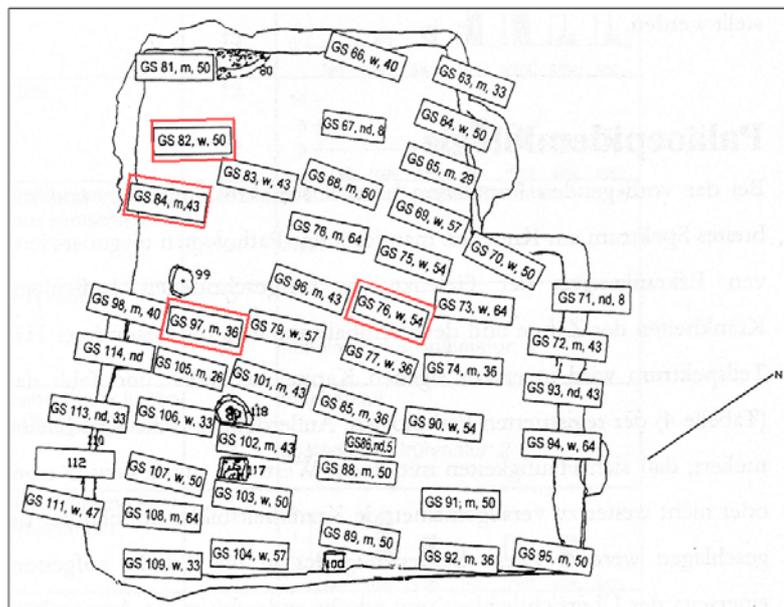


Abb. 16 Ausschnitt aus der Lageskizze des Klosterfriedhofs (südwestlicher Teil). In den Rechtecken sind jeweils die Fundnummer, das Geschlecht und das Alter (Mittelwert des Altersbereiches, Finke 1999) angegeben. Für die rot markierten Individuen ist ein enger verwandtschaftlicher Bezug postuliert.

3.3 Individuen aus Alia

Alia ist ein Dorf in Sizilien (nahe Palermo), in dem 1837 eine im Kirchenbuch des Ortes dokumentierte Choleraepidemie ausbrach. Binnen fünf Monaten wurden 306 Todesfälle offiziell registriert und die Verstorbenen in einer Höhle (Camposanto vecchio, Abb. 17) gemeinsam und mit Branntkalk bedeckt bestattet.



Abb. 17 Camposanto vecchio in Alia. (Bildquelle B. Bramanti)

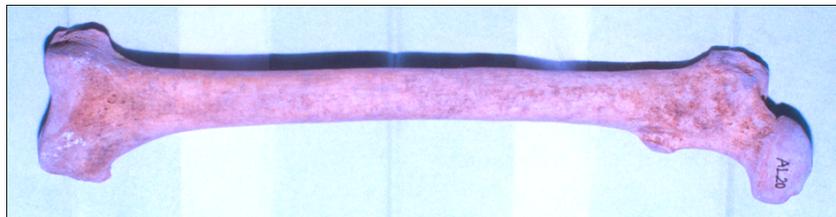


Abb. 18 Femur eines der in der Camposanto vecchio in Alia bestatteten Individuen. (Bildquelle: B. Bramanti)

Die untersuchten Knochen befanden sich in äußerlich gutem Zustand (vgl. Abb. 18) und wiesen eine gute DNA-Erhaltung. Für das Skelettkollektiv aus Alia lagen ebenfalls genetische Referenzdaten für autosomale STRs aus einer früheren Studie vor (Bramanti et al. 2003).

3.4 Individuen aus Stiftskirche Enger

Die Stiftskirche in Enger, die mit ihren ältesten Bauabschnitten auf das frühe 9. Jahrhundert zu datieren ist, wurde in den Jahren 1970 - 1973 völlig renoviert. Währenddessen durchgeführte umfangreiche archäologische Grabungen im Kirchenbereich ließen mehrere an dieser Stelle vorausgegangene Kirchengründungen erkennen. Die älteste wurde um 800 vollzogen, und wird trotz unsicherer historischer Quellenlage von einigen Archäologen dem Sachsenfürsten Widukind zugeschrieben, der während der Sachsenkriege (772-804 A.D.) Karl den Großen bekämpfte und sich nach Aufgabe des Widerstandes im Jahre 785

taufen ließ. Es wird vermutet, daß Widukind auch in der Stiftskirche Enger beigesetzt ist. Bei den archäologischen Grabungen an den ursprünglichsten Kirchenbauten wurden mehrere Gräber freigelegt (Abb. 19). Drei Gräber befanden sich an zentraler Stelle im Chor des ältesten Bauwerks (Anfang 9. Jahrhundert). Aus ihnen wurden die Überreste dreier männlicher Individuen geborgen (Fundnummern EN 447, EN462, EN 463, Abb. 19 und Abb. 20).

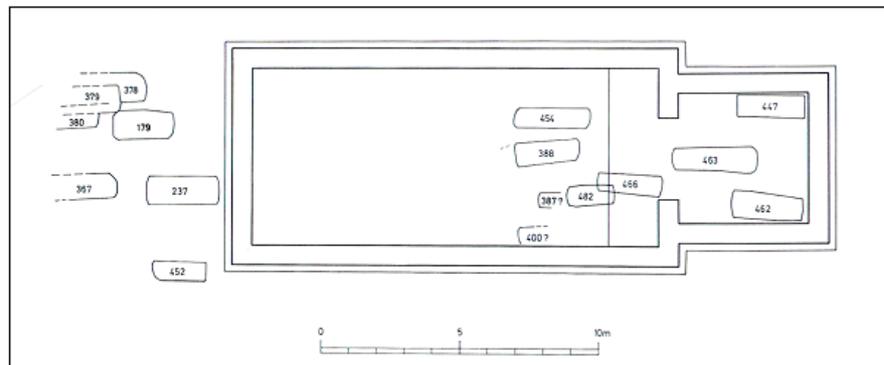


Abb. 19 Rekonstruktion des ersten Kirchenbaus in Enger mit Eintragung der gefundenen Gräber. Maßstab 1:200 (Bildquelle: Lobbedey & Klenke 1979)

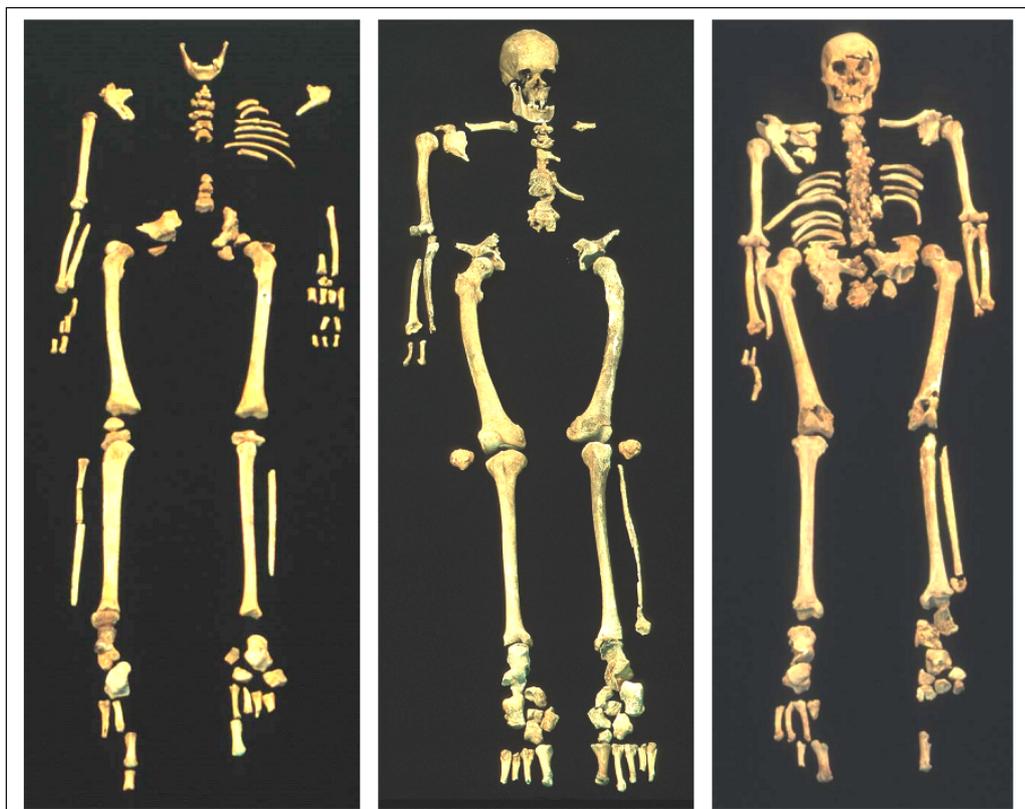


Abb. 20 Die Individuen aus den zentralen Gräbern der Stiftskirche Enger, von links nach rechts: EN 447 (juv), EN 463 (smat-sen), EN 462 (smat-sen). Die Skelette sind zum Teil nur unvollständig überliefert.

Für das Individuum aus dem mittleren Grab (EN 463) wird vor allem aufgrund der zentralen Lage der Grabstätte vermutet, daß es sich um die Überreste des Kirchenstifters, für den Identität mit dem Sachsenfürsten Widukind angenommen wird, handeln könnte.

Unter den weiteren im Zuge der Ausgrabungen geborgenen Individuen, deren Verbindung zu den im Chor bestatteten Personen unklar ist, befinden sich eine unter der Fundnummer EN 452 geführte Frau (Abb. 21) sowie die Überreste eines Mannes (EN 388, Abb. 22).



Abb. 21 Kalvarium und Mandibula des Individuums EN 452 (weiblich, smat-sen)



Abb. 22 Kalvarium und Mandibula des Individuums EN 388 (männlich, smat-sen)

4 aDNA-Untersuchungen zur Rekonstruktion sozialer Strukturen (prä)historischer Bevölkerungen

Die Aufdeckung direkter genealogischer Verwandtschaftsbeziehungen, aus denen wiederum umfassendere soziale Strukturen rekonstruierbar sind, ist eines der Desiderate der anthropologischer Forschung. Der Schwerpunkt des Erkenntnisinteresses der Anthropologie in Bezug auf Verwandtschaftsanalyse liegt in der Aufdeckung von Prozessen und dynamischen Aspekten innerhalb von Verwandtschaftsgruppen (Capra et al. 1991). Verwandtschaftsbeziehungen sind Teil von ökonomischen, politischen und oder religiösen Aspekten und können im Rückschluß bei (prä)historischen Bevölkerungen zur Rekonstruktion dieser kulturellen Parameter dienen. Auch wenn in verschiedenen Kulturen unterschiedliche Ansichten darüber herrschen, wer mit wem verwandt ist, sind biologische Verbindungen, mindestens Mutter-Kind-Relationen als kleinste gesellschaftliche Einheit, im Regelfall anzutreffen. Diese genetisch fixierten Beziehungen können auch an (prä)historischen Skeletten nachgewiesen werden. Aus ihnen können im Rückschluß kulturelle Verwandtschaftskonzepte einer Gesellschaft und weitergehend Folgerungen über die sozialen Strukturen abgeleitet werden, in welche die untersuchten Individuen eingebettet waren.

4.1 Molekulargenetische Geschlechtsbestimmung durch Koamplifikation X/Y-chromosomaler Marker

Das biologische Geschlecht ist ein basales Datum für Rekonstruktionen demographischer und sozialer Strukturen in menschlichen Gesellschaften (vgl. Kapitel 1.1). Eine sichere Geschlechtsbestimmung ist hierfür eine Grundvoraussetzung und eines der Ziele historisch-anthropologischer Untersuchungen. Daher wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Analysewerkzeug entwickelt, das die Bestimmung des biologischen Geschlechtes aus

(prä)historischen Skeletten auch dann ermöglicht, wenn die DNA in der zu untersuchenden Probe degradiert ist.

4.1.1 Determination des Geschlechtes durch molekulargenetische Marker

Für die molekulargenetische Geschlechtsbestimmung in bisher vorgenommenen Studien diente hauptsächlich die Amplifikation einer sowohl auf dem X- und dem Y-Chromosom auftretenden homologen, jedoch längendimorphen Region (106 and 112 bp) - das Amelogenin-Gen (AmelX und AmelY, Nakahori et al. 1991, Bailey et al. 1992, Mannucci et al. 1994). Dieser experimentelle Ansatz mit der simultanen Detektion einer X- und Y-chromosomalen Sequenz bot bereits einen klaren Vorteil gegenüber den ersten Versuchen der molekulargenetischen Geschlechtsbestimmung, die den Nachweis Y-spezifischer Marker anstrebten. Hier konnte das weibliche Geschlecht eines untersuchten Individuums nur aus einem negativen Amplifikationsresultat abgeleitet werden (z.B. Hummel & Herrmann 1991, Honda et al. 1994). Doch hat auch der alleinig durchgeführte Amelogenin-Nachweis den Nachteil, daß es bei starker Degradierung der DNA dazu kommen kann, daß männliche Individuen fälschlich als weiblich bestimmt werden, wenn die AmelY-Sequenz in einer Reaktion nicht amplifiziert wurde. Dieses Phänomen tritt häufig bei der Analyse degradierter DNA auf und wird als *allelic dropout* bezeichnet. Der einzige Weg, die Rate für diesen Fehler zu minimieren und zuverlässige Ergebnisse zu generieren, liegt in einer Erhöhung der Zahl der Amplifikationen (z.B. Taberlet et al. 1996).

Koamplifikation verschiedener X- und Y-chromosomaler Marker

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wird ein Multiplex-PCR-System zur Erhöhung der Sicherheit molekulargenetischer Geschlechtsbestimmungen an archäologischen Proben entwickelt. Angestrebt wird sowohl die Verringerung der Möglichkeiten von Fehlinterpretationen durch *allelic dropout* als auch durch die seltenen Fälle einer Deletion von AmelY (Santos et al. 1998). Das

neu entwickelte System sollte einen positiven Nachweis sowohl weiblicher als auch männlicher Individuen durch die Simultananalyse mehrerer verschiedener gonosomaler Marker ermöglichen. Hierfür wurden in das Analysesystem neben dem Nachweis für Amelogenin je zwei X-chromosomale STRs (DXS6789 und DXS9898) und zwei Y-chromosomale STRs (DYS391 und DYS392) integriert. Bei beiden STR-Typen handelt es sich um Mikrosatelliten mit einer ähnlicher Struktur wie die autosomale STRs (Cagliá et al. 1998, Edelman & Szibor 1999). Y-STRs ermöglichen neben dem Nachweis des männlichen Geschlechtes eines beprobten Individuums auch die Feststellung von Verwandtschaft über Patrilinien (vgl. Kap.3.1, Abb. 15).

Die Strategie der Koamplifikation X- und Y-chromosomaler Sequenzen wurde in forensischen Zusammenhängen bereits erfolgreich angewendet (Pfitzinger et al. 1993, Tun et al. 1999, Honda et al. 2001) und wird für Untersuchungen an archäologischem Material empfohlen (Brown 1998). Das hier entwickelte Analysesystem steuert zudem nur kurze DNA-Abschnitte als Zielsequenzen (91–166 bp) an und ist damit speziell für die Analyse degradierter DNA geeignet.

Die ausgewählten Marker Amelogenin, DXS6789, DXS9898, DYS391 und DYS392 wurden in einer Multiplex-PCR gemeinsam amplifiziert (für Protokolle und Sequenzen vgl. Kap. 2.2.4.3). Die Primer für die Y-STRs wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Müller 2002) zur Generierung von Y-Haplotypen aus degradierter DNA entwickelt und wurden unverändert übernommen. Die Eigenschaften der verwendeten X-chromosomalen Systeme sind in Kapitel 4.2.1, Tab. 12 beschrieben.

4.1.2 Untersuchungen von rezenten Individuen

Fragestellung und Proben: Die Ausbalancierung der Primermengen der Multiplex-PCR und die Etablierung der PCR-Parameter wie Annealtemperatur erfolgte an rezenten Proben (Mundschleimhautabstriche) von drei männlichen und sieben weiblichen Individuen.

Ergebnisse: Für die männlichen Probanden konnte übereinstimmend mit den Erwartungen in den X- und Y-chromosomalen Systemen jeweils ein Allel nachgewiesen werden. Die Amplifikationsresultate der Frauen zeigten keine Signale für die Y-chromosomalen Marker, während jeweils für mindestens einen X-STR Heterozygotie nachgewiesen werden konnte. Eine Ausnahme bildet die Probe K562, bei der es sich um eine Zelllinie handelt, die hier aufgrund bekannter Allelausprägung als Kalibrierungsreferenz für die X-chromosomalen STRs diente. Die Probe weist in den hier untersuchten sowie vier weiteren X-chromosomalen STRs (vgl. Tab. 56) nur eine Allelausprägung auf. Dies ist nicht vereinbar mit der hohen Heterozygotenrate für die untersuchten STRs. Eine Ursache für diesen Sachverhalt könnte in einer Monosomie X oder eine uniparentalen Disomie X (zweimal das identische X-Chromosom von einem Elternteil ererbt) gesucht werden, publiziert wurde darüber bislang nichts. Die Typisierungsergebnisse der Rezentproben und der Zelllinie K562 sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 10 Typisierungsergebnisse für X/Y-chromosomale Marker der untersuchten Rezentproben

Probe	Geschlecht	Amelo	DXS6789	DXS9898	DYS932	DYS391
BH	m	X/Y	21	8.3	10	11
PMS	m	X/Y	21	8.3	10	12
BM	m	X/Y	22	13	10	11
DS	w	X/X	20/21	11/13	-	-
SH	w	X/X	20/22	8.3/13	-	-
EK	w	X/X	20/20	11/12	-	-
KE	w	X/X	20/21	11/12	-	-
MB1	w	X/X	20/20	11/13	-	-
KW	w	X/X	20/20	12/13	-	-
K562	w	X/?	21	12	-	-

Amelo: Amelogenin-Gen. w: weiblich, m: männlich, ?: nicht bekannt

4.1.3 Untersuchungen von archäologischen Proben

Fragestellung und Proben: Untersucht wurden einige bronzezeitliche Individuen aus der Lichtensteinhöhle im Harz (Fundnummern Do 26, 58.3, 1076, 1102, 1500, 1911, 2388, 3742, 3750, 3756, R1, vgl. Kapitel 4.2.3.1). Von den

Skelettelementen wurden bereits genetische Referenzdaten in der Studie von Schultes 2000 mit dem AmpF/STR Profiler Plus PCR Amplification Kit (PE Applied Biosystems, vgl. Kapitel 4.2.1.1) generiert. In diesem Kit ist auch der geschlechtsanzeigende Marker Amelogenin enthalten, so daß bereits ein zusammen mit einem genetischen Fingerabdruck erhobenes Referenzdatum für das Geschlecht vorlag. Mit dieser Referenz sollten die mit der neu entwickelten X/Y-Multiplex-PCR generierten Daten verglichen und die Eignung des Analysesystems für aDNA-Untersuchungen geprüft werden.

Ergebnisse: Die Amplifikationen mit den aus bronzezeitlichen Skelettelementen gewonnenen Extrakten verliefen erfolgreich (vgl. Abb. 23 und Abb. 24).

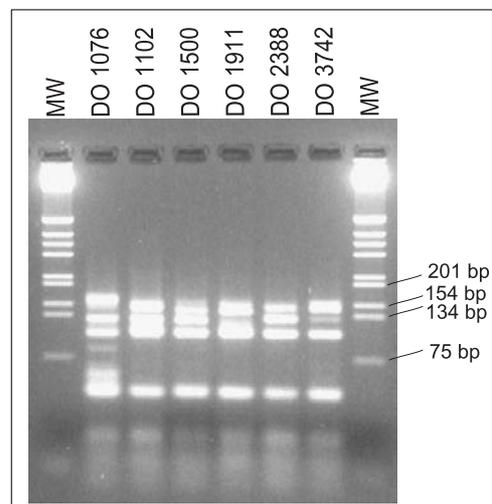


Abb. 23 Agarosegel mit Amplifikationsprodukten (91 – 166 bp) bronzezeitlicher Proben aus der Lichtensteinhöhle (Do). Deutliche Banden im Bereich der zu erwartenden PCR-Produkte belegen eine erfolgreiche Amplifikation. Banden unterhalb von 75 bp sind Primerdimere. MW: Molekularer Gewichtsstandard, hier 1KB-Leiter.

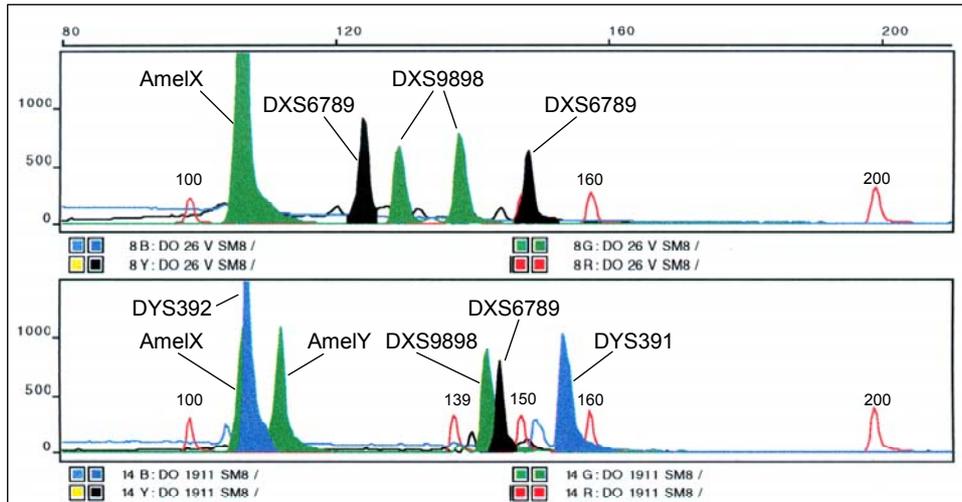


Abb. 24 Ergebnisse der Amplifikation (Elektropherogramm) mit der neu entwickelten X/Y-Multiplex-PCR für zwei Individuen aus der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle. Das obere Fenster zeigt das Ergebnis für ein weibliches Individuum (Do 26), das untere Fenster für ein männliches Individuum (Do 1911). Die Zahlen an der Spitze der kleineren roten Peaks zeigen die Längen (in bp) des internen Längenstandards Genescan ROX 500 an. Bei Do 26 (oben) ist das Geschlecht durch die Amplifikation von (nur) AmelX, dem Vorliegen der beiden X-STRs DXS9898 und DXS6789 in jeweils heterozygoter Ausprägung und dem Fehlen jeglicher Amplifikationsprodukte für die Y-chromosomalen STRs eindeutig als weiblich bestimmbar. Das Geschlecht von Do 1911 (unten) ist durch die Amplifikation beider homologer Sequenzabschnitte des Amelogenins, AmelX und AmelY, das Vorliegen von Amplifikationsergebnissen für die Y-STRs DYS392 und DYS391 sowie die homozygote Ausprägung für beide X-STRs eindeutig determinierbar.

Die mit dem neu entwickelten Analysesystem durchgeführte molekulare Geschlechtsbestimmung für die bronzezeitlichen Proben wies vollständige Übereinstimmung mit den Referenzdaten aus Schultes 2000 auf. Die Alleldeterminationen für die elf untersuchten Individuen (sieben weibliche und vier männliche) sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 11 Typisierungsergebnisse X- und Y-chromosomaler Marker für mehrere bronzezeitliche Individuen

Probe	ref. Sex	Amelo	DXS6789	DXS9898	DYS392	DYS391
DO 26	X/X	X/X	15/21	8.3/11	-	-
DO 58.3	X/Y	X/Y	21	13	-	11
DO 1076	X/Y	X/Y	24	8.3	11	11
DO 1102	X/Y	X/Y	21	8.3	11	11
DO 1500	X/X	X/X	15/23	12/14	-	-
DO 1911	X/Y	X/Y	20	12	11	11
DO 2388	X/X	X/X	21/23	8.3/12	-	-
DO 3742	X/X	X/X	20/21	8.3/13	-	-
DO 3750	X/X	X/X	20/(22)	12/14	-	-
DO 3756	X/X	X/X	20/22	8.3/14	-	-
DO R1	X/X	X/X	20/20	11/12	-	-

Amelo: Amelogenin-Gen. ref. Sex: Referenzdatum für das Geschlecht (Amelogenin) aus der Arbeit von Schultes 2000. Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert, - : es konnte kein Allel nachgewiesen werden.

Diskussion: Alle untersuchten weiblichen Individuen waren mindestens für einen X-chromosomalen Locus sicher als heterozygot bestimmbar. Zusammen mit der Abwesenheit von Amplifikationsergebnissen für Y-STRs unterstützt dies das durch Amelogenin angezeigte Ergebnis und sichert eine eindeutige Geschlechtsbestimmung. Dieser Vorteil der Koamplifikation sich gegenseitig kontrollierender X- und Y-STRs wurde z.B. bei einer Einzelamplifikation von Do 3742 (weiblich) deutlich. Hier war neben dem kräftigen AmelX-Signal ein schwaches AmelY-Signal detektierbar. Würde die Geschlechtsbestimmung nur auf der Analyse von Amelogenin beruhen, wäre die Geschlechtszuordnung der Probe für diese Einzelanalyse unsicher. Da hier jedoch simultan für beide X-chromosomalen STRs heterozygote Ergebnisse auftraten, während für die Y-STRs keine Signale detektierbar waren, konnte das Individuum trotz des (einmalig aufgetretenen) Amelogenin-Artefakts sicher als weiblich bestimmt werden.

Durch die Kombination X- und Y-chromosomaler Marker in einer Reaktion kann auch bei Ausfall eines oder mehrerer Systeme eine sichere molekulargenetische Geschlechtsbestimmung vorgenommen werden. Auch wenn das Amelogenin-Gen nur ein AmelX-Signal zeigt, kann durch die koamplifizierten Y-STRs das männliche Geschlecht für ein beprobtes Individuum

nachgewiesen werden. Andersherum werden weibliche Individuen nicht nur über die Abwesenheit von Amplifikaten Y-chromosomaler Marker bestimmt, sondern durch die hohe Chance der Heterozygotie in mindestens einem der X-chromosomalen STRs positiv nachgewiesen. Mit diesem Analysewerkzeug kann die Sicherheit molekulargenetischer Geschlechtsbestimmungen insbesondere bei Proben mit schlechtem DNA-Gehalt gesteigert werden.

4.2 Erweiterung der Möglichkeiten der Verwandtschaftsrekonstruktion durch X-chromosomale STRs

Nachweis von Verwandtschaft durch molekulargenetische Marker

Bisher werden für Untersuchungen von Verwandtschaftsstrukturen in historischen Populationen vor allem drei Markertypen genutzt: autosomale STRs, Y-chromosomale STRs und mitochondriale DNA (z.B. Debenham 1996, Gerstenberger et al. 1998, Jehaes et al. 1998, Clisson et al. 2001, Gerstenberger et al. 2001, Scholz et al. 2001, Rickards et al. 2001, Keyser-Tracqui et al. 2003). Autosomale STRs finden ihre Anwendung bei der Identifikation direkter verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen Individuen, wie sie Eltern-Kind-Relationen darstellen. Y-chromosomale STRs ermöglichen die Feststellung von patrilinearere Verwandtschaft auch über im Fundmaterial bestehende Generationslücken hinweg. Das Pendant zur Identifizierung maternaler Linien findet sich in der mütterlich vererbten mitochondrialen DNA. Dieser Markerkanon wird im Rahmen dieser Arbeit um auf dem X-Chromosom lokalisierte STRs erweitert. Die Untersuchung dieser Polymorphismen verschiebt insbesondere die Grenzen der Analyse in bestimmten Defizienzfällen (Vater-Tochter-Dyaden).

4.2.1 Analyse X-chromosomaler STRs zur Verwandtschaftsbestimmung

Auf dem X-Chromosom befinden sich neben Genen auch nichtcodierende Abschnitte mit STRs (X-STRs), die ähnlich den autosomalen STRs in Form von Di- bis Pentanukleotidrepeats aufgebaut sind. Die Forschung an diesen Markern mit Fokus auf forensische Applikationen begann erst vor wenigen Jahren (z.B. Kishida & Tamaki 1997, Edelmann & Szibor 1999, Tun et al. 1999). X-STRs haben das Potential, die Analyseresultate von autosomalen und Y-chromosomalen STRs zu unterstützen, besonders wenn es um die Generierung zusätzlicher Informationen bei komplexen Verwandtschaftsuntersuchungen mit „Informationslücken“ von einer oder mehreren Generationen geht. Auch wenn bei der Untersuchung autosomaler STRs (genetischer Fingerabdruck) an stark degradiertem Material wie Knochen nur unzureichende Resultate auftreten, können X-STRs die Analyse sinnvoll ergänzen (z.B. Szibor et al. 2003). In Defizienzfällen (bei Abwesenheit der molekulargenetischen Daten eines Elternteils), besonders solchen, in denen Vater-Tochter-Relationen im Fokus der Untersuchung stehen, können X-STRs von entscheidendem Vorteil zur Aufklärung von Verwandtschaftsvermutungen sein. Dies betrifft insbesondere solche Fälle, in denen der Putativvater nicht mehr zu beproben ist, aber weitere weibliche Nachkommen desselben als Probanden zu Verfügung stehen, die alle das gleiche väterliche X-Chromosom tragen sollten (z.B. Edelmann et al. 2002, Szibor et al. 2003). Der Vererbungsmodus des X-Chromosoms und der auf ihm befindlichen genetischen Marker wird in Abb. 25 veranschaulicht.

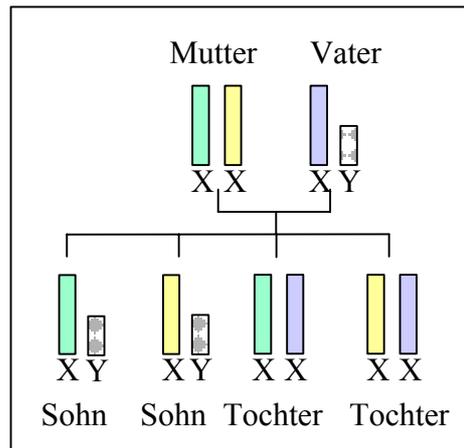


Abb. 25 Vererbungsgang des X-Chromosoms. Bei Frauen liegt das X-Chromosom als homologes Paar vor, während Männer nur ein X-Chromosom besitzen und damit hemizygot sind. Während die mütterlichen X-Chromosomen (hier gelb und grün markiert) mit einer Chance von 50% auf Nachkommen (Töchter und Söhne) vererbt werden, gibt der Vater sein X-Chromosom (hier blau) nur an seine Töchter weiter, diese jedoch besitzen dann alle das gleiche väterliche X-Chromosom.

Ein Teil der X-STRs steht in einem Linkage-Verhältnis zueinander, was bedeutet, daß diese Marker räumlich so nahe beieinander liegen, daß sie äußerst selten durch crossing-over-Ereignisse getrennt werden (Vogel & Motulsky 1997) sind und die gewonnenen Muster als Haplotyp interpretiert werden können. Basierend auf den zur Zeit bekannten Daten wurden vier solcher Linkage-Gruppen beschrieben (Szibor et al. 2003, Abb. 26).

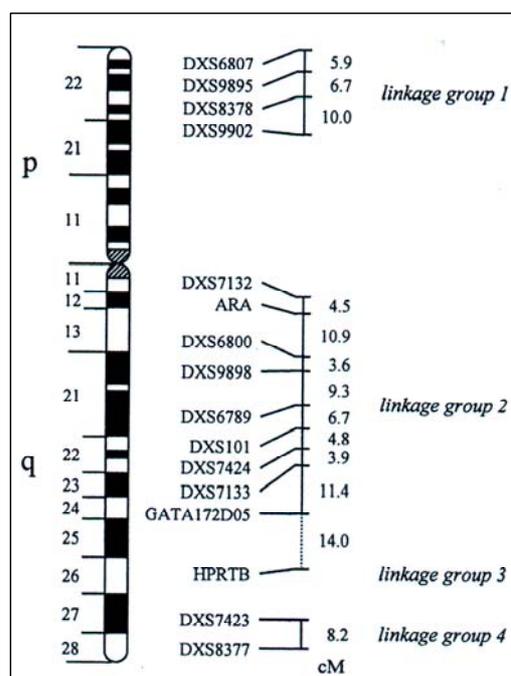


Abb. 26 Ideogramm des X-Chromosoms und Lokalisation der auf ihm befindlichen STRs und Zusammenfassung in Linkage-Gruppen. (Quelle Szibor et al. 2003).

Für Untersuchungen, in denen möglichst unabhängige genetische Informationen benötigt werden, sollten STRs aus verschiedenen Linkage-Gruppen benutzt werden. Sollen jedoch X-chromosomale Linien z.B. über mehrere Generationen verfolgt werden, bietet sich die Analyse von STRs aus einer Linkage-Gruppe an, die einen Haplotypen bilden.

Bei der Verwendung von X-STRs für die Verwandtschaftsrekonstruktion muß bedacht werden, daß im Gegensatz zu vielen anderen Chromosomenmonosomien oder -polysomien die respektiven Anomalien bezüglich des X-Chromosoms nicht letal sind, was durch die Inaktivierung überzähliger X-Chromosomen erklärt wird (Lyon 1961). Das Auftreten solcher abberanten Karyotypen, z.B. X0, sogenanntes Turner Syndrom mit einer Frequenz von ca. einem von 2500 weiblichen Individuen (z.B. Clement-Jones et al. 2000), kann jedoch die Ergebnisse einer Verwandtschaftsüberprüfung beeinflussen, die auf der molekulargenetischen Analyse X-chromosomaler Marker beruht. In solchen Fällen stellen X-STRs nicht mehr das Mittel der Wahl für die Verwandtschaftsfeststellung dar (Szibor et al. 2003). Da diese Fälle jedoch selten auftreten, wird an dieser Stelle davon ausgegangen, daß die Analyse X-chromosomaler STRs in den meisten Fällen zuverlässige Resultate generiert.

Da in diesem Teil der Arbeit die Erweiterung der Möglichkeiten der Verwandtschaftsrekonstruktion im Vordergrund steht, wurden gelinkte Marker aus Gruppe 2 zur Identifizierung von Haplotypen gewählt (Abb. 26). Die Gruppe ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms im mittleren bis centromernahen Bereich lokalisiert. Da Degradationsphänomene an den telomer gelegenen Bereichen der Chromosomen beginnen (Hummel et al. 1999), sind die Chancen für eine erfolgreiche Analyse genetischer Marker um so größer, je centromernäher diese sich befinden. Diese Bedingung wird von der für diese Arbeit verwendeten Markergruppe, den Tetranukleodidrepeats DXS6800, DXS6789, DXS9898, GATA172D05 sowie den Trinukleotidrepeats DXS101 und DXS7424 erfüllt. Weiterhin wurde die Auswahl der Marker aufgrund von publizierten Informationen bezüglich ihrer Aussagekraft in forensischen Analysen getroffen (Edelmann et al. 2001, Szibor et al. 2003). Von Bedeutung in diesem Zusammenhang sind die Werte für den Informationsgehalt (*polymorphism information content*, PIC), die beobachtete Heterozygotenrate

(*observed heterozygosity* $Het_{(obs)}$), die Diskriminanzstärke (*average power of discrimination*, PD) bei Frauen und Männern und die Ausschlußwahrscheinlichkeit (*expected probability of exclusion*, PE). Der PIC ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, daß für das untersuchte genetische Merkmal der Genotyp eines Individuums einen Rückschluß darauf zuläßt, welches seiner zwei Allele er von welchem Elternteil ererbt hat. Die Heterozygotenrate (Het) gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß aus einer Population, in der zufällig geheiratet wird, ein zufällig ausgewähltes Individuum für das untersuchte genetische Merkmal heterozygot ist. Die PD läßt Aussagen über die Wahrscheinlichkeit zu, daß zwei zufällig ausgewählte Individuen im untersuchten System einen unterschiedlichen Genotypen aufweisen. Die PE beschreibt die Wahrscheinlichkeit, daß bei bekannten Allelen von Mutter und Kind ein Mann, der nicht biologischer Vater des Kindes ist, durch den Test von einer Vaterschaft ausgeschlossen würde.

Die für diese Arbeit ausgewählten Marker sind als hochpolymorph und für die Verwandtschaftsrekonstruktion geeignet beschrieben (Edelmann et al. 2001). Die sie charakterisierenden Daten sind in Tab. 12 zusammengefaßt.

Tab. 12 Struktur und Informationsgehalt der verwendeten X-chromosomalen STRs

X-STR	Struktur	PIC	$Het_{(obs)}$	PD^F	PD^M	PE
DXS6800	$(TAGA)_x$ -CA-GATA-GAT-(GATA) $_4$ -CG-(TAGA) $_3$ -TC-(GATA) $_3$	0,690	0,694	0,885	0,729	0,690
DXS9898	$(TATC)_2$ -ATC-(TATC) $_x$	0,731	0,745	0,908	0,769	0,596
DXS6789	TATC-(TATG) $_x$ -(TATC) $_y$	0,702	0,746	0,893	0,741	0,702
DXS101^a	$(CTT)_x$ -(ATT) $_y$	0,878	0,885	0,928	0,889	0,878
DXS7424^a	$(TAA)_x$	0,764	0,836	0,982	0,794	0,764
GATA172D05	$(GATA)_x$	0,775	0,804	0,935	0,808	0,654

^a Trinukleotidrepeats, PIC: Polymorphismusinformationsgehalt, $Het_{(obs)}$: beobachtete Heterozygotenrate, PD^F : Diskriminanzstärke bei weiblichen Individuen, PD^M : Diskriminanzstärke bei männlichen Individuen, PE: Ausschlußwahrscheinlichkeit (ohne Daten der Mutter). Daten aus Edelmann et al. 2001.

Die ausgewählten X-STRs DXS6800, DXS6789, DXS9898, GATA172D05, DXS101 und DXS7424 wurden in einer Multiplex-PCR gemeinsam amplifiziert. Da die publizierten Primer PCR-Produkte mit großen und damit für die Untersuchung degradierter DNA ungeeigneten Fragmentlängen amplifizieren, wurden die Primer mit Fokus auf eine Verkürzung der PCR-

Produkte neu gestaltet. In das Multiplex-System wurde zusätzlich der Marker Amelogenin (Nakahori et al. 1991, Mannucci et al. 1994) integriert, der eine homologe, jedoch längendimorphe Regionen auf dem X- und dem Y-Chromosom nachweist (106 and 112 bp). Die Entwicklung der Primer wurde unter Berücksichtigung der Anforderungen an das Primerdesign für die Amplifikation degradiertes DNA unter Zuhilfenahme der Software PrimerSelect™ (Lasergene) durchgeführt. Diese Parameter beinhalten unter anderem die Amplifikation kurzer Produkte, ein absinkendes Energieprofil der Primer mit stärker bindendem 5'-Ende und weniger stabil bindendem 3'-Ende zu Reduzierung unspezifischer Amplifikationen. Darüber hinaus wurde die Vermeidung von Dimer- und Hairpinstrukturen sowie eine möglichst ähnliche Annealtemperatur für alle verwendeten Primer angestrebt (ausführlich beschrieben in Hummel 2003a). Darüber hinaus waren für die ausgewählten STRs Referenzallele einer kommerziell erhältlichen DNA (K562) bekannt (Edelmann, J. und Hering, S., persönliche Kommunikation), die eine Kalibrierung der neu designten Systeme ermöglichten.

4.2.1.1 Generierung genetischer Fingerabdrücke zur Authentizitätssicherung

Für einige Extrakte wurde zusätzlich zur X-STR-Multiplex-Typisierung ein individualspezifischer genetischer Fingerabdruck generiert und diese Daten mit denen aus früheren Publikationen (Schultes 2000) verglichen, um die Authentizität des Ergebnisses sicherzustellen. Hierzu wurde das AmpF1STR Profiler Plus PCR Amplification Kit (PE Applied Biosystems) verwendet, das eine Simultanamplifikation von neun autosomalen STRs und Amelogenin ermöglicht und bereits in forensischen Studien validiert (z.B. Neuhuber et al. 1999, Gusmao et al. 2000, Lederer et al. 2001) sowie erfolgreich für historische Studien verwendet wurde (Hummel et al. 2000, Bramanti et al. 2000, Schultes et al. 2000, Gerstenberger 2002). Die Reaktionsparameter sind in Kapitel 2.2.4.2 angegeben, wichtige Eigenschaften der im Kit enthaltenen genetischen Marker sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 13 AmpF/STR Profiler Plus PCR Amplification Kit: Systeme, Farbmarkierungen, Allelzahl und Allelgrößen

System	Het(obs)	Farbmarkierung	Allelzahl	Allelgrößen (bp)
D3S1358	0,79	5-FAM	8	114-142
VWA	0,74	5-FAM	11	157-197
FGA	0,87	5-FAM	14	219-267
D8S1179	0,84	JOE	12	128-168
D21S11	0,88	JOE	22	189-243
D18S51	0,88	JOE	22	247-255
D5S818	0,68	NED	10	273-341
D13S317	0,74	NED	8	206-234
D7S820	0,83	NED	10	258-294
Amelogenin	-	JOE	XY	106, 112

bp: Basenpaare, Farbmarkierungen: NED: gelb, JOE: grün, 5-FAM: blau, Het(obs): beobachtete Heterozygotenrate (nach Anslinger et al. 2001), Angaben über Allelzahl und Allelgrößen entstammen dem AmpF/STR Profiler Plus PCR Amplification Kit Manual

4.2.2 Untersuchungen von rezenten Individuen

Fragestellungen: Die Ausbalancierung der Primermengen der X-STR-Multiplex-PCR und die Etablierung der PCR-Parameter wie Annealtemperatur erfolgte an rezenten Proben (Mundschleimhautabstrichen). An zwei Gruppen rezenter Individuen wurden die Möglichkeiten der Verwendung X-chromosomaler Marker für Verwandtschaftskonstellationen getestet, wie sie bei der Bearbeitung archäologisch/anthropologischer und forensischer Fragestellungen eine Rolle spielen könnten. Dieses betrifft die Möglichkeit des Nachvollziehens der Weitergabe von X-Haplotypen über mehrere Generationen sowie die Rekonstruktion X-chromosomaler Muster bei Individuen, die nicht (erfolgreich) beprobt werden konnten (Kapitel 4.2.2.1). Zum anderen sollte die Kapazität der X-STRs zur Lösung von Defizienzfällen gezeigt werden (Kapitel 4.2.2.2). Um die Typisierung der X-chromosomalen STRs zu erleichtern, wurde eine Allelleiter gefertigt (siehe Anhang, Kapitel 1.1).

4.2.2.1 X-Haplotypen als generationenübergreifend transferierte Marker

Fragestellung und Proben: An DNA-Extrakten (Mundschleimhautabstrichen) einer rezenten Familie (sechs weibliche Individuen) wurde geprüft, in wie weit es möglich ist, die durch die X-STR-Multiplex-PCR generierten X-chromosomalen Haplotypen zuverlässig auch in heterozygoten Individuen zu erkennen und über mehrere Generationen zu verfolgen. Darüber hinaus sollte versucht werden, X-STR-Muster für mit den Probanden verwandte, jedoch nicht für eine DNA-Analyse zur Verfügung stehenden Personen zu rekonstruieren. Die hier untersuchten Individuen standen in gesicherter verwandtschaftlicher Beziehung zueinander und wurden mit der neu entwickelten X-STR-Multiplex-PCR typisiert.

Ergebnisse und Diskussion: Die Typisierungsergebnisse der X-chromosomalen STRs für die untersuchten Individuen sind in Abb. 27 dargestellt.

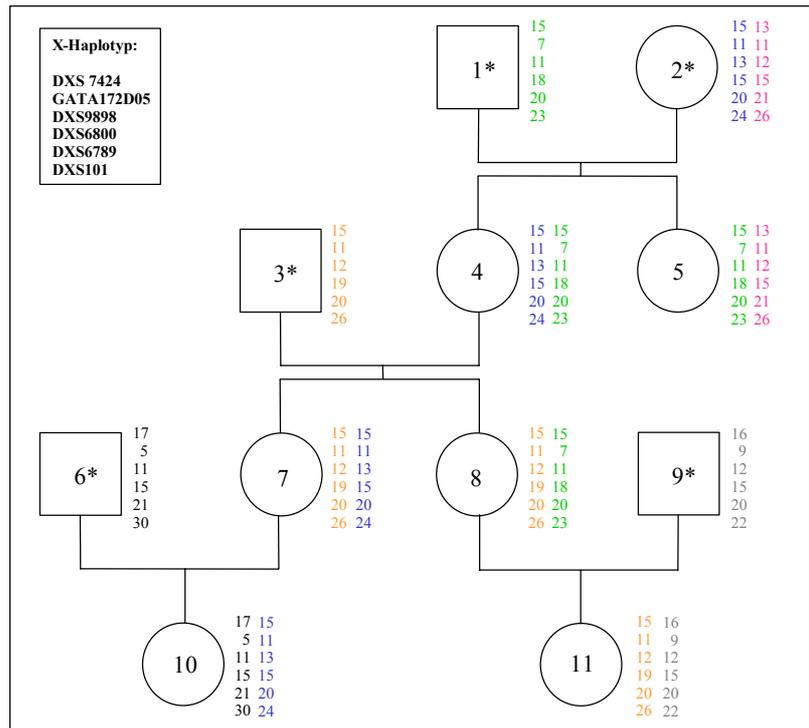


Abb. 27 Rezente Familie (männliche Individuen durch Quadrate, weibliche Individuen durch Kreise repräsentiert). Analyse X-chromosomaler Haplotypen (in verschiedenen Farben jeweils rechts vom betreffenden Individuum dargestellt) zur Prüfung der Eignung der ausgewählten Marker aus der Linkage-Gruppe 2 (Abb. 26) für die Verwandtschaftsrekonstruktion. Individuen mit * standen nicht für eine DNA-Analyse zur Verfügung, ihre Haplotypen konnten jedoch aus den Daten der beprobten Individuen vollständig rekonstruiert werden.

Die Analyse demonstriert das Potential, aber auch die Grenzen der Anwendung von X-STRs in der Untersuchung forensischen wie archäologischen Materials. Bei geeigneter genealogischer Abfolge - d.h. mindestens jede zweite Generation muß weiblich sein, um die Weitervererbung eines X-chromosomalen Musters zu gewährleisten - ist es unter Umständen möglich, eine Rekonstruktion von verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Individuen vorzunehmen, obwohl eine oder mehrere Generationen zwischen den Leben beider Personen liegen (z.B. teilt Person 10 einen X-Haplotypen mit Person 2, ebenso Person 1 und 8). Andererseits wird auch deutlich, daß in jeder Generation, in der eine Frau wiederum weibliche Nachkommen hat, die Chance 50% beträgt, daß das „falsche“ X-Chromosom weitervererbt wird, so daß im ungünstigen Fall keine verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Menschen (hier im Beispiel zwischen Personen 11 und 1) nachgewiesen werden können, zwischen denen eine Generationenlücke existiert.

4.2.2.2 Biologische oder soziale Geschwister?

Fragestellung und Proben: Die im folgenden dargestellte Untersuchung diente der praktischen Überprüfung der Anwendbarkeit X-chromosomaler Marker zum Lösen von Defizienzfällen für einen realen Fall. Untersucht wurde, welche der in Abb. 28 dargestellten Verwandtschaftsbeziehungen korrekt ist – a oder b. Der Fokus liegt hierbei auf der Frage, ob Individuum 7 den selben biologischen Vater hat wie seine Geschwister (Variante a) oder einen anderen (Variante b). Für eine DNA-Analyse standen nur die vier Geschwister zu Verfügung, da die Eltern bereits verstorben waren.

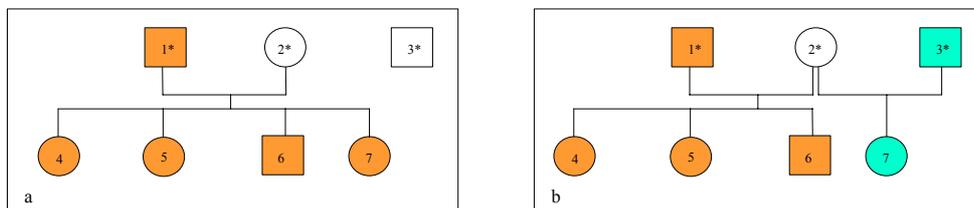


Abb. 28 Zu überprüfende Verwandtschaftsbeziehungen bei einer rezenten Familie. Es soll geklärt werden, ob Personen 4, 5, 6 und 7 denselben biologischen Vater haben (a) oder Person 7 aus einer illegitimen Beziehung stammt (b). Die mit * gekennzeichneten Individuen (Elterngeneration) standen nicht für eine DNA-Analyse zur Verfügung (Defizienzfall).

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Mundschleimhautabstriche der vier Geschwister (drei weibliche und ein männliches, dessen Typisierung nur fakultativ war) mit der neu entwickelten X-STR-Multiplex-PCR typisiert. Wenn die drei weiblichen Geschwister 4, 5 und 7 denselben biologischen Vater haben, müssen sie auch die Hälfte ihrer X-chromosomalen Allele teilen, nämlich den gemeinsam geerbten väterlichen X-Haplotypen.

Ergebnisse und Diskussion: Die Typisierungsergebnisse, die in Abb. 29 dargestellt sind, zeigen, daß alle untersuchten weibliche Individuen den gleichen (blau dargestellten) X-Haplotypen tragen. Die Daten lassen darüber hinaus eine Rekonstruktion der X-chromosomalen Muster der Eltern zu.

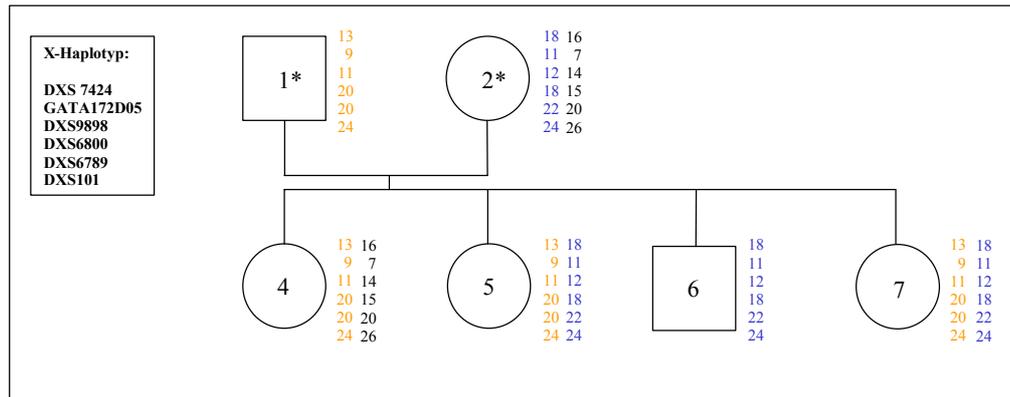


Abb. 29 Verwandtschaftsrekonstruktion an einer rezenten Familie zur Lösung eines Defizienzfalles. Analyse X-chromosomaler Haplotypen (in verschiedenen Farben jeweils rechts vom betreffenden Individuum dargestellt) zur Prüfung der Zugehörigkeit von Individuum 7 zur übrigen Familie. Personen 4, 5 und 7 teilen den selben X-Haplotypen (orange), als dessen Donor Person 1 rekonstruiert werden kann. Individuen mit * standen nicht für eine DNA-Analyse zur Verfügung, ihre Haplotypen konnten jedoch aus den Daten der beprobten Individuen vollständig rekonstruiert werden.

4.2.3 Untersuchungen von archäologischen Proben

4.2.3.1 Individuen aus der Lichtensteinhöhle

Für 14 Individuen der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle wurden von (Schultes 2000) konkrete Verwandtschaftshypothesen aufgestellt. Einige dieser vermuteten Beziehungen werden im folgenden mit X-chromosomalen STRs untersucht, um weitere Daten zu ermitteln, welche die bestehenden Konstrukte validieren oder falsifizieren. Die Einzeltypisierungsergebnisse sind im Anhang, Kapitel 12.2.1 aufgeführt.

Die Stellung von Do 2030 im Verwandtschaftsgefüge

Fragestellung und Proben: Wie in Abb. 30 (Ausschnitt aus Abb. 15) dargestellt ist, kann Individuum Do 2030 zwar nicht direkt mit den Familienzweigen II und III verbunden werden; seine Eingruppierung in die dargestellte Position ist aufgrund der in seinem genetischen Fingerabdruck repräsentierten Allele und des mtDNA-Haplotypen (Schultes 2000) sehr plausibel. Die Postulierung mindestens einer weiteren Generation noch nicht identifizierter Individuen (Eltern von Do 2030) ist nötig, um eine Assoziation von Do 2030 an den Stammbaum zu gewährleisten.

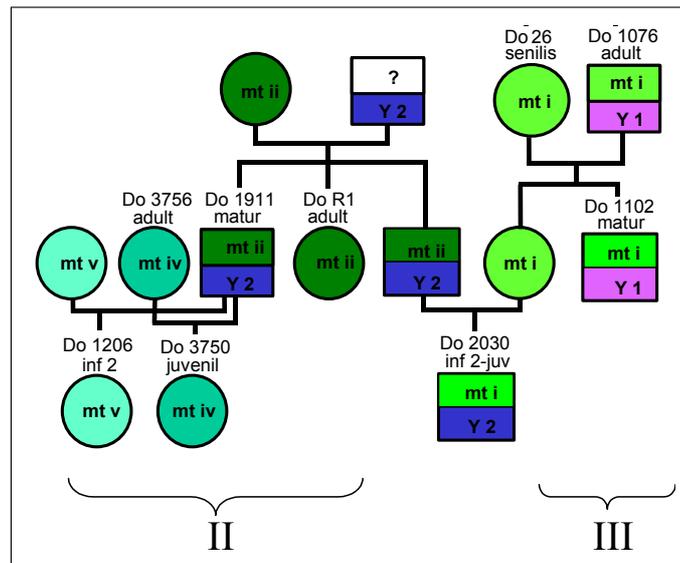


Abb. 30 Do 2030 zeigt eine bilineare Deszendenz, da es Träger des im Familienzweig II vorkommenden Y-Haplotypen sowie des in Familienzweig III vertretenen mt-Haplotyp ist und könnte das Bindeglied zwischen beiden Zweigen sein .

Die Positionierung von Do 2030 wird durch die Analyse X-chromosomaler Marker weiter untersucht, wobei geprüft werden soll, ob sich X-chromosomale Muster von Do 26 (Putativgroßmutter) bei Do 2030 wiederfinden. Hierbei kann ein positives Ergebnis die Plausibilität der Positionierung von Do 2030 an der angebildeten Stelle stark erhöhen, während ein negatives Ergebnis keine Aussage zulässt, weil die Chance für die Vererbung eines von Do 26 stammenden X-chromosomalen Haplotypen nur 25% beträgt. Im Zusammenhang mit dieser Fragestellung wurde zur Absicherung der Ergebnisse für Do 26 ebenfalls das Individuen Do 1102 typisiert, das in gesicherter verwandtschaftlicher Beziehung (Kind) zu Do 26 steht.

Ergebnisse: Die Typisierungsergebnisse für Do 26, Do 1102 und Do 2030 sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 14 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 26, Do 1102 und Do 2030

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 26	15/16	5/9	XX	8.3/11	16/17	15/21	19/23
Do 1102	16	9	XY	8.3	17	21	19
Do 2030	15	10	XY	8.3	15	21	24

Amelo: Amelogenin-Gen. Individuum Do 1102 zeigt als Kind von Do 26 Übereinstimmungen in allen untersuchten X-STR-Systemen. Rot geschriebene Allele bei Individuum 2030 markieren die Systeme, nach denen eine Übertragung X-chromosomaler Muster von Do 26 über eine unbestimmte Anzahl von Generationen auf Do 2030 auszuschließen ist.

Do 1102 teilt in jedem untersuchten System ein Allel mit Do 26, während der X-Haplotyp von Do 2030 in drei Systemen von den bei Do 26 zu beobachtenden Allelen abweicht.

Diskussion: Daß Do 1102 in jedem untersuchten System ein Allel mit Do 26 teilt, validiert die ohnehin sehr sichere, aufgrund der autosomalen STR-Daten und des gleichen mt-Haplotypen postulierten Mutter-Tochter-Beziehung zwischen diesen beiden Individuen. Der X-Haplotyp von Do 2030 weicht dagegen in drei Systemen von den bei Do 26 realisierten Allelen ab, dessen X-chromosomale Muster sich in Do 2030 also nicht wiederfinden lassen. Dieses Ergebnis läßt keine Aussagen über die Positionierung dieses Individuums innerhalb der Genealogie auf der bisherigen Datenbasis zu und kann daher nicht zur Klärung der zeitlichen Nähe des Anschlusses von Do 2030 an die Familienlinien II und III beitragen.

Authentizitätssicherung: Für einen der aDNA-Extrakte von Do 2030, der den von Do 26 abweichenden X-Haplotypen zeigt, wurde der genetische Fingerabdruck bestimmt. Damit wurde die Möglichkeit geprüft, daß es sich bei den gewonnenen Ergebnissen um eine Kontamination des verwendeten Extraktes durch rezente DNA (Mitarbeiter) handelt. Hierzu wurde der AmpF/STR™ Profiler Plus Kit (Applied Biosystems) benutzt, mit dem simultan neun autosomale STRs typisiert werden. Die gewonnenen Daten wurden mit denen aus einer früheren Studie (Schultes 2000) verglichen (Tab. 15).

Tab. 15 Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für Do 2030

Probe	D3S1358	VWA	FGA	Amelo	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
Do 2030	16/-	17/18	21/-	XY	10/-	29/30.2	16/-	10/-	12/-	-/-
Ref.	16/16	17/18	21/24	XY	10/12	29/30.2	16/18	10/13	12/13	9/9

Typisierungsergebnis für Do 2030 aus dieser Studie oben, Ergebnis von Schultes 2000 (Ref.) unten. Amelo: Amelogenin-Gen. Mit - angegebene Allele konnten nicht reproduziert nachgewiesen werden.

In den meisten Systemen konnte zwar nur ein Allel nachgewiesen werden, während das andere Allel nicht detektierbar war (*allelic dropout*). Um diese Allele nachzuweisen, wären weitere Amplifikationen nötig gewesen. Da jedoch nicht die Generierung vollständiger genetischer Fingerabdrücke in dieser Untersuchung im Vordergrund stand, und die Übereinstimmungen zwischen den neu erhobenen und den Referenzdaten deutlich ist, wird eine Authentizität der gewonnenen Ergebnisse angenommen. Darüber hinaus wurde ein Abgleich der Daten mit den genetischen Fingerabdrücken der Mitarbeiter des Instituts sowie der X-chromosomalen Allelmuster der Bearbeiter vorgenommen. Es konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden, die auf eine rezente Kontamination schließen lassen.

Prüfung zweier vermuteter Vater-Tochter-Dyaden

Fragestellung und Proben: In der Arbeit von Schultes werden für Do 58.3 (männlich) und Do 1500 (weiblich) sowie Do 902 (männlich) und Do 2589 (weiblich) zwei Vater-Tochter-Verhältnisse (dargestellt in Abb. 31) aufgrund der Bestimmungsergebnisse der autosomalen STRs postuliert (siehe auch Tab. 18). Da in beiden Fällen die Mutter bisher nicht identifiziert werden konnte, liegen hier aus archäologischem Zusammenhang klassische Defizienzfälle vor, bei denen X-chromosomale STRs zur Absicherung der Vaterschaftsanalysen beitragen können.

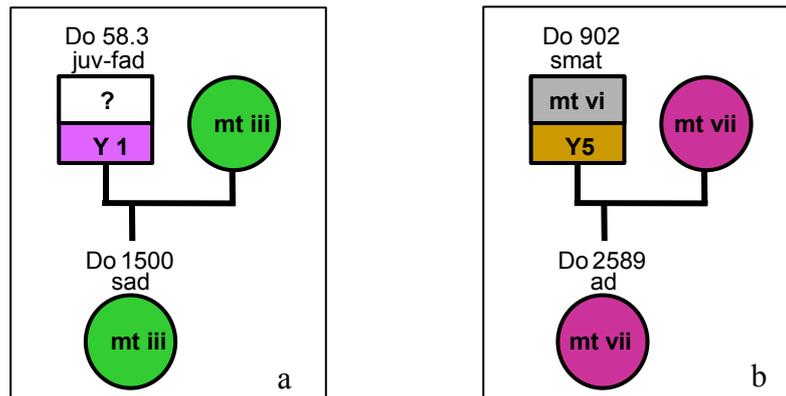


Abb. 31 Postulierte Vater-Tochter-Beziehungen zwischen Individuen der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle für die Fälle Do 58.3 und Do 1500 (a) sowie Do 902 und Do 2589 (b). Die Verwandtschaftszuschreibungen basieren auf der Analyse von autosomalen STRs (Schultes 2000). Symbole ohne Bezeichnung sind Platzhalter für noch nicht identifizierte Individuen, von denen für einige bestimmte genetische Merkmale wie z.B. das mt-Muster für die Mütter von Do 1500 (a) und Do 2589 (b) vorhergesagt werden können)

Zur Überprüfung der vermuteten Verwandtschaftsbeziehungen wurde eine Untersuchung X-chromosomaler Haplotypen für diese Individuen durchgeführt.

Ergebnisse: In Tab. 16 und Tab. 17 sind die Typisierungsergebnisse der untersuchten X-chromosomalen STRs für beide Putativvater-Tochter-Beziehungen zusammengefaßt.

Tab. 16 Typisierungsergebnisse für die untersuchten X-chromosomalen Systeme für die Individuen Do 58.3 und Do 1500

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 58.3	15	10	XY	13	16	21	24
Do 1500	14/15	7/10	XX	12/14	15/-	15/23	24/(24)

Amelo: Amelogenin-Gen. Angabe in Klammern: Allel wahrscheinlich, aber nicht vollständig reproduziert. Mit - angegebene Allele konnten nicht reproduziert nachgewiesen werden, ihre Existenz muß aber für möglich gehalten werden. Rot geschriebene Allele bei Individuum 1500 markieren die Systeme, nach denen eine Übertragung X-chromosomaler Muster von Do 58.3 auf Do 1500 auszuschließen ist.

Der Vergleich der Allele (Tab. 16) zwischen Do 58.3 (Putativvater) und Do 1500 läßt erkennen, daß in zwei der sechs untersuchten X-STR-Systemen keine Übereinstimmung vorhanden ist.

Tab. 17 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 902 und Do 2589

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 902	16	5	XY	11	18	20	23
Do 2589	16/19	9/10	XX	8.3/8.3	15/18	20/21	20/24

Amelo: Amelogenin-Gen. Rot geschriebene Allele bei Individuum 2589 markieren die Systeme, nach denen eine Übertragung X-chromosomaler Muster von Do 902 auf Do 2589 auszuschließen ist.

Der Vergleich der Allele zwischen Do 902 (Putativvater) und Do 2589 zeigt, daß in drei der sechs untersuchten X-STR-Systemen keine Übereinstimmung vorhanden ist.

Diskussion: In beiden untersuchten Defizienzfällen zeigte sich, daß bei der X-STR Typisierung der Dyaden Do 58.3/Do 1500 und Do 902/Do 2589 in zwei bzw. drei X-STR-Systemen keine Übereinstimmungen gefunden und dadurch beide Putativväter von einer biologischen Vaterschaft ausgeschlossen werden können. Die sehr ähnlichen Merkmale, die für beide Dyaden in den autosomalen STRs (Tab. 18) feststellbar sind, lassen zwar weiterhin eine nahe Verwandtschaft zwischen diesen Individuen vermuten, nur handelt es sich nicht um eine biologische Vater-Tochter-Beziehung.

Authentizitätssicherung: Für jedes der vier untersuchten bronzezeitlichen Individuen wurde aus einem aDNA-Extrakt der genetische Fingerabdruck bestimmt. Damit wurde die Möglichkeit geprüft, daß es sich bei den gewonnenen Ergebnissen um eine Kontamination des verwendeten Extraktes durch rezente DNA (z.B. Mitarbeiter) handelt. Hierzu wurde der AmpF/STR™ Profiler Plus Kit (Applied Biosystems) benutzt, mit dem simultan neun autosomale STRs typisiert werden. Die gewonnenen Daten wurden mit denen aus einer früheren Studie (Schultes 2000) verglichen (Tab. 18).

Tab. 18 Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die untersuchten Individuen Do 58.3, Do 1500, Do 902 und Do 2589

Probe	D3S1358	VWA	FGA	Amelo	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
Do 58.3	-/-	16/18	21/25	XY	13/-	29/-	16/-	11/-	-/-	-/-
Ref.	15/18	16/18	25/-	XY	13/13	29/30	-/-	11/(11)	(13)/-	-/-
Do 1500	18/-	-/-	21/-	X/-	14/-	-/-	13/-	11/-	-/-	9/-
Ref.	16/18	17/18	(21)/-	XX	13/14	28/30	12/15	11/12	11/-	10/13
Do 902	14/15	13/15	22/24	XY	13/-	31.2/32.3/33.2	12/-	12/13	13/-	-/-
Ref.	14/15	13/15	22/24	XY	13/13	31.2/32.2	10/12	12/(13)	9/13	9/9
Do 2589	16/-	14/15	22/-	X/-	13/-	29/30	-/-	11/-	11/-	-/-
Ref.	15/16	14/15	22/24	XX	13/13	28/-	-/-	11/(12)	(11)/-	-/-

Typisierungsergebnisse aus dieser Studie jeweils oben, Ergebnis aus Schultes 2000 (Ref.) unten. Amelo: Amelogenin-Gen. Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. Mit - angegebene Allele konnten nicht reproduziert nachgewiesen werden.

In den meisten Systemen konnte zwar nur ein Allel nachgewiesen werden, während das andere Allel nicht detektierbar war, auf weitere Amplifikationen zur Generierung vollständiger genetischer Fingerabdrücke wurde verzichtet, da dies nicht im Vordergrund der Untersuchung stand. Die gefundenen Übereinstimmungen zwischen den neu erhobenen und den Referenzdaten scheinen deutlich genug zu sein, um eine Authentizität der gewonnenen Ergebnisse anzunehmen. Darüber hinaus wurde ein Abgleich der Daten mit den genetischen Fingerabdrücken der Mitarbeiter des Instituts sowie der X-chromosomalen Allelmuster der Bearbeiter vorgenommen. Es konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden, die auf eine rezente Kontamination schließen lassen.

Überprüfung einer vermuteten Mutter-Tochter-Beziehung und Rekonstruktion einer möglichen Triade

Fragestellung: Eine von Schultes 2000 vermutete Mutter-Tochter-Relation zwischen Do 1500 und Do 2388 (Abb. 32), die durch autosomale STRs und mtDNA gut belegt ist, soll durch X-STRs geprüft werden. Anhand des erwarteten positiven Ergebnisses dieser „Mutterschafts“-Untersuchung soll die Konsistenz der verschiedenen genetischen Daten zueinander demonstriert werden.

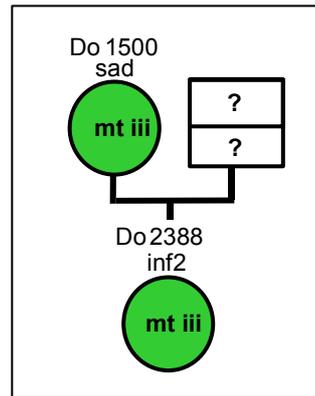


Abb. 32 Postulierte Mutter-Tochter-Beziehung zwischen Individuen der Lichtensteinhöhle im Fall Do 1500 und Do 2388. Die Verwandtschaftszuschreibungen basieren auf der Analyse von autosomalen STRs und mitochondrialen Haplotypen (Schultes 2000).

Ergebnisse und Diskussion: Die Typisierungsergebnisse für Do 1500 und Do 2388 sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 19 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 1500 und Do 2388

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 1500	14/15	7/10	XX	12/14	15/-	15/23	24/(24)
Do 2388	14/16	5/9/10	XX	8.3/12	17/20	21/23	19/24

Amelo: Amelogenin-Gen. Angabe in Klammern: Allel nicht vollständig reproduziert. Mehrere Allele angegeben: alle Allele sind mehrfach beobachtet worden, es konnte keine Entscheidung zugunsten eines Merkmals getroffen werden.

Die beiden Individuen teilen in den fünf untersuchten Systemen, die vollständig beurteilbar sind, ein Allel. Dieses Ergebnis validiert die aufgrund der genetischen Fingerabdrücke und mt-Haplotypen ohnehin schon sehr plausible Annahme einer Mutter-Tochter-Verwandtschaft zwischen diesen Individuen. Die Ergebnisse der unterschiedlichen genetischen Marker sind widerspruchsfrei und ergeben zusammen eine sichere Beurteilung des untersuchten Verwandtschaftsverhältnisses als Mutter-Tochter-Beziehung.

Im Zuge der Auftrennung aller in der Lichtensteinhöhle identifizierten X-chromosomalen Haplotypen zur Rekonstruktion dort praktizierten Residenzverhaltens (4.3) ist folgende Konstellation auffällig (Tab. 20, Auszug aus Tab. 30).

Tab. 20 Determinierte X-chromosomale Haplotypen einiger Individuen der Lichtensteinhöhle: Do 26, Do 1102, Do 1500 und Do 2388

X-Haplotypen							
in Probe(n)	Haplotyp(en)	DXS 7424	GATA	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
26	X6	15	5	11	16	15	23
1102, 26	X13	16	9	8.3	17	21	19
1500, 2388	X4	14	10	12	17 o. 20	23	24
1500	X7	15	7	14	15	15	-
2388	X13 o. X15	16	5 o. 9	8.3	17 o. 20	21	19

GATA: GATA172D05, Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. o.: oder, auf der bisherigen Datenbasis ist keine Entscheidung zugunsten eines Allels möglich

Hier deutet sich die Möglichkeit an, daß Do 2388 den gleichen X-Haplotypen X13 trägt wie Do 26 und Do 1102 (Mutter und Sohn, siehe oben). Do 26 kommt als unmittelbarer Donor des Haplotypen nicht in Frage, da dieses Individuum einen von Do 2388 abweichenden mt-Haplotypen trägt und die Mutter von Do 2388 mit Do 1500 bereits identifiziert ist. Der X-Haplotyp muß also vom Vater vererbt worden sein. Do 1102 als Träger des entsprechenden Haplotypen kommt hier als Donor in Frage (Tab. 21).

Tab. 21 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 1500, Do 2388 und 1102

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 1500	14/15	7/10	XX	12/14	15/-	15/23	24/(24)
Do 1102	16	9	XY	8.3	17	21	19
Do 2388	14/16	5/9/10	XX	8.3/12	17/20	21/23	19/24

Amelo: Amelogenin-Gen. Angabe in Klammern: Allel nicht vollständig reproduziert. Mehrere Allele angegeben: alle Allele sind mehrfach beobachtet worden, es konnte keine Entscheidung zugunsten eines Merkmals getroffen werden. Farbige angegeben sind die Allele, die Do 2388 jeweils mit einem der Putativeltern teilt.

Die Analyse der X-chromosomalen Haplotypen macht die vermutete Triade Do 1500/Do 1102/Do 2388 wahrscheinlich, da Do 2388 in allen sechs untersuchten X-STR-Systemen je ein Allel mit Do 1102 teilt. Um die Möglichkeit der Vaterschaft von Do 1102 zu Do 2388 weiter zu prüfen, werden in der folgenden Tabelle die genetischen Fingerabdrücke der Individuen (aus Schultes 2000) zusammengefaßt (Tab. 22).

Tab. 22 Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die untersuchten Individuen Do 1500, Do 2388 und Do 1102

Probe	D3S1358	VWA	FGA	Amelo	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
Do 1500 Ref.	16/18	17/18	(21)/-	XX	13/14	28/30	12/15	11/12	11/-	10/13
Do 2388 Ref.	15/16	16/17	20/21	XX	11/13/(15)	30/33.2	15/-	11/(12)	11/11	10/-
Do 1102 Ref.	15/16	16/16	20/21	XY	12/15	29/33.2	14/18	9/10	11/11	7/9

Typisierungsergebnisse aus Schultes 2000 (Ref.). Amelo: Amelogenin-Gen. Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. Mit - angegebene Allele konnten nicht reproduziert nachgewiesen werden. Farbige angegeben sind die Allele, die Do 2388 jeweils mit einem der Putativeltern teilt.

Die fünf für Do 2388 sicher bestimmten Systeme lassen keinen Ausschluß einer Vaterschaft von Do 1102 zu Do 2388 zu. Im STR-System D8S1179 wird von Schultes Allel 15 zumindest als möglich angegeben, das auch bei Do 1102 vorkommt. In den STR-Systemen D18S51 und D7S820 konnte bei Do 2388 jeweils ein Allel nicht sicher bestimmt werden. In diesen Systemen wurde von Schultes in Einzeltypisierungen jeweils einmal das Allel bestimmt, das auch beim Putativvater Do 1102 zu finden ist und demnach von diesem stammen könnte. Dies gilt ebenfalls für das System D5S818, für welches Schultes zwar neben Allel 11 als mögliche zweite Ausprägung 12 angibt, was zunächst zu einem Vaterschaftsausschluß für Do 1102 führt. Bei genauerer Betrachtung der Einzeldaten in Schultes 2000 wird jedoch deutlich, daß dieses Ergebnis als sehr unsicher anzusehen ist. Es wurde nur aus einem Extrakt zwar zwei Mal generiert, allerdings wurde bei einer dieser Amplifikationen auch das Allel 9 nachgewiesen, das beim Putativvater Do 1102 in diesem System vorhanden ist.

Nimmt man diese Typisierung des Locus D5S818 für Do 2388 als nicht gesichert an, widersprechen die genetischen Fingerabdrücke beim derzeitigen Stand der Untersuchung nicht der Rekonstruktion einer durch die Typisierung der X-Haplotypen angezeigten Triade Do 1500/Do 1102/Do2388. Eine Unterstützung erfährt diese Annahme durch die aufgrund der genetischen Fingerabdrücke bereits von Schultes 2000 gefundene enge, jedoch nicht weiter eingrenzbar Verwandtschaft zwischen Do 2388 und Do 1076, der als Vater von Do 1102 nun in eine mutmaßliche Großvaterposition zu Do 2388 gerückt ist. Weitere Typisierungen der autosomalen STRs der Personen dieser vermuteten Triade, besonders von Do 2388, das hier die unsichersten Resultate zeigt, sind

unerlässlich, um die hier vermutete Verwandtschaft zu erhärten, doch machen die bislang vorliegenden Daten (genetische Fingerabdrücke und besonders die X-chromosomalen STRs) diese Beziehung plausibel. Diese Ergebnisse würden somit das Stammbaumkonstrukt der Individuen der Lichtensteinhöhle (vgl. Abb. 15) insofern erweitern, als daß Do 1500 und Do 2388 angegliedert werden könnten und daß zum ersten Mal eine lückenlose Verwandtschaft über drei Generationen zwischen in der Höhle bestatteten Individuen nachgewiesen würde (Abb. 33).

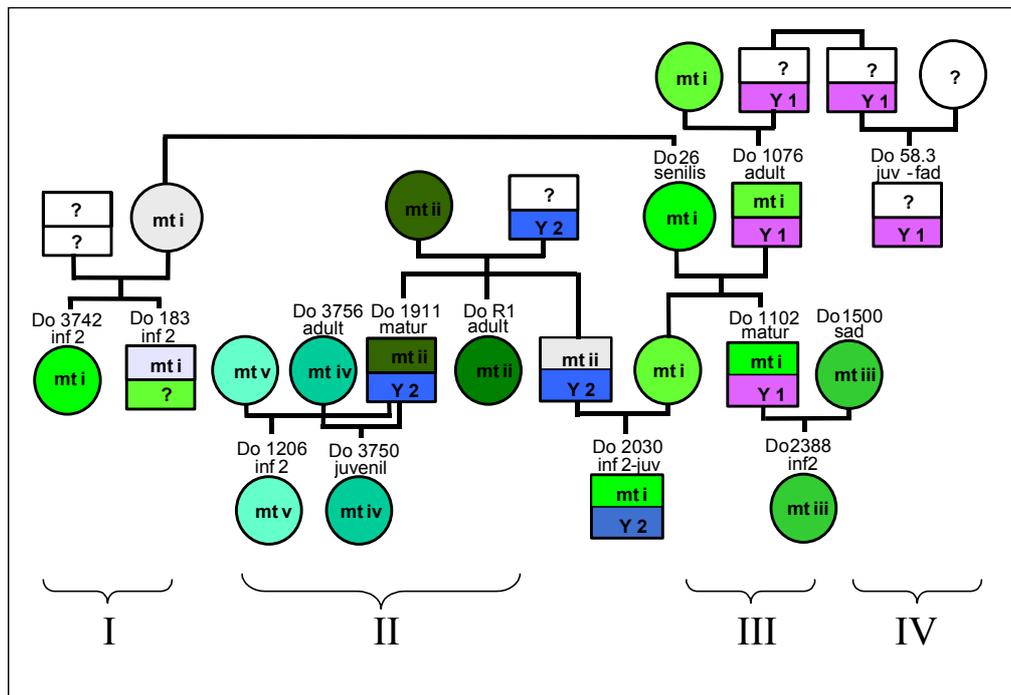


Abb. 33 Erweiterter Stammbaum zur Rekonstruktion biologischer Verwandtschaft eines Teils der Individuen aus der Lichtensteinhöhle nach Angliederung der bislang separaten Mutter-Tochter-Dyade Do 1500/Do 2388 über Do 1102 an den Stammbaum.

Überprüfung einer vermuteten Geschwisterbeziehung

Fragestellung und Proben: Die von Schultes postulierte Geschwisterbeziehung zwischen Do 3742 (weiblich) und Do 183 (männlich) (Abb. 34) soll mit X-chromosomalen Markern überprüft werden. Sie wird bislang aufgrund ähnlicher autosomaler STR-Allele und gleicher mtDNA vermutet und durch die Ergebnisse eines weiteren DNA-Markers gestützt (ccr5, vgl. Kapitel 5.1). Es besteht die 50%ige Chance, daß beide Individuen von der Mutter das

gleiche X-Chromosom geerbt haben und ein Geschwisterverhältnis beider Individuen über dieses mütterliche X-Chromosom nachgewiesen werden kann.

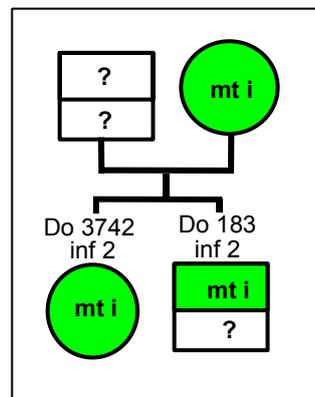


Abb. 34 Postulierte Geschwister-Beziehung zwischen Individuen Do 3742 und Do 183. Die Verwandtschaftszuschreibungen basieren auf der Analyse von autosomalen STRs und mitochondrialen Haplotypen (Schultes 2000). Symbole ohne Bezeichnung sind Platzhalter für noch nicht identifizierte Individuen, für die einige genetische Merkmale wie z.B. das mt-Muster für die Mutter von Do 3742 und Do 183 vorhergesagt werden können)

Ergebnisse und Diskussion: Die Typisierungsergebnisse für Do 3742 und Do 183 sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 23 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 3742 und Do 183

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 3742	13/15	7/10	XX	8.3/13	15/-	20/21	27/-
Do 183	14	(5)	XY	(13)	15	20	-

Amelo: Amelogenin-Gen. Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. - : kein Typisierungsergebnis

Es konnten nur drei der sechs untersuchten X-chromosomalen Systeme für Do 183 sicher typisiert werden, obwohl mehrfach Amplifikationen durchgeführt wurden. In zwei dieser Systeme teilt Do 183 jeweils ein Allel mit Do 3742, im System DXS 7424 ist dies nicht der Fall. Damit wird die Vermutung, daß beide vermuteten Geschwister das gleiche mütterlich ererbte X-Chromosom tragen, unwahrscheinlich. Darüber hinaus sind bei Do 183 in drei Systemen Ergebnisse nicht vollständig reproduziert, und für eines davon (GATA172D05) liegt ebenfalls der Hinweis auf ein Allel vor, das nicht bei Do 3742 wiederzufinden ist.

Aufgrund der unvollständigen X-chromosomalen Typisierungsergebnisse für Do 183 können hier keine sicheren Aussagen über die

Verwandtschaftsbeziehungen dieses Individuums zu Do 3742 getroffen werden. Es liegt aus der vorliegenden Analyse der Hinweis vor, daß die untersuchten Individuen, sofern es sich um Geschwister handeln sollte, nicht das gleiche X-Chromosom von einer möglichen gemeinsamen Mutter ererbt haben.

Überprüfung komplexer verwandtschaftlicher Beziehungen

Fragestellung und Proben: Im folgenden wurden die in der Arbeit von Schultes durch genetische Fingerabdrücke und mtDNA-Analyse aufgestellten Hypothesen überprüft, daß Do 1911 einerseits Bruder von Do R1 ist und andererseits mit zwei verschiedenen Frauen, Do 3756 und einer noch nicht identifizierten Person, zwei weibliche Nachkommen (Do 3750 und Do 1206) gezeugt hat, wie in Abb. 35 graphisch zusammengefaßt ist. Ob Do 1206 und Do 3750 wirklich Halbschwestern mit demselben Vater (Do 1911) sind, wie die Analyse autosomaler STR-Allele (Schultes 2000) mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten läßt, soll durch die Untersuchung X-chromosomaler Merkmale verifiziert werden. Beide Frauen müßten das gleiche X-Chromosom vom Vater geerbt haben und somit die Hälfte der Allele für X-chromosomale Marker teilen.

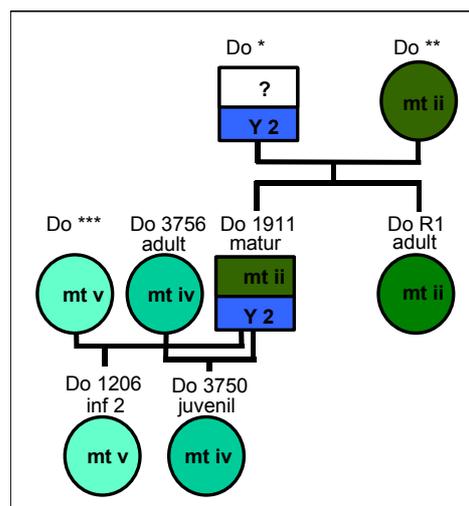


Abb. 35 Vermutete Verwandtschaftsbeziehung zwischen Do 1911 und Do R1 (Geschwister) sowie zwischen Do 1911, Do 3756 als Eltern von Do 3750 und Do 1911 als Vater von Do 1206. Do*, ** und *** sind bislang noch nicht identifiziert, für sie können jedoch einige genetische Merkmale wie z.B. das mt-Muster oder der Y-Haplotyp vorhergesagt werden.

Ergebnisse und Diskussion: Die Typisierungsergebnisse für Do R1, Do 1911, Do 3756, Do 3750 und Do 1206 sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 24 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die Individuen Do R1, Do 1911, Do 3756, Do 3750 und Do 1206

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do R1	13/16	9/10	XX	11/12	15/20	20/(20)	20/25
Do 1911	16	9	XY	12	15	20	25
Do 3756	11/15	10/11	XX	8.3/14	19/20	20/22	18/24
Do 3750	15/16	9/-	XX	12/14	15/19	20/22	18/25
Do 1206	14/16	9/11	XX	11/12	(15)/18	20/(20)	24/-

Amelo: Amelogenin-Gen. Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. Mehrere Allele angegeben: alle Allele sind mehrfach beobachtet worden, es konnte keine Entscheidung zugunsten eines Merkmals getroffen werden. . - : kein Typisierungsergebnis

Eine graphische Umsetzung der Ergebnisse (Abb. 36) erleichtert ihre Beurteilung und zeigt, daß die von Schultes postulierten Verwandtschaftsverhältnisse bestätigt werden können.

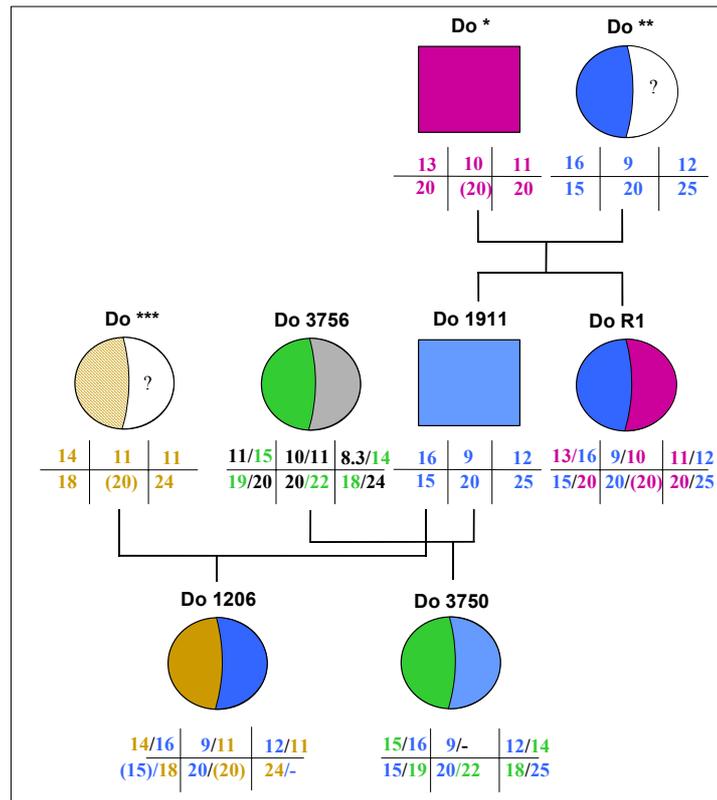


Abb. 36 Verwandtschaftsüberprüfung an einer prähistorischen Familie (männliche Individuen durch Quadrate, weibliche Individuen durch Kreise repräsentiert). Analyse X-chromosomaler Haplotypen (in verschiedenen Farben dargestellt). Die Individuen Do 1911 und Do R1 (Geschwister) teilen den selben X-Haplotypen (blau), den Do 1911 an seine beiden Töchter Do 1206 und Do 3750 weitergab. Der Verwandtschaftshypothese entsprechend findet sich ein X-chromosomaler Haplotyp (grün) von Do 3756 bei Do 3750 wieder, aber nicht bei Do 1206. Für deren Mutter können jedoch nun auch X-chromosomale Allele (braun) vorhergesagt werden, die eine spätere Identifizierung dieses Individuums sicher erleichtern.

Aus den gewonnenen X-chromosomalen Daten können sowohl das vermutete Geschwisterverhältnis zwischen Do 1911 und Do R1 bestätigt werden als auch die Vaterschaft von Do 1911 gegenüber den Individuen Do 1209 und Do 3750, die verschiedene Mütter haben. Darüber hinaus können weitere genetische Merkmale für die biologische Mutter von Do 1206 (Individuum Do ***) und die Eltern (Do * und **) von Do 1911 und Do R1 rekonstruiert werden (Abb. 36). Letztere teilen den blau dargestellte X-Haplotypen, der bei Do 1911 auf jeden Fall von der Mutter stammen muß. Es ist zwar theoretisch möglich, daß Do R1 zufällig den gleichen Haplotyp völlig unabhängig ererbt hat, doch im Kontext der bisher gewonnenen genetischen Daten für beide Individuen (ähnliche genetische Fingerabdrücke, gleiche mt-Linie) erscheint diese Hypothese sehr viel unwahrscheinlicher als die Annahme, daß das Tragen des gleichen X-Haplotypen durch eine gemeinsame Mutter (Do **) verursacht

wurde. Wenn dies zutrifft, kann für den Vater von Do R1 (Do *) ebenfalls der X-Haplotyp rekonstruiert werden (violett), für den in diesem Modell aufgrund der großen Ähnlichkeit der genetischen Fingerabdrücke zwischen Do 1911 und Do R1 auch eine Vaterschaft für Do 1911 angenommen wird.

Hinweis auf mögliche Verwandtschaft zwischen

Do 3742 und Do 1044 oder Do 2030

Fragestellung und Proben: Bei den Analysen X-chromosomaler Haplotypen, die im Rahmen der Fragestellung zur Klärung von praktiziertem Residenzverhalten in der Lichtensteinhöhle durchgeführt wurden, konnte für die Individuen Do 3742, Do 1044 und Do 2030 (Abb. 37) folgendes Ergebnis festgestellt werden (Tab. 25).

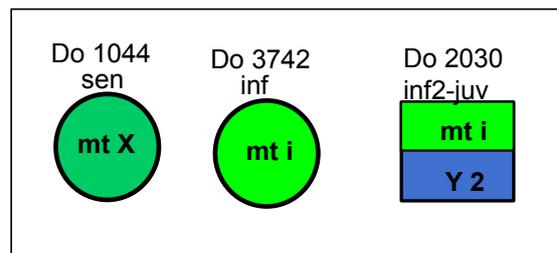


Abb. 37 Drei Individuen der Lichtensteinhöhle, die X-chromosomale Allele aufweisen, die auf eine Verwandtschaft zwischen mindestens zwei der Individuen hindeuten (Tab. 25). Hier gezeigt sind neben dem Sterbealter der Individuen ihre Zugehörigkeit zu Matri- und Patrilineen (mtDNA und Y-Haplotyp).

Tab. 25 X-chromosomale Marker für Do 3742, 1044 und 2030

Probe	Haplotyp(en)	DXS 7424	GATA172D05	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 1044	X23/X24	13/17	7/9	8.3/11	15/20	20/21	23/25
Do 3742	X??/X25	13/15	7/10	8.3/13	15/-	20/21	27/-
Do 2030	X8	15	10	8.3	15	21	24

. - : kein Typisierungsergebnis, ?? : fraglich

Die drei Möglichkeiten (A: Do 1044 und 3742 teilen einen Haplotypen (X23), B: Do 2030 und 3742 teilen einen Haplotypen (X8), C: keine Verwandtschaft zwischen den Individuen) sind zusammen mit möglichen Auflösungen der potentiellen X-Haplotypen in Tab. 26 zusammengefaßt.

Tab. 26 Möglichkeiten von Verwandtschaft über X-chromosomale Muster zwischen Do 3742, 1044 und 2030 und potentielle Haplotypenzuordnungen

	Probe	Haplotyp(en)	DXS 7424	GATA172D05	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
A	Do 1044	X23/X24	13/17	7/9	8.3/11	15/20	20/21	23/25
	Do 3742	X23/X25	13/15	7/10	8.3/13	15/-	20/21	27/-
	Do 1044, Do 3742	X23	13	7	8.3	15	20 o. 21	23 o. 25
	Do 1044	X24	17	9	11	20	20 o. 21	23 o. 25
	Do 3742	X25	15	10	13	-	20 o. 21	27
	Do 3742	X8/X25	13/15	7/10	8.3/13	15/-	20/21	27/-
B	Do 2030	X8	15	10	8.3	15	21	24
	Do 3742	X25	13	7	13	-	20	27
C	Do 1044	X23/X24	13/17	7/9	8.3/11	15/20	20/21	23/25
	Do 3742	X25/X26	13/15	7/10	8.3/13	15/-	20/21	27/-
	Do 2030	X8	15	10	8.3	15	21	24

Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. o.: oder, auf der bisherigen Datenbasis ist keine Entscheidung zugunsten eines Allels möglich. Annahme A: wenn Do 1044 und 3742 einen Haplotypen (X23) teilen, dann können die anderen Haplotypen X24 und X25 bestimmt werden. Annahme B: Wenn Do 2030 und 3742 einen Haplotypen (X8) teilen, kann auch Haplotyp X25 bestimmt werden. Annahme C: Wenn keine Verwandtschaft zwischen den drei Individuen vorliegt (keine geteilten Haplotypen), können auf der bisherigen Datenbasis die Haplotypen X23-X26 nicht separiert werden.

Diskussion: Beim derzeitigen Stand der Untersuchungen kann keine Entscheidung zugunsten einer der aufgestellten Hypothesen getroffen werden. Weitere Typisierungen, die für Do 3742 eine sichere Bestimmung des zweiten Allels in den Systemen DXS6800 und DXS101 ermöglichen würden, könnten zur Klärung der Frage nach eventueller Verwandtschaft zwischen zwei dieser drei Individuen beitragen. Wenn sich einer dieser Fälle bestätigen würde, wäre damit der Nachweis einer Verwandtschaftsbeziehung gelungen, die mit anderen genetischen Markern (autosomaler STRs, mtDNA und Y-STRs) nicht nachweisbar ist.

Nimmt man an, daß Variante A zutrifft (Verwandtschaftsverhältnis zwischen Do 1044 und Do 3742), kann es sich hier nicht um direkte Verwandtschaft handeln (Mutter/Tochter, Schwestern), da beide weiblichen Individuen verschiedene mitochondriale Muster aufweisen. Wenn der X-chromosomale Haplotyp über die mütterliche Linie an diese beiden Individuen vererbt worden wäre, würde man erwarten, daß sie auch die gleiche, weil ebenfalls mütterliche vererbte, mtDNA zeigen. Da dies nicht der Fall ist, liegt die Vermutung nahe, daß ein Mann der Donor dieses X-Haplotypen ist. Ein ähnliches Szenario wie

im Falle der Familie um Do 1911 (vgl. Abb. 36) würde gemäß dem Parsimonieprinzip zu den beobachteten Verhältnissen führen (Abb. 38a), weiter verzweigte Strukturen sind ebenfalls konstruierbar (z.B. Abb. 38b)

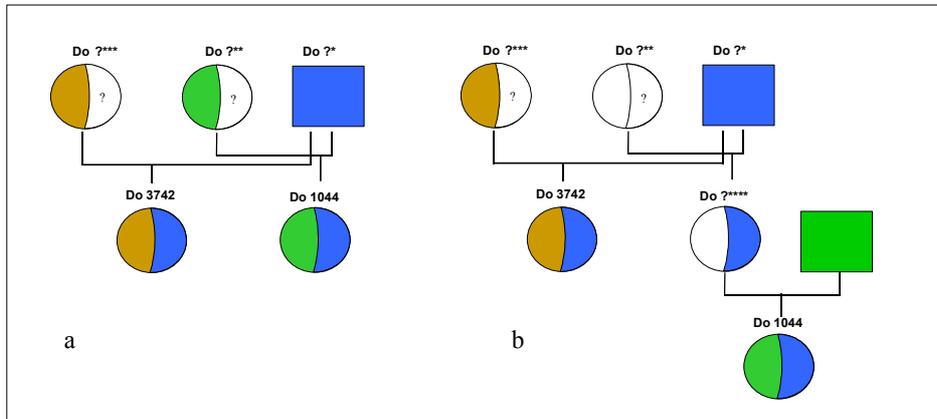


Abb. 38 Zwei mögliche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Do 3742 und Do 1044 unter der Annahme des Zutreffens von Variante A (beide Individuen teilen einen X-Haplotypen). a: engste mögliche Verwandtschaft (gleicher Vater, verschiedene Mütter), b: eine Variante weiter verzweigter familiärer Strukturen.

Variante B (Do 3742 und Do 2030 teilen einen X-Haplotypen) ließe sich zunächst scheinbar mit einer gemeinsamen Mutter erklären, die den geteilten X-Haplotypen und die mtDNA an beide Kinder vererbt hat. Damit würde sich das putative Geschwisterverhältnis zwischen Do 3742 und Do 183 (vgl. „Überprüfung einer vermuteten Geschwisterbeziehung“, S. 79) um ein weiteres Individuum erweitern lassen. Diese Konstellation ist jedoch nicht vereinbar mit den Ergebnissen der Typisierung autosomaler STRs (Daten aus Schultes 2000), die ein Zurückführen der drei Kinder auf ein gemeinsames Elternpaar nicht erlauben. Die nächstmöglichen Konstellationen (Halbbruder oder Cousin) sind in Abb. 39 dargestellt. Für den biologischen Vater von Do 2030 kann der Y-Haplotyp Y2 vorhergesagt werden.

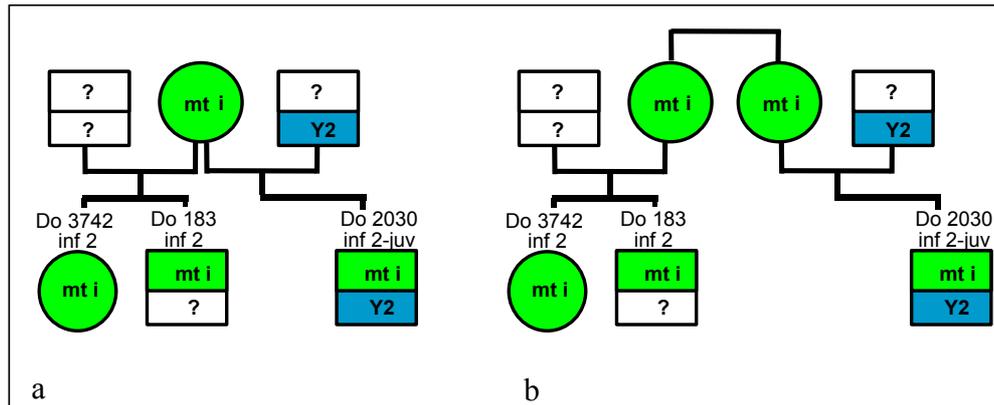


Abb. 39 Mögliche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Do 3742, Do 183 und Do 2030 unter der Annahme des Zutreffens von Variante B (beide Individuen teilen einen X-Haplotypen). a: Halbbruderschaft zu Do 3742/Do183, b: Do 2030 als Cousin von Do 3742/Do183.

Träfe diese Annahme zu, könnte es sich bei diesen noch nicht identifizierten Eltern dieser drei nicht erwachsenen Individuen um die vermuteten Bindeglieder zwischen den Familienzweigen II und III in der Lichtensteinhöhle handeln (vgl. Abb. 30).

4.2.3.2 Goslar – Hinter den Brüdern

Überprüfung einer vermuteten Vater-Tochter-Beziehung

Fragestellung und Proben: Für mehrere Individuen des Klosterfriedhofs „Hinter den Brüdern 6-8“ wurde ein enges verwandtschaftliches Verhältnis zueinander vermutet (Presciuttini et al. 2002), welches von Johannsen 2002 genauer untersucht und erweitert wurde. Diese Verwandtschaftshypothese ist in Abb. 40 dargestellt und enthält eine Vater-Tochter-Relation.

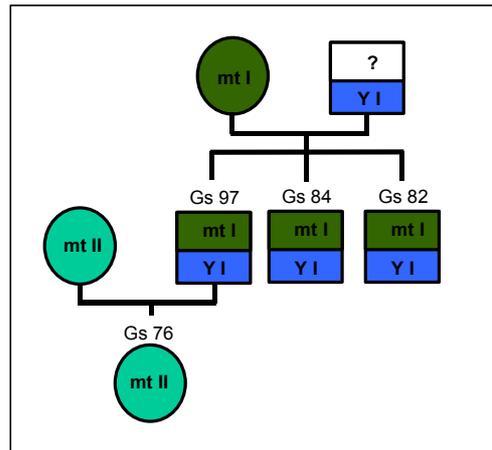


Abb. 40 Vorgeschlagene Verwandtschaftsbeziehung (Johannsen 2002) zwischen historischen Individuen aus Goslar. Die Gruppierung der Individuen Gs 97, Gs 84 und Gs 82 erfolgte aufgrund autosomaler STRs, mitochondrialer Haplotypen und Y-chromosomaler Haplotypen. Die Einordnung des Individuums Gs 76 erfolgte nach Auswertung autosomaler STRs. Symbole ohne Bezeichnung sind Platzhalter für noch nicht identifizierte Individuen, für die einige genetische Merkmale wie z.B. das mt-Muster oder der Y-Haplotyp vorhergesagt werden können.

Die postulierte Vater-Tochter-Beziehung zwischen Gs 97 (männlich) und Gs 76 (weiblich) beruht auf der Überprüfung autosomaler STRs (vgl. auch Tab. 28) und läßt eine Berechnung des Paternitätsindex von 0,976 zu (Johannsen 2002). Dies entspricht einer Vaterschaftswahrscheinlichkeit von 97,6% und macht eine Paternität von Gs 97 hinsichtlich Gs 76 sehr plausibel. Dieser (Defizienz-)Fall wurde nun zusätzlich mit X-chromosomalen STRs untersucht, um das vermutete Verwandtschaftsverhältnis zwischen Gs 97 und Gs 76 zu überprüfen und gegebenenfalls abzusichern. In die Untersuchung ebenfalls einbezogen wurde Gs 84, einer der postulierten Brüder von Gs 97, für den die 50%ige Chance bestand, daß er den gleichen (mütterlichen) X-Haplotypen wie Gs 97 trägt und gegebenenfalls die Richtigkeit der Typisierungsergebnisse von Gs 97 unterstützen könnte.

Ergebnisse und Diskussion: Die Untersuchung der X-Haplotypen zeigt, daß die Brüder Gs 84 und Gs 97 das gleiche mütterliche X-Chromosom geerbt haben, was mit der ohnehin sehr plausiblen Bruderschaftsvermutung zwischen diesen Individuen konsistent ist. Dagegen konnten beim Vergleich der X-Haplotypen zwischen Gs 97 (Putativvater) und Gs 76 in drei der sechs untersuchten X-STR-Systeme keine Übereinstimmung zwischen den Proben gefunden und dadurch die Vaterschaft von Gs 97 sicher ausgeschlossen werden. Die Typisierungsergebnisse sind in Tab. 27 zusammengefaßt.

Tab. 27 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die Individuen Gs 84, Gs 97 und Gs 76

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
GS 84	13	9	XY	11	15	20	23
Gs 97	13	9	XY	11	15	20	23
Gs 76	14/17	7/9	XX	11/12	16/18	21/-	16/24

Amelo: Amelogenin-Gen. Rot geschriebene Allele markieren die Systeme, nach denen eine Vaterschaft von Gs 97 zu Gs 76 ausgeschlossen werden kann.

Authentizitätssicherung: Für je einen der aDNA-Extrakte von Gs 97 und Gs 76 wurde der genetische Fingerabdruck bestimmt. Damit wurde die Möglichkeit geprüft, daß es sich bei den gewonnenen Ergebnissen um eine Kontamination des verwendeten Extraktes durch rezente DNA (Mitarbeiter) handelt. Hierzu wurde der AmpF/STR™ Profiler Plus Kit (Applied Biosystems) benutzt, mit dem simultan neun autosomale STRs typisiert werden. Die gewonnenen Daten wurden mit denen aus den Studien von Bramanti 2000 und Johannsen 2002 verglichen (Tab. 28) und waren konsistent mit beiden.

Tab. 28 Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die untersuchten archäologischen Proben Gs 97 und Gs 76

Probe	D3S1358	VWA	FGA	Amelo	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
GS 97	15/17	18/19	18/20	XY	10/13	30.2/32.2	14/-	12/-	11/-	12/-
Ref.	15/17	18/19	18/20	XY	10/13	30.2/32.2	14/16	12/12	11/12	10/12
GS 76	14/17	18/19	19/20	X	14/-	29/30	14/-	10/12	-	7/12
Ref.	14/17	18/19	19/20	XX	13/14	29/-	14/17	10/12	11/12	7/12

Ergebnis aus dieser Studie jeweils in der oberen Zeile, Referenzdaten (Ref.) von Johannsen 2002 jeweils unten. Amelo: Amelogenin-Gen.

In den meisten Systemen konnte zwar nur ein Allel nachgewiesen werden, während das andere Allel nicht detektierbar war, die gefundenen Übereinstimmungen zwischen den neu erhobenen und den Referenzdaten sind jedoch deutlich genug, um eine Authentizität der gewonnenen Ergebnisse anzunehmen. Darüber hinaus wurde ein Abgleich der Daten mit den genetischen Fingerabdrücken der Mitarbeiter des Instituts sowie der X-chromosomalen Allelmuster der Bearbeiter vorgenommen. Es konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden, die auf eine rezente Kontamination schließen lassen.

Auch die sehr ähnlichen genetischen Fingerabdrücke von Gs 97 und Gs 76 weisen klar auf eine enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen diesen

Individuen hin, nur besteht diese nicht in Form einer biologischen Vater-Tochter-Relation.

4.3 Rekonstruktion von Residenzverhalten in der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle

Die in einer Bevölkerung geltenden Regeln für die Partnerwahl spiegeln sich in der Wohnfolge (Residenzverhalten) wieder. Die geltende Wohnfolgeordnung bestimmt, an welchem Ort die neugegründete Familie ihren Wohnsitz einnimmt (Schmitz 1964, Vivello 1981). Die von einer Gemeinschaft praktizierten Heiratssitten bilden die Grundlage zur räumlichen Translokation von Individuen, da zumindest für einen der Partner die Eheschließung mit der Änderung seines Wohnortes verbunden ist. Dieser Residenzwechsel bewirkt einen großen Teil der kleinräumigen Bevölkerungsbewegungen (Schmidt 1989, Lehmkuhler 1991). Bestimmte Formen der Wohnfolgeordnung führen zu lokalen Abstammungsgruppen (Klans im Sinne von Murdock 1967), andere können zur völligen Dislokalisierung von Verwandtschaftsgruppen führen.

Zwei Grundformen der Residenzordnung sind die patrilokale und matrilocale Wohnfolgeordnung. Patrilokale Residenz bedeutet, daß bei herrschender Patri-linearität ein verheiratetes Paar auf dem Gebiet oder in der Nähe der Verwandten des Ehemanns (Patriklan) bleibt (Schmitz 1964). Patrilokalität - und damit verbunden Migration der weiblichen Individuen - bildet die Grundlage von etwa 70% der realisierten sozialen Systeme (z.B. Murdock 1967, Burton et al. 1996) und stellt damit die am häufigsten praktizierte Variante menschlichen Zusammenlebens dar. Wird matrilocale Residenz verfolgt, wohnt das Paar unter vorherrschender Matrilinearität bei der Familie der Frau (Matriklan) (Levi-Strauss 1981).

Molekulargenetischer Nachweis von Residenzverhalten

Wenn bestimmte Heiratsregeln und die aus ihnen resultierende Wohnfolge über mehrere Generationen hinweg eingehalten werden, müßte sich dies in der Zusammensetzung des Genpools einer Population abbilden. In diesem Zusammenhang hat sich die Untersuchung maternal vererbter mitochondrialer und

paternal übertragener Y-Haplotypen als geeignetes Mittel erwiesen, Residenzverhalten molekulargenetisch nachzuweisen. Praktiziert beispielsweise eine Population Patrilokalität, ist eine hohe Variabilität im mitochondrialen Genpool zu beobachten, der durch einen Eintrag „neuer“ mt-Haplotypen durch Zuzug von Frauen aus anderen Gemeinschaften verursacht wird (Genfluß). Dem gegenüber steht eine geringere Diversität des Y-chromosomalen Genpools, da im Idealfall kein Eintrag Y-chromosomaler Sequenzen von außen erfolgt.

Matrilokale Gesellschaften sollten dagegen eine höhere Variabilität Y-chromosomaler Haplotypen im Vergleich zu mt-Haplotypen aufweisen. Diese Überlegungen wurde bereits erfolgreich an rezenten Populationen überprüft (Salem et al. 1996, Oota et al. 2001, Oota et al. 2002) und auch auf historische Proben angewendet (Gerstenberger 2002). Unterschiede in der Variabilität der untersuchten Loci werden dabei auf statistischem Niveau erfaßt. Hierzu ist die Untersuchung einer möglichst großen Stichprobe erforderlich, die wenig direkt miteinander verwandte Individuen enthält. Diese Voraussetzung ist bei archäologischen Stätten jedoch nur selten gegeben. Bei kleinen Populationen, die zudem auch noch aus nahe verwandten Individuen bestehen, können statistische Verfahren zum Vergleich von mt- und Y-Variabilität keine verlässliche Anwendung finden. Hier können Modelle einen Anhaltspunkt für die erwarteten Größenordnungen geben, in denen sich die mt- und Y-Variabilitäten bewegen. Aussagekräftig sind die Individuen im reproduktionsfähigen und darüberliegenden Alter, welche die (ehemals) mobile Schicht der Gemeinschaft bilden. Auch hier gilt, daß die Variabilität der Y-Haplotypen zwischen matri- und patrilokalen Systemen deutlich differieren sollte (Abb. 41). Dagegen ist für die mt-Linien bei matrilokaler Wohnfolge eine geschlechterspezifische Asymmetrie in der mitochondrialen Diversität zu erwarten (bei Männern hoch, bei Frauen niedrig, Abb. 41b).

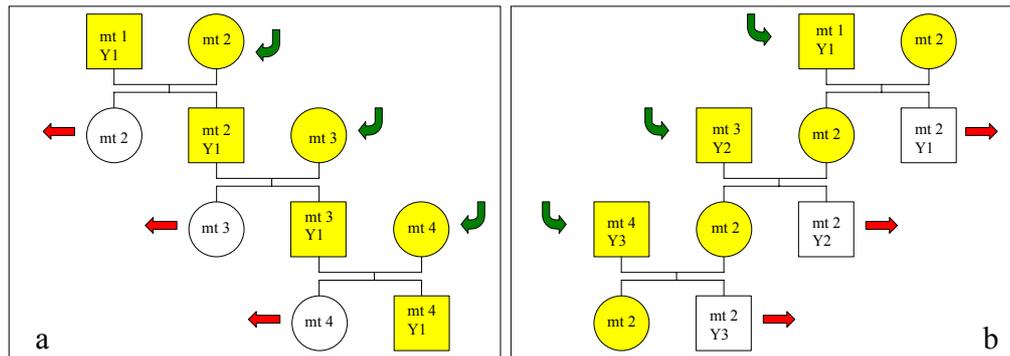


Abb. 41 Modell (ein Familienzweig) für die Veränderung der Variabilität von mt- und Y-Haplotypen in einer Population bei strikter Einhaltung von a) Patrilokalität bzw. b) Matrilokalität. mt: mitochondrialer Haplotyp, Y: Y-chromosomaler Haplotyp. Gelb: am Ort persistierende Individuen, weiß: gemäß den Heiratsregeln abwandernde Individuen. Grüne Pfeile: Einwanderung, rote Pfeile: Abwanderung von Individuen im reproduktionsfähigen Alter. Im (Extrem-)Modell erfaßt wird nur ein Familienzweig unter folgenden Randbedingungen: Jeder Mann paart sich genau mit einer Frau, aus jeder Verbindung entstehen ein Sohn und eine Tochter.

X-chromosomale Haplotypen zum Nachweis von Residenzverhalten

Ein weiterer Markertyp, der zur Klärung von Residenzverhalten herangezogen werden kann und dessen Analyse von engen verwandtschaftlichen Beziehungen der untersuchten Individuen profitiert, sind X-chromosomale STRs.

Die Identifizierung und Auftrennung der in weiblichen Individuen realisierten X-Haplotypen kann nur über Verwandte geschehen (zum Vererbungsmodus von X-STRs vgl. Kapitel 4.2.1). Diese Haplotypenauftrennung ist sicherer, wenn Individuen untersucht werden, deren Verwandtschaft durch weitere Marker abgesichert ist, kann im Prinzip aber auch bei größeren Bevölkerungsgruppen durchgeführt werden. Hier kann ähnlich wie bei der Verwandtschaftsidentifikation über autosomale STRs verfahren werden. Nach Typisierung der für die Untersuchung relevanten Individuen wird nach solchen gesucht, die die Hälfte ihrer Allele (den gleichen X-Haplotypen) teilen, ohne daß weitere Informationen außer dem Geschlecht notwendig sind, das gleich mit erfaßt werden kann. Für einen solchen Ansatz wäre aber eine Erhöhung der Anzahl der untersuchten X-STRs gegenüber der hier durchgeführten, auf mehreren verwandtschaftsanzeigenden Markern beruhenden Analyse zu empfehlen. Dabei muß beachtet werden, daß die Linkage-Gruppe nicht verlassen wird, um eine *en bloc*-Vererbung des Haplotypen zu sichern (vgl. Kapitel 4.2.1).

Ein weiterer Unterschied zu mt- und Y-Haplotypen besteht darin, daß männliche und weibliche Individuen eine numerisch differierende Zahl von Haplotypen tragen und damit weitergeben können. Daher wird besonders die Translokation weiblicher Individuen schnell zu einer deutlichen Erhöhung der Variabilität X-chromosomaler Haplotypen führen. Aussagekräftig sind auch hier die Individuen im reproduktionsfähigen und höheren Alter, welche die (ehemals) mobile Schicht der Gemeinschaft darstellen und vom Problem der Partnersuche unter Einhaltung der tradierten Heirats- und Wohnfolgeregeln betroffen sind. Während die Variabilität X-chromosomaler Marker bei Männern sowohl in patri- als auch matriloalen Systemen relativ hoch ist, kann bei Frauen ein deutlicher Unterschied erwartet werden. Bei praktizierter Matrilokalität sollten viele Frauen gleiche X-Haplotypen teilen (Abb. 42, z.B. Haplotyp Nummer 2, ist in allen vier Generationen nachweisbar).

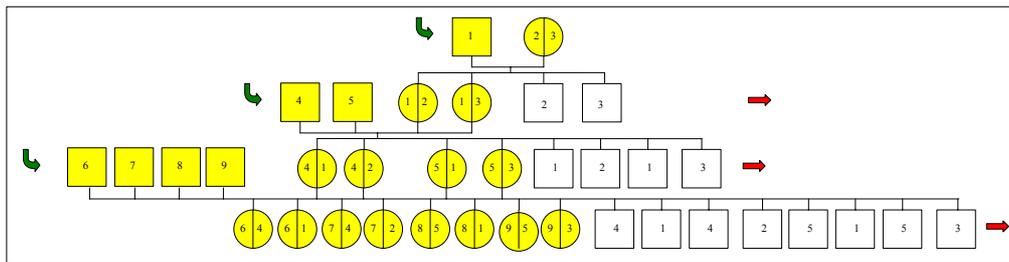


Abb. 42 Modell (ein Familienzweig) für die Veränderung der Variabilität X-chromosomaler Haplotypen in einer Population bei strikter Einhaltung von Matrilokalität. Gelb: am Ort persistierende Individuen, weiß: gemäß den Heiratsregeln abwandernde Individuen. Grüne Pfeile: Einwanderung, rote Pfeile: Abwanderung von Individuen im reproduktionsfähigen Alter. Im (Extrem-)Modell erfaßt wird nur ein Familienzweig unter folgenden Randbedingungen: Jeder Mann paart sich genau mit einer Frau, aus jeder Verbindung entstehen zwei Söhne und zwei Töchter.

In patriloalen Systemen (Abb. 43) dagegen sind nach Zuzug jeder eingeheirateten Frau zwei neue Haplotypen in der Population nachweisbar, wodurch eine und hohe X-chromosomale Variabilität verursacht wird.

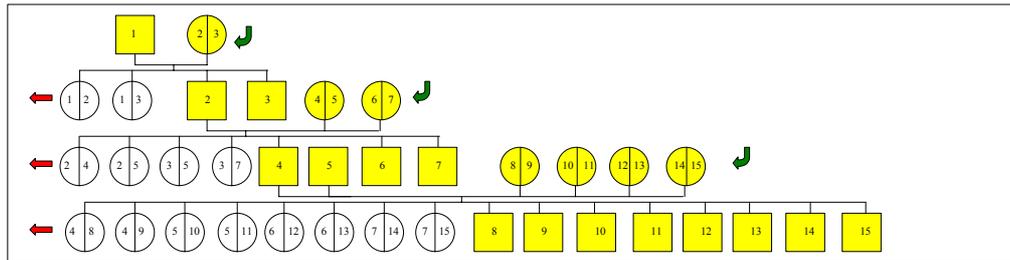


Abb. 43 Modell (ein Familienzweig) für die Veränderung der Variabilität X-chromosomaler Haplotypen in einer Population bei strikter Einhaltung von Patrilokalität. Gelb: am Ort persistierende Individuen, weiß: gemäß den Heiratsregeln abwandernde Individuen. Grüne Pfeile: Einwanderung, rote Pfeile: Abwanderung von Individuen im reproduktionsfähigen Alter. Im (Extrem-)Modell erfaßt wird nur ein Familienzweig unter folgenden Randbedingungen: Jeder Mann paart sich genau mit einer Frau, aus jeder Verbindung entstehen zwei Söhne und zwei Töchter.

4.3.1 Untersuchungen von archäologischen Proben

Fragestellung und Proben: Es sollte geprüft werden, ob Aussagen zum praktizierten Residenzverhalten der bronzezeitlichen Individuen der Lichtensteinhöhle (vgl. Kapitel 3.1) getroffen werden können. Hierzu wurden X-chromosomale STRs von Individuen der Lichtensteinhöhle untersucht, um die X-Haplotypenvariabilität unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht festzustellen. In die Analyse einbezogen wurden die in Tab. 29 aufgeführten Funde. Die Einzeltypisierungsergebnisse sind Anhang, Kapitel 12.2.1 dargestellt.

Ergebnisse: Es konnten erfolgreich Typisierungen X-chromosomaler STRs an 19 Individuen aus der Lichtensteinhöhle vorgenommen werden. Diese sind in der folgenden Tab. 29 zusammengefaßt.

Tab. 29 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker und Amelogenin für die untersuchten bronzezeitlichen Individuen aus der Lichtensteinhöhle

Individuum	Alter*	Geschlecht	DXS 7424	GATA	Amel	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
Do 26	sen	w	15/16	5/9	XX	8.3/11	16/17	15/21	19/23
Do 58.3	juv-fad	m	15	10	XY	13	16	21	24
Do 183	inf 2	m	14	(5)	XY	(13)	15	20	-
Do 902	smat	m	16	5	XY	11	18	20	23
Do 907	inf1	m	-	-	XY	12	15	-	19
Do 1044	sen	w	13/17	7/9	XX	8.3/11	15/20	20/21	23/25
Do 1076	ad	m	16	9	XY	8.3	(18)	24	(25)
Do 1102	mat	m	16	9	XY	8.3	17	21	19
Do 1103	sad	w	15	-	XX	12/13	18/18	20/(20)	(24)/28
Do 1206	inf2	w	14/16	9/11	XX	11/12	(15)/18	20/(20)	(24)/-
Do 1500	sad	w	14/15	7/10	XX	12/14	15/0	15/23	24/0
Do 1585	juv	w	(15)/17	7/(7)	X(X)	8.3/-	15/-	-	-
Do 1911	mat	m	16	9	XY	12	15	20	25
Do 2030	inf 2-juv	m	15	10	XY	8.3	15	21	24
Do 2388	inf2	w	14/16	5/9/10	XX	8.3/12	17/20	21(23)	19/24
Do 2589	ad	w	16/19	9/10	XX	8.3/8.3	15/18	20/21	20/24
Do 3742	inf 2	w	13/15	7/10	XX	8.3/13	15/-	20/21	27/-
Do 3750	juv	w	15/16	9/-	XX	12/14	15/19	20/22	18/25
Do 3756	ad	w	11/15	10/11	XX	8.3/14	19/20	20/22	18/24
Do R1	ad	w	13/16	9/10	XX	11/12	15/20	20/(20)	20/25

Amel: Amelogenin-Gen, GATA: GATA172D05. Geschlecht: w= weiblich, m= männlich. Alter: sen: senilis, mat: maturitas, ad: adultas, juv: juvenis, inf: infants, s: spät-, f: früh-. *: morphologische Altersbestimmung, Daten aus Schultes 2000. Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. Mehrere Allele angegeben: alle Allele sind mehrfach beobachtet worden, es konnte keine Entscheidung zugunsten eines Merkmals getroffen werden.

Es konnten 16 X-Haplotypen diskriminiert werden, weitere zehn liegen bisher nicht auftrennbar vor. Die Determination der verschiedenen X-Haplotypen erfolgte über die Typisierung männlicher Individuen (Träger nur eines Haplotypen) sowie die Nutzung der in Kapitel 4.2.3.1 durchgeführten Verwandtschaftsüberprüfungen. Eine Aufstellung der in der Lichtensteinhöhle gefundenen X-Haplotypen befindet sich in Tab. 30.

Tab. 30 Determinierte X-chromosomale Haplotypen in der Lichtensteinhöhle

X-Haplotypen							
in Probe(n)	Haplotyp(en)	DXS 7424	GATA	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
3756	X1	11	10 o. 11	8.3	20	20	24
R1	X2	13	10	11	20	(20)	20
183	X3	14	(5)	(13)	15	20	-
1500, 2388	X4	14	10	12	17 o. 20	23	24
1206	X5	14	11	11	18	(20)	(24)
26	X6	15	5	11	16	15	23
1500	X7	15	7	14	15	15	-
2030	X8	15	10	8.3	15	21	24
58.3	X9	15	10	13	16	21	24
3750, 3756	X10	15	-	14	19	22	18
902	X11	16	5	11	18	20	23
1076	X12	16	9	8.3	(18)	24	(25)
1102, 26	X13	16	9	8.3	17	21	19
1911, R1, 3750, 1206	X14	16	9	12	15	20	25
2388	X13 o. X15	16	5 o. 9	8.3	17 o. 20	21	19
907	X16	-	-	12	15	-	19
1103	X17/X18*	15	-	12/13	18/18	20/(20)	(24)/28
1585	X19/X20*	(15)/17	7/(7)	8.3/-	15/-	-	-
2589	X21/X22*	16/19	9/10	8.3/8.3	15/18	20/21	20/24
3742	X??/X25*	13/15	7/10	8.3/13	15/-	20/21	27/-
1044	X23/X24*	13/17	7/9	8.3/11	15/20	20/21	23/25

GATA: GATA172D05, Allele in Klammern: Datum nicht vollständig reproduziert. o.: oder, auf der bisherigen Datenbasis ist keine Entscheidung zugunsten eines Allels möglich, * Haplotypen auf der bisherigen Datengrundlage nicht auftrennbar. ?? Zuordnung der X-Haplotypen unklar, Erläuterung im anschließenden Text.

Die Auftrennung der X-Haplotypen ist für ein Individuum (Do 3742, weiblich) schwierig. Es kommen zwei weitere Individuen als Träger eines gleichen X-Haplotypen wie Do 3742 in Frage (Do 2030 und Do 1044), die sich aber gegenseitig (System DXS9898) ausschließen, das heißt, daß nicht beide als Donoren des gleichen oder der beiden verschiedenen in Do 3742 realisierten Haplotypen in Frage kommen (vgl. Kapitel 4.2.3.1, Tab. 25).

Um zu klären, ob Aussagen zum praktizierten Residenzverhalten der in der Lichtensteinhöhle bestatteten Individuen getroffen werden können, wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit (X-Haplotypen) und der in der Studie von Schultes 2000 gewonnenen Daten (mt- und Y-Haplotypen) zusammengeführt (Tab. 31).

Tab. 31 Zusammenfassung der Typisierungsergebnisse für X-STRs Marker, mtDNA und Y-STRs für die untersuchten bronzezeitlichen Individuen aus der Lichtensteinhöhle

Individuum	Alter**	Geschlecht	X-Haplotyp(en)	mt-Haplotyp		Y-Haplotyp	
				Schmidt*	Schultes*	Schmidt*	Schultes*
Do 26	sen	w	X6/X13	i	D	/	/
Do 1044	sen	w	X23/X24.	x	C	/	/
Do 1103	sad	w	X17/X18	viii	G	/	/
Do 1500	sad	w	X4/X7	iii	H	/	/
Do R1	ad	w	X2/X14	i/ii	(D/E)	/	/
Do 2589	ad	w	X21/X22	vii	(M)	/	/
Do 3756	ad	w	X1/X10	iv	I	/	/
Do 902	smat	m	X11	vi	J	Y5	V
Do 1102	mat	m	X13	I	D	Y1	I
Do 1076	ad	m	X12	i	D	Y1	I
Do 1911	mat	m	X14	ii	E	Y2	II
Do 199	fad-mat	m	n.d.	xi	(B)	Y4	IV
Do 58.3	juv-fad	m	X9	n.d.	n.d.	Y1	I
Do 183	inf 2	m	X3	i	D	n.d.	n.d.
Do 905	juv	m	n.d.	xii	K	Y2	II
Do 907	inf1	m	X16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Do 1916	juv	m	n.d.	ix	F	Y3	III
Do 2030	inf 2-juv	m	X8	i	D	Y2	II
Do 1206	inf2	w	X5/X14	v	(L)	/	/
Do 1585	juv	w	X19/X20	n.d.	n.d.	/	/
Do 2388	inf2	w	X4/X13 o. 15	iii	(H)	/	/
Do 3742	inf 2	w	X?/?/X25	i/ii	(D/E)	/	/
Do 3750	juv	w	X10/X14	iv	I	/	/

Geschlecht: w= weiblich, m= männlich. Alter: sen: senilis, mat: maturitas, ad: adultas, juv: juvenis, inf: infants, s: spät-, f: früh-. Alter**: morphologische Altersbestimmung, Daten aus Schultes 2000. Schmidt/Schultes*: verwendete, voneinander abweichende Nomenklatur in der vorgelegten bzw. der Referenzarbeit Schultes 2000. / : genetische Merkmale nicht vorhanden. n.d.: Merkmal nicht typisiert. Bei mt-Haplotypen: Angabe in Klammern: Datum nicht sicher reproduziert. Zwei Möglichkeiten angegeben: beide Varianten sind beobachtet worden, es konnte keine Entscheidung zugunsten eines Merkmals getroffen werden, im Fettdruck die wahrscheinlichere Ausprägung (aufgrund von Verwandtschaftsanalysen).

In der folgenden Tabelle sind die Erwartungswerte für die Variabilität von mt-, Y- und X-Haplotypen bei den Individuen im reproduktionsfähigen und höheren Alter (adultas - senilis) für patrilokale und matrilocale Residenz zusammengefaßt (Tab. 32). Die beobachteten Daten für die im Reproduktionsalter befindlichen und älteren Individuen der Lichtensteinhöhle sind ebenfalls dargestellt (Tab. 33).

Tab. 32 Erwartete Variabilität von X-chromosomalen, mitochondrialen und Y- Haplotypen für patrilokales und matrilokales Residenzverhalten.

Residenzverhalten	Geschlecht*	Var(X)	Var(mt)	Var(Y)
patrilokal	w	hoch, idealerweise teilen keine Frauen den gleichen Haplotypen	hoch, idealerweise teilen keine Frauen den gleichen Haplotypen	-
	m	hoch, jedoch niedriger als bei den Frauen, einige Männer (Brüder) tragen den gleichen Haplotypen	hoch, jedoch niedriger als bei den Frauen, einige Männer (Brüder) tragen den gleichen Haplotypen	niedrig, da kein Neueintrag
matrilokal	w	niedriger als bei den Männern, viele Frauen teilen X-Haplotypen	niedrig, da kein Neueintrag	-
	m	hoch, idealerweise teilen keine Männer den gleichen Haplotypen	hoch, da Männer von außerhalb kommen (mit der mtDNA ihrer Mütter)	hoch, da ständig Neueintrag

* der Individuen der Altersstufen *adultas* bis *senilis*, welche die reproduktive und damit mobile Schicht bilden bzw. gebildet haben. w= weiblich, m= männlich. Var(X): Variabilität X-chromosomaler Haplotypen, Var(mt): Variabilität mitochondrialer Haplotypen, Var(Y): Variabilität Y-chromosomaler Haplotypen.

In der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle finden sich folgende genetischen Verhältnisse (Tab. 33):

Tab. 33 Beobachtete Variabilität von X-chromosomalen, mitochondrialen und Y-Haplotypen bei (ehemals) reproduktionsfähigen Individuen aus der Lichtensteinhöhle.

Geschlecht*	Var(X)	Var(mt)	Var(Y)
w	hoch, es teilen keine Frauen den gleichen Haplotypen	relativ hoch, es teilen Frauen den gleichen Haplotypen**	-
	Hinweis auf Patrilokalität	keine Aussage möglich, Hinweis auf Matrilokalität oder häufige mt-Linie	-
m	hoch, es teilen keine Männer den gleichen Haplotypen	relativ hoch, 2/5 Männern teilen Haplotypen	relativ niedrig, es teilen Männer den gleichen Haplotypen***
	keine Aussage möglich	keine Aussage möglich, Hinweis auf Matrilokalität oder häufige mt-Linie	Hinweis auf Patrilokalität mit mind. fünf Familienlinien

* der Individuen der Altersstufen *adultas* bis *senilis*, welche die reproduktive und damit mobile Schicht bilden bzw. gebildet haben. w= weiblich, m= männlich. Var(X): Variabilität X-chromosomaler Haplotypen, Var(mt): Variabilität mitochondrialer Haplotypen, Var(Y): Variabilität Y-chromosomaler Haplotypen. ** Vorhandensein von mind. einer weiteren Frau mit mt-Linie i rekonstruierbar über mt-Linie der drei Kinder Do 3742, Do 183 und Do 2030. *** Vorhandensein von mind. einem weiteren Mann mit Y-Linie 2 rekonstruierbar über Y-Linie der drei Kinder Do 905 und Do 2030, ebenso ist über Do 58.3 das Vorhandensein eines weiteren Mannes mit Haplotyp Y1 erschließbar.

Diskussion: Da die bislang untersuchte Stichprobe (vormals) reproduktionsfähiger Individuen der Lichtensteinhöhle relativ klein ist und die Vermutung

bzw. der partielle Nachweis naher Verwandtschaftsbeziehungen besteht, kann die Variabilität der mitochondrialen und Y-chromosomalen Haplotypen nicht statistisch ausgewertet und das Verhältnis mt/Y-Variabilität beurteilt werden. Die Beobachtungen wurden daher nach den an den Modellen entwickelten Überlegungen ausgewertet (Tab. 32).

mtDNA: Alle sieben untersuchten Frauen zeigen unterschiedliche mitochondriale Haplotypen und geben damit zunächst einen deutlichen Hinweis auf patrilokales Residenzverhalten in der Lichtensteinhöhle. Die mt-Haplotypen der Männer lassen erwartungsgemäß keine konkrete Aussage zu. Die Variabilität ist den Annahmen entsprechend hoch. Von den fünf untersuchten Männern zeigen zwei (Vater und Sohn, Do 1102) die gleiche mt-Sequenz. Hier hat ein Ehepaar (Do 26 und Do 1076) mit gleichen mt-Linien Nachwuchs gezeugt. Zieht man weitere Informationen aus Tab. 31 hinzu, findet sich der gleiche mt-Haplotyp in drei Kindern (Do 2030, Do 3742 und Do 183, letztere vermutlich Geschwister), was darauf schließen läßt, daß noch mindestens eine weitere Frau mit dem gleichen mt-Haplotypen (i) wie Do 26 in der Lichtensteingemeinschaft gelebt haben muß. Durch Einbeziehung diese Beobachtung wird die mt-Variabilität der Frauen abgesenkt. Dieses Ergebnis kann bei Annahme von Patrilokalität durch einen Zuzug von Frauen mit einem in der Region besonders häufigen mt-Haplotypen erklärt werden, kann jedoch auch als Hinweis auf Matrilokalität gewertet werden. Die mitochondriale DNA gibt demnach im Rahmen der hier bearbeiteten Fragestellung keinen Aufschluß auf praktiziertes Residenzverhalten in der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle.

Y-STRs: Bei den fünf untersuchten Männern finden sich vier Y-Haplotypen, das Vorhandensein eines weiteren Mannes mit einem abweichenden Haplotypen kann über ein Kind (Do 1916) rekonstruiert werden. Damit erscheint die Variabilität zunächst hoch und als ein Hinweis auf Matrilokalität. Allerdings ist nicht zu erwarten, daß sich in der Lichtensteinhöhle bei praktizierter Patrilokalität nur eine einzige Y-Linie findet (das Modell, Abb. 43) berücksichtigte nur einen Zweig mit einem „Stammvater“), vielmehr können bei einer solchen Gemeinschaft mehrere miteinander verwandte Kernfamilien erwartet werden und damit mehrere Y-Haplotypen. Bei der geringen typisierten Individuenzahl kann nicht beurteilt werden, ob fünf Haplogruppen im hier untersuchten

Zusammenhang viel oder wenig sind. Der Nachweis von zwei erwachsenen Männern (Vater und Sohn, Do 1076 und 1102) aus der selben Patriline kann als Indiz für patrilokales Residenzverhalten gewertet werden. Dieser Hinweis wird verstärkt, da ein mutmaßliches Kind von Do 1102 identifiziert werden konnte, was belegt, daß Do 1102 seine Familie am Wohnort seines Vaters gegründet hat. Eine weitere Unterstützung erfährt dieser Hinweis auf ein patrilokales System dadurch, daß das Vorhandensein von mindestens einem weiteren Mann mit Y-Linie 2 über die Y-Linie der Kinder Do 905 und Do 2030 rekonstruierbar sowie über Do 58.3 das Vorhandensein eines weiteren Mannes mit Haplotyp Y1 erschließbar ist. Damit kann die Diversität der Y-Haplotypen in der Lichtensteinhöhle als relativ niedrig eingeschätzt und als Hinweis auf eine patrilokale Wohnfolgeordnung bewertet werden.

X-Haplotypen: Bei den vier untersuchten Männern werden vier verschiedene Haplotypen gefunden. Dieses Ergebnis ermöglicht gemäß den Vorüberlegungen keine Aussage bezüglich praktizierten Residenzverhaltens der Gemeinschaft. Die Analyse der X-chromosomalen Haplotypen zeigt bei den untersuchten Frauen eine deutliche Tendenz zu patrilokalem Residenzverhalten. In den sieben typisierten Frauen sind vierzehn verschiedene X-Haplotypen realisiert, es teilen keine Frauen den gleichen Haplotypen. Bei den typisierten Kindern, für die noch keine Eltern identifiziert werden konnten, werden weitere acht bis zehn X-chromosomale Haplotypen gefunden, die von Frauen mit den entsprechenden Merkmalen ererbt sein müssen. Damit kann eine hohe Diversität im X-chromosomalen Genpool der untersuchten Gruppe festgestellt werden. Diese Beobachtung ist mit der Theorie eines Zuzugs weiblicher Individuen von außerhalb vereinbar und stellt bei der derzeitigen Datenbasis (typisierte Individuen) einen deutlichen Hinweis auf patrilokales Residenzverhalten dar.

Schlußfolgerung: Insgesamt geben die genetischen Untersuchungen eher Hinweise darauf, daß die Männer der untersuchten Gruppe am Ort blieben, während ihre Partnerinnen zuzogen. Den stärksten Hinweis gibt neben einer relativ niedrigen Variabilität der Y-chromosomalen Haplotypen die hohe Diversität der X-chromosomalen Haplotypen. Diese wird sicher dadurch mitbewirkt, daß weibliche Individuen Träger von doppelt so vielen Haplotypen als Männer

sind. Es liegen zwar bislang keine Untersuchungen darüber vor, wie sich die Diversitäten von mitochondrialen, Y-chromosomalen und X-chromosomalen Haplotypen zueinander verhalten, doch lassen die bisherigen Studien (inklusive der vorliegenden an vermutlich sehr eng verwandten Individuen) vermuten, daß die generelle Variabilität X-chromosomaler Haplotypen sehr hoch ist, was gerade bei der Untersuchung kleinerer Personengruppen zu einer höheren Trennschärfe der Typisierungsergebnisse führen kann.

5 aDNA-Untersuchungen zur Prüfung epidemiologischer Hypothesen

5.1 Prüfung von Hypothesen bezüglich des Verbreitungszeitpunktes der *ccr5*Δ32-Variante

Eine in der Fachliteratur umstrittene Frage ist die nach der Ursache für die Verbreitung einer 32 Basenpaare (bp) umfassenden Mutation im den Chemokinrezeptor 5 (*ccr5*) kodierenden Gens, die heute homozygote Träger in hohem Maße vor einer Infektion mit dem HI-Virus (*human immunodeficiency virus*) und damit vor AIDS schützt. Da diese Krankheit erst seit wenigen Jahrzehnten auftritt, kann sie nicht den Selektionsfaktor für die bereits Mitte der 1990er Jahre beobachtete z.T. recht hohe Distribution des mutierten *ccr5*Δ32-Allels in der europäischen Bevölkerung darstellen. Die Ursache hierfür muß demnach in einem anderen Selektionsfaktor gesucht werden, der von einigen Arbeitsgruppen in den mittelalterlichen Pandemien der Pest und Pocken vermutet wird. Zur Klärung dieser Fragestellungen eröffnet die Untersuchung von (prä)historischem Skelettmaterial einen einzigartigen Zugang zur direkten Überprüfung von Hypothesen, die aus der Beobachtung moderner Populationen heraus aufgestellt wurden.

5.1.1 Molekulargenetischer Nachweis des *ccr5* - Gens in historischen Bevölkerungen

Bei der Untersuchung von *ccr5*/*ccr5*Δ32 wird ein biallelisches Merkmal, d.h. in zwei Ausprägungen vorliegend, analysiert, das *a priori* nicht individualisierbar ist. Bei der Typisierung solcher Loci besteht grundsätzlich die Gefahr, daß Kontaminationen mit rezenter DNA das Ergebnis verfälschen können (z.B. Cooper et al. 2001, Hummel 2003b) Bei der Entwicklung des PCR-gestützten Nachweises des *ccr5*-Locus mußte eine Möglichkeit eingearbeitet werden, die Authentizität der *ccr5*-Genotypisierung über die bloße Vielfach-Reproduktion des Ergebnisses hinaus sicherzustellen. Hierzu wurde eine Strategie verfolgt, die von Bramanti et al. 2003 entwickelt wurde und es ermöglicht, eine *a priori*

nicht individualisierbare Sequenz, wie in diesem Fall ccr5, einem bestimmten Individuum zuzuordnen. Hierzu wird eine Koamplifikation des ccr5-Locus gemeinsam mit autosomalen STRs, die ihrerseits individualisierbare Marker darstellen und deren Eigenschaften über forensische Studien validiert sind (Polymeropoulos et al. 1991, Kimpton et al. 1992, Anker et al. 1992, Lins et al. 1998), durchgeführt (vgl. Kapitel 2.1.1). Die verwendeten STR-Systeme sind D5S818, TPOX, TH01 und VWA. Der mit ihnen generierte genetische Fingerabdruck ermöglicht eine Ausschlußwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der von Seltenheit der Allele von 10^{-5} - 1^{-10} (Berechnung unter Verwendung der im Manual *Powerplex16*, Promega aufgeführten Allelfrequenzen). Darüber hinaus wurde das Amelogenin-Gen zur Geschlechtsbestimmung koamplifiziert (Primersequenzen und Protokolle sind in Kapitel 2.2.4.4 aufgeführt).

Diese Strategie der Simultanamplifikation des ccr5 Locus und autosomaler STRs erlaubt es, etwaige Kontaminationen (Kreuzkontaminationen zwischen den Proben oder Eintrag rezenter DNA) aufzudecken (Hummel et al. 2000, Hummel 2003b) und ist für diesen Zweck mindestens ebenso geeignet wie andere, in der Fachliteratur vorgeschlagene Kontrollinstanzen, z.B. eine Reproduktion jedes Ergebnisses in einem zweiten Labor (Hofreiter et al. 2001b). Durch die koamplifizierten, individualisierbaren STRs kann auch das ccr5-Ergebnis einer Probe zugeordnet (vgl. Kapitel 2.1.1).

5.1.2 Untersuchungen von rezenten Individuen

Fragestellung und Proben: Die Ausbalancierung der Primermengen der Multiplex-PCR und die Etablierung der PCR-Parameter wie Annealtemperatur erfolgte an rezenten Proben (Mundschleimhautabstriche) von zwei männlichen und drei weiblichen Individuen. Die nachgewiesenen Allele wurden weiter zur Erstellung einer Allelleiter (vgl. Tab. 34) verwendet.

Ergebnisse: Die Typisierungsergebnisse der Rezentproben sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 34 Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Rezentproben

Probe	ccr5	Amelo	TPOX	D5S818	TH01	VWA
MK	wt/Δ32	XX	8/8	11/12	6/8*	14/16*
DS	wt/wt	X/X	8/11	12/12*	6/6	15/15
SH	wt/wt	X/X	10*/12	11/12	9.3/9.3	17/17
BH	wt/Δ32	X/Y*	8/11*	11/13*	6/7*	14/15
AF	wt/wt	X/Y	8/9*	11/12	9/9.3*	15/17*

Amelo: Amelogenin-Gen, wt: Wildtypallel, nicht deletierte Variante des ccr5 Gens, Δ32: ccr5Δ32-Variante, 32 bp Deletion gegenüber dem Wildtyp.* : Systeme für Allelleiter verwendet

5.1.3 Untersuchungen von archäologischen Proben

5.1.3.1 Intraregionaler, diachroner Vergleich

Fragestellung: Anhand der genetischen Typisierung des ccr5-Locus aus Skelettproben verschiedener Zeitstellungen (1750 - 1810 A.D. und 2900 v.Chr.) der gleichen geographischen Region Zentraldeutschlands (Harz) wird untersucht, ob und in welcher Häufigkeit die ccr5Δ32-Variante in historischen Bevölkerungen nachweisbar ist. Es soll die Hypothese einer erst vor relativ kurzer Zeit im Nordosten Europas entstandenen Mutation und ihrer kurz darauffolgenden Verbreitung geprüft werden, wie sie nach Untersuchung von den ccr5-Locus flankierenden STRs aufgestellt wurde (Libert et al. 1998, Stephens et al. 1998, Klitz et al. 2001).

Proben: Untersucht wurden 17 bronzezeitliche Skelettelemente aus der Lichtensteinhöhle (vgl. Kapitel 3.1) und 19 Individuen des frühneuzeitlichen Friedhofs Goslar/Hinter den Brüdern (vgl. Kapitel 3.2), für die genetische Vergleichsdaten für autosomale STRs zur Verfügung standen (Schultes 2000, Bramanti 2000).

Ergebnisse: Für 7 der 19 untersuchten Skelette aus Goslar/Hinter der Brüdern konnte die ccr5Δ32-Variante nachgewiesen werden, wobei jedoch keines der Individuen homozygot für das deletierte Allel war. Dieses Ergebnis entspräche einer Allelfrequenz von 18,4% für das mutierte Gen. Da für Gs 82 und 97 (beide wt/wt) später eine direkte Verwandtschaft belegt wurde (vgl. Kapitel

4.2.3.2, Abb. 40), wird eines dieser Individuen nicht berücksichtigt und das Ergebnis auf 19,4% korrigiert. Die Typisierungsergebnisse sind in Tab. 35 zusammengefaßt.

Tab. 35 Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Proben aus Goslar/Hinter den Brüdern

Probe	ccr5	Amelo	TPOX	D5S818	TH01	VWA
GS 30	wt/wt	-	12/-	11/-	-	-
GS 31	wt/wt	X/X	10/11	10/13	6/9.3	16/18
GS 39	wt/wt	X/Y	8/11	11/11	7/9.3	17/-
GS 45.1	wt/wt	X/Y	11/-	10/11	7/-	-
GS 49	wt/Δ32	X/Y	8/-	11/13	6/9.3	15/17
GS 52	wt/Δ32	X/X	9/11	12/13/14	9.3/-	-/-
GS 53	wt/wt	X/Y	8/(10)	11/13	8/9	18/19
GS 54	wt/wt	X/Y	8/-	11/13	8/-	17/-
GS 61	wt/Δ32	X/X	8/11	11/12	6/9.3	15/-
GS 67	wt/wt	X/Y	8/11	11/-	9/-	15/16
GS 68	wt/Δ32	X/Y	8/11	11/12	7/9	15/17
GS 76	wt/Δ32	X/X	9/11	10/12	7/9.3	18/19
GS 79	wt/wt	X/X	8/11	10/11	9/9.3	16/-
GS 82	wt/wt	X/Y	8/11	12/-	9./9.3	15/18
GS 95	wt/wt	X/Y	8/-	11	9.3/-	17/-
GS 96	wt/Δ32	X/Y	8/11	10/12	7/9	14/19
GS 97*	wt/wt	X/Y	8/-	12	6/9.3	18/19
GS 102	wt/Δ32	X/Y	8/-	9/12	(6)/9	16/17
GS 105	wt/wt	X/X	8/10	11/-	9/-	16/17

Amelo: Amelogenin-Gen, wt: Wildtypallel, nicht deletierte Variante des ccr5 Gens, Δ32: ccr5Δ32-Variante, 32 bp Deletion gegenüber dem Wildtyp. (): Allel konnte nicht vollständig reproduziert werden. . - : kein Typisierungsergebnis. * : Individuum bei der Errechnung der Häufigkeit des ccr5Δ32-Variante aufgrund direkter Verwandtschaft zu anderen hier untersuchten Individuen nicht berücksichtigt

Auch unter den bronzezeitlichen Individuen aus der Lichtensteinhöhle wurde die ccr5Δ32-Variante bei 4 der 17 untersuchten Individuen detektiert, was einer Allelfrequenz von 11,8% entspräche. Auch hier sind einige Individuen, darunter Do 3742 und 183, beide heterozygote Träger der Mutation, vermutlich direkt verwandt (vgl. Kapitel 4.2.3.1, Abb. 34). Weiter findet sich eine Mutter-Tochter-Beziehung (Do 3756/3750) und eine Triade (Do 26, Do 1076 und Do 1102) unter den untersuchten Proben. Daher wird die Häufigkeit der ccr5Δ32-Variante auf 10,7% korrigiert. Unter den bronzezeitlichen Individuen konnten

ebenfalls keine homozygoten Träger des deletierten Allels nachgewiesen werden. Die Typisierungsergebnisse sind in Tab. 36 zusammengefaßt.

Tab. 36 Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Proben aus der Lichtensteinhöhle

Probe	ccr5	Amelo	TPOX	D5S818	TH01	VWA
DO 26	wt/wt	XX	8/-	9/11	7/9.3	16/17
DO 58.3	wt/wt	X/Y	8/-	11/-	6/8	16/18
DO 183*	wt/Δ32	X/Y	8/11	10/-	6/9.3	14/19
DO 199	wt/wt	XX	11/-	12/-	7/9	14/-
DO 300	wt/wt	XX	8/11	-/-	6/-	16/-
DO 902	wt/Δ32	X/Y	8/8	12/-	6/9.3	13/15
DO 1044	wt/wt	XX	8/11	9/-	9.3/-	17/-
DO 1076	wt/wt	X/Y	8/11	10/12	7/9.3	15/16
DO 1102*	wt/wt	X/Y	8/-	9/10	7/-	-/-
DO 1103	wt/Δ32	XX	9/11	11/12	6/9.3	14/15
DO 1500	wt/wt	XX	9/12	-/-	9.3/-	-/-
DO 1911	wt/wt	X/Y	8/9	11/12	9.3/-	17/19
DO 1916	wt/wt	X/Y	8/10	12/12	6/7	14/16
DO 2030	wt/wt	X/Y	8/-	13/-	7/9	18/-
DO 3742	wt/Δ32	XX	8/-	13/-	6/9.3	14/-
DO 3750	wt/wt	XX	9/12	11/12	9/9.3	17/19
DO 3756*	wt/wt	XX	8/9	12/-	9/9.3	17/19

Amelo: Amelogenin-Gen, wt: Wildtypallel, nicht deletierte Variante des ccr5 Gens, Δ32: ccr5Δ32-Variante, 32 bp Deletion gegenüber dem Wildtyp. - : kein Typisierungsergebnis . * : Individuum bei der Errechnung der Häufigkeit des ccr5Δ32-Variante aufgrund direkter Verwandtschaft zu anderen hier untersuchten Individuen nicht berücksichtigt

Diskussion: Die errechneten Allelfrequenzen für beide untersuchten historischen Stichproben können nur einen ungefähren Anhaltspunkt für die Häufigkeit der Mutation in den damaligen Bevölkerungen geben. Frühere molekulargenetische Analysen am Skelettkollektiv Goslar/Hinter den Brüdern (Bramanti 2000) weisen darauf hin, daß die auf dem Friedhof beigesezten Individuen miteinander verwandt waren und somit keine zufällige Stichprobe darstellen. Ebenso ist für die Individuen aus der Lichtensteinhöhle eine enge verwandtschaftliche Beziehung belegt (Schultes 2000). Aus diesem Grund wird hier auf eine statistische Weiterverarbeitung der gewonnenen Daten verzichtet, da der Fehler nicht abschätzbar ist.

Dessen ungeachtet zeigt die Untersuchung klar, daß die ccr5Δ32-Variante bereits vor beinahe 3000 Jahren in Mitteleuropa in einer merklichen Häufigkeit auftritt, womit die Klitz'sche Hypothese einer vor 700–1000 Jahre entstandenen Mutation und die Datierung nach Stephens mit einer knapp 2000 Jahre alten Mutation widerlegt sind. Auch das an die heutige Häufigkeit der ccr5Δ32-Variante heranreichende Vorkommen der Mutation im Skelettkollektiv von Goslar weist in dieselbe Richtung. Wäre die Mutation erst kürzlich evolviert, könnte sie nur dann bereits vor 250 Jahren in Mitteleuropa in hohen Frequenzen wie den hier beobachteten vorkommen, wenn ein sehr gravierender Selektionsdruck auf das Gen wirkte.

Daß die Pocken den ihnen zugeschriebenen Selektionsdruck auf die Verbreitung der ccr5Δ32-Variante hatten (z.B. Klitz et al. 2001, Galvani & Slatkin 2003), ist angesichts des Nachweises der Mutation im bronzezeitlichen Skelettkollektiv unwahrscheinlich. Zwar wurden Pocken schon im 15. Jahrhundert v.Chr. in Indien beschrieben, sie sind aber erst seit dem 6. Jahrhundert A.D. in Europa (Frankreich und Italien) belegt (z.B. Winkle 1997), so daß ein von *Variola* ausgehender Selektionsdruck auf die deletierte Genvariante von dieser Zeit an zu erwarten und mit dem Befund aus der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle nicht in Einklang zu bringen ist.

Die Hypothese, daß die mittelalterlichen Pestpandemien als positiver Selektionsdruck auf das ccr5Δ32-Allel wirkten - von Altschuler 2000 favorisiert, von anderen Autoren vorsichtiger als eine unter mehreren Möglichkeiten benannt - wurde bereits in einer anderen Studie durch die Untersuchung der Allelfrequenz der ccr5Δ32-Variante an einer mittelalterlichen Massenbestattung vermuteter Pestopfer (Kremeyer 2003) geprüft. Obwohl die bearbeitete Stichprobe nicht groß genug war, um ein statistisch abgesichertes Resultat zu ergeben, ist ein Trend in die Richtung zu beobachten, daß Pest wohl nicht als Selektionsfaktor für die Verbreitung von ccr5Δ32 in Betracht zu ziehen ist. Dieser Trend wird durch die Ergebnisse der vorgelegten Studie verstärkt; eine selektive Wirkung der mittelalterlichen Pestpandemien in Form eines Überlebensvorteils für die Mutationsträger auf die Verbreitung der ccr5Δ32-Variante kann daher als unwahrscheinlich betrachtet werden.

Die mit einem großen Konfidenzintervall behafteten Berechnungen für das erstmalige Auftreten der ccr5Δ32-Variante in Europa vor 3500 Jahren (400-13000; C.I. 95%) bzw. 2250 Jahren (900-4700; C.I.95%) von Libert et al. 1998 konnten mit dem verfügbaren Probenmaterial nicht direkt überprüft werden. Dies könnte anhand der Typisierung von neolithischen oder aus noch früherer Zeit stammenden Individuen geschehen. Dennoch weist die erfolgreiche Detektion des mutierten Allels in bronzzeitlichen Skeletten daraufhin, daß die Mutation deutlich älter als 3000 Jahre alt ist, wenn die Annahmen bezüglich des Ursprungsortes im Finno-ugrischen Raum zutreffen. Dieses Ergebnis hätte ebenfalls Konsequenzen für die diskutierten Hypothesen bezüglich der Verbreitungsart und –geschwindigkeit der Genvariante. Libert et al. schließen anhand ihrer Errechnung eines recht jungen Alters der ccr5Δ32-Mutation darauf, daß genetische Drift nicht für die Ausbreitung der Mutation verantwortlich sein kann, sondern daß ein starker, die Träger der Genvariante begünstigender Faktor nötig gewesen wäre. Dieses Argument entfiel oder wäre deutlich abgeschwächt bei der Annahme eines wesentlich früheren Auftretens der ccr5Δ32-Variante, wie es die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse plausibel erscheinen lassen. Der Effekt einer genetischen Drift als Ursache der heute und bereits in historischen Populationen zu beobachtenden Häufigkeit von ccr5Δ32 in Europa wurde in den bisher publizierten Studien möglicherweise unterschätzt und sollte als Hypothese eine Aufwertung erfahren.

5.1.3.2 Interregionaler Vergleich

Fragestellung: Untersucht wird im folgenden, ob sich der heute deutlich ausgeprägte Nordost-Südwest-Gradient der Verteilung der ccr5Δ32-Variante innerhalb Europas (z.B. Martinson et al. 1997, Libert et al. 1998, Stephens et al. 1998, Lucotte & Dieterlen 2003 vgl. Abb. 44) bereits in historischen Bevölkerungen nachweisen läßt.

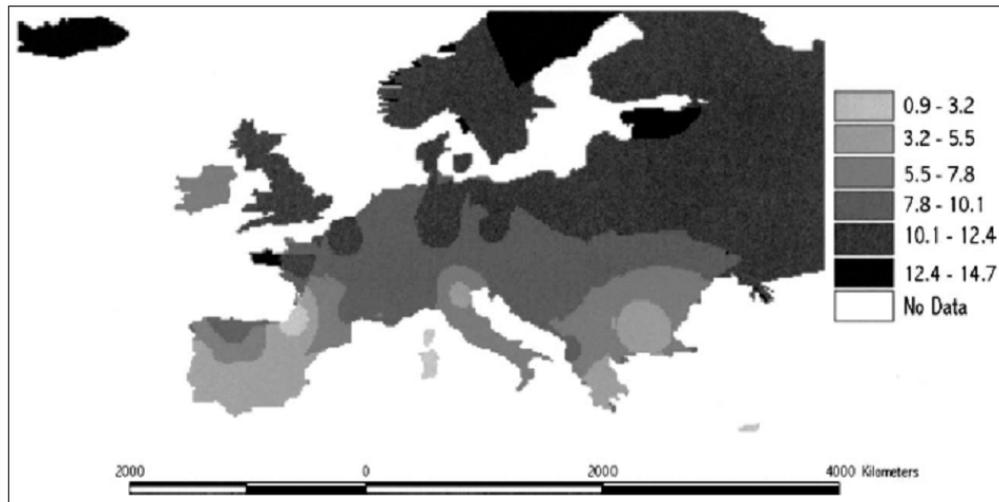


Abb. 44 Heutige Verteilung der $ccr5\Delta32$ -Variante (Allelfrequenzen in %) in Europa (Abb. aus Lucotte & Dieterlen 2003). In der Grafik sind die Daten aus verschiedenen Publikationen zusammengefasst (Martinson et al. 1997, Christodoulou et al. 1997, Libert et al. 1998, Lucotte & Mercier 1998, Stephens et al. 1998, Voevodin et al. 1998, Alvarez et al. 1998, Zamarchi et al. 1999, Battiloro et al. 2000, Ruiz et al. 2001, Dean et al. 2002).

Könnte ein historischer Gradient nachgewiesen werden, wäre dies ein weiterer Indikator für eine wesentlich frühere Entstehung und Verbreitung der Mutation als von Klitz (vor 700 – 1000 Jahren) und Stephens (vor 1.875 Jahren) angenommen.

Proben: In die Untersuchung wurden 19 Individuen eines sizilianischen Skelettkollektivs aus Alia (1837) einbezogen, für welche $ccr5$ -fingerprint-Typisierungen vorgenommen und diese mit den Daten der frühneuzeitlichen Individuen (Kapitel 5.1.3.1, Tab. 35) aus Deutschland (Goslar) verglichen wurden. Für Alia, ein Dorf in Sizilien (nahe Palermo), ist für das Jahr 1837 eine Choleraepidemie im Kirchenbuch des Ortes dokumentiert. Innerhalb von fünf Monaten wurden 306 Todesfälle offiziell registriert. Die Toten wurden gemeinsam in einer Höhle (Camposanto vecchio) und mit Branntkalk bedeckt bestattet. Dieses Skelettkollektiv ist etwa zeitstellungsgleich mit der frühneuzeitlichen Serie Goslar/Rammelsberg und dient als südlicher Punkt des zu überprüfenden $ccr5\Delta32$ -Gradienten.

Ergebnisse: In der historischen sizilianischen Stichprobe konnte bei einer von 19 Proben gesichert die $ccr5\Delta32$ -Variante nachgewiesen werden. Das entspräche bei einer Zufallstichprobe einer Allelfrequenz von 2,6%. Die Typisierungsergebnisse sind in Tab. 37 zusammengefasst.

Tab. 37 Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Proben aus Alia (Sizilien)

Probe	ccr5	Amelo	TPOX	D5S818	TH01	VWA
AL 3	wt	XY	8/11	12/13	9/-	16/18
AL 5	wt	XY	8/9	10/12	9/9.3	16/18
AL 7	wt	XY	8/-	11/-	6/8	15/17
AL 11	wt	XY	8/11	13/-	6/9	18/-
AL 12	wt	XX	8/11	12/-	6/8	16/18
AL 13	wt	XY	8/11	12/13	6/-	14/16
AL 23	wt	XY	8/10	10/11	6/9	17/-
AL 24	wt/ Δ 32	XY	12/-	11/-	8/-	-/-
AL 25	wt	XX	8/11	11/-	6/-	-/-
AL 26	wt	XY	8/-	11/12	8/-	17/-
AL 55	wt	XY	8/9	10/12	7/8	15/18
AL 59	wt	XY	8/-	11/-	6/9.3	18/-
AL 60	wt	XY	9/11	11/13	9.3/-	16/18
AL 63	wt	XX	10/-	12/-	-/-	-/-
AL 72	wt	XY	8/-	12/-	-/-	20/-
AL 75	wt	XY	-/-	12/-	8/-	20/-
AL 80	wt	XY	8/-	11/13	6/8	17/-
AL 87	wt	XX	8/10	11/-	9.3	16/18
AL 90	wt	XX	8/-	12/-	8/9.3	-/-

Amelo: Amelogenin-Gen, wt: Wildtypallel, nicht deletierte Variante des ccr5 Gens, Δ 32: ccr5 Δ 32-Variante, 32 bp Deletion gegenüber dem Wildtyp.

Diskussion: Für die Individuen aus Alia konnten zwar bislang keine verwandtschaftlichen Beziehungen belegt werden, doch sind solche für eine kleine Dorfgemeinschaft anzunehmen, weshalb auch in diesem Fall die Allelfrequenz nur die Größenordnung des Auftretens der Mutation beschreiben kann. Der für das Skelettkollektiv Alia errechneten Allelfrequenz für die ccr5 Δ 32-Variante von 2,6% steht eine Häufigkeit des mutierten Allels von 19,4% etwa zeitgleich in Goslar (Kapitel 5.1.3.1) gegenüber.

Die erhobenen Daten aus beiden historischen Populationen zeigen bereits den Trend des heute zu beobachtenden Verteilungsgradienten des ccr5 Δ 32-Allels und machen damit ebenfalls eine erst kürzliche Entstehung und Verbreitung dieser Mutation unwahrscheinlich.

5.1.4 Sequenzierung von ccr5-Allelen aus historischen Proben

Fragestellung und Proben: Um nachzuweisen, daß mit der ccr5-fingerprint-Multiplex-PCR tatsächlich das ccr5-Gen in historischen Individuen nachgewiesen wird, wurde die ccr5 Δ 32-Variante aus einigen DNA-Extrakten sequenziert (zur Durchführung vgl. Kapitel 2.2.4.6). Hierzu wurden zwei rezent und zwei bronzezeitliche Proben aus der Lichtensteinhöhle (vgl. Kapitel 5.1.3.1) analysiert. Aus einer weiteren Rezentprobe wurde das Wildtypallel sequenziert. Die Proben sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 38 Proben für die Sequenzierung des ccr5 bzw. ccr5 Δ 32-Allels

Probe	Zeitstellung	ccr5-Genotyp	sequenziertes Allel
DS	rezent	wt/wt	wt
BH	rezent	Δ 32/wt	Δ 32
Opp	rezent	Δ 32/ Δ 32	Δ 32
Do 902	bronzezeitlich	Δ 32/wt	Δ 32
Do 3742	bronzezeitlich	Δ 32/wt	Δ 32

wt: Wildtypallel, nicht deletierte Variante des ccr5 Gens, Δ 32: ccr5 Δ 32-Variante, 32 bp Deletion gegenüber dem Wildtyp.

Ergebnisse: Die ccr5 Δ 32-Variante konnte aus den beiden Rezentproben (BH und Opp) und den beiden bronzezeitlichen Proben (Do 902 und Do 3742) sequenziert werden. Das Wildtypallel wurde aus einer weiteren Rezentprobe (DS) analysiert. Die Sequenzdaten aller Proben wurden mit den publizierten Allelen verglichen (Wildtyp: GenBank Accessionnummer U95626, ccr5 Δ 32: GenBank Accessionnummer AF052244). Dieses Alignment, das auch die verwendeten PCR-Primer beinhaltet, ist in folgender Abbildung dargestellt:

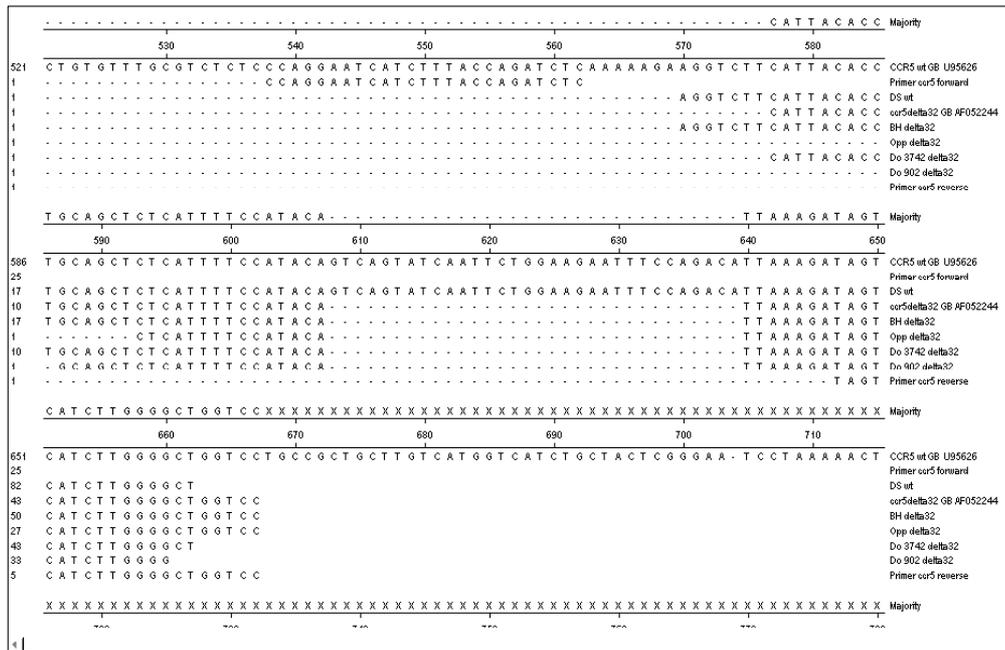


Abb. 45 Alignment der sequenzierten Allele mit den Referenzallelen für *ccr5* aus GenBank. wt: Wildtypallel, nicht deletierte Variante des *ccr5* Gens, *delta32*: *ccr5Δ32*-Variante, 32 bp Deletion gegenüber dem Wildtyp. Rezente Proben: DS, BH, Opp. Bronzezeitliche Proben: Do 902, Do 3742. Die mit – dargestellte Region im mittleren Fenster entspricht der 32 bp Deletion der *ccr5Δ32*-Variante.

Sowohl die Daten aus den Rezentproben als auch aus den prähistorischen Skelettelementen zeigen Übereinstimmung mit den publizierten Daten. Dieses Ergebnis belegt, daß wirklich die *ccr5Δ32*-Variante und kein zufällig längengleiches Artefakt, z.B. eine völlig anders lokalisierte Sequenz, durch die hier durchgeführten Analysen nachgewiesen wurde.

5.2 Entwicklung von Analysesystemen für die Prüfung der Hypothese eines singulären Ursprungs der *ccr5Δ32*-Variante

Da die in der *ccr5Δ32*-Variante deletierte Region beidseitig von einer 10 bp-Sequenz gleichen Aufbaus flankiert wird, entsteht eine Art Sollbruchstelle, die ein zur Deletion von 32 bp führendes Rekombinationsereignis fördert (Samson et al. 1996). Daher muß grundsätzlich von der Möglichkeit ausgegangen werden, daß diese Deletion mehrfach unabhängig voneinander entstanden sein kann, was die Interpretationen bezüglich des heutigen Verbreitungsmusters der

Genvariante beeinflusst. Diese Frage kann durch direkte Analyse genetischer Marker historischer Individuen geklärt werden.

5.2.1 Molekulargenetische Marker zur Prüfung auf ein singuläres Mutationsereignis für $ccr5\Delta32$

Die Studien, die sich mit der Berechnung des erstmaligen Auftretens der $ccr5\Delta32$ -Variante beschäftigen (Libert et al. 1998, Stephens et al. 1998, Klitz et al. 2001), versuchen auch zu ermitteln, ob es sich bei der Entstehung der Genvariante um ein singuläres Mutationsereignis gehandelt hat. Dies geschieht über STR-Linkageanalysen (Untersuchung von STRs in räumlicher Nähe zum mutierten Gen) an rezenten Bevölkerungen und dem Versuch der Identifizierung eines *ancient* Haplotypen, um gegebenenfalls *das* Chromosom 3 genetisch charakterisieren zu können, auf dem das Mutationsereignis eintrat. Es ist aufgrund der bislang publizierten STR-Linkagestudien als wahrscheinlich anzusehen, daß die $ccr5\Delta32$ -Variante tatsächlich genau ein Mal entstanden ist, eine weitere Absicherung dieser Hypothese soll durch DNA-Analysen an historischem Skelettmaterial geschehen (Kapitel 5.2.3).

Ccr5-gelinkte STRs, für die bestimmte Allelkombinationen mit der $ccr5\Delta32$ -Variante korrelieren und einen Haplotypen bilden, wurden bislang von Libert et al. 1998, Klitz et al. 2001 und Stephens et al. 1998 veröffentlicht, die für ihre Untersuchungen an rezenten Populationen verschieden weit vom $ccr5$ -Gen lokalisierte Marker benutzen.

Libert et al. 1998 untersuchen die Dinukleotidrepeats IRI3.1 (systematischer Name: D3S4579) and IRI3.2 (systematischer Name: D3S4580), 11 kb *upstream* and 68 kb *downstream* des $ccr5$ -Gens. In dieser Studie wird beobachtet, daß in den untersuchten Systemen IRI3.1 und IRI3.2 jeweils ein bestimmtes Allel, es wird von den Autoren Allel „0“ benannt, mit dem Auftreten der $ccr5\Delta32$ -Variante assoziiert ist. Dieses Allel „0“ im System IRI3.1 wird bei 49% der $ccr5/\Delta ccr5$ -Individuen und 96,6% der $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ -Individuen nachgewiesen. Allel „0“ im STR IRI3.2 findet man bei 52,6% der $ccr5/\Delta ccr5$ -Individuen und 88,5% der $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ -Individuen. Die Korrelation ist etwas

niedriger als bei IRI3.1, was mit der erhöhten *crossing over*-Rate bei diesem weiter vom $ccr5$ -Locus entfernten Allel erklärt werden kann. Der gefundene Haplotyp besteht demnach aus $ccr5\Delta32$ - IRI3.1 Allel 0 - IRI3.2 Allel 0.

Stephens et al. 1998 finden für die Systeme GAAT12D11 (Tetranukleotidrepeat, im folgenden GAAT abgekürzt) und AFMB362wb9 (Dinukleotidrepeat, im folgenden AFMB abgekürzt) mit den kartierten Distanzen CCR5-(0.8 cR)-GAAT-(2.7 cR)-AFMB ein starkes Kopplungsungleichgewicht zum $ccr5$ -Locus. In der Stephen'schen Studie wird zudem die Korrelation zwischen dem Auftreten der $ccr5\Delta32$ -Variante und bestimmten Allelausprägungen in den Systemen GAAT - AFMB beschrieben. Von den untersuchten $ccr5\Delta32$ -tragenden Abschnitten auf Chromosom 3 zeigten 84,8% für die untersuchten STRs die Allelkombination GAAT-AFMB: 197bp-215bp, die daher als *ancient* Haplotyp postuliert wird. Diese STR-Allelkombination wiesen ebenfalls 36,6% der 146 untersuchten $ccr5$ -Wildtypallele auf, was durch eine relativ hohe *crossing over*-Rate für diese beiden recht weit vom $ccr5$ -Gen entfernten STRs erklärt werden kann (vgl. Abb. 46).

Klitz et al. 2001 identifizieren einen sechs-Locus-Haplotypen, bestehend aus $ccr5$, IRI3.1, IRI3.2, AFMB, CCR2 und D3S2420. Auch hier zeigen sich deutliche Kopplungsungleichgewichte (D) zwischen bestimmten Allelen der untersuchten STRs und der 32-bp Deletion des $ccr5$ Gens: AFMB - $ccr5\Delta32$ (D = 0,91), IRI3.1 - $ccr5\Delta32$ (D = 0,79) und IRI3.2 - $ccr5\Delta32$ (D = 0,71). Die weiteren Kopplungen fielen niedriger aus.

Die Ergebnisse der Studien lassen demnach eine Haplotypenanalyse bestehend aus den Markern $ccr5\Delta32$ und den STRs IRI3.1, IRI3.2, GAAT und AFMB am aussagekräftigsten für eine STR-Linkage-Studie an historischem Skelettmaterial erscheinen. Eine Umrechnung der in den Literatur veröffentlichten Einheiten der Entfernungen dieser STRs zu $ccr5$ ($1\text{ cM} \approx 1\text{ Mb}$, $1\text{ cM} = 3.76\text{ cR}$ (Stephens et al. 1998)) und Visualisierung der Lokalisierung dieser Marker ergibt folgendes Bild:

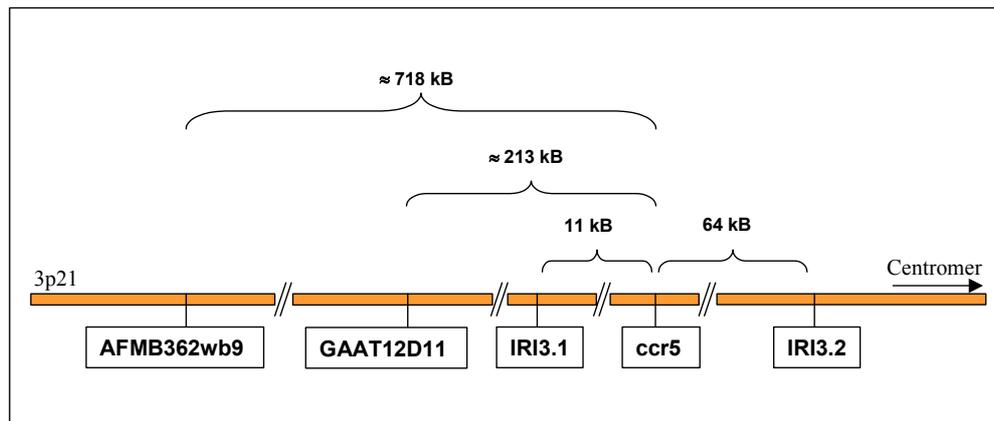


Abb. 46 Schema der genomischen Organisation des $ccr5$ -Gens und der ausgewählten $ccr5$ -gelinkten STRs auf Chromosom 3p21. Abbildung nicht maßstabsgerecht, durch Unterbrechungen auf dem DNA-Strang symbolisiert. Die Abstände der einzelnen STRs zu $ccr5$ sind in Kilobasen (kb) angegeben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Multiplex-PCR-System für die simultane Analyse des $ccr5$ -Gens mit den STRs IRI3.1, IRI3.2, GAAT und AFMB entwickelt (Primersequenzen und Reaktionsparameter sind in Kapitel 2.2.4.5 dargestellt). Das System sollte hier exemplarisch erprobt und für weiterführende Arbeiten bereitgestellt werden, um dort systematisch zur Prüfung der Hypothese eines gemeinsamen Ursprungs aller $ccr5\Delta32$ -Varianten auf historische Proben angewendet zu werden (Bertermann 2004, Ancillotti Perilli 2004).

Die Entwicklung der hier angestrebten Multiplex-PCR war dadurch erschwert, daß keine Referenzallele für die publizierten *ancient* Haplotypen bekannt waren. Es ist aufgrund unzureichender Datenpublikation nicht einmal völlig gesichert, ob in unterschiedlichen Studien, die sich den gleichen STRs widmen, die gleichen Allele als korreliert mit $ccr5\Delta32$ gefunden wurden. Durch diesen Datenmangel konnte auch der Größenbereich der Systeme nicht genau berechnet werden. Um dennoch zu gewährleisten, daß sich der (nur ungefähr abschätzbare) Allelrange benachbarter STRs keinesfalls überlappt, mußten beim Primerdesign relativ große Abstände zwischen den einzelnen Systemen eingehalten werden.

5.2.2 Untersuchungen von rezenter Individuen

Fragestellung und Proben: Die Ausbalancierung der Primeremengen der Multiplex-PCR und die Etablierung der PCR-Parameter wie Annealtemperatur (vgl. Kapitel 2.2.4.5) erfolgte an rezenter Proben (Mundschleimhautabstriche, vgl. Kapitel 2.2.2).

Ergebnisse: Die ursprünglich als Pentaplex-PCR geplante Koamplifikation des *ccr5*-Gens mit vier gekoppelten STRs wurde aufgrund der Entstehung unspezifischer Produkte aufgegeben und statt dessen in zwei Triplex-Reaktionen durchgeführt. Diese beinhalten jeweils den Nachweis des *ccr5*-Locus und (Triplex A) die Systeme IRI3.1 und IRI3.2 aus Libert et al. 1998 sowie (Triplex B) die Systeme GAAT12D11 und AFMB362wb9 aus Stephens et al. 1998. Die Dinukleotidrepeatsysteme IRI3.1 und IRI3.2 zeigen deutliche Stotterartefakte (Abb. Abb. 47), die durch Absenken der Elongations-temperatur (vgl. Kapitel 2.2.4.5) reduziert, jedoch nicht völlig ausgeschaltet werden konnten. Dies bedeutet für die Amplifikation historischer Proben, daß für die Gewinnung sicherer Ergebnisse stringente Kriterien zur Reproduktion angelegt werden müssen.

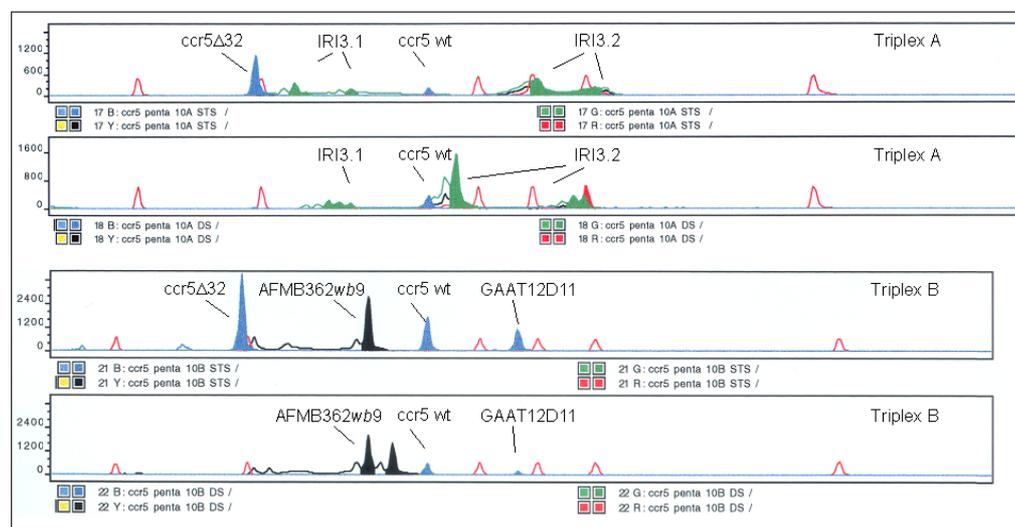


Abb. 47 Elektropherogramm von PCR-Produkten zweier rezenter Individuen, die mit den Triplexen A (*ccr5*, IRI3.1, IRI3.2) und B (*ccr5*, AFMB362wb9, GAAT12D11, vgl. Kapitel 2.2.4.5) gewonnen wurden. In den oberen beiden Spuren ist erkennbar, daß trotz der Herabsetzung der Elongationstemperatur für Triplex A (Kapitel 2.2.4.5, Einstellung der PCR-Parameter) Stotterartefakte das Erscheinungsbild der Systeme IRI3.1 und IRI3.2 bestimmen.

Der ccr5 Δ 32-*ancient* Haplotyp wird in an dieses Kapitel thematisch anschließenden Diplomarbeiten mit den hier entwickelten Systemen (Bertermann 2004, Ancillotti Perilli 2004) bestimmt werden.

5.2.3 Untersuchungen von archäologischen Proben

Fragestellung und Proben: Für die ccr5 Δ 32 Variante wird ein singuläres Mutationsereignis angenommen. Dies wird durch Studien an rezenten Populationen gestützt (Kapitel 5.2.1), deren Ergebnisse zur Postulierung eines *ancient* Haplotyps führen. Dieser besteht aus der ccr5 Δ 32-Variante und bestimmten Allelen in den flankierenden STRs IRI3.1, IRI3.2, GAAT und AFMB. Eine deutliche Unterstützung würde diese Hypothese erfahren, wenn in (prä)historischen Bevölkerungen dieser Haplotyp ebenfalls mit vergleichbaren oder höheren Häufigkeiten wie heute gefunden würde. Bei Unterrepräsentanz dieses Haplotypen beispielsweise in Verbindung mit der Überrepräsentanz eines völlig anderen in historischen Bevölkerungen läge ein Hinweis bezüglich einer Überarbeitung der Hypothese des singulären Ursprungs der Mutation vor. Darüber hinaus würde bei Nachweis des postulierten *ancient* Haplotypen in historischen Bevölkerungen ein Vergleich zur Häufigkeit seines Auftretens in heutigen Bevölkerungen möglich sein und einen weiteren Anhaltspunkt für eine Abschätzung des Alters der Mutation geben.

Der experimentelle Ansatz, die aus Untersuchungen moderner Bevölkerungen heraus aufgestellten Hypothesen direkt an historischem und prähistorischem Skelettmaterial zu überprüfen, sollte im Hinblick auf die aus den rezenten Daten der Studien von Libert et al. 1998, Klitz et al. 2001 und Stephens et al. 1998 formulierten *ancient* Haplotypen, umgesetzt werden. Dazu soll das neu entwickelte ccr5-linked-STR-System auf historische Proben aus der Lichtensteinhöhle (vgl. Kapitel 3.1) und Goslar/Rammelsberg (vgl. Kapitel 3.2) angewendet werden (Bertermann 2004, Ancillotti Perilli 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur exemplarisch Amplifikationen mit DNA-Extrakten prähistorischer Individuen aus der Lichtensteinhöhle vorgenommen, um das neu entwickelte Analysesystem für die Anwendung auf

degradierte DNA zu optimieren und seine Eignung für die geplanten Anschlußvorhaben zu gewährleisten.

Ergebnisse: Das Analysesystem konnte ohne Schwierigkeiten auf die Untersuchung degradierter DNA übertragen werden. Elektropherogramme, die entsprechende Amplifikationsprodukte für eine bronzzeitliche Probe zeigen, sind in Abb. 48 dargestellt.

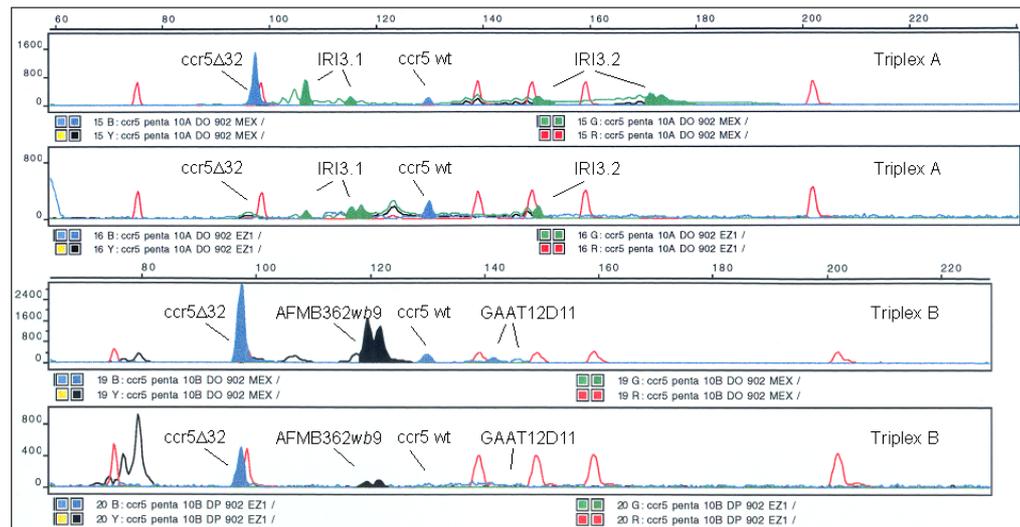


Abb. 48 Elektropherogramm von PCR-Produkten einer bronzzeitlichen Probe (amplifiziert aus zwei Extrakten), die mit den Triples A ($ccr5$, IRI3.1, IRI3.2) und B ($ccr5$, AFMB362wb9, GAAT12D11, vgl. Kapitel 2.2.4.5) gewonnen wurden. Die jeweils untere Probe (gleiches Individuum, anderer DNA-Extrakt) zeigt schwächere Amplifikationsprodukte sowie *allelic dropout*-Phänomene.

Der $ccr5$ -Locus und die avisierten gelinkten STRs konnten erfolgreich aus bronzzeitlicher DNA amplifiziert werden. Das Analysesystem erwies sich als tauglich zur Typisierung degradierter DNA und wurde in den Anschlußvorhaben zur Prüfung Hypothesen zum Ursprung der $cc5\Delta32$ -Variante durch Untersuchung der historischen Häufigkeit des *ancient* Haplotypen zu Verfügung verwendet (Bertermann 2004, Ancillotti Perilli 2004).

5.3 Entwicklung eines Analysesystems für die Prüfung von Hypothesen zu ABO-Blutgruppenverteilungsunterschieden

Als Ursache für die weltweit sehr unterschiedliche Distribution der einzelnen ABO-Blutgruppen werden neben Ereignissen wie *bottleneck*-Situationen oder *founder*-Effekten auch Krankheiten diskutiert, die den Reproduktionserfolg eines Individuums beeinflussen. aDNA Analysen bieten eine einzigartige Möglichkeit, konkrete Hypothesen, wie z.B. die Benachteiligung der Träger einer Blutgruppe bei bestimmten Infektionskrankheiten, wie Pest oder Cholera, direkt an historischem Skelettmaterial zu überprüfen.

5.3.1 Molekulargenetischer Nachweis von ABO-Blutgruppen-Allelen

Bevor die Genetik der ABO-Blutgruppen bekannt war, wurden die für Blut rezenter Individuen etablierten serologischen Tests auf archäologische Materialien wie Mumien- und Knochengewebe angewendet (z.B. Boyd & Boyd 1933, Kirst et al. 1971, Borgognini-Tarli 1980). Es zeigte sich jedoch, daß diese Methode auf stark degradierte biologische Materialien wie Knochen nicht anwendbar ist. In das Skelett eingewanderte Mikroorganismen können den ABO-Antigenen chemisch ähnelnde Stoffe abgeben, die zu falschen Resultaten beim serologischen Test führen (z.B. Berg et al. 1983).

Im Jahre 1990 veröffentlichte Yamamoto et al. 1990 die genetischen Marker, welche die humanen ABO-Blutgruppen determinieren. Die ABO-Gene befinden sich auf Chromosom 9q34, bestehen aus mindestens sieben Exons mit einer codierenden Region von über 18 kb genomischer DNA. Mit Entdeckung der genetischen Hintergründe der ABO-Blutgruppen durch Yamamoto und weiteren Studien (z.B. Lee & Chang 1992, Grunnet et al. 1994, Fukumori et al. 1995, Nishimukai et al. 1996, Ringel et al. 2000, Yip 2002) wird eine genetische Charakterisierung der ABO-Eigenschaften an archäologischem Material und eine Loslösung von serologischen Tests für Untersuchungen möglich. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde ein PCR-RFLP-basiertes

Analysesystem zur molekulargenetischen Typisierung von ABO-Blutgruppen für degradierte DNA etabliert und auf Individuen historischer Bevölkerungen angewendet (Kapitel 5.3.3). Auch hier sollte, um auch Analysen aus stärker degradierter DNA zu ermöglichen, mit möglichst kurzen Produktlängen gearbeitet werden.

Das Analysesystem sollte eine Typisierung der häufigen ABO-Varianten A₁, B₁, O₁ und O_{1v} erlauben (vgl. auch Hummel et al. 2002b). Darüber hinaus sollte die seltenere Blutgruppe O₂ determinierbar sein, die sich nur geringfügig von B₁ unterscheidet, um Fehlbestimmungen von O-Allelen als B zu vermeiden. Hintergrund hierfür ist, daß einige Studien bezüglich der differentiellen Anfälligkeit der Träger verschiedener Blutgruppen gegenüber Infektionskrankheiten (z.B. Cholera) ein erhöhtes Risiko für schwere Erkrankungen für Blutgruppe O-Individuen finden. Will man diese Hypothesen an historischen Bevölkerungen überprüfen (z.B. Hummel et al. 2002a), muß gewährleistet sein, daß die Träger dieser Eigenschaft sicher erkannt werden. Die meisten O-Varianten (hier O₁ und O_{1v}) sind beispielsweise durch eine Deletion einer Base an Nukleotidposition 261 des Exon 6 charakterisiert. Dagegen können B₁-Allele durch einen von anderen Blutgruppen abweichenden Basenaustausch an Position 796 des Exon 7 bestimmt werden (vgl. Tab. 39). Die an den untersuchten Stellen auftretenden Sequenzpolymorphismen können durch kommerziell erhältliche Restriktionsenzyme differentiell geschnitten werden. Die Lokalisierung der untersuchten Nukleotidpositionen, ihre Ausprägung für verschiedene Blutgruppen und die geeigneten Endonukleasen zum Nachweis von Sequenzvariationen sind in Tab. 39 zusammengefaßt.

Tab. 39 Untersuchte Nukleotidpositionen zur Diskriminierung von ABO-Allelen, Längen der generierten PCR-Produkte und allelspezifische RFLP-Produktlängen

Chromosom 9		Exon 6		Exon 7	
PCR Produktlänge		103/104 bp		64 bp	
Restriktionsenzym		Rsa I	HpyCH4IV	Nla III	Mnl I
RFLP Produktlänge		66+37 bp	73/72+31 bp	37+27 bp	42/41+23/22 bp
untersuchte np		np 261	np 297	np 796	np 802
Allele ¹	A ₁	G	A	C	G
	B ₁	G	G	A	G
	O ₁	del	A	C	G
	O _{1v}	del	G	C	G
	O ₂	G	G	C	A

¹ Allelnomenklatur nach Nishimukai et al. 1996. np: Nukleotidposition. bp: Basenpaare. del: Deletion. Die Felder mit fettem Schrifttyp zeigen die Sequenzvarianten an, die mit dem darüber notierten Restriktionsenzym geschnitten werden. Tabelle verändert nach Hummel et al. 2002b. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind in Kapitel 2.2.8 aufgeführt.

Die häufigsten in Europa auftretenden ABO-Genotypen sind mit der Amplifikation und restriktionsenzymatischen Aufarbeitung des Exon 6 Amplifikates bereits zu trennen (Tab. 40oben). Zu Typisierung der selteneren Allelkombinationen muß eine Analyse der Nukleotidpositionen 796 und 802 auf Exon 7 folgen. Die erwarteten Restriktionsmuster sind in Tab. 40 dargestellt.

Tab. 40 Erwartete Restriktionsmuster für verschiedene ABO-Allelkombinationen

Phänotyp	Genotyp	Rsa I	HpyCH4IV	Nla III	Mnl I
A	AA	--	--	o	o
A	AO ₁	!-	--	o	o
O	O ₁ O ₁	!!	--	o	o
O	O ₁ O _{1v}	!!	!-	o	o
O	O _{1v} O _{1v}	!!	!!	o	o
A	AO ₂	--	!-	--	!-
AB	AB	--	!-	!-	--
O	O ₂ O ₂	--	!!	--	!!
B	BO ₂	--	!!	!-	!-
B	BB	--	!!	!!	--
A	AO _{1v}	!-	!-	--	--
O	O ₁ O ₂	!-	!-	--	!-
B	BO ₁	!-	!-	!-	--
O	O _{1v} O ₂	!-	!!	--	!-
B	BO _{1v}	!-	!!	!-	--

-- : PCR-Produkt wird nicht geschnitten. !- : ein Allel des PCR-Produktes wird geschnitten, das andere nicht. !! : das PCR-Produkt wird vollständig geschnitten. o : Ergebnis wird zur Analyse nicht benötigt. Die oben abgesetzten Genotypen bestehen aus den in Europa am häufigsten auftretenden Allelen und können bereits durch die Analyse der auf Exon 6 lokalisierten Nukleotidpositionen durch Behandlung mit Rsa I und HpyCH4IV determiniert werden.

Da die publizierten Primer PCR-Produkte mit großen Fragmentlängen generieren, wurden die Primer mit Fokus auf eine Verkürzung der PCR-Produkte und damit einer Anpassung an die Erfordernisse der Untersuchung degradiertes DNA neu gestaltet. Die Entwicklung der Primer wurde unter Berücksichtigung der Anforderungen an die Amplifikation degradiertes DNA unter Zuhilfenahme der Software PrimerSelect™ (Lasergene) durchgeführt. Bei der Wahl der Primerbindungsstellen mußte beachtet werden, daß nur intendierte Restriktionsschnittstellen im PCR-Produkt enthalten sind. Die untersuchte Sequenzabweichung an Nukleotidposition 802 konnte nur mit einem Enzym (Mnl I) nachgewiesen werden, das jedoch eine sehr häufig im Genom vorkommende Erkennungssequenz (!NNNNNNGGAG) besitzt. Um ein PCR-Produkt zu generieren, das nur die gewünschte einzelne Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease einschließt, wurde der *forward* Primer gezielt am Ende einer unerwünschten Erkennungssequenz positioniert und durch Einbau

eines Mismatches in den *reverse* Primer eine weitere Restriktionsstelle maskiert (vgl. Abb. 49),

		np 779		np 796		np 802 np 803		np 829				
exon7partial_A.seq	CCAGTCCCAGGCCTACATCCC	AAGGACGAGGGCGATT	TCTACTACCT	GGGGGGGT	TCTT	CGGGGGGT	CGGT	GCAA	GAGGT	GCAGCGGCT		
exon7partial_B.SEQ	CCAGTCCCAGGCCTACATCCC	AAGGACGAGGGCGATT	TCTACTACCT	GGGGGGGT	TCTT	CGGGGGGT	CGGT	GCAA	GAGGT	GCAGCGGCT		
exon7partial_01.seq	CCAGTCCCAGGCCTACATCCC	AAGGACGAGGGCGATT	TCTACTACCT	GGGGGGGT	TCTT	CGGGGGGT	CGGT	GCAA	GAGGT	GCAGCGGCT		
exon7partial_01v.seq	CCAGTCCCAGGCCTACATCCC	AAGGACGAGGGCGATT	TCTACTACCT	GGGGGGGT	TCTT	CGGGGGGT	CGGT	GCAA	GAGGT	GCAGCGGCT		
exon7partial_02.SEQ	CCAGTCCCAGGCCTACATCCC	AAGGACGAGGGCGATT	TCTACTACCT	GGGGGGGT	TCTT	CGGGGGGT	CGGT	GCAA	GAGGT	GCAGCGGCT		
exon 7 primer_SEQ		AAGGACGAGGGCGATT	TCTA					GGT	CGGT	GCAA	GAGGT	GCAGC
Mnl I recognition sites		INNNNNNGAGG		INNNNNNGAGG		INNNNNNGAGG						
Nla III recognition site				CATG!								

Abb. 49 Alignment eines Exon7-Abschnittes verschiedener ABO-Allele, des Primers für das auf Exon 7 liegende PCR-Produkt und der darin enthaltenen Erkennungssequenzen für die Endonukleasen zum Nachweis von Basensubstitutionen an den Nukleotidpositionen 796 und 802. !: Symbol für den „Schnitt“ des Enzyms. Zwei nicht intendierte Schnitte mit Mnl I werden vermieden, indem der *forward* Primer (links) genau an der potentiell zu schneidenden Base terminiert und in den *reverse* Primer an Position 829 ein Mismatch eingeführt wurde, das die Erkennungssequenz für Mnl I maskiert.

Besondere Beachtung wurde ebenfalls der Vermeidung von Dimer- und Hairpinstrukturen geschenkt, damit im zweiten Analyseschritt (RFLP, vgl. Kapitel 2.2.8) keine Artefakte die Analyse behindern. Die für die Untersuchung ausgewählten Marker wurden in zwei Singleplex-PCR-Ansätzen amplifiziert.

Es wurden zwei Primersysteme für Singleplex-Amplifikationen etabliert. Primersystem Ex6 schließt die untersuchten Nukleotidpositionen 261 und 297 auf Exon 6 ein, Primersystem Ex7 amplifiziert die auf dem Exon 7 liegenden Positionen 796 und 802. Die amplifizierten Produktlängen betragen 103/104 bp bzw. 64 bp und werden damit den Anforderungen an die Typisierung auch degradierter DNA gerecht.

5.3.1.1 Generierung eines genetischen Fingerabdruckes zur Authentizitätssicherung

Für alle untersuchten archäologischen Proben wurde zusätzlich zur ABO-Multiplex-Typisierung ein individualspezifischer genetischer Fingerabdruck generiert und diese Daten mit denen aus früheren Publikationen (Schultes 2000, Bramanti 2000) verglichen, um die Authentizität des Ergebnisses sicherzustellen. Hierzu wurde der AmpFISTR Profiler Plus PCR Amplification Kit

(Applied Biosystems) verwendet, der eine Simultanamplifikation von neun autosomalen STRs und Amelogenin ermöglicht.

5.3.2 Untersuchungen von rezenten Individuen

Fragestellung und Proben: Für die Etablierung der ABO-Genotypisierungssysteme wurde DNA (Speichelextrakte (vgl. Tab. 41) von zwölf rezenten Individuen mit bekannter phänotypischer Blutgruppe verwendet.

Ergebnisse: Die beobachteten Längen der RFLP-Produkte entsprachen den Voraussagen und ließen eine eindeutige Bestimmung der ABO-Blutgruppenallele zu. Diese Genotypisierungen standen in vollem Einklang mit den serologisch ermittelten Daten der Probanden. Die Typisierungsergebnisse der Rezentproben sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 41 ABO-Genotypisierungsergebnisse für die untersuchten rezenten Kontrollproben

Probe	Phänotyp*	Ergebnis der Restriktionsanalyse				Genotyp**
		Rsa I	HpyCH4IV	Nla III	Mnl I	
1	A	! -	--	-- (o)	-- (o)	A O ₁
2	A	! -	--	-- (o)	-- (o)	A O ₁
3	A	--	--	-- (o)	-- (o)	AA
4	B	--	!!	!!	--	BB
5	B	! -	! -	! -	--	B O ₁
6	AB	--	! -	! -	--	AB
7	AB	--	! -	! -	--	AB
8	O	!!	--	-- (o)	-- (o)	O ₁ O ₁
9	O	!!	--	-- (o)	-- (o)	O ₁ O ₁
10	O	! -	!!	--	! -	O _{1v} O ₂
11	O	!!	! -	-- (o)	-- (o)	O ₁ O _{1v}
12	O	!!	!!	-- (o)	-- (o)	O _{1v} O _{1v}

* : vorher bekannt ** : durch diese Studie ermittelt -- : PCR-Produkt wird nicht geschnitten. ! - : ein Allel des PCR-Produktes wird geschnitten, das andere nicht. !! : Das PCR-Produkt wird vollständig geschnitten. (o) : Ergebnis wird zur Analyse nicht benötigt.

5.3.3 Untersuchungen von archäologischen Proben

Fragestellung und Proben: Nach der Etablierung des ABO-Analysesystems für rezente Kontrollproben sollte die Eignung des Systems für die Untersuchung von aDNA geprüft werden. Dazu wurden Typisierungen an sieben Proben aus der Lichtensteinhöhle (Fundnummern Do 1102, 1172, 124, 2388, 2589, 3742 und 3750, vgl. Kapitel 4.2.3.1) und acht Skeletten aus Goslar/Hinter den Brüdern (Fundnummern Gs 63, 67, 79, 84, 95, 96, 102 und 105, vgl. Kapitel 4.2.3.2) aus je zwei unabhängigen DNA-Extrakten durchgeführt. Um die Authentizität der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde aus jedem Extrakt ein genetischer Fingerabdruck ermittelt (5.3.1.1) und mit den molekulargenetischen Referenzdaten früherer Studien von Schultes 2000 und Bramanti 2000 und den Allelprofilen der Bearbeiter abgeglichen.

Ergebnisse: Die DNA aus Extrakten der untersuchten historischen Individuen konnte erfolgreich analysiert werden. In Abb. 50 sind die generierten PCR-Produkte dargestellt.

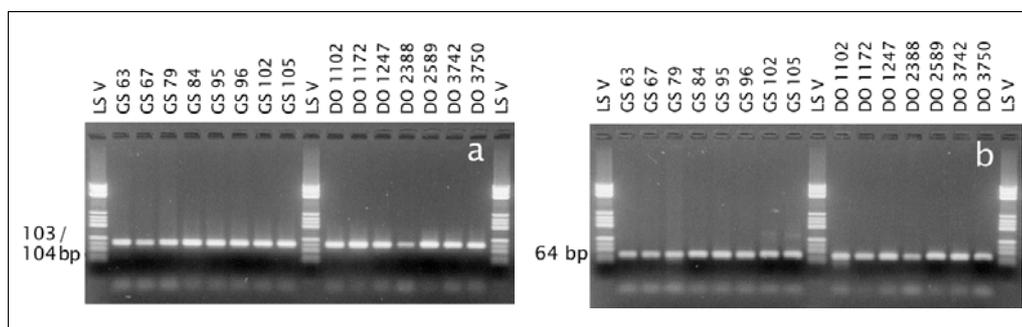


Abb. 50 ABO-Amplifikationsprodukte aus Extrakten der untersuchten historischen Individuen. **a** 103/104 bp lange PCR-Produkte, die mit dem Ex6 System gewonnen wurden. **b** 64 bp lange PCR-Produkte, die mit dem Ex7 System gewonnen wurden.

Durch die anschließende RFLP-Analyse der Amplikons (Abb. 51) konnte eine ABO-Genotypisierung durchgeführt werden (Tab. 42).

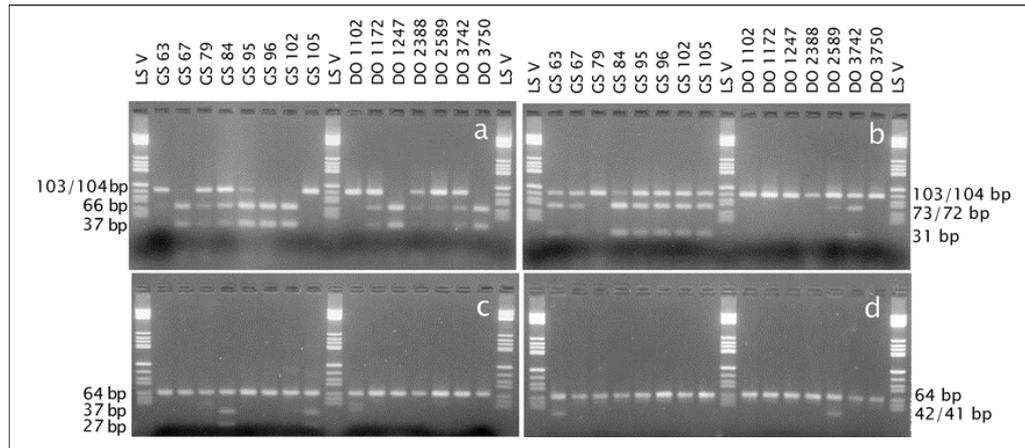


Abb. 51 RFLP Analyse der aus den historischen Proben gewonnenen ABO-Amplikons mit den Restriktionsenzymen **a** Rsa I, **b** HpyCH4IV, **c** Nla III, **d** Mnl I. Bei den Proben GS 79 und DO 1102 erschweren bereits während der PCR entstandene (vgl. Abb. 50) Primerdimere (Länge ca.50 bp) die Interpretation der Ergebnisse der Restriktionsanalyse, da sie von RFLP-Fragmenten schwer zu unterscheiden sind, wenn nicht, wie hier, die Analyse auf sehr hochauflösenden Gelen (z.B. 4,4%ige Agarosegele) stattfindet.

Die ABO-Typisierungsergebnisse für die archäologischen Proben sind in Tab. 42 zusammengefaßt.

Tab. 42 ABO-Genotypisierungsergebnisse für die untersuchten archäologischen Skelettproben aus der Lichtensteinhöhle und Goslar

Probe	Ergebnis der Restriktionsanalyse				Genotyp
	Rsa I	HpyCH4IV	Nla III	Mnl I	
GS 63	! -	! -	--	! -	O ₁ O ₂
GS 67	!!	! -	-- (o)	-- (o)	O ₁ O _{1v}
GS 79	! -	--	-- (o)	-- (o)	AO ₁
GS 84	! -	! -	! -	--	BO ₁
GS 95	! -	! -	--	--	AO _{1v}
GS 96	!!	! -	-- (o)	-- (o)	O ₁ O _{1v}
GS 102	!!	! -	-- (o)	-- (o)	O ₁ O _{1v}
GS 105	--	! -	! -	--	AB
DO 1102	--	--	-- (o)	-- (o)	AA
DO 1172	! -	--	-- (o)	-- (o)	AO ₁
DO 1247	!!	--	-- (o)	-- (o)	O ₁ O ₁
DO 2388	! -	--	-- (o)	-- (o)	AO ₁
DO 2589	! -	! -	--	! -	O ₁ O ₂
DO 3742	! -	! -	--	--	AO _{1v}
DO 3750	!!	--	-- (o)	-- (o)	O ₁ O ₁

-- : PCR-Produkt wird nicht geschnitten. ! - : ein Allel des PCR-Produktes wird geschnitten, das andere nicht. !! : Das PCR-Produkt wird vollständig geschnitten. (o) : Ergebnis wird zur Analyse nicht benötigt.

Diskussion: Das neu entwickelte ABO-Analysesystem ist aufgrund der sehr kurzen generierten Amplikons auch für degradierte DNA geeignet. Um Analyseartefakte, z.B. durch unspezifische Produkte, zu vermeiden, müssen stringente Reaktionsbedingungen (höchstmögliche Annealtemperatur) eingehalten werden.

Für die archäologischen Proben konnten erfolgreich und reproduzierbar ABO-Allele typisiert werden. Neben den häufigen Varianten A_1 , B_1 , O_1 und O_{1v} konnte in zwei Fällen das seltene O_2 -Allel nachgewiesen werden. Die Verteilung der Blutgruppen scheint ähnlich der heute in Deutschland vertretenen zu sein. Heute seltenere Allele finden sich auch in den (prä)historischen Proben nicht oft, was aufgrund der geringen Stichprobengröße jedoch nur als Trend zu werten ist.

Authentizitätssicherung: Die Ergebnisse der Analysen des genetischen Fingerabdruckes (die Reaktionsparameter sind in Kapitel 2.2.4.2 aufgeführt) der aDNA-Extrakte zur Prüfung auf etwaige Kontaminationen sind in der folgenden Tab. 43 zusammengefaßt.

Tab. 43 Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die untersuchten historischen Individuen aus der Lichtensteinhöhle und Goslar.

Probe	D3S1358	VWA	FGA	Amelo	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
GS 63	14/15	16/17	20/25	XY	12/13	30/30.2	12/-	9/11	12/14	10/-
Ref.	14/15	(16)/(17)	20/(25)	XY	12/13	(30.2)-	(12)-	9/11	12/(14)	10/10
GS 67	15/-	15/17	-/-	XY	10/13	29/33.2	-/-	13/-	12/-	-/-
Ref.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
GS 79	16/-	15/17	19/21	XX	12/15	29/31	-/-	10/-	-/-	-/-
Ref.	16/16	(15)/17	(19)/(21)	XX	12/15	29/31	-/-	10/10	-/-	-/-
GS 84	15/-	15/18	18/20	XY	13/-	29/30.2	16/22	12/-	11/12	12/-
Ref.	15/15	15/18	(18)/20	XY	13/13	29/30.2	(22)-	12/12	12/-	9/12
GS 95	17/-	16/17	22/24	XY	13/15	29/32.2	14/-	11/-	10/13	11/12
Ref.	17/17	16/17	(22)/24	XY	13/15	29/32.2	14/14	11/11	(10)/13	11/(12)
GS 96	15/17	14/19	22/24	XY	13/14	30/31.2	14/15	10/12	13/-	9/12
Ref.	15/17	14/19	22/(24)	XY	13/14	30/31.2	(14)/(15)	10/12	13/-	(9)-
GS 102	14/15	16/17	20/21	XY	11/14	29/30	15/-	9/12	-/-	12/-
Ref.	14/15	17/-	20/20	XY	11/14	29/30	-/-	9/12	-/-	12/12
GS 105	17/-	17/-	23.2/25	XY	11/14	30/-	12/17	11/-	10/-	8/13
Ref.	17/-	16/17	23.2/25	X(Y)	11/14	28/30	12/(17)	11/11	10/-	(8)-
DO 1102	15/16	16/17	20/21	XY	12/15	29/33.2	14/18	9/10	11/-	7/-
Ref.	15/16	16/16	20/21	XY	12/15	29/33.2	14/18	9/10	11/11	7/9
DO 1172	15/17	15/16	21/22/25	XY	12/13/15	33.2/-	-/-	10/12	11/-	-/-
Ref.	15/17	15/16	21/25	XY	12/13	30.2/33.2	-/-	10/12	11/-	8/-
DO 1247	15/16	17/18	22/25	XX	11/13	29/32.2	-/-	12/-	8/-	10/-
Ref.	15/16	17/-	22/-	XX	11/13	29/-	-/-	12/12	8/-	10/-
DO 2388	15/16	17/-	-/-	XX	13/15	30/33.2	-/-	9/11	-/-	-/-
Ref.	15/16	16/17	20/21	XX	13/-	30/33.2	15/-	11/-	11/11	10/-
DO 2589	15/-	-/-	22/-	XX	15/-	-/-	-/-	12/-	11/-	-/-
Ref.	15/16	14/15	22/24	XX	13/13	28/-	-/-	11/12	11/-	-/-
DO 3742	14/16	13/14	24/-	XX	13/-	29/-	12/-	10/13	-/-	-/-
Ref.	14/16	13/14	24/-	XX	13/-	29/32.2	12/15	10/13	8/10	9/10
DO 3750	16/18	17/-	21/23	XX	12/13	29/32.2	17/-	11/12	12/-	8/10
Ref.	16/18	17/-	21/23	XX	12/13	29/32.2	16/17	11/12	9/12	8/10

Ergebnis aus dieser Studie jeweils in der oberen Zeile, Referenzdaten (Ref.) aus früheren Publikationen (Schultes 2000 für Do und Bramanti 2000 für Gs) jeweils unten. Amelo: Amelogenin-Gen. (-): Allel konnte nicht vollständig reproduziert werden.

Die gefundenen Übereinstimmungen des genetischen Fingerabdruckes zwischen den neu erhobenen und den Referenzdaten sind deutlich. Darüber hinaus wurde ein Abgleich der Daten mit den genetischen Fingerabdrücken der Mitarbeiter des Instituts vorgenommen. Es konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden, die auf eine rezente Kontamination schließen lassen. Mit den gewonnenen STR-Typisierungsergebnissen wird auch die Authentizität der vorher aus denselben DNA-Extrakten der archäologischen Proben gewonnenen

ABO-Resultaten belegt. Dieses Verfahren stellt die beste Möglichkeit der Sicherung der Echtheit von aDNA-Ergebnissen dar, wenn, wie in diesem Fall, ein *a priori* nicht individualisierbarer Marker aufgrund differierender Analysestrategien nicht in ein STR-Fingerprint-System eingebettet werden kann (vgl. Kapitel 2.1.1).

6 Molekulargenetische Marker zur Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes

6.1 Entwicklung von Analysesystemen zur molekulargenetischen Identifikation von Haarfarbe und Hauttyp

Die in der forensischen Arbeit etablierte Untersuchung von autosomalen STRs, Y-STRs und mitochondrialer DNA zur Identifikation und Verwandtschaftsrekonstruktion geben (intendiert) nur sehr eingeschränkte Informationen über das Erscheinungsbild des Donors der untersuchten DNA (z.B. Bowcock et al. 1994, Lowe et al. 2001).

Sowohl bei der Aufklärung von Kriminalfällen, die ohne Augenzeugen verübt wurden, als auch bei Rekonstruktion des Aussehens skelettiert aufgefundener unbekannter Toter wäre jede Information bezüglich physischer Charakteristika wie z.B. Haarfarbe oder Hauttyp nützlich (Grimes et al. 2001), was ebenso für die Untersuchung von Skeletten im Rahmen bestimmter anthropologischer Fragestellungen gilt. Die Möglichkeit der Untersuchung genetischer Marker, die mit menschlichen Phänotypen assoziiert sind, würde hier neue Zugänge eröffnen und auch einen Beitrag zur Beantwortung der Frage nach dem Erscheinungsbild unserer Vorfahren leisten (vgl. Kapitel 1.3).

In diesem Zusammenhang gibt es bereits ein kommerzielles Kit der Firma DNAPrint genomics (USA, www.dnaprint.com), mit dem es möglich ist, die Augenfarbe eines Individuums auf Basis molekularer Daten festzustellen. Das Kit ist patentiert, die verwendeten Marker sind bislang nicht publiziert (vermutlich innerhalb der nächsten zwei Jahre, persönliche Kommunikation T.

Frudakis, Fa. DNAPrint), so daß diese Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet werden konnte.

6.1.1 Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes mit molekulargenetischen Markern

Der Fokus dieses Kapitels liegt auf der Evaluation der momentan verfügbaren Möglichkeit der Prognose der Haarfarbe und des Hauttyps eines Menschen aufgrund auf seiner DNA. Es soll ein Analysesystem entwickelt werden, das, auf historische Proben angewendet, Informationen über das äußere Erscheinungsbild unserer Vorfahren bereitstellt.

Obwohl die Umwelt, insbesondere in Form von Sonnenlicht (z.B. Tomita et al. 1986, Friedmann et al. 1990) und Vitaminzufuhr (Pavlovitch et al. 1982, Abdel-Malek et al. 1988), eine offensichtliche Rolle für die Hautpigmentierung spielt, zeigen die Unterschiede der Pigmentierung von Haut und Haar von Neugeborenen verschiedener Regionen der Welt, daß es eine genetische Komponente gibt, die zur Ausprägung von Pigmentationsunterschieden führt. Diese Diversität kann auf Unterschiede in der Anzahl, der Größe und Beschaffenheit der Melanosomen zurückgeführt werden (Szabo 1967, Toda et al. 1972). In diesen wird Melanin gebildet, das in zwei Hauptformen, dem braun/schwarzen Eumelanin und dem rot/gelben Phäomelanin auftritt (Thody et al. 1991). Die Melanosomen werden zunächst in den Melanozyten gebildet und dann in die Keratinozyten sekretiert, die sich in der Epidermis der Haut und im Haarschaft befinden (z.B. Rana 2003). Dort bewirken das Verhältnis Eumelanin/Phäomelanin, die Packart des Melanins in den Melanosomen sowie deren Anzahl eine charakteristische Pigmentierung, die lokal etwas verschieden sowie zeitlich variabel (Haarfarbe ändert sich im Verlauf der Zeit) sein kann (Rees 2003).

Um die genetischen Zusammenhänge zu verstehen, die zu den zu beobachtenden Pigmentierungsunterschieden von Menschen verschiedener Regionen der Welt führen, wurden bereits in den 1970er Jahren populationsgenetische Modelle entwickelt (Harrison & Owen 1964, Stern

1970), die die Beteiligung von mindestens drei genetischen Loci allein für die Diversität der Hautpigmentierung postulieren.

Am Tiermodell konnte gezeigt werden, daß bei Mäusen die Melaninsynthese im wesentlichen von zwei Genen kontrolliert wird: *Extension* und *Agouti*. *Extension* wird in den Melanozyten exprimiert und produziert den Rezeptor für das Melanozyten stimulierende Hormon (MSHR = Melanocortin-1 Rezeptor, *MC1R*). Dieser Rezeptor wirkt auf die Melanogenese über die Aktivierung von Adenylylzyklase und damit Erhöhung des cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) Levels und wird durch die Bindung von Melanozyten stimulierendem Hormon (α -MSH) sowie adrenocorticotropischem Hormon (ACTH) aktiviert (Miyata et al. 1982). Für das menschliche Genom wurde das zu *MC1R* homologe Gen identifiziert. Es wurde ein ähnlicher chemischer Mechanismus wie bei der Maus gefunden. Welche Art von Melanin in den humanen Melanosomen produziert wird, hängt von mehreren Faktoren ab. Obwohl die exakten Mechanismen noch der Klärung bedürfen, ist bekannt, daß die Verfügbarkeit von Sulfhydrylgruppen, Cystein und Gluthathion (Prota 1980, Hearing & Jimenez 1987) die Melanogenese beeinflusst. Durch die Bindung von α -MSH wird die Aktivität des Enzyms Tyrosinase reguliert, die beeinflusst, welche Art des Melanins gebildet wird (z.B. Aroca et al. 1993). Die genauen Zusammenhänge sind noch nicht geklärt, aber man kann sich vereinfacht einen biochemischen Schalter vorstellen, der über eine Signalkaskade aktiviert wird und bestimmt, in welchen Verhältnissen die beiden Varianten des Melanins gebildet werden. Ein vereinfachtes Schema dieser Zusammenhänge ist in Abb. 52 dargestellt.

Antagonistisch zu *Extension* wirkt *Agouti* (Lu et al. 1994), der als primärer Schalter von der Eumelanin- zur Phäomelaninsynthese fungiert (Kobayashi et al. 1995). Die Rolle des menschlichen *Agouti*-Homologes ist trotz erfolgreicher Klonierung des Gens bislang strittig (Voisey et al. 2001, Kanetsky et al. 2002), obwohl Experimente *in vitro* zeigen, daß *Agouti* antagonistisch zu *MC1R* wirkt (Yang et al. 1997) bzw. die Exprimierung anderer Gene, die einen Anteil an der Melaninsynthese haben, herunterreguliert (Voisey et al. 2003). Dennoch scheint sich jedoch abzuzeichnen, daß seine Bedeutung *in vivo* nicht der in Mäusen gleichkommt.

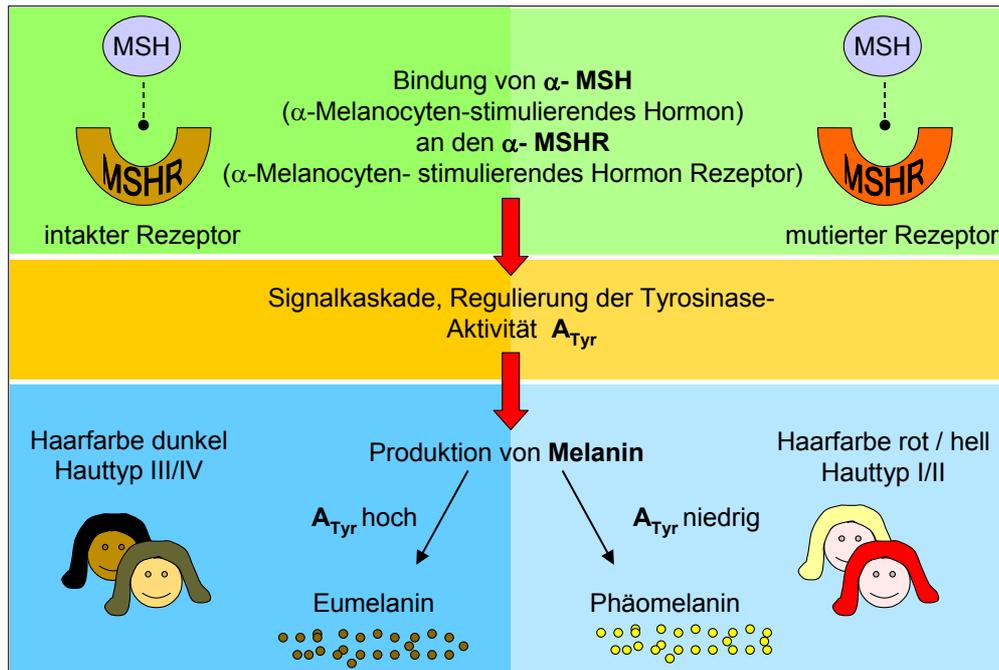


Abb. 52 Schema der Melaninbildung. In den menschlichen Melanozyten werden zwei Arten von Melanin gebildet: das schwarzbraune Eumelanin und das rötlichgelbe Phäomelanin. Eumelanin ist photoprotektiv, während Phäomelanin bei Bestrahlung mit UV-Licht freie Radikale bildet und daher zum Auftreten von UV-induzierten Hautschäden beitragen kann (Valverde et al. 1995). Individuen mit rotem Haar bilden hauptsächlich Phäomelanin in Haut und Haar oder/und haben eine verringerte Fähigkeit zur Bildung von Eumelanin, was die fehlende Bräunung ihrer Haut erklärt. Die Hauttypen (I-IV) sind nach der Fitzpatrick-Skala notiert (Fitzpatrick 1988): I: bei UV-Einwirkung immer Sonnenbrand, keine Bräunung, II: immer Sonnenbrand, bräunt leicht nach einmaliger und mehrmaliger UV-Exposition, III: selten Sonnenbrand, gute Bräunung, IV: kein Sonnenbrand, tiefe Bräunung.

Das Schema zeigt stark vereinfacht den grundsätzlichen Mechanismus der Regulierung zwischen der Produktion von Eumelanin und Phäomelanin in den Melanosomen der Melanozyten. Einer der Regulatoren ist die Höhe der Aktivität des Enzyms Tyrosinase, welche wiederum von der Fähigkeit des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons zur Bindung an seinen Rezeptor abhängig ist. Ist dieser Rezeptor in seiner Funktionalität eingeschränkt oder ausgeschaltet, verläuft der Stoffwechselweg in Richtung der Bildung von Phäomelanin und somit zur Ausprägung von rotem Haar und heller Haut. Einschränkungen oder Verlust der Funktionalität des Rezeptors können durch Mutationen im kodierenden Gen (*MC1R*) entstehen. SNPs in diesem DNA-Abschnitt sind gut untersucht und stehen auch im Mittelpunkt der hier durchgeführten Untersuchungen. Diese Untersuchungen von *MC1R*-Mutationen, die im Kontext der Hautkrebsforschung durchgeführt wurden, zeigen, daß bestimmte Variationen im *MC1R*-Gen hoch mit rotem Haar und

heller, UV-sensitiver Haut assoziiert sind (z.B. Valverde et al. 1995, Rees & Flanagan 1999, Flanagan et al. 2000, Box et al. 2001, Healy et al. 2001). Kanetsky et al. 2002 finden in ihrer Studie eine Basentransition in der 5' untranslatierten Region des menschlichen *Agouti*-Gens, für die sie eine sehr schwache Assoziation mit dunklem Haar und braunen Augen beobachten, welche jedoch nicht durch anderen Studien belegt ist.

Für die vorliegende Untersuchung wurden SNPs ausgewählt, für die nach Möglichkeit jeweils mehrere Studien Vergleichsdaten liefern, die eine starke Assoziation des betreffenden Markers zu einer phänotypischen Ausprägung zeigen. Für viele Marker liegen zwar derartige Untersuchungen vor, diese kommen jedoch nicht immer zum gleichen Ergebnis (vgl. Tab. 44) und betreffen v.a. Nordeuropäer (Iren, Briten, Niederländer). Aus den publizierten Untersuchungen wurde folgende Auswahl an Markern getroffen (Tab. 44). Eine Evaluation der Eignung dieser Marker zur Untersuchung zentral-europäischer Individuen und molekulargenetischen Rekonstruktion ihrer phänotypischen Charakteristika wird im Rahmen dieser Studie durchgeführt (Kapitel 6.1.2), um später historische Individuen dieser Region zu untersuchen (Kapitel 6.1.3).

Tab. 44 Untersuchte Loci auf dem *MC1R*-Gen und der 5' untranslatierten Region des *ASIP* sowie markerbezügliche Untersuchungsergebnisse aus anderen Studien

Locus	Austausch	Phänotypenassoziation, (Studie)
Val60Leu	G > T	blondes und hellbraunes Haar (1), rotes Haar, wenn in Kombination mit Arg151 Cys, Arg160Trp, Asp294His oder Val60Leu homozygot (2), Hauttyp I/II, nicht-melanöser Hautkrebs (3), schwach assoziiert mit hellem und rotem Haar (4), nicht assoziiert mit rotem Haar (5)
Asp84Glu	C > A	rote Haare, helle Haut (6, 7), assoziiert mit Melanomen (8), rotes Haar, nicht-melanöser Hautkrebs (3), rotes Haar (9) schwach assoziiert mit rotem Haar, heller Haut (4), rotes und blondes Haar (5)
Val92Met	G > A	rotes Haar, helle Haut (6), nicht assoziiert mit rotem Haar (1), bei Chinesen häufig, bei Europäern assoziiert mit hellem Haar, heller Haut (7), schwach assoziiert mit Hauttyp I/II, nicht-melanöser Hautkrebs (3), nicht assoziiert mit rotem Haar, höhere Frequenzen bei hellem Haar als bei dunklem (5)
Arg142His	G > A	rotes Haar (2), rotes Haar, nicht-melanöser Hautkrebs (3), rotes Haar (9), blondes und hellbraunes Haar (5)
Arg151 Cys	C > T	rotes Haar (1), rotes Haar, helle Haut (3, 4, 7, 10), rotes Haar (5, 9), helle Haut, Melanome (11, 12)
Arg160Trp	C > T	rotes Haar (1, 9, 5), rotes Haar, helle Haut (3, 4, 10), helle Haut, Melanome (12)
Asp294His	G > C	rotes Haar (1, 9, 5), rotes Haar, helle Haut (4, 10), helle Haut, Melanome (12), schwache Assoziation mit Hauttyp I/II, nicht-melanöser Hautkrebs (3)
ASIP g.8818	A > G	dunkles Haar, braune Augen (13), keine phänotypische Assoziation (14)

Locusbezeichnung: Die Zahlen geben die Codonposition an. Aminosäurecode: Val: Valin, Leu: Leucin, Asp: Asparaginsäure, Glu: Glutaminsäure; Arg: Arginin, His: Histidin, Cys: Cystein, Trp: Tryptophan, Met: Methionin. Studien: (1)Box et al. 1997, (2)Harding et al. 2000, (3)Bastiaens et al. 2001, (4)Palmer et al. 2000, (5)Grimes et al. 2001, (6)Valverde et al. 1995, (7)Rana et al. 1999, (8)Valverde et al. 1996, (9)Kennedy et al. 2001, (10)Flanagan et al. 2000, (11)van der Velden et al. 2001, (12)Smith et al. 1998, (13)Kanetsky et al. 2002, (14) Voisey et al. 2001.

Die ausgewählten Marker wurden in zwei Triplex-PCR-Ansätzen amplifiziert. System A beinhaltet die Marker *ASIP*, *MC1R* Arg160Trp, Arg151Cys und Val60Leu. Mit System B werden die Loci *MC1R* Asp84Glu, Arg142His, Asp294His, Val92Met koamplifiziert. Da die publizierten Primer PCR-Produkte mit zu großen Fragmentlängen generieren, wurden die Primer mit Fokus auf eine Verkürzung der PCR-Produkte neu gestaltet. Die Entwicklung der Primer wurde unter Berücksichtigung der Anforderungen an die Primerentwicklung für die Amplifikation degradierter DNA unter Zuhilfenahme der Software PrimerSelect™ (Lasergene) durchgeführt. Besondere Beachtung wurde der Vermeidung von Dimer- und Hairpinstrukturen geschenkt, damit im zweiten Analyseschritt (SBE, vgl. Kapitel 2.2.7) keine aus Sekundärstrukturen resultierenden Artefakte die Analyse behindern.

6.1.2 Untersuchungen von rezenten Individuen

Fragestellung: Die Eignung der auf der Datenbasis publizierter Studien ausgewählten Marker zur molekulargenetischen Trennung verschiedener Haarfarben und Hauttypen sollte an Rezentproben evaluiert werden. Die Untersuchung wurde an mitteleuropäischen Individuen durchgeführt, deren geographische Herkunft damit etwa deckungsgleich mit den im Weiteren zu untersuchenden historischen Proben ist (vgl. Kapitel 6.1.3). Auf Basis der Daten der rezenten Referenzpopulation sollte geprüft werden, ob mit den untersuchten genetischen Markern a) Träger verschiedener Haarfarben voneinander unterscheidbar sind, b) Repräsentanten verschiedener Hauttypen gegeneinander diskriminiert werden können und c) Träger verschiedener Augenfarben identifiziert werden können, wobei letzteres durch die bereits publizierten Daten als eher unwahrscheinlich einzuschätzen war.

Proben: Die bearbeiteten Rezentproben entstammen zwei Stichproben. Zum einen handelt es sich um Speichelproben (vgl. 2.2.2) von 23 Individuen, die dem Bearbeiter von Freiwilligen zur Verfügung gestellt wurden. Für diese Proben wurde eine Klassifizierung der Haarfarbe vom Probanden selbst und dem Bearbeiter vorgenommen und werden als sichere Bestimmungen angesehen, da nur deutliche Vertreter verschiedener Haarfarben beprobt wurden. Für die statistische Auswertung zur Ermittlung haarfarbassoziierter Marker werden diese Individuen berücksichtigt. Eine Abschätzung des Hauttyps durch den Bearbeiter erfolgte zwar nach der Fitzpatrick-Skala (Fitzpatrick 1988), wird aber als unsicheres Datum angesehen und geht nicht mit in statistische Auswertungen ein; das gleiche betrifft die Bestimmung der Augenfarbe und ihre Verwendung. Das zweite Kollektiv, bestehend aus 138 Individuen, entstammt einer gesunden Kontrollstichprobe zu einer Studie zur Untersuchung der Assoziation von *MC1R*-Mutationen mit Hautkrebs der Abteilung Dermatologie und Venerologie (Universität Göttingen), deren DNA (Blutproben von 83 Individuen, vgl. 2.2.2) sowie zusätzliche Daten (55 Individuen) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Für diese Individuen wurden von Ärzten Hauttyp, Haar- und Augenfarbe bestimmt. Diese Bestimmung werden als sicher vorausgesetzt, die entsprechenden Datensätze gehen in die statistischen Untersuchungen zur Ermittlung haarfarb-,

hauttyp- und augenfarbassoziierter Mutationen ein. Die Proben und die gewonnenen Typisierungsergebnisse sind im Anhang (Kapitel, 12.2.3, Tab. 54) dargestellt.

Statistische Auswertung: Fall-Kontroll-Studien, *odds ratio*

Dieser Studientyp ist analytisch, retrospektiv und beobachtend. Es werden zwei Kollektive, Merkmalsträger und Kontrollgruppe, bezüglich einer zurückliegenden oder genetisch festgelegten Einflußgröße verglichen (Weiß 2001). Beide Kollektive sollten bezüglich aller wichtigen Merkmale (z.B. Alter, Geschlecht, geographische Herkunft) weitgehend ähnlich sein und sich nur im zu untersuchenden Merkmal unterscheiden. Dieser Studientyp ist daher geeignet für die Untersuchung der Korrelation genetischer Marker mit distinkten phänotypischen Charakteristiken und wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Bei Fall-Kontroll-Studien wird das Maß für das Risiko oft durch die *odds ratio* dargestellt. Die *odds* und *odds ratio* stellen eine Möglichkeit dar, Anteilswerte in Kreuztabellen auszudrücken und zu vergleichen. Man kann *odds* mit "Chancen" und *odds ratio* mit "relative Chancen" übersetzen. Die *odds* ist das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, daß ein Ereignis eintritt, zur Wahrscheinlichkeit, daß dieses Ereignis nicht eintritt. Untersucht man zwei Gruppen, so kann mit der *odds ratio* das Verhältnis der *odds* der beiden Gruppen ausgedrückt werden. Für eine 2×2-Tabelle (Tab. 45) berechnen sich die *odds* und *odds ratio* folgendermaßen:

Tab. 45 Schema einer 2×2-Tabelle zur Berechnung der *odds ratio*

		Marker 1 (mut)	Marker 2 (wt)
Merkmal XY	Phänotyp 1	A	B
	Phänotyp 2	C	D

A, B, C, D : Anzahl der Individuen, die die jeweilige Markerausprägung (1 oder 2) zeigen.
mut: detektierte genetische Mutation, wt: Wildtyp

Die *odds* für Phänotyp 1 beträgt A/B, die für Phänotyp 2 C/D. Die *odds ratio*

(OR) für beide Phänotypen errechnet sich aus $\frac{A/B}{C/D} = \frac{A \cdot D}{C \cdot B} = OR$.

Die *odds ratio* ist ein Maß für die Stärke des Unterschiedes zwischen zwei Gruppen, eine OR von 1 würde zeigen, daß es keinen Unterschied gibt, ein $OR > 1$ zeigt, daß die *odds* der ersten Gruppe größer wäre und damit die Chance, in dieser Gruppe die untersuchte Mutation zu finden, höher als in Gruppe 2.

Die OR wurde als Bewertungsmaß berechnet, da in den Referenzpublikationen zu *MC1R*-Mutationen ebenfalls *odds ratios* angegeben werden, um eine Abschätzung der Stärke der Korrelation zwischen bestimmten Mutationen und phänotypischen Ausprägungen durchzuführen. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten sollten mit den bereits publizierten vergleichbar sein.

Diagnostischer Test: ROC (*Receiver-Operating-Characteristics*)

Über die Bestimmungen der *odds ratio* für die einzelnen SNP-Marker hinaus wurde geprüft, ob die Kombination mehrerer Marker deutlichere Korrelationen zu bestimmten Phänotypen erkennen läßt. Hierzu wurde ein diagnostischer Test durchgeführt. Diese Art von Test wird benutzt, um eine größere Sicherheit bezüglich des Krankheitsstatus (hier übertragen: untersuchter Phänotyp) eines Menschen zu gewinnen. Gütekriterien eines Tests sind seine Sensitivität und Spezifität. Die Sensitivität gibt den Anteil derjenigen Merkmalsträger an, die mit dem durchgeführten Test auch als Merkmalsträger erkannt werden. Die Spezifität gibt den Anteil der Nicht-Merkmalsträger an, die auch als solche durch den Test identifiziert wurden.

Die meisten der für diagnostische Tests erfaßten Größen sind nicht binär (zwei Alternativmerkmale), sondern stetiger Art. Um dennoch binäre Testentscheidungen durchführen zu können, wird eine Trenngröße τ festgelegt. Diese besteht in einem Schwellenwert, der die Zustände „Merkmalsausprägung“ und „Merkmalsfreiheit“ voneinander trennt. Für die untersuchten Personen wird ein Meßwert bestimmt, der mit der Trenngröße τ verglichen wird. Der Schwellenwert beeinflusst die falsch-negativen und falsch-positiven Ergebnisse (vgl. Abb. 53).

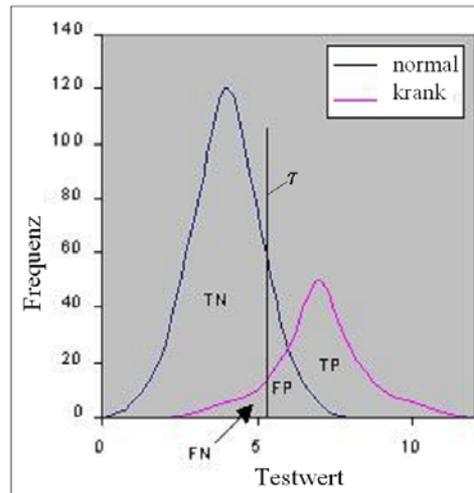


Abb. 53 Testwertkurven für ein Patienten- und ein Kontrollkollektiv. τ : Trennwert für binäre Testentscheidung. FN: *false negatives* = Kranke, deren Testwert unterhalb des Schwellenwertes liegt, werden fälschlich als normal klassifiziert. FP: *false positives* = Gesunde, deren Testergebnis oberhalb des Trennwertes liegt, werden als krank eingestuft. TN: *true negatives* = Gesunde, die als gesund erkannt werden. TP: *true positives* = Kranke, die durch den Test auch als krank erkannt werden.

Mit der Analyse können für jeden Schwellenwert ein positiver Vorhersagewert (*positive predictive value*), ein negativer Vorhersagewert (*negative predictive value*), die *likelihood ratio* und eine *odds ratio* für die entsprechende Markerkombination errechnet werden. Der positive Vorhersagewert gibt den Anteil der tatsächlichen Merkmalsträger an der durch den Test als positiv vorausgesagten Gruppe an. Der negative Vorhersagewert gibt den Anteil der Nicht-Merkmalsträger an der durch den Test als Nicht-Merkmalsträger vorausgesagten Gruppe an. Die *likelihood ratio* gibt an, wieviel Mal wahrscheinlicher es ist, daß jemand mit einem positiven Test Merkmalsträger ist als jemand mit einem negativen Test.

Der gewählte Trennwert beeinflusst auch die Spezifität und die Sensitivität, welche Wertepaare bilden, die gegeneinander aufgetragen werden können. Die daraus resultierende Kurve, die ROC-Kurve (*Receiver-Operating-Characteristics*, Metz 1978), dient zur Veranschaulichung und der Auswahl von fragestellungsabhängigen Schwellenwerten (entlang der ROC-Kurve), wie im Beispiel (Abb. 54) dargestellt.

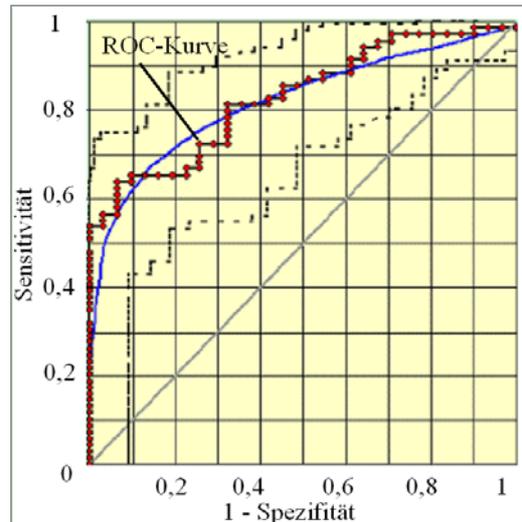


Abb. 54 Beispiel für eine ROC-Kurve. Angegeben sind die ROC-Kurve (Kreise, rot), eine Trendkurve unter Annahme der Normalverteilung der Daten (blaue Kurve), das obere und untere Konfidenzband (95%) der ROC-Kurve (gestrichelte Linien, punktweise Vertrauensbereich entsprechend Binomialverteilung) sowie die Diagonale (graue Linie).

Die AUC (*area under the curve*) kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte der Trennschärfe anzeigt.

Kombination mehrerer Loci

Zur Erhöhung der Trennschärfe des diagnostischen Tests können die diskriminatorischen Eigenschaften der Einzelmarker kombiniert werden. Hierzu wird für jedes untersuchte Individuum ein Wert errechnet, in das die unterschiedliche Effektstärke der verschiedenen SNPs einfließt. Für diese Transformation wurden für die vorliegende Studie die *odds ratios* jedes Einzelmerkmals verwendet, die mit der Anzahl der Mutationen, die das betreffende Individuum an dieser Stelle aufweist (keine, eine oder zwei), multipliziert wurden. Diese Einzelwerte wurden addiert (bei $OR < 0$ wurde der Kehrwert der OR als Multiplikator verwendet und der Wert subtrahiert) und somit für jeden Probanden eine Kenngröße errechnet, mit welcher eine ROC-Analyse zur Bestimmung eines optimalen diagnostischen Trennwertes durchgeführt wurde.

Ergebnisse: Es wurden fragestellungsabhängige *odds ratios* für die einzelnen untersuchten SNP-Stellen errechnet. Diese werden in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 46).

Tab. 46 Odds ratios für die untersuchten SNPs bei unterschiedlichen Fragestellungen

	Fragestellung	odds ratio							
		Val60 Leu	Asp84 Glu	Val92 Met	Arg142 His	Arg151 Cys	Arg160 Trp	Asp294 His	ASIP g.8818
Haar	1 versus andere	0,98	6,23	0,37	6,48	5,13	5,41	6,48	0,47
	2 versus 3/4	1,05	0,00	2,80	1,27	2,90	0,82	0,00	1,29
Haut	1 versus andere	0,00	0,00	0,00	10,40	10,47	10,24	0,00	1,77
	2 versus 3	0,88	/ Div 0	1,49	/ Div 0	4,86	1,01	/ Div 0	1,78
Augen	1 versus andere	1,57	0,00	1,07	2,59	0,75	1,54	0,00	0,53
	2 versus andere	0,66	0,00	0,77	0,38	2,15	0,49	/ Div 0	0,93
	4 versus andere	1,04	/ Div 0	1,29	0,97	0,44	1,48	0,00	2,03

Haar = Haarfarbe: 1: rot, 2: blond, 3: braun, 4: schwarz. Haut = Hauttyp: 1: I, 2: II, 3: III nach Skala von Fitzpatrick 1988. Augen = Augenfarbe: 1: Grün, 2: blau, 4: braun. /Div 0: kein Ergebnis, da die Berechnung die Division durch 0 erfordern würde.

Die aufgelisteten *odds ratios* zeigen die deutlichsten Korrelationen einzelner Marker für den Hauttyp I sowie für rotes Haar. Die OR z.B. für Arg151Cys bei der Untersuchung zur Abtrennung von Hauttyp I von 10,47 bedeutet, daß die Chance, bei Individuen mit Hauttyp I diese Mutation zu finden, 10,47 mal höher ist, als diese Mutation bei Menschen mit anderem Hauttyp zu detektieren.

Die errechneten ORs wurden als markerspezifische Effektstärkefaktoren verwendet, um die individuellen Kenngrößen für die Probanden zu berechnen. Diese Größe wurde jeweils für verschiedene Markersets ermittelt, da nicht alle Proben mit allen Markern typisiert worden waren und nicht alle Marker aussagekräftige Ergebnisse zeigten.

Tab. 47 Markersets für ROC-Berechnung bei unterschiedlichen Fragestellungen

Fragestellung		Val60 Leu	Asp84 Glu	Val92 Met	Arg142 His	Arg151 Cys	Arg160 Trp	Asp294 His	ASIP g.8818
Haar	1 vs andere I	-	x		x	x	x	x	-
	1 vs andere II	x	x	x	x	x	x	x	x
	1 vs andere III	-	x	x	x	x	x	x	x
	2 vs 3/4 I	-	-	-	x	x	x	-	-
	2 vs 3/4 II	x	-	x	x	x	x	-	x
	2 vs 3/4 III	-	-	x	x	x	x	-	x
Haut	1 vs andere I	-	-	-	x	x	x	-	-
	1 vs andere II	-	-	-	x	x	x	-	x
	2 vs 3 I	-	-	x	-	x	x	-	-
	2 vs 3 II	-	-	x	-	x	x	-	x
	2 vs 3 III	x	-	x	-	x	x	-	x
Augen	1 vs andere I	-	-	x	x	x	x	-	-
	1 vs andere II	-	-	x	x	x	x	-	x
	1 vs other III	x	-	x	x	x	x	-	x
	2 vs andere I	-	-	x	x	x	x	-	-
	2 vs andere II	-	-	x	x	x	x	-	x
	2 vs andere III	x	-	x	x	x	x	-	x
	4 vs andere I	-	-	x	x	x	x	-	-
	4 vs andere II	-	-	x	x	x	x	-	x
	4 vs andere III	x	-	x	x	x	x	-	x

Haar = Haarfarbe: 1: rot, 2: blond, 3: braun, 4: schwarz. Haut = Hauttyp: 1: I, 2: II, 3: III nach Skala von Fitzpatrick 1988. Augen = Augenfarbe: 1: Grün, 2: blau, 4: braun. I: Primerset I, II: Primerset II, III: Primerset III. x: Marker im Markersset enthalten, -: nicht im Markersset enthalten.

Aufgrund der ermittelten Daten wurde für jedes Markersset ein Trennwert (unter mehreren möglichen) ausgewählt. Dieser Trennwert (Threshold) wurde mit Schwerpunkt auf hohe Spezifität ausgewählt, um zu gewährleisten, daß nur wenige Nicht-Merkmalsträger fälschlich als Merkmalsträger diagnostiziert werden. Mit diesem Ansatz wird in Kauf genommen, daß nicht die höchstmögliche Sensitivität erreicht wird, also nicht alle Merkmalsträger als solche identifiziert werden. Dafür sind diejenigen Individuen, welche als Merkmalsträger identifiziert werden, dies auch mit hoher Sicherheit. Die ausgewählten Trennwerte sind zusammen mit den mit ihren assoziierten Daten (u.a.. Spezifität, Sensitivität, *likelihood ratio*) in Tab. 48 zusammengefaßt

Tab. 48 ROC-Analyseergebnisse für die untersuchten Fragestellungen

Fragestellung	T	FP	TP	Sens [%]	Spec [%]	PPV [%]	NPV [%]	ACC [%]	OR	LH	ROC	
Haar	1 vs andere I	10,4	0,04	0,61	60,87	96,38	73,68	93,66	91,30	41,38	16,8	0,83
	1 vs andere II	7,31	0,04	0,68	68,18	96,05	83,33	91,25	89,80	52,14	17,27	0,85
	1 vs andere III	7,31	0,05	0,68	68,18	95,24	78,95	91,95	89,62	42,86	14,32	0,86
	2 vs 3/4 I	0,63	0,09	0,21	21,31	90,91	65,00	59,32	60,14	2,71	2,34	0,56
	2 vs 3/4 II	4,14	0,03	0,1	10,00	97,22	80,00	49,30	51,32	3,89	3,6	0,64
	2 vs 3/4 III	4,14	0,02	0,1	10,00	97,73	80,00	54,43	55,95	4,78	4,4	0,65
Haut	1 vs andere I	20,59	0,04	0,67	66,67	96,18	44,44	98,44	94,89	50,4	17,47	0,97
	1 vs andere II	20,79	0,01	0,5	50,00	98,68	75,00	96,15	95,12	75	38	0,97
	2 vs 3 I	2,78	0,04	0,25	24,64	96,77	89,47	53,57	58,78	9,81	7,64	0,61
	2 vs 3 II	3,41	0,03	0,28	27,50	97,22	91,67	54,69	60,53	13,28	9,9	0,66
	2 vs 3 III	3,41	0,03	0,27	27,03	96,77	90,91	52,63	58,82	11,11	8,38	0,66
Augen	1 vs andere I	1,41	0,16	0,23	23,08	83,67	36,00	73,21	66,42	1,54	1,41	0,57
	1 vs andere II	1,41	0,10	0,17	16,67	89,66	40,00	72,22	68,29	1,73	1,61	0,58
	1 vs andere III	2,17	0,11	0,2	20,00	88,89	40,00	75,00	70,27	2	1,8	0,56
	2 vs andere I	3,22	0,01	0,14	14,29	98,65	90,00	57,48	59,85	12,17	10,57	0,58
	2 vs andere II	0,96	0,05	0,11	10,53	95,45	66,67	55,26	56,10	2,47	2,32	0,52
	2 vs andere III	0,46	0,01	0,14	14,29	94,87	71,43	55,22	56,76	3,08	2,79	0,55
	4 vs andere I	1,39	0,14	0,2	20,00	86,27	33,33	75,86	69,34	1,57	1,46	0,56
	4 vs andere II	3,14	0,08	0,2	20,00	91,94	44,44	78,08	74,39	2,85	2,48	0,60
	4 vs andere III	3,19	0,09	0,21	21,05	90,91	44,44	76,92	72,97	2,67	2,32	0,62

T: *threshold* (Trennwert), FP: *false positive rate*, TP: *true positive rate*, Sens: *sensitivity*, Spec: *specificity*, PPV: *positive predictive value*, NPV: *negative predictive value*, ACC: *diagnostic accuracy*, OR: *odds ratio*, LH: *likelihood ratio*, ROC: ROC-Wert = AUC (*area under the curve*). Haar = Haarfarbe: 1: rot, 2: blond, 3: braun, 4: schwarz. Haut = Hauttyp: 1: I, 2: II, 3: III nach Skala von Fitzpatrick 1988. Augen = Augenfarbe: 1: Grün, 2: blau, 4: braun.

Aus diesen Analysedaten kann entnommen werden, daß nur für zwei Fragestellungen, nämlich die Identifizierung rothaariger Individuen (Haarfarbe I) und solcher mit UV-sensitivem Hauttyp I, die verwendeten Marker für einen aussagefähigen diagnostischen Test geeignet sind (rot geschriebene Datensätze).

Für die Erkennung rothaariger Individuen im untersuchten Kollektiv können je nach Auswahl der typisierten Marker als sinnvolle Trennwerte 10,4 (5-Locus-Typisierung) bzw. 7,31 (vollständige Typisierung) angenommen werden. Kann man Primersset II (alle untersuchten Marker) benutzen, werden Probanden mit dem Wert 7,31 oder einem höherem Wert mit dem durchgeführten Test als rothaarig klassifiziert. Dabei liegt die Rate der falsch positiven (FP) Ergebnisse

bei 4%, was den Test sehr spezifisch macht (Spezifität 96,05%). Das heißt, daß diejenigen, die als rothaarig eingestuft werden, es mit hoher Sicherheit auch sind. Auf der anderen Seite beträgt die Sensitivität des Tests nur 68,18%, was bedeutet, daß ca. 32% der im untersuchten Kollektiv enthaltenen rothaarigen Individuen durch den Test nicht erkannt werden. Der Anteil der tatsächlich Rothaarigen an der durch den Test als rothaarig vorausgesagten Gruppe (PPV), beträgt 83,33%, wogegen die Wahrscheinlichkeit, daß ein Mensch wirklich keine roten Haare hat, wenn dies durch den Tests so festgestellt wird, 91,25% beträgt. Im Gesamtbild führt dies zu einer *accuracy*, also einem Anteil korrekt bestimmter - rothaarig oder mit anderer Haarfarbe - Individuen von 89,8%. Die *odds ratio* von 52,14% beschreibt, daß die Chance, in der Gruppe der Rothaarigen die untersuchte Mutationskombination zu finden, 52 mal höher als in der Gruppe der Individuen mit andersfarbigem Haar. Die *likelihood ratio* von 17,27 sagt aus, daß es 17 mal wahrscheinlicher ist, daß jemand, der im Test als rothaarig eingestuft wird, auch rothaarig ist als jemand mit einem negativen Test. Der ROC-Wert (*area under the curve*) von 0,85 (Abb. 55a) ist deutlich von 0,5 (Diagonale) verschieden und belegt somit die Güte des Testwertes. Der Wert sagt aus, daß ein zufällig aus der Gruppe der Rothaarigen ausgewähltes Individuum in 81% der Fälle ein höheres Testergebnis hat als ein zufällig ausgewähltes Individuum aus der Gruppe der Probanden mit anderer Haarfarbe.

Für die Erkennung von Individuen mit Hauttyp I im untersuchten Kollektiv kann als sinnvoller Trennwert 20,79 (5-Locus-Typisierung, Primerset II) angenommen werden. Probanden mit diesem oder höherem Wert werden mit dem durchgeführten Test als Träger UV-sensitiver Haut klassifiziert. Dabei liegt die Rate der falsch positiven (FP) Ergebnisse bei 1%, was den Test sehr spezifisch macht (Spezifität 98,68%), das heißt, daß diejenigen, die als Hauttyp I eingestuft werden, es mit sehr hoher Sicherheit auch sind. Auf der anderen Seite beträgt die Sensitivität des Tests nur 50%, was bedeutet, daß die Hälfte der im untersuchten Kollektiv enthaltenen Individuen mit Hauttyp I durch den Test nicht erkannt werden. Der Anteil der tatsächlichen Individuen mit UV-sensitiver Haut an der durch den Test als hellhäutig vorausgesagten Gruppe (PPV), beträgt 75%, wogegen die Wahrscheinlichkeit, daß ein Mensch wirklich

nicht Hauttyp I hat, wenn dies durch den Tests festgestellt wird, 96,15% beträgt. Im Gesamtbild führt dies zu einer diagnostischen *accuracy*, also einem Anteil korrekt bestimmter Individuen von 95,12%. Die *odds ratio* von 75% beschreibt, daß die Chance, in der Gruppe der Träger von Hauttyp I die untersuchte Mutationskombination zu finden, 75 mal höher als in der Gruppe der Individuen mit anderem Hauttyp. Die *likelihood ratio* von 38 sagt aus, daß es 38 mal wahrscheinlicher ist, daß jemand, der im Test als Träger UV-sensitiver Haut eingestuft wird, auch Hauttyp I hat als jemand mit einem negativen Test. Der ROC-Wert (*area under the curve*) von 0,97 (Abb. 55b) liegt fast bei 1 und belegt somit die Güte des Testwertes. Der Wert sagt aus, daß ein zufällig aus der Gruppe der Rothaarigen ausgewähltes Individuum in 97% der Fälle ein höheres Testergebnis hat als ein zufällig ausgewähltes Individuum aus der Gruppe der Probanden mit anderer Haarfarbe.

Beide Analysen sind hochspezifisch, wenn auch nicht sehr sensitiv. Die ROC-Kurven für beide diagnostischen Tests sind in Abb. 55 dargestellt.

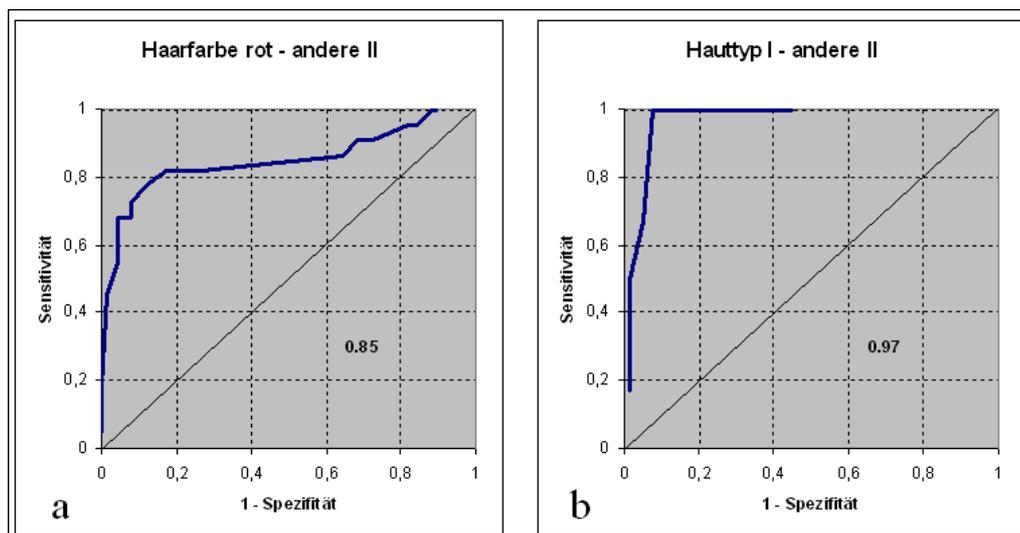


Abb. 55 ROC-Kurven (blau) für die Identifizierung von a) Rothaarigen mit Markerset I und b) Trägern von Hauttyp I mit Markerset II. ROC-Werte (=AUC, *area under the curve*) mit angegeben.

Für diese Kurven sind die ROC-Werte deutlich von der Diagonalen (= kein erkennbarer Zusammenhang, 50%ige Fehlerwahrscheinlichkeit) verschieden. Dies gilt nicht für die anderen untersuchten Fragestellungen. Hier zeigt bereits der diagonalennahe Verlauf der ROC-Kurven, von denen hier zwei

exemplarisch dargestellt sind (Abb. 56), daß keine erkennbare Korrelation der typisierten Marker zum untersuchten phänotypischen Merkmal besteht.

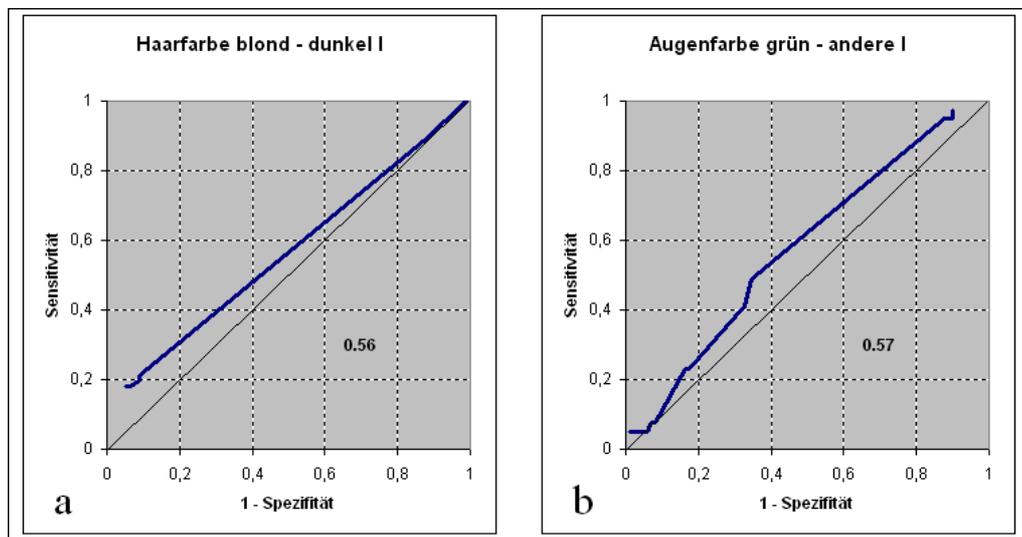


Abb. 56 ROC-Kurven (blau) für die Identifizierung von a) Blonden mit Markerset I und b) Trägern von grünen Augen mit Markerset I. ROC-Werte (=AUC, *area under the curve*) mit angeben.

Diskussion: Um die diagnostische Kapazität der beiden ausgewählten Trennwerte zu überprüfen, müßten sie auf eine weitere Stichprobe mitteleuropäischer Individuen mit festgestellten phänotypischen Merkmalen angewendet werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, weshalb einschränkend festgestellt werden muß, daß die gewählten Trennwerte genau für diese Stichprobe gelten.

Soll das Analysesystem auf eine andere Population angewendet werden (ob modern oder historisch), müßten die *thresholds* neu bestimmt werden, da sonst ein Fehler unbestimmbaren Ausmaßes auftritt. Dies ist für historische Populationen *a priori* jedoch nicht möglich (vgl. Kapitel 6.1.3).

Die Werte für den NPV (*negative predictive value*) der durchgeführten Analysen für die Abtrennung rothaariger Individuen und solcher mit UV-sensitiver Haut sind in ihrer Aussagekraft eingeschränkt, da in beiden Fällen das Kollektiv der typisierten Nicht-Merkmalsträger sehr viel größer war als das der Merkmalsträger. In beiden Analysen würde man bereits einen NPV von über 80% erreichen, wenn man bei einem Individuum unbekanntem Phänotyps *immer* vermuten würde, daß es nicht das Fokus-Merkmal trägt.

Dennoch wird eine Analyse (prä)historischer DNA-Proben (Kapitel 6.1.3) für durchführbar gehalten, mit dem Bewußtsein nicht abschätzbarer Fehler a) durch die nicht vermeidbare Unausgewogenheit des Verhältnisses Merkmalsträger/Nicht-Merkmalsträger in der rezenten Population und b) dadurch, daß die Häufigkeiten der untersuchten Mutationen vor 3000 Jahren nicht bekannt sind und daher das System nicht kalibriert werden kann.

6.1.3 Untersuchungen von archäologischen Proben

Die Nukleotiddiversität auf dem *MC1R*-Locus ist deutlich höher als die durchschnittliche SNP-Variabilität humaner Sequenzen (Rana et al. 1999). Dies betrifft jedoch nur Individuen nichtafrikanischen Ursprungs, so daß angenommen werden kann, daß in den übrigen Teilen der Welt weniger starke oder in eine andere Richtung zielende Selektionsdrücke auf das Gen wirken. Für einige *MC1R*-Mutationen konnte gezeigt werden, daß sie wahrscheinlich erst nach der Trennung europäischer und asiatischer Populationen entstanden, für andere kann vermutet werden, daß sie älter sind, da sie in verschiedenen Bevölkerungsgruppen nachgewiesen werden konnten (Rana et al. 1999). Da es sich selbst bei den „jüngeren“ *MC1R*-Mutationen um solche handelt, für die eine Evolution vor ca. 71.000 Jahren angenommen wird, wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, daß die heute in europäischen Populationen zu beobachtenden *MC1R*-Mutationen bereits in der Bronzezeit, aus der die ältesten der untersuchten (prä)historischen Individuen stammen, vorhanden waren und dort mit ähnlichen Verteilungsmustern wie heute nachgewiesen werden können.

Fragestellung und Proben: Es sollen historische Individuen aus verschiedenen archäologischen Zusammenhängen auf haarfarb- und hauttyp-korrelierte Mutationen hin untersucht werden. Mit den durch die Bearbeitung rezenter mitteleuropäischer Individuen gewonnenen Erkenntnissen (Kapitel 6.1.2) soll versucht werden, Aussagen über das äußere Erscheinungsbild von (prä)historischen Menschen auf Basis ihrer genetischen Merkmale zu treffen.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Proben der Fundplätze Lichtensteinhöhle (Kapitel 3.1), Goslar (Kapitel 3.2) und Enger (Kapitel 3.4) unter-

sucht. An ihnen wurden die gleichen Marker wie für die Rezentindividuen analysiert (Einzeltypisierungsergebnisse im Anhang, Kapitel 12.2.2). Anschließend wurden die Eigenschaften der einzelnen Loci unter Berücksichtigung der differentiellen Effektstärke der Einzelmarker kombiniert und individuen-spezifische Kenngrößen berechnet (vgl. Kapitel 6.1.2, Kombination mehrerer Loci).

Ergebnisse: Das SNP-Analysesystem für phänotypenassoziierte Loci konnte erfolgreich auf die archäologischen Proben übertragen werden. Es wurden 16 Individuen aus der Lichtensteinhöhle typisiert, sowie vier Proben aus Goslar und fünf aus der Stiftskirche Enger. Die Ergebnisse sowie die errechneten mutationsabhängigen Kenngrößen (unter Nutzung der *odds ratio* der Rezentprobenuntersuchung) für die untersuchten Individuen sind in den Tab. 49 und Tab. 50 zusammengefaßt, die Einzeltypisierungsergebnisse befinden sich im Anhang (12.2.2).

Tab. 49 Zusammenfassung der Typisierungsergebnisse der untersuchten phänotypenassoziierten Marker für historische Proben aus Goslar (Gs) und der Stiftskirche Enger (EN)

Probe	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val92 Met	Asp294 His	K (Haar)	K (Haut)
Gs 58	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/2)	(1/1)	I: 0,00 II: -2,67	I: 0,00 II: 0,00
Gs 76	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: 0,00	I: 0,00 II: 0,00
Gs 84	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: -2,11	I: 0,00 II: 1,77
Gs 97	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: -2,11	I: 0,00 II: 1,77
EN 388	1/2	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 10,54 II: 8,43	I: 20,71 II: 22,48
EN 447	1/2	1/1	1/1	1/1	1/(2)	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: -2,11	I: 0,00 II: 1,77
EN 452	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: 0,00	I: 0,00 II: 0,00
EN 462	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: 0,00	I: 0,00 II: 0,00
EN 463	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: 0,00	I: 0,00 II: 0,00

I: Wildtypallel, 2: mutiertes Allel, - : kein (Typisierungs-)Ergebnis. Allele in Klammern: Ergebnis nicht vollständig reproduziert. K(Haar): aus den typisierten Mutationen errechnete Kenngröße für diese Probe im Kontext der Identifizierung von Individuen mit rotem Haar. K(Haut): aus den typisierten Mutationen errechnete Kenngröße für diese Probe im Kontext der Identifizierung von Individuen mit UV-sensitiver Haut. I : Kenngröße für Markerset I, II: Kenngröße für Markerset II

Tab. 50 Zusammenfassung der Typisierungsergebnisse der untersuchten phänotypen-assoziierten Marker für (prä)historische Proben aus der Lichtensteinhöhle (Do)

Probe	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val92 Met	Asp294 His	K (Haar)	K (Haut)
Do 26	-	-	-	-	1/1	1/1	1/1	1/1	-	-
Do 35	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	-	1/1	1/1	-	-
Do 58.3	(1/1)	(1/2)	(1/1)	(1/2)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	I: 5,41 II: 5,39	I: 10,25 II: 10,25
Do 902	1/1	1/1	1/2)	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	I: 5,13 II: 2,46	I: 10,47 II: 10,47
Do 1076	-	(1/1)	(1/1)	-	-	(1/1)	(1/1)	1/1	I: 0,00 II: -	I: 0,00 II: -
Do 1103	(1/2)	1/2)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 5,41 II: 3,30	I: 10,24 II: 12,00
Do 1247	1/1	1/1	1/2)	1/1	(1/1)	(1/1)	(1/1)	1/1	I: 5,13 II: 5,13	I: 10,47 II: 10,47
Do 1500	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: 0,00	I: 0,00 II: 0,00
Do 1585	1/1	-	-	-	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	-	-
Do 1911	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: -1,12	I: 0,00 II: 0,00
Do 2030	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: 0,00	I: 0,00 II: 0,00
Do 2388	1/2)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: -2,11	I: 0,00 II: 1,77
Do 2589	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: -2,11	I: 0,00 II: 1,77
Do 3742	(1/1)	(1/1)	(1/1)	1/1	1/1	(1/1)	(1/2)	1/1	I: -2,67 II: -2,67	I: 0,00 II: 0,00
Do 3756	-	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	I: 0,00 II: -	I: 0,00 II: -
Do R1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	I: 0,00 II: 0,00	I: 0,00 II: 0,00

1: Wildtypallel, 2: mutiertes Allel, - : kein (Typisierungs-)Ergebnis. Allele in Klammern: Ergebnis nicht vollständig reproduziert. K(Haar): aus den typisierten Mutationen errechnete Kenngröße für diese Probe im Kontext der Identifizierung von Individuen mit rotem Haar. K(Haut): aus den typisierten Mutationen errechnete Kenngröße für diese Probe im Kontext der Identifizierung von Individuen mit UV-sensitiver Haut. I : Kenngröße für Markerset I, II: Kenngröße für Markerset II

Der Vergleich der berechneten Kenngrößen für die historischen Individuen mit den entsprechenden Trennwerten, die aus den Rezentdaten ermittelt wurden (Tab. 48), zeigt, daß ein Individuum (EN 388) als Träger roten Haars und UV-sensitiver Haut des Typs I angesprochen werden kann (Tab. 51).

Tab. 51 Vergleich des errechneten Trennwertes für die Identifizierung von Individuen mit rotem Haar und heller Haut und den ermittelten Kenngrößen für EN 388.

	Haarfarbe rot vs andere Markerset I	Haarfarbe rot vs andere Markerset II	Hauttyp I vs andere Markerset I	Hauttyp I vs andere Markerset II
Trennwert (Kontrollkollektiv)	10,40	7,31	20,59	20,79
Kenngröße EN 388	10,54	8,43	20,71	22,48

Trennwerte (*thresholds*): vgl. Tab. 48, Markersets I und II; vgl. Tabelle Tab. 47

Die Kenngrößen des Individuums EN 388 liegen über den Trennwerten, was die Bestimmung der phänotypischen Charakteristiken Haarfarbe (rot) und Hauttyp (I) ermöglicht. Die Kenngrößen der anderen Individuen liegen deutlich unterhalb der Schwellenwerte, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sie dunklere Haarfarben und weniger UV-sensitive Haut besaßen, ohne daß beim derzeitigen Kenntnisstand eine weitere Differenzierung der bei diesen Personen realisierten Merkmale möglich ist.

Ein Elektropherogramm, das die Typisierungsergebnisse einer bronzezeitlichen Probe zeigt, ist im folgenden (Abb. 57) abgebildet.

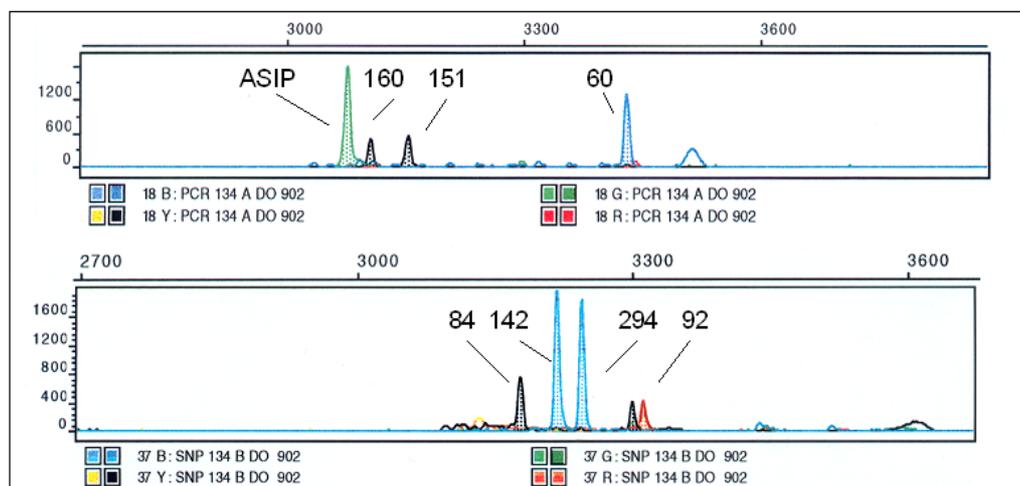


Abb. 57 Elektropherogramm mit *MC1R*-SNP-Ergebnissen einer bronzezeitlichen Probe (Do 902). Untersuchte Codonpositionen auf dem *MC1R*-Gen mit Ziffern wiedergegeben. Das untersuchte Individuum ist homozygoter Träger des Wildtypalleles in allen Systemen außer Val92Met, wo eine heterozygote Ausprägung detektiert werden konnte.

Diskussion: Die Rekonstruktion des Phänotyps kann nur unter Annahme einer dem heutigen Zustand ähnlichen Verteilung und Funktion der untersuchten *MC1R*-Mutationen in historischen Bevölkerungen in Mitteleuropa vorgenommen werden. Da beim heutigen Kenntnisstand nichts gegen eine

solche Annahme spricht, wird im Rahmen dieser Untersuchung von der grundsätzlichen Möglichkeit der Übertragung der Daten aus dem Kontrollkollektiv ausgegangen. Es muß jedoch ein nicht abzuschätzender Fehler für möglich gehalten werden muß, der jedoch nur vermeidbar wäre, wenn ein historisches haarfarb- und hauttypbekanntes Kontrollkollektiv zur Ermittlung gültiger diagnostischer Trennwerte zur Verfügung stünde - was nicht möglich ist.

Bezüglich der methodischen Praxis ist zu bemerken, daß im Gegensatz zum Nachweis der untersuchten SNPs an rezenten Proben die Typisierung der historischen Proben mit einigen Schwierigkeiten behaftet war. Zum einen traten in einigen Fällen bei den SBE-Resultaten deutliche Nebenpeaks (vor allem blaue) auf, die sich durch Änderung der Konzentrationen der SBE-Primer reduzieren ließen. Dieses Ergebnis zeigt, daß bei den historischen Proben offenbar - und mit der Erwartung an aDNA konform - die Matrizen für die SBE-Reaktion, die eigentlichen PCR-Produkte, in weniger ausgewogenem Maße entstehen als bei den Rezentproben, und daß sich dieses Ungleichgewicht auf den SBE-Schritt auswirkt, dort aber zum Teil kompensiert werden kann. Darüber hinaus konnte trotz der Kürze der amplifizierten Produkte beobachtet werden, daß in den Multiplexreaktionen nicht immer alle PCR-Produkte generiert wurden (Abb. 58).

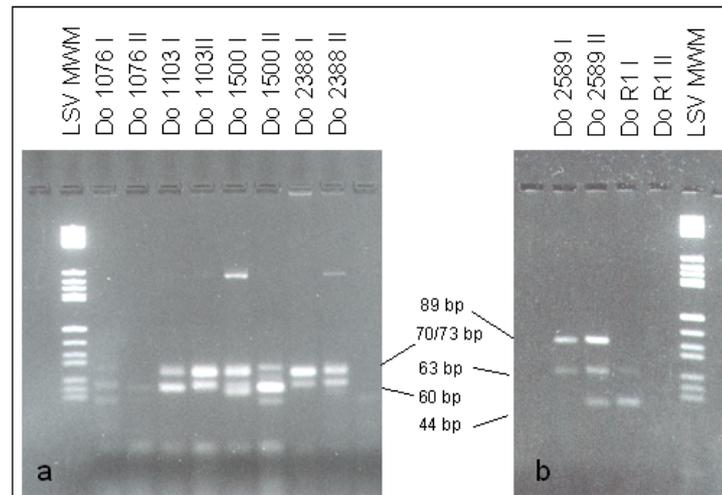


Abb. 58 Agarosegel mit PCR-Produkten (nach 40 Zyklen) von phänotypassoziierten SNPs aus bronzezeitlichen Proben der Lichtensteinhöhle (Do). LSV MWM: Molekularer Gewichtsstandard V (Roche). a: System II (Triplex mit Fragmenten von 60, 70 und 73 bp), für die ersten beiden Proben sind nur schwache Amplikons erkennbar, bei Do 1706 II ist nur die Bande bei 60 bp sichtbar, hier kam es nicht zu einer effizienten Vermehrung der anderen Zielsequenzen. b: System I (Triplex mit Fragmenten von 44, 63 und 89 bp, vgl. 2.2.4.7), bei der ersten Probe (Do 2589 I) z.B. wurde das 44 bp lange PCR-Produkt nicht generiert, bei der Probe R1 I ist das 89 bp lange Fragment betroffen.

Folglich können im anschließenden SBE-Schritt die nicht amplifizierten Loci nicht nachgewiesen werden, es werden Peaks „ausfallen“. Da in SBE-System A zwei schwarze Peaks aufeinanderfolgen (Abb. 57 oberer Teil) und in System B zwei blaue Peaks (Abb. 57 unterer Teil), kann durch Störung des Peakmusters bei Nichterscheinen eines oder mehrerer Peaks unter Umständen nur schwer bestimmt werden, welche Marker im Elektropherogramm zu beobachten sind. Hier kann, ähnlich der STR-Fragmentlängenanalyse, ein Standard Sicherheit schaffen, welcher der Probe vor ihrer elektrophoretischen Auftrennung zugefügt wird. Da das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gerät zur Fragmentlängenanalyse (ABI 310) nur vier unterschiedliche Farben detektieren kann, die bereits für den Nachweis der vier Basen benötigt werden, konnte kein Standard in abweichender fünfter Farbe verwendet werden. Um dennoch einen Anhaltspunkt zur eindeutigen Allelbestimmung zu haben, wurde ein aus zwei Markern bestehender Standard in einer zwar schon „belegten“ Farbe gefertigt, er migriert aber an Positionen, an denen Probenpeaks in dieser Farbe nicht zu erwarten sind (vgl. Kapitel 2.2.7, Tab. 9) Dieser Zweipunkte-Standard wurde den aus historischen Proben generierten PCR-Produkten vor der Fragmentlängenanalyse zugefügt. Der kürzere Standardpeak migriert kurz vor dem schwarzen, das Wildtypallel anzeigenden

Peak des Locus Arg160Trp (Abb. 59, unten), das größere Produkt kurz nach dem blauen, das Wildtypallel anzeigenden Peak des Locus Asp294His (Abb. 60).

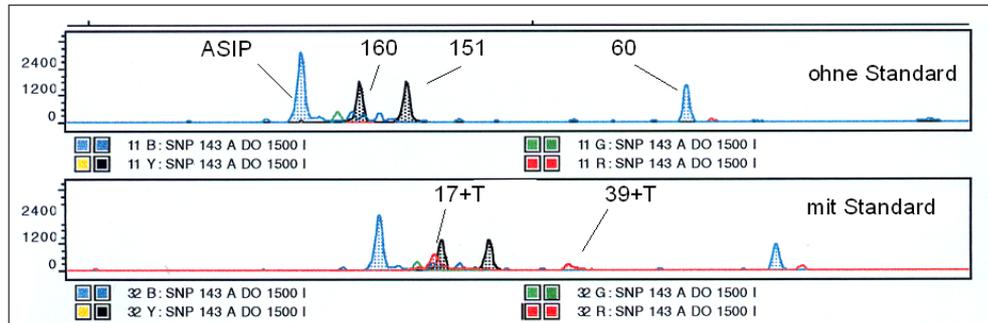


Abb. 59 Elektropherogramm der SBE-Produkte (Set A) einer Probe ohne Zweipunkte-Standard (oben) und mit Standard. Das kurze Standardfragment 17 + T (18 bp lang) erscheint kurz vor dem schwarzen, das Wildtypallel anzeigenden Peak von Arg160Trp (24 bp). Hier werden die Laufunterschiede der verschiedenen gefärbten Produkte besonders im Bereich sehr kleiner Fragmente sehr deutlich.

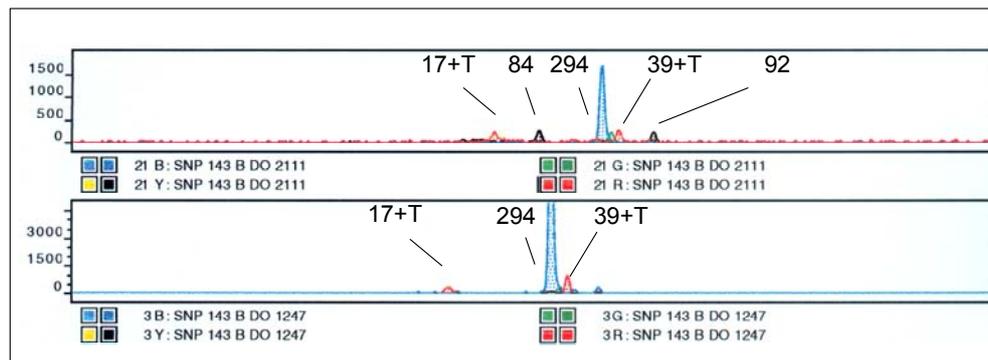


Abb. 60 Elektropherogramm der SBE-Produkte (Set B) von zwei Proben (Do 2111 und Do 1247) mit Zweipunkte-Standard. Das kurze Standardfragment 17 + T (18 bp lang) erscheint relativ weit vor dem Locus Asp84Glu, das größere Fragment 39 + T (40 bp lang) migriert kurz nach dem blauen Wildtyppeak von Asp294His (41 bp). In beiden Proben fallen ein oder mehrere Loci aus, was besonders im unteren Beispiel eine Zuordnung des blauen Peaks unmöglich machen würde, wenn die Typisierung nicht durch einen Standard unterstützt würde. Darüber hinaus ist zu erkennen, daß sich die Laufunterschiede der verschiedenen gefärbten Produkte sich im Bereich der größeren Fragmente verringern, obgleich geringfügig längere blau markierte Fragmente (Asp294His) auch in diesem Größenbereich immer noch schneller wandern als z.B. etwas kürzere rot markierte Fragmente (39 + T).

Authentizitätssicherung: Die *MC1R/ASIP*-Typisierungen der untersuchten historischen Proben wurden größtenteils mit den selben Extrakten wie die Typisierungen der X-chromosomalen STRs durchgeführt (Kapitel 4.2.1). Diese sind ihrerseits hochpolymorphe Marker, die bereits eine Identifizierung von Kontaminationen erlauben würden. Zusätzlich wurde an dieser Stelle für die

verwendeten Extrakte ein genetischer Fingerabdruck amplifiziert. Es liegen aus dieser Studie keine Hinweise für systematische Kontaminationen der Chemikalien oder Extrakte vor.

Darüber hinaus konnten entgegen der Erwartung, daß aufgrund der geringen Größe der generierten Produkte mit einer erhöhten Kontaminationsrate durch exogene, besonders aus den Reaktionsgefäßen stammende DNA (Schmidt et al. 1995) zu rechnen sein müßte, in den meisten Leerkontrollen keine spezifischen PCR-Produkte detektiert werden (Abb. 61).

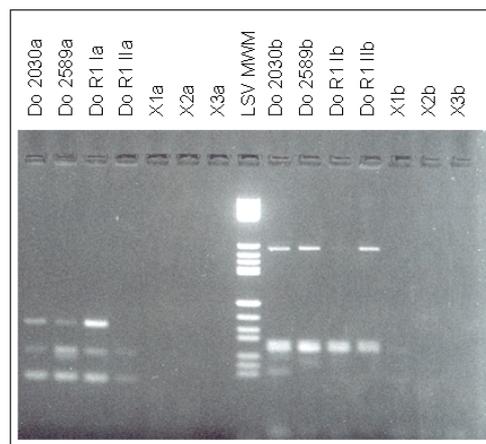


Abb. 61 Agarosegel mit PCR-Produkten (nach 40 Zyklen) von phänotypassoziierten SNPs aus bronzezeitlichen Proben der Lichtensteinhöhle (Do) sowie Leerkontrollen (X1-X3). LSV MWM: Molekularer Gewichtsstandard V. Linke Seite: System I (Triplex mit Fragmenten von 44, 63 und 89 bp) vgl. 2.2.4.7). b: System II (Triplex mit Fragmenten von 60, 70 und 73 bp). In den Leerkontrollen sind keine Produkte detektiert, die eine Intensität vergleichbar mit den aus Proben gewonnenen Amplikons aufweisen. Da jedoch auch keine Primerdimere zu sehen sind, kann vermutet werden, daß zwar auch in den Leerkontrollen primerverbrauchend PCR-Produkte generiert werden, diese jedoch die Nachweisgrenze des Agarosegels nicht erreichten.

In mehreren Leerkontrollen konnten einzelne Banden detektiert werden, die jedoch nur in wenigen Fällen auf spezifische PCR-Produkte zurückzuführen und durch die SBE-Reaktion zu typisieren waren. In den anderen Fällen entstanden unspezifische Produkte, die im zweiten Analyseschritt nicht zu auswertbaren Ergebnissen führten. In einem Fall konnte in einer Leerkontrolle ein vollständiges Profil mit dem PCR-System I nachgewiesen werden. Die SBE-Reaktion zeigte, daß in allen vier Loci das Wildtypallel nachweisbar war. Da die untersuchten Marker nicht polymorph genug sind, um die Rückführung auf eine Person zuzulassen, mußte offenbleiben, ob es sich um eine Kontamination durch den Bearbeiter (gleiches Allelprofil) oder um eine Kontamination aus dem Reaktionsgefäß handelt.

6.1.4 Sequenzierung von *MC1R* und *ASIP* zur Validierung der SBE-Ergebnisse

***MC1R*:** Zur Validierung der mit der SBE-Technik gewonnenen *MC1R*-Typisierungsergebnisse wurde für 30 rezente Individuen das gesamte *MC1R*-Gen in der Abteilung für Dermatologie der Universität Göttingen sequenziert und die Daten zur Verfügung gestellt.

***ASIP*:** Für *ASIP* wurden Sequenzierungen an zehn rezenten Proben durchgeführt (Protokolle und Parameter sind in Kap. 2.2.4.8 aufgeführt), um die durch die SBE-Methode gewonnenen Resultate zu prüfen. Die untersuchten Proben sind in Tab. 55 zusammengefaßt.

Ergebnisse: Die Ergebnisse aus den Sequenzierreaktionen waren konsistent mit denen der SBE-Analyse, validieren die SBE-Methode und die damit gewonnenen Typisierungsergebnisse. Die Ergebnisse sind Im Anhang, Kapitel 12.2.3, Tab. 55 aufgeführt.

7 Abschließende Diskussion und Ausblick

Ziel der Arbeit war die Erweiterung des bislang vorhandenen Repertoires an molekulargenetischen Analysesystemen zur Untersuchung von Individuen und Bevölkerungen vergangener Zeiträume. Die Schwerpunkte der durchgeführten Analysen lagen auf der Rekonstruktion kultureller und sozialhistorischer Kenngrößen, der Etablierung von Werkzeugen zur Prüfung epidemiologischer Hypothesen direkt am historischen Skelettmaterial sowie der Rekonstruktion phänotypischer Charakteristika (prä)historischer Menschen mit DNA-Markern. Im folgenden Kapitel werden die zentralen Ergebnisse der Arbeit im Hinblick auf die mit der Entwicklung der respektiven Analysesysteme verbundenen Intentionen diskutiert sowie über Anschlußmöglichkeiten an die vorgestellten Projekte nachgedacht.

Rekonstruktion sozialer Strukturen in historischen Bevölkerungen

Molekulargenetische Marker bieten einen Zugang zur Rekonstruktion sozialer und kultureller Charakteristika historischer Populationen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher neue Markersysteme entwickelt, um diesen biologischen Zugang zu erweitern. Diese Analysesysteme wurden zudem im Hinblick auf die Randbedingungen, die durch den Fokus auf die Analyse degradierter DNA gebildet werden, konzipiert. Dazu gehört die Nutzung möglichst kurzer DNA-Zielsequenzen sowie die forcierte Anwendung von Multiplex-Assays.

Eines der formulierten Ziele war die Verbesserung des molekulargenetischen Zugangs zur Untersuchung der Geschlechterrelation in einer Population. In diesem Zusammenhang wurde die Etablierung eines Analysesystems angestrebt, das eine molekulargenetische Geschlechtsdeterminierung von Skelettfunden mit höherer Bestimmungssicherheit gewährleistet, als dies bislang der Fall war. Es sollten mehrere Marker simultan amplifiziert werden, mit denen sowohl das weibliche als auch das männliche Geschlecht eines untersuchten Individuums positiv nachgewiesen wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Untersuchungssystem entwickelt, das die Simultananalyse von Amelogenin, zwei Y-chromosomalen und zwei X-chromosomalen STRs ermöglicht. Die Anwendung auf bronzezeitliches Skelettmaterial verlief erfolgreich (vgl. Kapitel 4.1.3). Es konnte gezeigt werden, daß, den Erwartungen an das Analysesystem folgend, eindeutige Geschlechtsdeterminationen mit diesem System möglich sind, ohne die Untersuchung vielfach wiederholen zu müssen, um die Möglichkeit von *allelic dropout* auszuschließen. Das hier entwickelte Analysewerkzeug stellt somit eine wichtige Erweiterung der Möglichkeiten zur molekularen Geschlechtsbestimmung an degradiertem DNA dar. Es bietet Anschlußmöglichkeiten für Forschungsvorhaben, welche Fragestellungen bearbeiten, die z.B. auf differentielles Verhalten einer Gesellschaft gegenüber einem Geschlecht fokussieren. Diese Untersuchungen können von dem hier entwickelten und an prähistorischen Skelettfunden erprobten System profitieren. Dies betrifft sowohl die Sicherheit der durchgeführten Geschlechtsbestimmung als auch die Tatsache, daß mit diesem Multiplex-Ansatz zeitsparend und ressourcenschonend gearbeitet werden kann.

Die Bedeutsamkeit der Aufdeckung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen historischen Individuen für die Rekonstruktion der sozialen Strukturen der aus diesen Menschen bestehenden Population wurde bereits ausführlich in Kapitel 1.1 dargelegt. Angesichts der Relevanz dieser Analysen für die Prähistorische Anthropologie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die in der aDNA-Forschung zur Verwandtschaftsklärung verwendeten Sequenztypen (autosomale STRs, Y-chromosomale STRs und mitochondriale DNA) um eine Markerklasse erweitert - X-chromosomale STRs. Die durchgeführten Untersuchungen an rezenten und (prä)historischen Proben (vgl. Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) zeigen, daß X-chromosomale STRs eine Markergruppe darstellen, die bei der Rekonstruktionen bestimmter verwandtschaftlicher Konstellationen wichtige Informationen beibringen kann, die durch die anderen bislang verwendeten Sequenztypen nicht gewonnen werden können. Bei der Prüfung direkter Verwandtschaft zeigt sich die Stärke der X-STRs als aussagefähiger Marker für die Untersuchung von Vater-Tochter-Relationen. Dies konnte einerseits beim untersuchten rezenten Defizienzfall gezeigt werden

(vgl. Kapitel 4.2.2.2), wird aber bei der Überprüfung von vermuteten Dyaden bei den analysierten (prä)historischen Individuen (vgl. Kapitel 4.2.3) besonders deutlich. Drei der vier untersuchten Vater-Tochter-Dyaden, die aufgrund autosomaler STR-Daten postuliert wurden und zu deren weiterer Absicherung die jeweilig zugehörige Mutter bislang nicht identifiziert ist (Do 902/2589, Do 58.3/1500, Do 1911/1206, Gs 97/76), konnten aufgrund der X-chromosomalen Daten widerlegt werden. Die bereits vorher auf der Datengrundlage von zwei oder drei genetischen Markern (autosomale STRs, mtDNA, Y-STRs) vermuteten Relationen wie Mutter/Tochter (Do 1500/2388) und Vollgeschwisterverhältnis (Do 1911/R1, Gs 97/84) waren durch die vorangegangenen Untersuchungen bereits besser abgesichert. Sie konnten durch die Analyse X-chromosomaler STRs bestätigt bzw. in einem weiteren Fall nicht widerlegt werden (Do 183/3742). Die hier durchgeführte Untersuchung an (prä)historischen Skelettfunden zeigt, daß das neu entwickelte X-STR-Typisierungssystem im Kontext anthropologischer Forschung eine wichtige Erweiterung des Untersuchungsrepertoires zur Feststellung naher Verwandtschaft zwischen Individuen darstellt.

Bei der Verwendung X-chromosomaler STRs als generationenübergreifende Marker können unter günstigen Umständen - mindestens jede zweite Generation besteht aus einem weiblichen Individuum; der entsprechende X-chromosomale Haplotyp wird kontinuierlich weitergegeben - Individuen miteinander in eine verwandtschaftliche Beziehung gebracht werden, für die Verwandtschaft mit anderen Markern nicht mehr nachweisbar ist (vgl. Kapitel 4.2.2.1, z.B. Individuen 2 und 10). Ein solcher Fall wurde im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen für die bronzezeitliche Lichtensteinhöhle möglicherweise gefunden (vgl. Kapitel 4.2.3.1, Do 3742, Do 1044, Do 2030), bedarf jedoch zur Absicherung weiterer Typisierungen. Diese Eigenschaft der X-chromosomalen STRs als potentiell generationenübergreifend transferierter Marker, der im Unterschied zu Y-STRs und mtDNA auch von Männern auf ihre Töchter weitergegeben werden kann, stellt eine neue wichtige Option für die aDNA-Analytik dar, wenn es um die Zuordnung von Skeletten zu historischen Persönlichkeiten geht. Im Fall der Identifizierung eines männlichen Individuums, für den nur ein entfernter weiblicher Nachfahre für einen

Vergleich von DNA-Mustern zur Verfügung steht, stellen X-chromosomale STRs den einzigen Markertyp dar, mit dem potentiell eine Verbindung zwischen beiden Menschen nachgewiesen werden kann.

Die durchgeführten Untersuchungen an den Skelettfunden der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle zeigten auch, daß die Analyse X-chromosomaler Marker einen Zugang zur Rekonstruktion des Residenzverhaltens von vorgeschichtlichen Populationen bietet. Dieser lag bislang nur in der Typisierung von mitochondrialen und Y-chromosomalen Haplotypen und der statistischen Auswertung der Häufigkeit ihres Vorkommens in der betreffenden Population. Die Voraussetzung hierfür, das Vorhandensein eines großen Skelettkollektivs, bestehend aus nach Möglichkeit wenig miteinander verwandter Individuen, die darüber hinaus auch noch analysierbare DNA aufweisen, ist in archäologischen Zusammenhängen nicht oft gegeben. Insbesondere wenn prähistorische Populationen im Fokus der Untersuchung stehen, hat man es oft mit kleineren Gruppen zu tun, deren Mitglieder häufig in engeren Verwandtschaftsverhältnissen zueinander stehen. Hier sind die Möglichkeiten der Bestimmung von Residenzverhalten mit mitochondrialen und Y-chromosomalen Haplotypen eingeschränkt.

Die Typisierung X-chromosomaler STRs von Individuen aus der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle (vgl. Kapitel 4.3) zeigt, daß sich dieser Markertyp auch als Zugang zur Rekonstruktion der Wohnfolgeordnung einer kleineren Population von Individuen eignet, die in engerem verwandtschaftlichen Verhältnis zueinander stehen. Für die Lichtensteinhöhle konnten durch Untersuchung von X-chromosomalen STRs deutliche Hinweise auf patrilokales Residenzverhalten ausgemacht werden. Eine Einbeziehung der mitochondrialen und Y-chromosomalen Haplotypen der Individuen, die im Rahmen einer früheren Studie (Schultes 2000) typisiert worden waren, unterstützt diese Annahme; die Ergebnisse der Y-chromosomalen Typisierungen weisen in die gleiche Richtung, wären allein jedoch nicht aussagekräftig genug gewesen. Mit der Etablierung der Untersuchung X-chromosomaler Marker in der *ancient* DNA-Analytik wurde somit der Markerkanon sinnvoll erweitert, der es ermöglicht, sich den sozialen

Strukturen einer Bevölkerung von der Seite der biologischen Merkmale der Individuen aus zu nähern, aus denen die untersuchte Population besteht.

Analysesysteme zur Bearbeitung epidemiologischer Fragestellungen

Ein weiteres Vorhaben dieser Arbeit lag in der Entwicklung von DNA-Markensystemen, die es ermöglichen sollten, epidemiologische Hypothesen direkt an archäologischem Skelettmaterial zu untersuchen. Die bearbeiteten Fragestellungen betrafen die Entstehung sowie den Zeitpunkt der Verbreitung der eine Deletion von 32 Basenpaaren aufweisenden Variante des humanen *ccr5*-Gens (*ccr5* Δ 32, vgl. Kapitel 1.2). Die auf den Daten rezenter Populationen beruhende Berechnungen dreier Arbeitsgruppen kommen zwar im Detail zu widersprüchlichen Ergebnissen, ihre Resultate zeigen jedoch eine klare Tendenz zur Annahme eines erst kürzlichen Entstehens der *ccr5* Δ 32-Mutation vor 1000- 3500 Jahren (exklusive der zum Teil enormen Konfidenzintervalle, vgl. Kapitel 5.1). Darüber hinaus wird für die Entstehung des mutierten Allels aufgrund von STR-Linkage-Studien ein singuläres Mutationsereignis angenommen. Beide Hypothesen können durch Typisierung des *ccr5*-Locus an (prä)historischer Proben untersucht werden.

Daher wurde ein Analysesystem entwickelt, das Anschlußvorhaben die Möglichkeit eröffnet, durch STR-Linkage-Analysen an archäologischen Skeletten der Frage nach einem singulären oder mehrfach unabhängig erfolgten Ursprung der Mutation nachzugehen.

Eine Untersuchung zur Prüfung der Hypothesen bezüglich des Zeitraums der Verbreitung der *ccr5* Δ 32-Variante wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Multiplex-Nachweis des *ccr5*-Gens und autosomaler STRs etabliert, der es erlaubt, über die Individualisierbarkeit der STR-Profile auch das simultan generierte *ccr5*-Datum einem bestimmten Individuum zuzuschreiben. Mit diesem System wurden Skelettfunde verschiedener historischer und prähistorischer Zeitstellungen typisiert, von denen im untersuchten Kontext die wichtigsten Proben die bronzezeitlichen Knochenfunde aus der Lichtensteinhöhle darstellten. Da bereits in diesen fast 3000 Jahre alten menschlichen Überresten die *ccr5* Δ 32-Variante in nennenswerter

Häufigkeit zu detektieren war (vgl. Kapitel 5.1.3), müssen die auf den Daten rezenter Individuen beruhenden Hypothesen bezüglich des Zeitpunktes einer merklichen Verbreitung der Genvariante überdacht und hinsichtlich eines weit vorher liegenden Datums korrigiert werden.

Diese durchgeführte Untersuchung verdeutlicht, wie wichtig (prä)historische Skelettfunde für die Rekonstruktion epidemiologischer Fragestellungen unserer Zeit sind und auch künftig sein werden. Diese Proben stellen ein genetisches Archiv unschätzbaren Wertes dar, und mit der sich stetig fortentwickelnden Methodik in der *ancient* DNA-Analytik werden die Überreste unserer Vorfahren immer mehr der in ihnen gespeicherten Informationen preisgeben. Angesichts dieser absehbaren Entwicklung ist es um so wichtiger, Analysestrategien zu finden, mit denen ressourcenschonend gearbeitet werden kann. Dies ist unabdingbar, um heute bereits Untersuchungen mit den zur Verfügung stehenden Mitteln durchführen zu können, aber gleichzeitig zu gewährleisten, daß auch zukünftigen Wissenschaftlergenerationen dieses genetische Archiv erhalten bleibt. Eben dieses Ziel wird - neben anderen Analysevorteilen - durch die Nutzung von Multiplex-Assays wie den in der vorliegenden Arbeit verwendeten für die Genotypisierung archäologischer Skelettfunde verfolgt.

Ebenfalls im Kontext der Entwicklung und Verfügbarmachung von Analysesystemen zur Untersuchung epidemiologischer Fragestellungen durch aDNA-Analysen an archäologischem Skelettmaterial wurde eine PCR-basierte Methode etabliert, um ABO-Blutgruppen zu bestimmen. Damit wurde ein Nachweissystem geschaffen, das Anschlußprojekten die Möglichkeit der direkten Prüfung von Hypothesen zur heute beobachtbaren weltweit unterschiedlichen Verteilung der ABO-Blutgruppen direkt an (prä)historischen Skelettfunden bietet. Mit dem entwickelten ABO-Analysesystem können die Hauptgenotypen A, B und O unterschieden werden. Da einige der veröffentlichten Hypothesen einen Nachteil von Trägern der Blutgruppe O gegenüber bestimmten Infektionskrankheiten vermuten (vgl. Kapitel 1.2), wurde das System so konzipiert, daß die drei häufigsten Varianten der Blutgruppe O unterschieden werden können. Diese sind die Allele O_1 , O_{1v} und O_2 , wobei die Identifizierung der O_2 -Variante besonders wichtig ist, da ihre Sequenz der des

Allels der Blutgruppe B stark ähnelt und daher leicht als solches fehlbestimmt werden könnte.

Das Analysesystem wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich auf bronzezeitliche und frühneuzeitliche Skelettfunde angewendet und erwies sich den Vorannahmen gemäß als geeignet für die Analyse degradierter DNA. Da nur kurze DNA-Fragmente als Matrizen für die ABO-Genotypisierung fungieren, kann davon ausgegangen werden, daß auch Proben mit weniger guter DNA-Erhaltung als die hier untersuchten einer Analyse mit dem neu entwickelten System zugänglich sind. Mit der Etablierung dieses Systems wurde eine Anschlußmöglichkeit für Projekte geschaffen, die auf die Untersuchung epidemiologischer Fragestellungen im Zusammenhang mit den ABO-Blutgruppen an archäologischem Skelettmaterial fokussieren. Diesen Vorhaben steht nun ein an historischen Skelettfunden erprobtes molekulargenetisches Werkzeug zur ABO-Genotypisierung aus degradierter DNA zur Verfügung.

Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes mit molekulargenetischen Markern

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit wurde dahingehend formuliert, die verfügbaren Möglichkeiten der Rekonstruktion phänotypischer Charakteristika wie Haarfarbe und Hauttyp durch molekulargenetische Marker zu prüfen und auf historisches Skelettmaterial anzuwenden. Ziel ist dabei die Einführung von DNA-Markern zur Verbreiterung der Datenbasis, auf der Rekonstruktionen des Erscheinungsbildes von Personen in anthropologischen und forensischen Zusammenhängen basieren. Darüber hinaus soll bei dieser Rekonstruktionsarbeit der subjektive Einfluß des Präparators durch objektivierbare, mit naturwissenschaftlichen Methoden zu erhebende Daten reduziert werden (vgl. Kapitel 1.3).

Um diese Zielsetzung zu erreichen, wurden SNPs auf dem *MC1R*-Gen und dem *ASIP*-Gen an rezenten und historischen Proben untersucht. Dazu wurde ein PCR-basiertes Analysesystem etabliert, das sehr kurze DNA-Fragmente als Matrizen verwendet, um zu gewährleisten, daß auch aus Proben mit degradierter DNA Typisierungen möglich sind. Anhand der rezenten

Stichprobe wurden Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für die untersuchten Marker ermittelt (vgl. Kapitel 6.1.2). Es zeigte sich, daß die typisierten SNPs ein Erkennen von heller, UV-sensitiver Haut und rotem Haar mit hoher Bestimmungssicherheit ermöglichen. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden auf archäologische Skelettfunde verschiedener Zeitstellungen angewendet. Die meisten der untersuchten (prä)historischen Individuen können als Personen mit blondem oder dunklerem Haar und wenig UV-sensitiver Haut charakterisiert werden. Bei einem Individuum (EN 388) wurde eine Merkmalskombination angetroffen, die es sehr wahrscheinlich macht, daß dieser Mensch rothaarig und mit einer UV-empfindlichen Haut ausgestattet war (vgl. Kapitel 6.1.3).

Ogleich nur zum Aussehen eines der analysierten historischen Individuen solch detaillierte Aussagen getroffen werden können, zeigt die Untersuchung das Potential der Bestimmung von phänotypassoziierten DNA-Markern für die Rekonstruktionsarbeit auf. Sie demonstriert, daß die in der Erbsubstanz gespeicherten Informationen, welche wesentliche Aspekte des äußeren Erscheinungsbildes des Menschen determinieren, erfolgreich auch an degradiertes DNA untersucht werden können. Nun ist prinzipiell der Zugang zu dieser bislang nicht genutzten Informationsquelle für die Gewinnung von Daten über das Aussehen (prä)historischer Menschen eröffnet. Damit zeichnet sich ab, daß es in naher Zukunft durch die Einbeziehung molekulargenetischer Analysen in die Rekonstruktionserstellung möglich sein wird, Abbildern unserer Vorfahren gegenüberzustehen, die dem tatsächlichen Äußeren dieser Individuen sehr nahekommen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit entwickelten Analysesystemen wird eine Erweiterung der Grenzen der bislang in der *ancient* DNA Analytik angewandten Untersuchungsmöglichkeiten angestrebt. Das erweiterte Markerrepertoire vergrößert ebenso die Anzahl der Fragestellungen, zu deren Lösung die Analyse von aDNA beitragen kann. Einigen dieser Fragen konnte bereits im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nachgegangen werden. Für weitere Vorhaben wurden mit der Entwicklung, Etablierung und Validierung der respektiven Analysesysteme die methodischen Voraussetzungen geschaffen.

8 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion der Lebensbedingungen von Menschen vergangener Zeiträume ist eines der Desiderate der Prähistorischen Anthropologie. Ein wichtiges Quellenmaterial stellen in diesem Zusammenhang die körperlichen Überreste vor- und frühgeschichtlicher Menschen dar. Ihre Analyse bietet Zugang zu biologischen Kenngrößen, aus denen wiederum kultur- und sozialgeschichtliche Daten über historische Populationen abgeleitet werden können.

Die *ancient DNA*-Analytik bietet Zugang zu solchen biologischen Daten über die klassischen morphologischen Methoden hinaus. Zur Erweiterung der bislang verfügbaren Möglichkeiten der molekulargenetischen Untersuchung von Skelettfunden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit neue Marker und Analysesysteme etabliert, um die Möglichkeiten der Rekonstruktion von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen (prä)historischen Individuen zu erweitern, das Geschlechterverhältnis in einer Population verlässlich bestimmen zu können, Informationen im Kontext epidemiologischer Fragestellungen sowie Erkenntnisse über das äußere Erscheinungsbild unserer Vorfahren zu gewinnen.

Eine Geschlechtsdetermination bildet die Grundlage für die Untersuchung der Geschlechterrelation einer Bevölkerung. Um die sichere Bestimmung auch für Proben mit degradiertem DNA zu gewährleisten, wurde ein Analysesystem entwickelt, in dem X- und Y-chromosomale STRs koamplifiziert werden. Das System konnte erfolgreich auf bronzezeitliche Proben der Lichtensteinhöhle/Harz angewendet werden.

Das Markerkerrepertoire zur Verwandtschaftsanalyse wurde um die X-chromosomalen STRs erweitert, die besonders bei der Untersuchung von Vater-Tochter-Dyaden wichtige Informationen bereitstellen. In den an historischen Proben der Fundstellen „Lichtensteinhöhle“ und „Goslar/Hinter den Brüdern“ durchgeführten Untersuchungen konnte das Potential dieses Markertyps zur Überprüfung vermuteter Vater-Tochter-Beziehungen erfolgreich genutzt werden. Darüber hinaus trug die Typisierung X-chromosomaler STRs von

Individuen der Lichtteinhöhle zur Rekonstruktion des dort praktizierten Residenzverhaltens bei. Es konnten deutliche Hinweise auf eine patrilokale Wohnfolgeordnung ausgemacht werden.

Die Entwicklung eines Multiplex-Analysesystems zur Typisierung des immungenetischen Markers *ccr5* und seiner um 32 bp deletierten Variante ermöglichte die Untersuchung der Frage nach dem Zeitraum der Verbreitung der *ccr5*Δ32-Mutation an historischem Skelettmaterial. Es konnte gezeigt werden, daß das Alter der Mutation bislang zu gering geschätzt wurde.

Schließlich wurde ein Beitrag zur Etablierung molekulargenetischer Marker bei der Rekonstruktion phänotypischer Charakteristika unserer Vorfahren geleistet, indem phänotypassoziierte DNA-Marker an historischen Skelettfunden untersucht wurden. Die Analysen ermöglichten es, in begrenztem Maße Aussagen zum äußeren Erscheinungsbild der untersuchten vor- und frühgeschichtlichen Menschen zu treffen.

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Arbeitsabläufe und verwendete Reagenzien im EZ1 Biorobot.....	22
Tab. 2	X-STR Multiplex PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allele und Allelgrößen.....	25
Tab. 3	X/Y-STR-Multiplex-PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allele und Allelgrößen.....	30
Tab. 4	ccr5-fingerprint-STR Multiplex PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allele und Allelgrößen	32
Tab. 5	ccr5-linked-STR Multiplex PCR: verwendete Primer, Farbmarkierungen, Allelrange und Allelgrößen	34
Tab. 6	Phänotyp-SNP-PCRs: verwendete Primer und Produktgrößen	37
Tab. 7	ABO-Typisierungs-PCRs: verwendete Primer, nachgewiesene relevante Nukleotidpositionen und Produktgrößen.....	39
Tab. 8	SBE-Multiplexsysteme: verwendete Primer, amplifizierte relevante SNP-Positionen und Produktgrößen	43
Tab. 9	SBE-Duplexsystem zur Generierung eines Zweipunkte-Standards, verwendete Primer und Produktgrößen.....	44
Tab. 10	Typisierungsergebnisse für X/Y-chromosomale Marker der untersuchten Rezentproben	58
Tab. 11	Typisierungsergebnisse X- und Y-chromosomaler Marker für mehrere bronzezeitliche Individuen.....	61
Tab. 12	Struktur und Informationsgehalt der verwendeten X-chromosomalen STRs	66
Tab. 13	AmpF/STR Profiler Plus PCR Amplification Kit: Systeme, Farbmarkierungen, Allelzahl und Allelgrößen.....	68
Tab. 14	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 26, Do 1102 und Do 2030	74

Tab. 15	Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für Do 2030	75
Tab. 16	Typisierungsergebnisse für die untersuchten X-chromosomalen Systeme für die Individuen Do 58.3 und Do 1500.....	76
Tab. 17	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 902 und Do 2589	77
Tab. 18	Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die Individuen Do 58.3, Do 1500, Do 902 und Do 2589	78
Tab. 19	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 1500 und Do 2388	79
Tab. 20	Determinierte X-chromosomale Haplotypen einiger Individuen der Lichtensteinhöhle: Do 26, Do 1102, Do 1500 und Do 2388	80
Tab. 21	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 1500, Do 2388 und 1102	80
Tab. 22	Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die untersuchten Individuen Do 1500, Do 2388 und Do 1102.....	81
Tab. 23	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die bronzezeitlichen Individuen Do 3742 und Do 183	83
Tab. 24	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die Individuen Do R1, Do 1911, Do 3756, Do 3750 und Do 1206	85
Tab. 25	X-chromosomale Marker für Do 3742, 1044 und 2030.....	87
Tab. 26	Möglichkeiten von Verwandtschaft über X-chromosomale Muster zwischen Do 3742, 1044 und 2030 und potentielle Haplotypenzuordnungen.....	88
Tab. 27	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die Individuen Gs 84, Gs 97 und Gs 76	92
Tab. 28	Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die untersuchten archäologischen Proben Gs 97 und Gs 76.....	92

Tab. 29	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker und Amelogenin für die untersuchten bronzezeitlichen Individuen aus der Lichtensteinhöhle	98
Tab. 30	Determinierte X-chromosomale Haplotypen in der Lichtensteinhöhle	99
Tab. 31	Zusammenfassung der Typisierungsergebnisse für X-STRs Marker, mtDNA und Y-STRs für die untersuchten bronzezeitlichen Individuen aus der Lichtensteinhöhle	100
Tab. 32	Erwartete Variabilität von X-chromosomalen, mt- und Y-Haplotypen für patrilokales und matrilocales Residenzverhalten.	101
Tab. 33	Beobachtete Variabilität von X-chromosomalen, mitochondrialen und Y- Haplotypen bei (ehemals) reproduktionsfähigen Individuen aus der Lichtensteinhöhle.	101
Tab. 34	Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Rezentproben	107
Tab. 35	Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Proben aus Goslar/Hinter den Brüdern.....	108
Tab. 36	Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Proben aus der Lichtensteinhöhle.....	109
Tab. 37	Typisierungsergebnisse für die ccr5-fingerprint-PCR für Proben aus Alia (Sizilien).....	113
Tab. 38	Proben für die Sequenzierung des ccr5 bzw. ccr5 Δ 32-Allels.....	114
Tab. 39	Untersuchte Nukleotidpositionen zur Diskriminierung von ABO-Allelen, Längen der generierten PCR-Produkte und allelspezifische RFLP-Produktlängen	124
Tab. 40	Erwartete Restriktionsmuster für verschiedene ABO-Allelkombinationen.....	125
Tab. 41	ABO-Genotypisierungsergebnisse für die untersuchten rezenten Kontrollproben	127

Tab. 42	ABO-Genotypisierungsergebnisse für die untersuchten archäologischen Skelettproben aus der Lichtensteinhöhle und Goslar...	129
Tab. 43	Typisierungsergebnisse mit dem AmpF/STR™ Profiler Plus Kit für die untersuchten historischen Individuen aus der Lichtensteinhöhle und Goslar.....	131
Tab. 44	Untersuchte Loci auf dem <i>MC1R</i> -Gen und der 5' untranslatierten Region des <i>ASIP</i> sowie markerbezügliche Untersuchungsergebnisse aus anderen Studien.....	137
Tab. 45	Schema einer 2×2-Tabelle zur Berechnung der <i>odds ratio</i>	139
Tab. 46	<i>Odds ratios</i> für die untersuchten SNPs bei unterschiedlichen Fragestellungen.....	143
Tab. 47	Markersets für ROC-Berechnung bei unterschiedlichen Fragestellungen.....	144
Tab. 48	ROC-Analyseergebnisse für die untersuchten Fragestellungen..	145
Tab. 49	Zusammenfassung der Typisierungsergebnisse der untersuchten phänotypenassoziierten Marker für historische Proben aus Goslar (Gs) und der Stiftskirche Enger (EN).....	150
Tab. 50	Zusammenfassung der Typisierungsergebnisse der untersuchten phänotypenassoziierten Marker für (prä)historische Proben aus der Lichtensteinhöhle (Do).....	151
Tab. 51	Vergleich des errechneten Trennwertes für die Identifizierung von Individuen mit rotem Haar und heller Haut und den ermittelten Kenngrößen für EN 388.....	152
Tab. 52	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die untersuchten Individuen der Lichtensteinhöhle und Goslar/Hinter den Brüdern.....	198
Tab. 53	Typisierungsergebnisse für phänotypenassoziierte Marker für die untersuchten Individuen der Lichtensteinhöhle, Goslar/Hinter den Brüdern und Enger.....	207

Tab. 54	Untersuchte Individuen zur Berechnung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen (vgl. Kap. 6), ihre phänotypischen Charakteristika und Typisierungsergebnisse für die phänotypenassoziierten SNPs Val60Leu, Asp84Glu, Val92Met, Arg151Cys, Arg160Trp, Arg142His, Asp294His, <i>ASIP</i> g. 8818.	214
Tab. 55	Mit zwei verschiedenen Methoden erhaltene Typisierungsergebnisse (vgl. Kapitel 6.1.4) für Loci des <i>MC1R</i> -Gens (30 Individuen) und der <i>ASIP</i> UTR (10 Individuen).....	219
Tab. 56	Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für rezente Proben.	220

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Rekonstruktion des Gesichtes einer Mumie, für die Identität mit Nofretete vermutet wird.	13
Abb. 2	Zwei Darstellungen von Neanderthalern. a: Darstellung als keulenschwingender Wilder b: Dermoplastische Rekonstruktion eines Neandertalers als werkzeugherstellender Mensch	14
Abb. 3	Prinzip der im EZ1 Biorobot angewendeten Extraktionsmethode	22
Abb. 4	Mit den benötigten Reaktionschemikalien vorgefüllte und verblisterte Kartusche für die DNA-Extraktion einer Probe.....	23
Abb. 5	Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen X-STR-Multiplex-PCR	25
Abb. 6	Agarosegel zum Vergleich des Amplifikationserfolges mit drei verschiedenen Reaktionszusammensetzungen jeweils für drei historische Proben aus der Lichtensteinhöhle Do 26, Do 1076 und Do 1911 sowie eine rezente Probe	28
Abb. 7	Elektropherogramm eines Amplifikationsergebnisses einer historischen Probe aus der Lichtensteinhöhle (Do 2589) mit dem Multiplex-PCR-Kit.....	28
Abb. 8	Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen X/Y-STR-Multiplex-PCR	30
Abb. 9	Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen ccr5-fingerprint-Multiplex-PCR	32
Abb. 10	Schema des Längenbereiches der verwendeten Systeme der neu entworfenen ccr5-linked-STR-Multiplex-PCR.....	34
Abb. 11	Single Base Extension Reaktion. Dargestellt ist jeweils der obere DNA-Strang für zwei Allele eines Locus mit einem SNP in biallelischer Ausprägung (T>G).....	41

Abb. 12	Schema einer simultanen SBE-Analyse von vier SNP-Stellen (Pos.1-4), die auf einem oder auf mehreren PCR-Produkten verschiedenen lokalisiert sein können.....	42
Abb. 13	Blick in einen Teil der Lichtensteinhöhle	48
Abb. 14	Menschliche Überreste in der Lichtensteinhöhle	49
Abb. 15	Rekonstruktion biologischer Verwandtschaft eines Teils der Individuen aus der Lichtensteinhöhle	50
Abb. 16	Ausschnitt aus der Lageskizze des Klosterfriedhofs.....	51
Abb. 17	Camposanto vecchio in Alia	52
Abb. 18	Femur eines der in der Camposanto vecchio in Alia bestatteten Individuen	52
Abb. 19	Rekonstruktion des ersten Kirchenbaus in Enger mit Eintragung der gefundenen Gräber. Maßstab 1:200	53
Abb. 20	Die Individuen aus den zentralen Gräbern der Stiftskirche Enger, EN 447, EN 463, EN 462.....	53
Abb. 21	Kalvarium und Mandibula des Individuums EN 452	54
Abb. 22	Kalvarium und Mandibula des Individuums EN 388	54
Abb. 23	Agarosegel mit Amplifikationsprodukten (91 – 166 bp) bronzezeitlicher Proben aus der Lichtensteinhöhle.	59
Abb. 24	Ergebnisse der Amplifikation (Elektropherogramm) mit der neu entwickelten X/Y-Multiplex-PCR für zwei Individuen aus der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle.....	60
Abb. 25	Vererbungsgang des X-Chromosoms	64
Abb. 26	Ideogramm des X-Chromosoms und Lokalisation der auf ihm befindlichen STRs und Zusammenfassung in Linkage-Gruppen	64
Abb. 27	Rezente Familie. Analyse X-chromosomaler Haplotypen zur Prüfung der Eignung der ausgewählten Marker aus der Linkage-Gruppe 2 für die Verwandtschaftsrekonstruktion	70

- Abb. 28** Zu überprüfende Verwandtschaftsbeziehungen bei einer rezenten Familie (Defizienzfall).....71
- Abb. 29** Verwandtschaftsrekonstruktion an einer rezenten Familie zur Lösung eines Defizienzfalles.....72
- Abb. 30** Do 2030 zeigt eine bilineare Deszendenz, da es Träger des im Familienzweig II vorkommenden Y-Haplotypen sowie des in Familienzweig III vertretenen mt-Haplotyp ist und könnte das Bindeglied zwischen beiden Zweigen sein73
- Abb. 31** Postulierte Vater-Tochter-Beziehungen zwischen Individuen der bronzezeitlichen Lichtensteinhöhle für die Fälle Do 58.3 und Do 1500 (a) sowie Do 902 und Do 2589 (b).....76
- Abb. 32** Postulierte Mutter-Tochter-Beziehung zwischen Individuen der Lichtensteinhöhle im Fall Do 1500 und Do 2388.....79
- Abb. 33** Erweiterter Stammbaum zur Rekonstruktion biologischer Verwandtschaft eines Teils der Individuen aus der Lichtensteinhöhle nach Angliederung der bislang separaten Mutter-Tochter-Dyade Do 1500/Do 2388 über Do 1102 an den Stammbaum.....82
- Abb. 34** Postulierte Geschwister-Beziehung zwischen Individuen Do 3742 und Do 183.....83
- Abb. 35** Vermutete Verwandtschaftsbeziehung zwischen Do 1911 und Do R1 (Geschwister) sowie zwischen Do 1911, Do 3756 als Eltern von Do 3750 und Do 1911 als Vater von Do 1206.....84
- Abb. 36** Verwandtschaftsüberprüfung an einer prähistorischen Familie (Do 1911, Do R1, Do 3750, Do 3756, Do 1206).....86
- Abb. 37** Drei Individuen der Lichtensteinhöhle, die X-chromosomale Allele aufweisen, die auf eine Verwandtschaft zwischen mindestens zwei der Individuen hindeuten (Do 2030, Do 1044, Do 3742).87
- Abb. 38** Zwei mögliche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Do 3742 und Do 1044.....89

Abb. 39	Mögliche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Do 3742, Do 183 und Do 2030.....	90
Abb. 40	Vorgeschlagene Verwandtschaftsbeziehung zwischen historischen Individuen aus Goslar.	91
Abb. 41	Modell (ein Familienzweig) für die Veränderung der Variabilität von mt- und Y-Haplotypen in einer Population bei strikter Einhaltung von a) Patrilokalität bzw. b) Matrilokalität.....	95
Abb. 42	Modell (ein Familienzweig) für die Veränderung der Variabilität X-chromosomaler Haplotypen in einer Population bei strikter Einhaltung von Matrilokalität.....	96
Abb. 43	Modell (ein Familienzweig) für die Veränderung der Variabilität X-chromosomaler Haplotypen in einer Population bei strikter Einhaltung von Patrilokalität.	97
Abb. 44	Heutige Verteilung der <i>ccr5</i> Δ32-Variante in Europa.....	112
Abb. 45	Alignment der sequenzierten Allele mit den Referenzallelen für <i>ccr5</i> aus GenBank.	115
Abb. 46	Schema der genomischen Organisation des <i>ccr5</i> -Gens und der ausgewählten <i>ccr5</i> -gelinkten STRs auf Chromosom 3p21.....	118
Abb. 47	Elektropherogramm von PCR-Produkten zweier rezenter Individuen, die mit den Triplexen A (<i>ccr5</i> , IRI3.1, IRI3.2) und B (<i>ccr5</i> , AFMB362wb9, GAAT12D11) gewonnen wurden.....	119
Abb. 48	Elektropherogramm von PCR-Produkten einer bronzezeitlichen Probe, die mit den Triplexen A (<i>ccr5</i> , IRI3.1, IRI3.2) und B (<i>ccr5</i> , AFMB362wb9, GAAT12D11-) gewonnen wurden.	121
Abb. 49	Alignment eines Exon7-Abschnittes verschiedener ABO-Allele, des Primers für das auf Exon 7 liegende PCR-Produkt und der darin enthaltenen Erkennungssequenzen.....	126
Abb. 50	ABO-Amplifikationsprodukte aus Extrakten der untersuchten historischen Individuen. a 103/104 bp lange PCR-Produkte, die mit dem	

Ex6 System gewonnen wurden. b 64 bp lange PCR-Produkte, die mit dem Ex7 System gewonnen wurden.	128
Abb. 51 RFLP Analyse der aus den historischen Proben gewonnenen ABO-Amplikons	129
Abb. 52 Schema der Melaninbildung	135
Abb. 53 Testwertkurven für ein Patienten- und ein Kontrollkollektiv	141
Abb. 54 Beispiel für eine ROC-Kurve.....	142
Abb. 55 ROC-Kurven (blau) für die Identifizierung von a) Rothaarigen mit Markerset I und b) Trägern von Hauttyp I mit Markerset II.....	147
Abb. 56 ROC-Kurven (blau) für die Identifizierung von a) Blonden mit Markerset I und b) Trägern von grünen Augen mit Markerset I.....	148
Abb. 57 Elektropherogramm mit <i>MC1R</i> -SNP-Ergebnissen einer bronzezeitlichen Probe (Do 902).. ..	152
Abb. 58 Agarosegel mit PCR-Produkten von phänotypassoziierten SNPs aus bronzezeitlichen Proben der Lichtensteinhöhle.....	154
Abb. 59 Elektropherogramm der SBE-Produkte (Set A) einer Probe ohne Zweipunkte-Standard (oben) und mit Standard	155
Abb. 60 Elektropherogramm der SBE-Produkte (Set B) von zwei Proben (Do 2111 und Do 1247) mit Zweipunkte-Standard.	155
Abb. 61 Agarosegel mit PCR-Produkten von phänotypassoziierten SNPs aus bronzezeitlichen Proben der Lichtensteinhöhle (Do) sowie Leerkontrollen (X1-X3)	156

11 Literaturverzeichnis

- Abdel-Malek ZA, Ross R, Trinkle L, Swope V, Pike JW, Nordlund JJ (1988)** Hormonal effects of vitamin D3 on epidermal melanocytes. *J Cell Physiol* 136: 273-280
- Alt KW, Pichler S, Vach W, Klima B, Vlcek E, Sedlmeier J (1997)** Twenty-five thousand-year-old triple burial from Dolni Vestonice: an ice-age family? *Am J Phys Anthropol* 102: 123-131
- Altschuler EL (2000)** Plague as HIV vaccine adjuvant. *Med Hypotheses* 54: 1003-1004
- Alvarez V, Lopez-Larrea C, Coto E (1998)** Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum Genet* 102: 483-486
- Amici A, Rollo F (1992)** PCR-SSCP characterization of Mu element components in a Huari (10th century) maize sample. *Ancient DNA Newsletter* 1/2: 22-23
- Ancillotti Perilli E (2004)** Ancient STRs Haplotype and D32CCR5: STRs as an instrument to investigate the origin of the 32 base pair deletion conferring resistance to HIV-1 infection in ancient German skeletons from 18th century and Bronze Age collections. *Diplomarbeit, Universität Rom*
- Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H (1992)** Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Hum Mol Genet* 1: 137
- Anslinger K, Rolf B, Keil W (2001)** Evaluation and application of the AmpF/STR Profiler Plus PCR amplification kit in a Bavarian population sample. *Int J Legal Med* 114: 278-280
- Aroca P, Urabe K, Kobayashi T, Tsukamoto K, Hearing VJ (1993)** Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J Biol Chem* 268: 25650-25655
- Auffermann B, Orschiedt J (eds) (2002)** *Die Neandertaler. Eine Spurensuche.* Konrad Theiss Verlag GmbH, Stuttgart
- Bacher R, Suter PJ, Eggenberger P, Ulrich-Bochsler S, Meyer L (1990)** *Aegerten. Die spätrömischen Anlagen und der Friedhof der Kirche Bürglen.* Bern, Stuttgart: Haupt. pp 98-131

- Bailey DMD, Affara NA, Ferguson-Smith MA (1992)** The X-Y homologous gene Amelogenin maps to the short arms of both the X and Y chromosomes and is highly conserved in primates. *Genomics* 14: 203-205
- Barnard A, Good A (eds) (1984)** *Research Practices in the Study of kinship*. Academic Press, London
- Barnes JA (1973)** Genetrix-genitor-nature-culture. In: Goody J (ed) *The character of kinship*. Cambridge University Press London
- Baron H, Hummel S, Herrmann B (1995)** Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones. *J Archaeol Sci* 23: 667-671
- Bartels I, Hansmann I, Eiben B (1990)** Excess of females in chromosomally normal spontaneous abortuses. *Am J Med Genet* 35: 297-298
- Bastiaens MT, ter Huurne JA, Kielich C, Gruis NA, Westendorp RG, Vermeer BJ, Bavinck JN (2001)** Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Genet* 68: 884-894
- Battiloro E, Andreoni M, Parisi SG, Mura MS, Sotgiu G, Aceti A, Cossu G, Concia E, Verna R, D'Ambrosio E (2000)** Distribution of the CCR5 delta32 allele in Italian HIV type 1-infected and normal individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 181-182
- Bender K, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Schneider PM (2003)** Comparative analysis of short tandem repeats and single nucleotide polymorphisms on the Y-chromosome in Germans, Chinese and Thais. *Leg Med (Tokyo)* 5 Suppl 1: S164-S168
- Berg S, Bertozzi B, Meier R, Mendritzki S (1983)** Comparative methodological contribution and critical observations on the interpretation of blood group determinations of mummies and skeletal remains. *Anthropol Anz* 41: 1-19
- Bertermann U (2004)** Alte STR-Haplotypen und delta32ccr5. Untersuchungen zur Datierungsfrage einer immunologisch relevanten Mutation an Skelettfunden der Lichtensteinhöhle und des Frankenbergquartiers in Goslar. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes T, O'Donnell S (1987)** Association between O blood group and occurrence and severity of diarrhoea due to *Escherichia coli*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 120-123
- Blackwell C, Dundas S, James V, Mackenzie D, Brown J, Alkout A, Todd W, Elton R, Weir D (2002)** Blood group and susceptibility to disease caused by *Escherichia coli* O157. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 393-396

- Blanpain C, Lee B, Tackoen M, Puffer B, Boom A, Libert F, Sharron M, Wittamer V, Vassart G, Doms RW, Parmentier M (2000)** Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations. *Blood* 96: 1638-1645
- Borgognini-Tarli SM (1980)** Blood group determination on medieval bone samples (XI A.D.) from gava market (Hungary). *Anthrop Contemp* 3: 351-354
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994)** High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457
- Box NF, Duffy DL, Irving RE, Russell A, Chen W, Griffyths LR, Parsons PG, Green AC, Sturm RA (2001)** Melanocortin-1 receptor genotype is a risk factor for basal and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 116: 224-229
- Box NF, Wyeth JR, O'Gorman LE, Martin NG, Sturm RA (1997)** Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* 6: 1891-1897
- Boyd WC, Boyd LC (1933)** Blood grouping by means of preserved muscle. *Science* 78: 578
- Bramanti B (2000)** Genetic characterization of the Goslar skeleton collective by aDNA analysis. Anlage 3 zum Abschlußbericht "Der Harz als frühmittelalterliche Industrielandschaft" Teilprojekt Anthropologie AZ II 70959
- Bramanti B, Hummel S, Chiarelli B, Herrmann B (2003)** Ancient DNA analysis of the delta F508 mutation. *Hum Biol* 75: 105-115
- Bramanti B, Hummel S, Schultes T, Herrmann B (2000)** Genetic characterization of an historical human society by means of aDNA analysis of autosomal STRs. *Biennial Books of EAA* 1: 147-163
- Brandstatter A, Parsons TJ, Parson W (2003)** Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *Int J Legal Med* 117: 291-298
- Brown K (1998)** Gender and Sex - What can ancient DNA tell us? *Ancient Biomol* 2: 3-15
- Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W (1999)** DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20 : 1722-1728
- Burger J, Hummel S, Pfeiffer I, Herrmann B (2000)** Palaeogenetic analysis of (pre)historic artifacts and its significance for anthropology. *Anthropol Anz* 58: 69-76

- Burton ML, Moore CC, Whiting, J.W.M. (1996)** Regions based on social structure. *Curr Anthropol* 37: 87-123
- Cagliá A, Dobosz M, Boschi I, D'Aloja E, Pascali VL (1998)** Increased forensic efficiency of a STR-based Y-specific haplotype by addition of the highly polymorphic DYS385 locus. *Int J Legal Med* 111: 142-146
- Capra F, Steindl-Rast D, Matus T (eds) (1991)** *Belonging to the universe: explorations on the frontiers of science and spirituality*. San Francisco: Harper.
- Christodoulou C, Poullikas M, Neumann AU, Kostrikis LG (1997)** Low frequency of CCR5delta32 allele among Greeks in Cyprus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13: 1373-1374
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA (2000)** The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 695-702
- Clisson I, Keyser C, Francfort H-P, Crubezy E, Samashev K, Ludes B (2001)** Genetic Analysis of Human Remains from a Frozen Kurgan in Kazakhstan (Berel Site, 200-300 BC). (unveröffentlichte Arbeit)
- Cooke G, Hill A (2001)** Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2: 967-977
- Cooper A (1992)** Removal of colourings, inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contamination from ancient DNA samples. *Ancient DNA Newsletter* 1/2: 31-32
- Cooper A, Rambaut A, Macaulay V, Willerslev E, Hansen AJ, Stringer C (2001)** Human origins and ancient human DNA. *Science* 292: 1655-1656
- Dean M, Carrington M, O'Brien SJ (2002)** Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 3 : 163-292
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ (1996)** Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 273: 1856-1862
- Debenham PG (1996)** DNA typing. Heteroplasmy and the Tsar. *Nature* 380: 484-485
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ,**

- Littman DR, Landau NR (1996)** Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996)** HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-673
- Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R (2002)** Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X- chromosome. *Forensic Sci Int* 125: 217-222
- Edelmann J, Hering S, Michael M, Lessig R, Deischel D, Meier-Sundhausen G, Roewer L, Plate I, Szibor R (2001)** 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. *Forensic Sci Int* 124: 215-218
- Edelmann J, Szibor R (1999)** Validation of the HumDXS6807 short tandem repeat polymorphism for forensic application. *Electrophoresis* 20: 2844-2846
- Faerman M, Kahila G, Smith P, Greenblatt C, Stager L, Filon D, Oppenheim A (1997)** DNA analysis reveals the sex of infanticide victims. *Nature* 385: 212-213
- Finke T (1999)** Die Skelettfunde aus dem neuzeitlichen Gräberfeld Goslar, "Hinter den Brüdern". Anlage 1 zum Abschlußbericht "Der Harz als frühmittelalterliche Industrielandschaft" Teilprojekt Anthropologie AZ II 70959
- Fischer C, Jock B, Vogel F (1998)** Interplay between humans and infective agents: a population genetic study. *Hum Genet* 102: 415-422
- Fitzpatrick TB (1988)** The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124: 869-871
- Flanagan N, Healy E, Ray A, Philips S, Todd C, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL (2000)** Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet* 9: 2531-2537
- Flindt S, Leiber C (eds) (1998)** Kulthöhlen und Menschenopfer im Harz, Ith und Kyffhäuser. Mitzkat, Holzminden
- Friedman MJ, Trager W (1981)** The biochemistry of resistance to malaria. *Sci Am* 244: 154-164
- Friedmann PS, Wren FE, Matthews JN (1990)** Ultraviolet stimulated melanogenesis by human melanocytes is augmented by di-acyl glycerol but not TPA. *J Cell Physiol* 142: 334-341

- Fukumori Y, Ohnoki S, Shibata H, Yamaguchi H, Nishimukai H (1995)** Genotyping of ABO blood groups by PCR and RFLP analysis of 5 nucleotide positions. *Int J Legal Med* 107: 179-182
- Galvani AP, Slatkin M (2003)** Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5- Δ 32 HIV-resistance allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15276-15279
- Gerstenberger J (2002)** Analyse alter DNA zur Ermittlung von Heiratsmustern in einer frühmittelalterlichen Bevölkerung. Dissertation, Universität Göttingen
- Gerstenberger J, Hummel S, Herrmann B (1998)** Assignment of an Isolated Skeletal Element to the Skeleton of Duke Christian II through STR Typing. *Ancient Biomol* 00: 1-6
- Gerstenberger J, Hummel S, Herrmann B (2002)** Reconstruction of residence patterns through genetic typing of skeletal remains of an early medieval population. *Ancient Biomol* 4 : 25-31
- Gerstenberger J, Hummel S, Schultes T, Herrmann B (2001)** Reconstruction of a historical genealogy by DNA analysis from ancient human remains. *World Archeological Congress* 4
- Gilbert MT, Hansen AJ, Willerslev E, Rudbeck L, Barnes I, Lynnerup N, Cooper A (2003a)** Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *Am J Hum Genet* 72: 48-61
- Gilbert MT, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, Cooper A (2003b)** Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 72: 32-47
- Gill P (2001)** An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int J Legal Med* 114: 204-210
- Glass RI, Holmgren J, Haley CE, Khan MR, Svennerholm A, Stoll BJ, Hossain KMB, Black RE, Yunus M, Barua D (1985)** Predisposition for cholera of individuals with O blood group. *Am J Epidemiol* 121: 791-796
- Grimes EA, Noake PJ, Dixon L, Urquhart A (2001)** Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Sci Int* 122: 124-129
- Grunnet N, Steffensen R, Bennett EP, Clausen H (1994)** Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: frequency of a novel O allele defined as O2. *Vox Sang* 67: 210-215
- Gusmao L, Alves C, Costa S, Amorim A, Brion M, Gonzalez-Neira A, Sanchez-Diz P, Carracedo A (2002)** Point mutations in the flanking

regions of the Y-chromosome specific STRs DYS391, DYS437 and DYS438. *Int J Legal Med* 116: 322-326

Gusmao L, Sánchez-Diz P, Alves C, Lareu MV, Carracedo A, Amorim A (2000) Genetic diversity of nine STRs in two northwest Iberian populations: Galicia and northern Portugal. *Int J Legal Med* 114: 109-113

Haldane J (1949) The rate of mutations of human genes. *Proc 7th Int Congr Genet Hereditas (Suppl)* 35: 267-273

Harding RM, Healy E, Ray AJ, Ellis NS, Flanagan N, Todd C, Dixon C, Sajantila A, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL (2000) Evidence for variable selective pressures at MC1R. *Am J Hum Genet* 66: 1351-1361

Harrison G, Owen J (1964) Studies on the inheritance of human skin colour. *Ann Hum Genet* 28: 27-37

Hauswirth WW, Dickel CD, Rowold DJ, Hauswirth MA (1994) Inter- and intrapopulation studies of ancient humans. *Experientia* 50: 585-591

Healy E, Jordan SA, Budd PS, Suffolk R, Rees JL, Jackson IJ (2001) Functional variation of MC1R alleles from red-haired individuals. *Hum Mol Genet* 10: 2397-2402

Hearing VJ, Jimenez M (1987) Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* 19: 1141-1147

Hennessy EP, Green AD, Connor MP, Darby R, MacDonald P (2003) Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 188: 176-177

Herrmann B, Grupe G, Hummel S, Piepenbrink H, Schutkowski H (1990) *Prähistorische Anthropologie. Leitfaden der Feld- und Labormethoden.* Springer Heidelberg.

Hill PB, Kopp J (eds) (1995) *Familiensoziologie. Grundlagen und theoretische Perspektiven.* Stuttgart: Teubner.

Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Haeseler AA, Paabo S (2001a) DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* 29: 4793-4799

Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S (2001b) Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2: 353-359

Holy L (ed) (1996) *Anthropological Perspectives on Kinship.* London, Pluto Press.

- Honda K, Harihara S, Fukushima H, Wakasugi C, Misawa S (1994)** Sex Identification of Old Skeletal Remains by DNA Analysis: The Report of Three Cases. *Jpn J Legal Med* 48: 349-356
- Honda K, Tun Z, Matoba R (2001)** DNA testing of Klinefelter's syndrome in a criminal case using XY chromosomal STR multiplex-PCR. *J Forensic Sci* 46: 1235-1238
- Höss M, Jaruda P, Zastawny TH, Dizdrearoglu M, Pääbo S (1996)** DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24: 1304-1307
- Hummel S (ed) (2003a)** Ancient DNA typing - Methods, Strategies and Applications. Springer Verlag New York, Heidelberg
- Hummel S (2003b)** Ancient DNA: recovery and analysis. In: Nature Publishing Group (ed) *Encyclopedia of the Human Genome*
- Hummel S, Bramanti B, Schultes T, Kahle M, Haffner S, Herrmann B (2000)** Megaplex DNA typing can provide a strong indication of the authenticity of ancient DNA amplifications by clearly recognizing any possible type of modern contamination. *Anthrop Anz* 58: 15-21
- Hummel S, Herrmann B (1991)** Y-Chromosome-Specific DNA Amplified in Ancient Human Bone. *Naturwissenschaften* 78: 266-267
- Hummel S, Herrmann B, Rameckers J, Muller D, Sperling K, Neitzel H, Tonnies H (1999)** Proving the authenticity of ancient DNA by comparative genomic hybridization. *Naturwissenschaften* 86: 500-503
- Hummel S, Nordsiek G, Rameckers J, Lassen C, Zierdt H, Baron H, Herrmann B (1995)** aDNA - Ein neuer Zugang zu alten Fragen. *Z Morph Anthropol* 81: 41-65
- Hummel S, Schmidt D, Bramanti B, Kahle M, and Herrmann B (2002a)** ABO typing of historic individuals from a Sicilian cholera site. Poster, 6th International Conference on Ancient DNA, Jerusalem, Israel.
- Hummel S, Schmidt D, Kahle M, Herrmann B (2002b)** ABO blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP. *Int J Legal Med* 116: 327-333
- Inhorn MC, Brown PJ (1990)** The anthropology of infectious disease. *Annu Rev Anthropol* 19: 89-117
- Jalanko A, Kere J, Savilahti E, Schwartz M, Syvanen AC, Ranki M, Soderlund H (1992)** Screening for defined cystic fibrosis mutations by solid-phase minisequencing. *Clin Chem* 38: 39-43

- Jehaes E, Decorte R, Peneau A, Petrie JH, Boiry PA, Gilissen A, Moisan JP, Van den Berghe H, Pascal (1998)** Mitochondrial DNA analysis on remains of a Putative son of Louis XVII, King of France and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet* 6: 383-395
- Johannsen P (2002)** Überprüfung von Verwandtschaft in einem frühneuzeitlichen Skelettkollektiv mit molekularen Markern. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Kanetsky PA, Swoyer J, Panossian S, Holmes R, Guerry D, Rebbeck TR (2002)** A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *Am J Hum Genet* 70: 770-775
- Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, Willemze R, Bavinck JN (2001)** Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 117: 294-300
- Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B (2003)** Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet* 73: 247-260
- Kimpton C, Walton A, Gill P (1992)** A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet* 1: 287
- Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M (1993)** Automated DNA profiling employing multiplex amplification of Short Tandem Repeat loci. *PCR Meth Appl* 3: 13-22
- Kirst R, Lukie M, Richter C, Schuebert W (1971)** Über die AB0-Blutgruppeneigenschaft der Fingernägel. *Forum Kriminalistik* 3: 76-80
- Kishida T, Tamaki Y (1997)** Japanese population data on X-chromosomal STR locus AR. *Nippon Hoigaku Zasshi* 51: 376-379
- Klappauf L (1996)** Stadtkernarchäologische Untersuchungen in Goslar und die Montanarchäologie des Harzes. *Arbeitshefte zur Denkmalpflege in Niedersachsen* 2: 53-57
- Klitz W, Brautbar C, Schito AM, Barcellos LF, Oksenberg JR (2001)** Evolution of the CCR5 Δ 32 mutation based on haplotype variation in Jewish and Northern European population samples. *Hum Immunol* 62: 530-538
- Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G, Hearing VJ (1995)** Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J Cell Sci* 108 (Pt 6): 2301-2309
- Kremeyer K (2003)** Frequenzanalyse des Delta32ccr5-Allels in einer mittelalterlichen Bevölkerung. aDNA-Untersuchung einer

pestzeitlichen Massenbestattung aus der Hansestadt Lübeck.
Diplomarbeit, Universität Göttingen

- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S (1997)** Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* 90: 19-30
- Lagos R, Avendano A, Prado V, Horwitz I, Wasserman S, Losonsky G, Cryz S Jr, Kaper JB, Levine MM (1995)** Attenuated live cholera vaccine strain CVD 103-HgR elicits significantly higher serum vibriocidal antibody titers in persons of blood group O. *Infect Immun* 63: 707-709
- Lalani AS, Masters J, Zeng W, Barrett J, Pannu R, Everett H, Arendt CW, McFadden G (1999)** Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science* 286: 1968-1971
- Laser H (1979)** Haemoglobin S and P. falciparum malaria. *Nature* 280: 613-614
- Lassen C, Hummel S, Herrmann B (1995)** Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. *Int J Legal Med* 107: 152-155
- Lassen C, Hummel S, Herrmann B (1997)** Molekulare Geschlechtsbestimmung an Skelettresten früh- und neugeborener Individuen des Gräberfeldes Aegerten, Schweiz. *Anthrop Anz* 55: 183-191
- Lassen C, Hummel S, Herrmann B (2000)** Molecular sex identification of stillborn and neonate individuals ("Traufkinder") from the burial site Aegerten. *Anthropol Anz* 58: 1-8
- Lavater JC (ed) (1772)** Von der Physiognomik. Weidmanns Erben und Reich, Leipzig
- Lederer T, Betz P, Seidl S (2001)** DNA analysis of fingernail debris using different multiplex systems: a case report. *Int J Legal Med* 114: 263-266
- Lee JC, Chang JG (1992)** ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J Forensic Sci* 37: 1269-1275
- Lehmkuhler S (1991)** Heiratskreise in der Vorgeschichte. *Archäologische Informationen* 14: 155-159
- Levi-Strauss C (ed) (1981)** Die elementaren Strukturen der Verwandtschaft. Suhrkamp, Frankfurt a.M.
- Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Clausters M, de la Rúa C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G,**

- Grinde B, Güran S, Kucinkas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C (1998)** The Δ CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in northeastern Europe. *Hum Mol Genet* 7: 399-406
- Lindahl T (1993)** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715
- Lins AM, Micka KA, Sprecher CJ, Taylor JA, Bacher JW, Rabbach DR, Bever RA, Creacy SD, Schumm JW (1998)** Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system. *J Forensic Sci* 43: 1168-1180
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR (1996)** Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367-377
- Lobbedey U, Klenke W (eds) (1979)** Die Ausgrabungen in der Stiftskirche zu Enger. Denkmalpflege und Forschung in Westfalen 1. Rudolf Habelt Verlag, Bonn
- Lowe AL, Urquhart A, Foreman LA, Evett IW (2001)** Inferring ethnic origin by means of an STR profile. *Forensic Sci Int* 119: 17-22
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, . (1994)** Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802
- Lucotte G, Dieterlen F (2003)** More about the Viking hypothesis of origin of the delta32 mutation in the CCR5 gene conferring resistance to HIV-1 infection. *Infect Genet Evol* 3: 293-295
- Lucotte G, Mercier G (1998)** Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 19: 174-177
- Luzzatto L (1979)** Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood* 54: 961-976
- Lyon MF (1961)** Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Naturwissenschaften* 190: 372-373
- Mannucci A, Sullivan KM, Ivanov PL, Gill P (1994)** Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int J Legal Med* 106: 190-193
- Marklund L, Moller MJ, Sandberg K, Andersson L (1996)** A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm Genome* 7: 895-899

- Marth G, Schuler G, Yeh R, Davenport R, Agarwala R, Church D, Wheelan S, Baker J, Ward M, Kholodov M, Phan L, Czabarka E, Murvai J, Cutler D, Wooding S, Rogers A, Chakravarti A, Harpending HC, Kwok PY, Sherry ST (2003)** Sequence variations in the public human genome data reflect a bottlenecked population history. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 376-381
- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB (1997)** Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 16: 100-103
- Meischner D (2001)** Der Göttinger Neanderthaler. <http://www.dieter-meischner.de/fo/neander.htm> (02.03.2004)
- Metz CE (1978)** Basic Principles of ROC Analysis. *Seminars in Nuclear Medicine* VIII: 283-298
- Miyata T, Hayashida H, Kikuno R, Hasegawa M, Kobayashi M, Koike K (1982)** Molecular Clock of Silent Substitution: At Least Six-Fold Preponderance of Silent Changes in Mitochondrial Genes Over Those in Nuclear Genes. *J Mol Evol* 19: 28-35
- Morley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G (1999)** Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 112: 241-248
- Müller B (2002)** Design einer Multiplex-PCR zur Typisierung von Y-STR Haplotypen aus degradiertem DNA. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Murdock GP (ed) (1966)** Social structure. New York: The free Press.
- Murdock GP (ed) (1967)** Ethnographic Atlas. University of Pittsburgh Press, Pittsburgh
- Nakahori Y, Takenaka O, Nakagome Y (1991)** A human X-Y homologous region encodes "Amelogenin". *Genomics* 9: 264-269
- Neuhuber F, Radacher M, Meisner N, Tutsch-Bauer E (1999)** Nine STR markers plus amelogenin (AmpF/STR Profiler Plus): a forensic study in an Austrian population. *Int J Legal Med* 113: 60-62
- Nishimukai H, Fukumori Y, Okiura T, Yuasa I (1996)** Genotyping of the ABO blood group system by PCR-based methods.
- Oota H, Kitano T, Jin F, Yuasa I, Wang L, Ueda S, Saitou N, Stoneking M (2002)** Extreme mtDNA homogeneity in continental Asian populations. *Am J Phys Anthropol* 118: 146-153

- Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S (1995)** A Genetic Study of 2000 Year-Old Human Remains From Japan Using Mitochondrial DNA Sequences. *Am J Phys Anthropol* 98: 133-145
- Oota H, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D, Ishida T, Stoneking M (2001)** Human mtDNA and y-chromosome variation is correlated with matrilineal versus patrilineal residence. *Nat Genet* 29: 20-21
- Pääbo S (1990)** Amplifying ancient DNA. A Guide to Methods and Applications: 159-166
- Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA (2000)** Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 66: 176-186
- Pavlovitch JH, Rizk M, Balsan S (1982)** Vitamin D nutrition increases skin tyrosinase response to exposure to ultraviolet radiation. *Mol Cell Endocrinol* 25: 295-302
- Pfiztinger H, Ludes B, Mangin P (1993)** Sex determination of forensic samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence. *Int J Legal Med* 106: 213-216
- Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, Merril CR (1991)** Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH) Dinucleotide repeat polymorphism at the human non-histone chromosomal protein HMG14 gene. *Nucleic Acids Res* 13: 3753
- Presciuttini S, Bramanti B, Hummel S, Herrmann B (2002)** Assessing relationship in an ancient skeletal collection by the numbers of alleles shared identical by state among pairs of individuals. *International Congress Series* 1163
- Prota G (1980)** Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* 75: 122-127
- Rana BK (2003)** New insights into G-protein-coupled receptor signaling from the melanocortin receptor system. *Mol Pharmacol* 64: 1-4
- Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, Chang BH, Sambughin N, Lin M, Watkins S, Bamshad M, Jorde LB, Ramsay M, Jenkins T, Li WH (1999)** High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics* 151: 1547-1557
- Rees JL (2003)** Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* 37: 67-90
- Rees JL, Flanagan N (1999)** Pigmentation, melanocortins and red hair. *QJM* 92: 125-131

- Reich K, Westphal G, Schulz T, Muller M, Zipprich S, Fuchs T, Hallier E, Neumann C (1999)** Combined analysis of polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in psoriasis. *J Invest Dermatol* 113: 214-220
- Rickards O, Martinez-Labarga C, Favaro M, Frezza D, Mallegni F (2001)** DNA analyses of the remains of the Prince Branciforte Barresi family. *Int J Legal Med* 114: 141-146
- Ringel PF, Weiler G, Bein G (2000)** Errors in ABO typing of blood stains using PCR. *Int J Legal Med* 113: 352-355
- Rollo F (2000)** Molecular investigations on mummified seeds and other plant remains. *unknown*: 198-208
- Rösing F (1986)** Kith or kin? On the feasibility of kinship reconstructions in skeletons. In: David AR (ed) *Science in Egyptology*. Manchester University Press, Manchester, pp 223-237
- Ruano G, Fenton W, Kidd KK (1989)** Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster" PCR. *Nucleic Acids Res* 17: 5407
- Ruiz A, Royo JL, Rubio A, Borrego S, Leal M, Sanchez B, Nunez-Roldan A, Antinolo G (2001)** Spectrofluorimetric analysis of CCR5-delta 32 allele using real-time polymerase chain reaction: prevalence in southern Spanish HIV(+) patients and noninfected population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 191-193
- Salem AH, Badr FM, Gaballah MF, Pääbo S (1996)** The genetics of traditional living: Y-chromosomal and mitochondrial lineages in the Sinai Peninsula. *Am J Hum Genet* 59: 741-743
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW (1996)** Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-725
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C (1998)** Reliability of DNA-based sex tests. *Nat Genet* 18: 103
- Schmerer W (1999)** Optimierung der STR-Genotypenanalyse an Extrakten alter DNA aus bodengelagertem menschlichen Skelettmaterial. Dissertation, Universität Göttingen

- Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B (2000)** STR-genotyping of archaeological human bone: experimental design to improve reproducibility by optimisation of DNA extraction. *Anthrop Anz* 58: 29-35
- Schmidt HD (1989)** Migration aus historisch-demographischer Sicht und ihre Bedeutung für die Bevölkerungsbiologie. *Anthrop Anz* 47: 97-108
- Schmidt T, Hummel S, Herrmann B (1995)** Evidence of contamination in PCR laboratory disposables. *Naturwissenschaften* 82: 423-431
- Schmitz CA (ed) (1964)** Grundformen der Verwandtschaft. Pharos-Verlag Schwabe, Basel
- Schneider DM (ed) (1984)** A critique of the study of kinship. University of Michigan press, Ann Arbor
- Scholz M, Hengst S, Broghammer M, Pusch CM (2001)** Intrapopulation relationships in ancient societies: a multidisciplinary study. *Z Morphol Anthropol* 83: 5-21
- Schuchhardt C (ed) (1936)** Deutsche Vor- und Frühgeschichte in Bildern. Verlag R. Oldenbourg, München, Berlin
- Schultes T (2000)** Typisierung alter DNA zur Rekonstruktion von Verwandtschaft in einem bronzezeitlichen Skelettkollektiv. Dissertation, Universität Göttingen, Cuvellier Verlag
- Schultes T, Hummel S, Herrmann B (1997)** Zuordnung isolierter Skelettelemente mittels aDNA-typing. *Anthrop Anz* 55: 207-216
- Schultes T, Hummel S, Herrmann B (2000)** Ancient DNA-typing approaches for the determination of kinship in a disturbed burial site. *Anthrop Anz* 58 : 37-44
- Schutkowski H (1993)** Sex determination of infant and juvenile skeletons: I. morphognostic features. *Am J Phys Anthropol* 90: 199-205
- Smith R, Healy E, Siddiqui S, Flanagan N, Steijlen PM, Rosdahl I, Jacques JP, Rogers S, Turner R, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL (1998)** Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Dermatol* 111: 119-122
- Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M (1998)** Dating the origin of the CCR5-Δ32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 62: 1507-1515

- Stern C (1970)** Model estimates the number of gene pairs involved in pigmentation variability of the Negr-American. *Hum Hered* 20: 165-168
- Stoneking M (2001)** Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past.. *Nature* 409: 821-822
- Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P (1993)** A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15: 636-1
- Swerdlow DL, Mintz ED, Rodriguez M, Tejada E, Ocampo C, Espejo L, Barrett TJ, Petzelt J, Bean NH, Seminario L, Tauxe RV (1994)** Severe life-threatening cholera associated with blood group O in Peru: implications for the Latin American Epidemic. *J Infect Dis* 170 : 468-472
- Syvanen AC, Ikonen E, Manninen T, Bengtstrom M, Soderlund H, Aula P, Peltonen L (1992)** Convenient and quantitative determination of the frequency of a mutant allele using solid-phase minisequencing: application to aspartylglucosaminuria in Finland. *Genomics* 12: 590-595
- Szabo G (1967)** Photobiology of melanogenesis: cytological aspects with reference to differences in racial coloration. *Advances in biology of skin*. In: Montagna W, Hu F (eds) *The Pigmentary System*. Pergamon Press, New York pp 379-396
- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D (2003)** Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 117: 67-74
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996)** Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24: 3189-3194
- Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Cryz SJ, Edelman R, Levine MM (1995)** Extension of the volunteer challenge model to study South American cholera in a population of volunteers predominantly with blood group antigen O. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 75-77
- Thody AJ, Higgins EM, Wakamatsu K, Ito S, Burchill SA, Marks JM (1991)** Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J Invest Dermatol* 97: 340-344
- Toda K, Pathak MA, Parrish JA, Fitzpatrick TB, Quevedo WC, Jr. (1972)** Alteration of racial differences in melanosome distribution in human epidermis after exposure to ultraviolet light. *Nat New Biol* 236: 143-145

- Tomita Y, Tsai TM, Steyers C, Ogden L, Jupiter JB, Kutz JE (1986)** The role of the epiphyseal and metaphyseal circulations on longitudinal growth in the dog: an experimental study. *J Hand Surg [Am]* 11: 375-382
- Tun Z, Honda K, Nakatome M, Nakamura M, Shimada S, Ogura Y, Kuroki H, Yamazaki M, Terada M, Matoba R (1999)** Simultaneous detection of multiple STR loci on sex chromosomes for forensic testing of sex and identity. *J Forensic Sci* 44: 772-777
- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ (1995)** Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11: 328-330
- Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A, Jackson IJ, Rees JL (1996)** The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* 5: 1663-1666
- van der Velden PA, Sandkuijl LA, Bergman W, Pavel S, van Mourik L, Frants RR, Gruis NA (2001)** Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *Am J Hum Genet* 69: 774-779
- van Loon FP, Clemens JD, Sack DA, Rao MR, Ahmed F, Chowdhury S, Harris JR, Ali M, Chakraborty J, Khan MR, . (1991)** ABO blood groups and the risk of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 163: 1243-1246
- Vivelo FR (ed) (1981)** *Handbuch der Kulturanthropologie: Eine grundlegende Einführung*. Klett-Cotta, Stuttgart
- Voevodin A, Samilchuk E, Dashti S (1998)** A survey for 32 nucleotide deletion in the CCR-5 chemokine receptor gene (deltaccr-5) conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 in different ethnic groups and in chimpanzees. *J Med Virol* 55: 147-151
- Vogel F, Motulsky AG (eds) (1997)** *Human Genetics. Problems and Approaches*. 3. Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Voisey J, Box NF, van Daal A (2001)** A polymorphism study of the human agouti gene and its association with MC1R. *Pigment Cell Res* 14: 264-267
- Voisey J, Kelly G, van Daal A (2003)** Agouti signal protein regulation in human melanoma cells. *Pigment Cell Res* 16: 65-71
- Wagner M, Schütze Y (eds) (1998)** *Verwandtschaft. Sozialwissenschaftliche Beiträge zu einem vernachlässigten Thema*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991)** Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 10: 506-513
- Weiß C (ed) (2001)** Basiswissen Medizinische Statistik. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Winkle S (ed) (1997)** Kulturgeschichte der Seuchen. Artemis & Winkler, Düsseldorf/Zürich
- Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S (1990)** Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 345: 229-233
- Yang YK, Ollmann MM, Wilson BD, Dickinson C, Yamada T, Barsh GS, Gantz I (1997)** Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action. *Mol Endocrinol* 11: 274-280
- Yip SP (2002)** Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet* 66: 1-27
- Zamarchi R, Indraccolo S, Minuzzo S, Coppola V, Gringeri A, Santagostino E, Vicenzi E, De Silvestro G, Biagiotti R, Baldassarre C, Chieco-Bianchi L, Amadori A (1999)** Frequency of a mutated CCR-5 allele (delta32) among Italian healthy donors and individuals at risk of parenteral HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15: 337-344
- Ziegle JS, Su Y, Corcoran KP, Nie L, Mayrand PE, Hoff LB, McBride LJ, Kronick MN, Diehl SR (1992)** Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14: 1026-1031

12 Anhang

12.1 Typisierungskriterien

12.1.1 Einzelbestimmung und Genotypisierung STRs

Um eine STR-Typisierung (Kapitel 14.1.3, 4.2.3, und 5.1.3) historischer Proben zu gewährleisten, die einerseits das Maximum an authentischen Signalen berücksichtigt, andererseits die in Kapitel 2.1 aufgeführten Artefakte als mögliche Fehlerquellen berücksichtigt, wurde bei der Einzeltypisierung einer Probe folgender Kriterienkatalog eingehalten (nach Schultes 2000):

- Als Allelsignale werden die Peaks aufgenommen, die innerhalb der direkt an sie angrenzenden Bereiche (eine Wiederholungseinheit) die stärksten Signalintensitäten aufweisen.
- Als Artefaktsignale werden Peaks gewertet, die diesen Allelsignalen vorangehen und deren Höhe 40% des Allelpeaks unterschreitet.
- Als Artefaktsignale werden Peaks gewertet, die eine Repeateinheit länger als eine Allelsignale sind und deren Höhe 20% des Allelpeaks unterschreitet.
- Bei um eine Repeateinheit gegenüber dem determinierten Allelsignal kürzeren Peaks werden diejenigen als unsichere Signale gewertet und in Klammern notiert, deren Höhe 40 – 80% des bereits bestimmten Allelsignals beträgt. Bei um eine Repeateinheit längeren Peaks werden diejenigen als unsicher notiert, deren Höhe zwischen 20 und 60% in Relation zum bereits bestimmten Allelsignals beträgt.
- Alle anderen Signale, deren Länge mit einem möglichen Allel übereinstimmt, werden als Allelsignal bestimmt.

Die Gesamtgenotypisierung einer Probe aus ihren Einzelergebnissen erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Ein Allel muß mindestens einmal reproduziert sein. Hierzu muß es mindestens zweimal aus einer Einzelbestimmung als Allelsignal

- hervorgegangen sein. Dabei müssen die PCR-Ergebnisse aus zwei unabhängigen Extraktionen generiert worden sein.
- Bei Reproduktion aus nur einem Extrakt wird das Allel in Klammern aufgenommen.
 - Wenn mehr als zwei Allele diese Bedingungen erfüllen, kann keine abschließende Genotypisierung durchgeführt werden. Es wird dasjenige Allel determiniert, das am häufigsten reproduziert wurde, wobei unsichere Allele mit halber Wertigkeit eingehen. Bei Gleichwertigkeit werden die möglichen Allele in Klammern gestellt aufgeführt.
 - Ein homozygoter Genotyp wird nur dann bestimmt, wenn in mindestens vier PCRs aus zwei Extrakten ausschließlich das jeweilige Allel detektiert wurde. Wenn ein Allel nur in drei Reaktionen aus zwei Extrakten allein bestimmt und ein weiteres Allel in einer zusätzlichen Reaktion beobachtet wurde, wird das homozygote Ergebnis in Klammern angegeben.

12.1.2 Einzelbestimmung und Genotypisierung SNPs

Um eine SNP-Typisierung historischer Proben zu gewährleisten (Kapitel 6.1.3), die einerseits das Maximum an authentischen Signalen berücksichtigt, andererseits Artefakte durch postmortalen Basenaustausch als mögliche Fehlerquellen berücksichtigt, wurde bei der Einzeltypisierung einer Probe folgender Kriterienkatalog eingehalten (nach Schultes 2000):

- Als Allelsignale werden die Peaks aufgenommen, die im erwarteten Längenbereich liegen.
- Als Artefaktsignale werden Peaks gewertet, die eine ungewöhnliche Form aufweisen (z.B. sehr breitbasig sind). Diese werden von der Bestimmung ausgenommen.

Die Gesamtgenotypisierung einer Probe aus ihren Einzelergebnissen erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Ein Allel muß mindestens einmal reproduziert sein. Hierzu muß es mindestens zweimal aus einer Einzelbestimmung als Allelsignal hervorgegangen sein. Dabei müssen die PCR-Ergebnisse aus zwei unabhängigen Extraktionen generiert worden sein.
- Bei Reproduktion aus nur einem Extrakt wird das Allel in Klammern aufgenommen.
- Wenn mehr als zwei Allele diese Bedingungen erfüllen, kann keine abschließende Genotypisierung durchgeführt werden. Es wird dasjenige Allel determiniert, das am häufigsten reproduziert wurde, wobei unsichere Allele mit halber Wertigkeit eingehen. Bei Gleichwertigkeit werden die möglichen Allele in Klammern gestellt aufgeführt.
- Ein homozygoter Genotyp wird nur dann bestimmt, wenn in mindestens vier PCRs aus zwei Extrakten ausschließlich das jeweilige Allel detektiert wurde. Wenn ein Allel nur in drei Reaktionen aus zwei Extrakten allein bestimmt und ein weiteres Allel in einer zusätzlichen Reaktion beobachtet wurde, wird das homozygote Ergebnis in Klammern angegeben.

12.2 Typisierungsergebnisse

12.2.1 X-STR-Typisierungsergebnisse für archäologische Proben

Tab. 52 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für die untersuchten Individuen der Lichtensteinhöhle und Goslar/Hinter den Brüdern

Do 26 (Femur links)								
Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
1	26	15	5/9	X	8.3/11	-	15/21	(15)/23
7	40c	15/16	5/9	X	8.3/11	16/17	15/21	19/23
5	8	n.d	n.d	X/-	8.3/11	n.d	15/21	n.d
V	45	15/16	5/9	X	8.3/11	16/17	15/21	19/23
Genotyp		15/16	5/9	XX	8.3/11	16/17	15/21	19/23

n.d. : nicht untersucht, - : kein Typisierungsergebnis

Do 58.3 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
1	43	15	-	Y	-	16	18/22	24
o1	43	15	-	XY	(13)	17	20/21	24
o2	43	(14)/15	-	XY	10	16	21	24
o3	43	15/16	(9)	XY	12	16	18/20/22	-
DS8	46	15	10	XY	13	16	-	24
DS8B	48	15	10	XY	(10)/13	16	21/23	24
EZ1 5 RP	64	15	10	-	-	-	21	-
EZ15 aTC	59	15	-	XY	13	16	21	24
EZ15 TC	60	-	-	Y	-	16	21	-
EZ1A	48	15	-	XY	13	16	-	-
Genotyp		15	10	XY	13	16	21	24

Do 183 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
2	9	n.d	n.d	X/Y	-	n.d	15	n.d
EZ15RPd	60	-	-	Y	-	-	20	-
2	13b	n.d	n.d	Y/-	12	n.d	-	n.d
EZ1 9 II	62	(14)	-	-	-	-	-	-
EZ15RPc	60	14	-	-	-	-	20	(21)
EZ15RPa	60	16	-	-	-	-	21	24
EZ15RPPhc	60	15	-	-	-	-	-	-
EZ1 3 I	54	-	5	-	-	-	-	-
EZ1 3 IIa	61	-	5	Y	-	-	(20)	-
3	10a	-	-	X/Y	13	-	-	-
3	11b	-	-	X/-	13	-	20	-
EZ15 RPa	61	-	-	Y	-	-	20	-
EZ1 12 I B	65	14	-	-	-	15	-	-
EZ1 12 II A	65	14	-	-	-	-	-	-
EZ1 12 II B	65	14	-	X	-	-	-	-
EZ1 13 I A	66	14	-	-	-	-	-	-
EZ1 13 I B	66	13	-	-	-	-	-	-
EZ1 13 II A	66	14	-	-	-	-	20	-
EZ1 13 II B	66	14	(5)/9	-	11	15	20	-
EZ1 II test	67 a	14	11	X	-	15	20	26
Genotyp		14	(5)	XY	(13)	15	20	-

Do 902 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
EZ1 7 I	62	(14)16	5 (10)	XY	11	18	20	21/23
EZ1 7 II	62	16	5	XY	11	18	20	23
EZ 1 8	62	16	5	XY	11	18	21	
EZ1 9	62	16	5	XY	11	-	20	23
Mex	64	16	5		11	18	20	23
ez1TEST I	67A	-	-	XY	11	-	-	21
ez1TEST I	67B	16	5	XY	11	18	20	23
ez1TESTII	67A	(16)	-	-	-	-	-	(28)
ez1TESTII	67B	-	5	XY	11	18	20	23
Genotyp		16	5	XY	11	18	20	23

Do 907 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
DS2	46	-	-	XY	12	15	-	19
TS XXX	46	18	-	XY	12	15/(18)	-	19
Genotyp		-	-	XY	12	15	-	19

Do 1044 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
II	74	13	7/9	X	8.3/11	15/20	20/21	25
II	73a	13	9	X	8.3/11	15/20	(20)/21	23
II	73b	13	7/9	X	8.3/11	15/20	20/21	23
6	73a	-	-	-	11	-	20	-
6	73b	13/17	-	X	11	-	-	-
II	75a	13/17	7/9	X	8.3/11	15/20	20/21	23/25
II	75b	13/17	7/9	X	8.3/11	15/20	20/21	23/25
6	75	13	-	X	-	15	20	25
Genotyp		13/17	7/9	XX	8.3/11	15/20	20/21	23/25

Do 1076 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
7	40c	16	9	XY	8.3	18	24	25
7	42 1,5	(15)/16	9	XY	8.3	(18)	24	25
7	42 2,0	16	9	XY	8.3	18	24	25
3	27	16	9	XY	8.3		24	
3	8	n.d.	n.d.	X/Y	8.3	n.d.	24	n.d.
Genotyp		16	9	XY	8.3	(18)	24	(25)

Do 1102 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
1	8	n.d	n.d	X/Y	8.3	n.d	21	n.d
3	9	n.d	n.d	X/Y	8.3	n.d	21	n.d
o	9	n.d	n.d	-	-	n.d	21	n.d
3	27	16/17	9/11	X	8.3/12	(16)/17	21	(15)/19
*	43	16	9	XY	8.3	17	21	19
*	45	16	9	XY	8.3	17/18	21	-
**	43	-	9	XY	8.3	17	21	19
Genotyp		16	9	XY	8.3	17	21	19

Do 1103 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
2	7	n.d	n.d	X	12/13	n.d	20	n.d
EZ1 3 A	55	-	-	-	-	-	-	-
EZ13 B	55	-	-	-	-	-	-	-
EZ1 3	54	-	-	-	14	-	-	-
EZ1test I	67A	15	-	X	12/13	18	20	24/28
EZ1test I	67B	15	9	X	13	18	20	24
EZ1 test II	67A	15	-	X	-	18	-	28
EZ1 test II	67B	15	-	X	-	18	-	28
Genotyp		15	-	XX	12/13	18/18	20/(20)	(24)/28

Do 1206 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
7	37b	16	-	-	11	(18)	(19)	-
7	42 1,5	16/17	9/11	X	11/(12)	18	20	24
7	42 2,0	-	-	X	11	18	20	24
1	SM43	14/16	9	X	8.3/(12)	-	20	-
1	SM64	-	-	-	-	-	-	-
6	SM43	14	11	X	11/12	15	21	25
6	SM64	-	-	-	12	-	-	20
2	SM43	-	9	-	-	(15)	20	-
2	SM64	16	-	-	-	-	-	-
Genotyp		14/16	9/11	XX	11/12	(15)/18	20/(20)	(24)/-

Do 1500 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
3	10a	n.d	n.d	X/-	12/14	n.d	15	n.d
3	11a	n.d	n.d	X/	12	n.d	15	n.d
3	11b	n.d	n.d	X/	14	n.d	15/23	n.d
3	43	14/15	5	X	14	15	23	24
3	45	14/(15)	5/7	X	12	15/20	15	-
1a	11	n.d	n.d	X/	12	n.d	15	n.d
1b	11	n.d	n.d	X/	14	n.d	-	n.d
1	43	(14)/15	-	X	14	15	-	24
1	45	14/(16)	7/10	X	11/(12)	-	15/23	24
2	45	14	-	-	12	15	23	-
I DS8	46	14/15/16	7	X	12/14	15	-	19/24
I DS8	48	15/(16)	-	X	-	-	15	-
II DS8	46	15	7	X	12	15	-	24
II DS8	48	-	-	-	12	-	15	-
EZ1 3	55a	14	7/(9/10)	-	-	-	-	-
EZ1 3	55b	14	7/9/(10)	-	14	-	-	-
EZ1 3	54	-	-	-	-	-	-	-
EZ13 a	61	15	-	-	-	-	-	-
EZ1 8	62	-	-	-	-	-	-	-
EZ19(3)	62	15	-	-	-	-	-	-
Genotyp		14/15	7/10	XX	12/14	15/-	15/23	24/-

Do 1585 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
DS8	46	17	7	X	8.3	15	-	-
DS8	48	17	-	X	-	-	-	-
DS5	46	15/17	7	X	8.3	15	-	-
DS5	48	15	7	-	-	21	15	-
Genotyp		(15)/17	7/(7)	X(X)	8.3/-	15/-	-	-

Do 1911 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
1	8	n.d	n.d	X/Y	12	n.d	20	n.d
6	13	16	9	Y/-	-	15	20	25
7	37b	16	9	XY	12	15	20	25
7	34	16	9	XY	12	15	20	25
EZ1 13	66 a	16	9	XY	12	15	20	25
Genotyp		16	9	XY	12	15	20	25

Do 2030 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
EZ13 Ia	61	17	-	XY	8.3	-	-	-
EZ13IIa	61	15	-	-	-	-	-	-
EZ13IIa	61	15	-	Y	-	-	-	-
EZ17 I	62	-	10	XY	8.3	15	21	24
EZ 17 II	62	-	10	X	(14)	15	-	-
EZ 19 I	62	15	10	Y	-	15	-	-
EZ 19 II	62	14	(10)	-	8.3	-	-	24
DS1	64	15	10	-	-	15	21	24
EZ1 7 I	64	15	10	-	-	15	21	24
1	37b	15	10	XY	8.3	-	21	24
6	27	15	10	X	8.3	15	21	19
1	42 1,5	(15)/16	(9)/10	XY	-	-	-	-
1	42 2,0	15	10	XY	-	-	21	24
Genotyp		15	10	XY	8.3	15	21	24

Do 2388 (Mandibula, Zahn)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
c	43	14/15/16	5/9/10	X	8.3/11/12/14	16/17	21/22/23	24/28
3	43	(15)/16	-	X	8.3	-	(20)/21	15/(18)/19
3	64	15/16	5/9	-	8.3	-	(21)	-
o	43	14/15	9	X	8.3/12	-	21	-
o	64	-	-	-	8.3	17/20	21	19
EZ1 3A	55	15/17	-	-	(8.3)/12	-	-	-
EZ1 3B	55	16	-	-	-	-	-	-
EZ1 3	54	-	-	X	-	20	-	-
EZ13	60	14	10	X	11/12	-	-	-
EZ1 3a	61	-	-	-	8.3	-	-	-
EZ1 3a	61	-	5	X	8.3	-	-	-
EZ1 9	62	16	-	-	11	17	-	-
EZ1 9	64	-	5	-	-	18	-	-
1	64	-	5	-	8.3/12	17/20	23	19/24
Genotyp		14/16	5/9/10	XX	8.3/12	17/20	21/(23)	19/24

Do 2589 (Mandibula, Zahn)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
DS8	SM46	(15)/16/(17)18	(9)/10	X	8.3	15	-	20/24
DS8	48	16/18	9	X	8.3	18	20/(21)	20/24
EZ1 3	54	-	-	-	-	15	-	-
EZ13	60	17	-	-	8.3	-	-	-
EZ1 8	62	(16)	-	X	8.3	15	20/21	24
EZ1 8	64	16	9		8.3	-	20/21	24
EZ1 9	62	16	9	X	-	18	21/22	-
EZ1 9	64	16	-	-	-	18	-	20
XXXI	64	-	-	-	-	15/18	20	-
XXIX	64	16/19	-	-	8.3	-	-	-
ez1 04	71A	16/18/19	10	X	8.3	15/18	-	24
ez1 04	71B	16/17/19	10	X	8.3	-	(19)	24
ez1 04	71C	16/19	9	X	8.3	15/18	20/21	20
Genotyp		16/19	9/10	XX	8.3/8.3	15/18	20/21	20/24

Do 3742 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
3	6	n.d.	n.d.	X/(Y)	(8.3)/13	n.d.	20/(21)	n.d.
3	8	n.d.	n.d.	X/-	8.3/13	n.d.	20/21	n.d.
1	9	n.d.	n.d.	-	13	n.d.	20/21	n.d.
1	45	15	-	XY	8.3	15	-	26
EZ1	47A	15	7/10	X	8.3/13	15	22	(18)/27
EZ1	47B	13	7/10	X	13	-	20	-
EZ1	48	13	-	X	13	15/18	20/21	18/27
DS8	48	14/15	-	-		15	((21))	27
DS8	46	13/15	7/10	X	8.3/13	-	-	(26)/27
DS 8	64	13	7	-	8.3/13	15	21	(26)/27
EZ 1 7 I	62	-	10	-	-	-	-	-
EU 17II	62	15	7	-	-	-	-	27
EU 17II	64	13	7	-	13	-	20	-
EZ1test I	67A	13/15	7	X	8.3	15	20/21	27
EZ1testI	67B	13	-	X	8.3/13	15	20	-
EZ1testII	67A	-	10	X	8.3/13	-	20/21	26
EZ1testII	67B	13	7	X	-	-	21	-
Genotyp		13/15	7/10	XX	8.3/13	15/-	20/21	27/-

Do 3750 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
1	7	n.d.	n.d.	X/-	14	n.d.	20	n.d.
0	10	n.d.	n.d.	X/-	12/14	n.d.	-	n.d.
XXVI	43	15/16	6/9	X	12	((15))/19	20/22	18/25/(26)
o	9	n.d.	n.d.	X/-	12/14	n.d.	20	n.d.
o	46	15/16	9	X	12/(14)	15/19	-	18/25
o	48	16	9	X	12/14	15/19	19/20/22	18/25
o	64	11	-	-	12/14	15/19	20/22	18/25
EZ1 3	54	-	-	-	-	-	20	-
Genotyp		15/16	9/-	XX	12/14	15/19	20/22	18/25

Do 3756 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
1	8	n.d.	n.d.	X/-	8.3/14	n.d.	20/22	n.d.
5	9	n.d.	n.d.	X	8.3/14	n.d.	20/22	n.d.
5	12	n.d.	n.d.	X/-	8.3/14	n.d.	20/22	n.d.
5	43	11/15	10/11	X	8.3/14	19/20	20/22	18/24
*	12	n.d.	n.d.	-	8.3	n.d.	20/22	n.d.
*	43	(14)/15	10/11	X	8.3	18	20	-
XXVII	46	11/15	10	X	8.3/14	15/19	-	18/24
XXVII	48	11	-	X	8.3/14	20	20	18
IV2	46	(11)	10/11	X	8.3	-	-	18/24
TS IV2	48	-	10	(X)Y	8.3	20	-	27
EZ1 3	55a	-	-	-	-	-	16	-
EZ1 3	55b	11	-	-	-	(15)	-	-
Genotyp		11/15	10/11	XX	8.3/14	19/20	20/22	18/24

Do R1 (Maxilla, Zahn)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
3a	10	n.d.	n.d.	X/-	11/12	n.d.	(19)/20	n.d.
3b	10	n.d.	n.d.	X/-	11/12	n.d.	(19)/20	n.d.
3	12	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	(19)/(20)/24	n.d.
1a	12	n.d.	n.d.	X/-	11/12	n.d.	19	n.d.
1b	12	n.d.	n.d.	X/-	11/12	n.d.	(19)/20	n.d.
1	43	13	9/10	X	11/12	15/20	20	20/25
1	45	13/16	10	X	11/12	20	20/22	20
3	43	13/16	9/10	X	11/12	15/20	20	20/25
3	64	13/16	9/10	-	11/12	15/20	20	20/25
EZ1 3	54	13/16	10	X	11/12	15/20	20	20/25
Genotyp		13/16	9/10	XX	11/12	15/20	20/(20)	20/25

Gs 84 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
iv	64	-	9	Y	11	-	20	23
i	64	-	9	-	11	15	20	23
ii	64	13	9	-	11	15	20	23
iii	64	-	9	-	11	15	20	23
EZ1	47A	13	9	X	11	15	20	23
EZ1	47B	13	9	XY	-	15	-	-
EZ1 7	62	13	-	(X)	-	15	20	26
Genotyp		13	9	XY	11	15	20	23

Gs 97 (Femur links)

Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
EZ1	47A	13	9	XY	11	15	20	23
EZ1	47B	13	9	XY	11	15	-	-
EZ1RP	59a	13	9	XY	11	15	-	23
EZ1RP	59b	13	9	Y	-	-	20	-
EZ1RPPH	59a	13	9	XY	11	15	20	-
EZ1RPPH	59b	13	9	XY	11	15	20	23
EZ1TC	59a	13	9	XY	11	15	20	-
EZ1TC	59b	13	9	XY	11	15	20	23
EZ1TCPh	59a	13	9	XY	11	15	-	-
EZ1TCPh	59b	13	9	XY	11	15	20	23
EZ1	48a	13	(9)	XY	11	15	20	21/23
EZ1	48b	13/(18)	9	XY	11	15	20/22	23
Genotyp		13	9	XY	11	15	20	23

Do Gs 76 (Femur links)								
Extrakt	PCR	DXS7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
EZ1	47A	14/17	7/9	X	11/12	16/18	21	16/24
EZ1	47B	(14)/17	9	X	11/12	16	21	24
EZ1	48a	14/17	7	X	11/12	16/18	21	16/24
EZ1	48b	14/17	7	X	11/12	16/18	21	16/24
RP	59a	14/17	-	X	-	18	-	16/24
RPPH	59b	14/17	9	X	12	16	20	-
RP	59b	14	7	X	11/13	16	-	24
RPPH	59b	14/17	-	(XY)	11/12	-	21	(26)
IIFeExtr.	48	14	-	X	8..3/11	16/18	21/22	(16)/19/24/25
Genotyp		14/17	7/9	XX	11/12	16/18	21/-	16/24

12.2.2 MC1R-Typisierungsergebnisse für archäologische Proben

Tab. 53 Typisierungsergebnisse für phänotypenassoziierte Marker für die untersuchten Individuen der Lichtensteinhöhle, Goslar/Hinter den Brüdern und Enger

Do 26 (Femur links)									
Extrakt	PCR	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
7	143	-	-	-	-	1	1	1	1
v	143	-	-	-	-	1	1	1	1
Genotyp		-	-	-	-	1/1	1/1	1/1	1/1

ASIP: Agouti signal protein, 160-294: untersuchte Codonpositionen (vgl. Kapitel 6.1.1, Tab. 44). 1: Wildtypallel, 2: mutiertes Allel, - : kein Typisierungsergebnis

Do 35 (Femur links)									
Extrakt	PCR	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
2	143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	1	1
2	114	1	1	1	1	-	-	-	-
2	143b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	-	1	1
Genotyp		(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)	-	1/1	1/1

n.d. : nicht untersucht

Do 1247 (Mandibula, Zahn)

Extrakt	PCR	<i>ASIP</i> g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
XXVIII	143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	1
XXVIII	114	1	1	1	1	1	1	1	1
XXX	114	1	1	1/2	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Genotyp		1/1	1/1	1/(2)	1/1	(1/1)	(1/1)	(1/1)	1/1

Do 1500 (Femur links)

Extrakt	PCR	<i>ASIP</i> g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
8	108	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	1
EZ1.3	135	1	-	-	-	-	-	-	1
3	143	1/2	1	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	143	1	1	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	144b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	1
3	144b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	1	-	-
8	145a	1	1	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Genotyp		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

Do 1585 (Femur links)

Extrakt	PCR	<i>ASIP</i> g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
8	143	1	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	143	1	-	-	-	1	1	1	1
Genotyp		1/1	-	-	-	(1/1)	(1/1)	(1/1)	(1/1)

Do 1911 (Femur links)

Extrakt	PCR	<i>ASIP</i> g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
EZ1.3	130	1	1	1	1/2	1	1	1	-
MEX	133	1	1	1	1/2	1	1	1	1
EZ1.3	135	1	1	1	1/2	1	1	1	1
Genotyp		1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1

Do 2030 (Femur links)

Extrakt	PCR	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
EZ1.3 I	108	-	1	1	1	1	1	1	1
EZ1.3 II	108	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	1
EZ1.7 II	143	1	1	1	2	1	1	1	1
EZ1.7 I	143	1	1	1	1	1	1	1	1
EZ1.7 II	143	1	1	1	1	1	1	-	1
Genotyp		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

Do 2388 (Mandibula, Zahn)

Extrakt	PCR	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
o	143	(1/2)	1	1	1	1	1	1	1
1	143	1/2	1	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
o	144b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	1
1	144b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	1
Genotyp		1/(2)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

Do 2589 (Mandibula, Zahn)

Extrakt	PCR	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
8	108	1/2	1	1	1	1	1	1	1
8	111	1/2	1	1	-	1	1	1	1
8	114	1/2	1	1	1	1	1	1	-
EZ1.8	129	-	1	-	1	1	1	-	-
EZ1.8	135	1/2	1	1	1	1	1	1	1
EZ1.9	143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	1
EZ1.04	143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	1
EZ1.04	144	1/2	1	1	1	1	1	1	1
Genotyp		1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

Do 3742 (Femur links)

Extrakt	PCR	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294His
EZ1.3	108	-	1	1	1	1	1	1/2	1
EZ1.3	111	1	1	1	1	1	1	1/2	1
EZ1Test	135	-	-	-	1	1	-	2	1
EZ1	143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	-	2	1
Genotyp		(1/1)	(1/1)	(1/1)	1/1	1/1	(1/1)	(1/2)	1/1

Probe	Anthro	Haarf	Augen	Licht- typ	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294 His
3880	1	3	4	2	11	11	11	12	11	11	12	11
3759	1	3	1	2	11	11	11	12	11	11	11	11
3760	1	3	2	2	11	11	11	11	11	11	11	11
3828	1	4	4	3	11	11	11	12	11	11	11	11
3765	1	3	2	3	11	11	11	11	11	11	11	11
3819	1	3	4	3	11	11	11	11	11	11	12	11
3812	1	3	4	3	11	11	11	11	11	11	11	11
3791	1	3	1	2	12	11	11	11	11	11	12	11
3792	1	3	1	3	11	11	11	11	11	11	11	11
3801	1	4	2	2	11	11	12	11	11	11	11	11
3830	1	3	1	3	11	11	11	11	11	11	11	11
3714	0	3	2	2	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3722	0	3	1	2	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3736	0	3	4	3	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3740	0	3	1	2	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3741	0	3	2	3	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3744	0	3	2	2	n.d.	11	12	11	11	11	11	11
3753	0	3	1	2	n.d.	12	11	11	11	11	11	11
3756	0	3	1	3	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3758	0	3	4	2	n.d.	11	11	11	11	12	11	11
3766	0	3	4	3	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3821	0	3	1	2	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3769	0	3	1	3	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3771	0	3	4	3	n.d.	12	11	11	11	11	11	11
3775	0	3	2	2	n.d.	12	11	11	11	11	11	11
3781	0	3	1	2	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3782	0	3	2	2	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3790	0	3	4	3	n.d.	11	12	11	11	11	11	11
3793	0	3	4	3	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3794	0	3	4	3	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3807	0	3	2	3	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3808	0	3	4	3	n.d.	12	11	11	11	11	11	11
3809	0	3	1	3	n.d.	11	11	11	11	11	12	11
3814	0	3	2	2	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3816	0	3	2	2	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3817	0	3	1	2	n.d.	12	11	11	11	11	11	11
3820	0	3	2	2	n.d.	11	11	11	11	11	11	12
3826	0	3	4	3	n.d.	12	11	11	11	11	11	11

Probe	Anthro	Haarf	Augen	Licht- typ	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294 His
39	1	2	1	1	11	12	12	11	11	11	11	11
40	1	2	1	2	11	11	11	11	11	11	11	11
41	1	2	4	2	12	12	11	11	11	11	11	11
42	1	2	1	3	11	12	11	11	11	11	11	11
56	1	2	1	2	11	11	11	11	11	11	11	11
58	1	2	4	3	11	11	11	11	11	11	11	11
60	1	2	2	2	11	11	12	11	11	11	12	11
63	1	2	2	3	11	11	11	11	11	11	11	11
90	1	2	1	3	11	11	11	11	11	11	12	11
92	1	2	2	2	12	11	11	11	11	11	12	11
93	1	2	2	3	12	11	11	11	11	11	12	11
94	1	2	2	2	11	11	12	11	11	11	11	11
95	1	2	1	2	11	11	11	12	11	11	12	11
96	1	2	1	2	11	11	11	11	11	12	11	11
99	1	2	2	3	11	11	11	11	11	11	12	11
100	1	2	2	3	11	11	11	11	11	11	12	11
113	1	2	2	3	11	11	11	11	11	11	11	11
118	1	2	4	3	12	11	11	11	11	11	11	11
132	1	2	2	2	12	11	12	11	11	11	11	11
3810	1	2	4	3	12	11	11	11	11	11	11	11
3798	1	2	2	2	11	11	11	11	11	11	11	11
3785	1	2	1	2	11	11	11	11	11	11	11	11
3768	1	2	2	3	11	11	11	11	11	11	11	11
3829	1	2	2	2	11	11	11	11	11	11	12	11
3806	1	2	2	3	11	11	11	12	11	11	11	11
3832	1	2	2	2	11	11	12	11	11	11	11	11
3865	1	2	2	2	12	11	11	11	11	11	11	11
3866	1	2	4	3	12	11	11	11	11	11	12	11
3764	1	2	2	3	12	11	11	12	11	11	11	11
3879	1	2	1	2	11	11	12	11	11	11	11	11
3718	1	2	1	3	11	11	11	12	11	11	12	11
3797	0	2	2	3	n.d.	11	11	11	11	11	12	11
3719	0	2	4	3	n.d.	12	11	11	11	11	12	11
3738	0	2	1	2	n.d.	11	11	11	11	11	12	11
3745	0	2	2	3	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3754	0	2	2	3	n.d.	11	11	12	11	11	11	11
3757	0	2	1	2	n.d.	11	11	11	11	11	11	11
3776	0	2	2	2	n.d.	12	11	11	11	11	11	11

Probe	Anthro	Haarf	Augen	Licht- typ	ASIP g.8818	Arg 160 Trp	Arg 151 Cys	Val 60 Leu	Asp 84 Glu	Arg 142 His	Val 92 Met	Asp 294 His
3780	0	2	2	2	n.d	11	12	11	11	11	11	11
3783	0	2	2	3	n.d	11	11	11	11	11	11	11
3784	0	2	2	3	n.d	11	11	11	11	11	11	11
3788	0	2	1	2	n.d	12	11	11	11	11	11	11
3799	0	2	1	3	n.d	11	11	12	11	11	11	11
3800	0	2	2	2	n.d	11	11	11	11	11	12	11
3802	0	2	2	2	n.d	11	11	12	11	11	11	11
3804	0	2	2	2	n.d	11	12	11	11	11	11	11
3811	0	2	4	2	n.d	11	11	12	11	11	11	11
3813	0	2	2	2	n.d	11	11	12	11	11	11	11
3815	0	2	2	3	n.d	11	11	11	11	11	11	11
3818	0	2	2	2	n.d	11	12	11	11	11	11	11
3825	0	2	1	2	n.d	12	11	11	11	11	11	11
3852	0	2	2	2	n.d	11	12	11	11	11	11	11

Anthro: Im Institut für Zoologie und Anthropologie, Abteilung Historische Anthropologie und Humanökologie Göttingen, typisiert, 1: ja, 0: nein (nur Abteilung für Dermatologie). Haarf: Haarfarbe; 1: rot, 2: blond, 3: braun, 4: schwarz. Augen: Augenfarbe; 1: grün, 2: blau, 4: braun. Lichttyp: Hauttyp klassifiziert nach Fitzpatrick-Skala: I: bei UV-Einwirkung immer Sonnenbrand, keine Bräunung, II: immer Sonnenbrand, bräunt leicht nach einmaliger und mehrmaliger UV-Exposition, III: selten Sonnenbrand, gute Bräunung, IV: kein Sonnenbrand, tiefe Bräunung. Typisierung der untersuchten Loci: 1: Wildtypallel, 2: mutiertes Allel

Tab. 55 Mit zwei verschiedenen Methoden erhaltene Typisierungsergebnisse (vgl. Kapitel 6.1.4) für Loci des *MC1R*-Gens (30 Individuen) und der *ASIP* UTR (10 Individuen).

Probe	ASIP g.8818		Arg 160 Trp		Arg 151 Cys		Val 60 Leu		Asp 84 Glu		Arg 142 His		Asp 294 His		Val 92 Met	
	Seq	SBE	Seq	BE	Seq	SBE	Seq	SBE	Seq	SBE	Seq	SBE	Seq	SBE	Seq	SBE
3715	-	-	11	11	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11
3716	12	12	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	12	12
3718	-	-	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	12	12
3737	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3742	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3743	-	-	22	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3759	11	11	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11
3760	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3764	-	-	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11
3765	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3768	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3785	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3791	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	12
3792	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3798	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3801	-	-	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3806	-	-	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11
3810	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3812	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3819	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	12
3828	-	-	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11
3829	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	12
3830	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3832	-	-	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3865	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3866	-	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	12
3867	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3879	-	-	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
3880	-	-	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	12	12
3881	-	-	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
1618	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2816	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2894	22	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2936	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2937	22	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Seq: Ergebnis aus Direktsequenzierung, SBE: Ergebnis aus Single Base Extension, 1: Wildtypallel, 2: mutiertes Allel

12.3 Allelleiter für X-STR-Multiplex

Für die Bestimmung der Allele der X-chromosomalen STRs sowie des Amelogenins wurde für jedes System eine Allelleiter angefertigt, um eine auf Längenberechnung der Fragmente basierende Allelbestimmung, bei der Laufunterschiede zwischen Gelen (z.B. Ziegler et al. 1992, Kimpton et al. 1993) zu Ungenauigkeiten führen, zu vermeiden. Bei einer Allelleiter handelt es sich um einen Vergleichsstandard, in dem möglichst viele der bekannten Allele für das betreffende System enthalten sind (für eine Population vergleichbaren biogeographischen Ursprungs und damit ähnlicher Allelrepräsentanz wie der untersuchten). Die Kalibrierung erfolgte durch die Festlegung eines Referenzallels nach Typisierung der DNA der Zelllinie K562, für welche die Allelausprägung für die untersuchten Systeme bekannt war (Edelmann J., Hering S., persönliche Kommunikation). Zur Erstellung der Allelleitern wurden einzeln generierte PCR-Produkte mehrerer Individuen bekannten Genotyps gepoolt. Die für die Allelleiter verwendeten Systeme einzelner Individuen sowie die

Tab. 56 Typisierungsergebnisse für X-chromosomale Marker für rezente Proben

Probe	DXS 7424	GATA172D05	Amelo	DXS9898	DXS6800	DXS6789	DXS101
K562	17	11*	X/?	12	20	21	24
SH	13/15	7/10*	XX	8.3/13	18/18*	20/22*	19/26*
DS	15/17	5/11	XX	11/13	15/15	20/21	24/30*
HS	15/17*	5/9*	XX	12/13*	15/18	21/21	18/25*
BK	14	5/9	XX	8.3/11*	15/18	20	25/26*
RS	14/16*	5/10	XX	8.3/12	15/19*	15/21*	21/27*
NS	15/16	7/9	XX	11/12	15/15	22	27/28*
STS	13*	5	XY*	8.3	20*	20	27
BH	17	7	XY	8.3	15	21	24
FS	17	10	XY	11	15	21	19
EA	16/16	7/9	XX	8.3/11	18/20	16	18/27
UB	13/16	7/9	XX	11/11	18/18	21/22	27/27
gednap D	-	-	-	14	-	-	-
Allele in Leiter	13/14/15/1 6/17	5/7/9/10/11	XY	8.3/11/12/ 13/14	15/18/19/20	15/20/21/ 22	18/19/21/2 4/25/26/27/ 28/30

* zum Erstellen der Allelleiter verwendete Systeme, ?: nicht bekannt (vgl. Kapitel 4.1)

Für die Alleleiter wurden Systeme verschiedener Individuen (in der Tabelle mit * markiert) singleplex amplifiziert. Anschließend wurden 0,5 µl des Produktes auf ein PAGE-Gel aufgetragen und die Fluoreszenzeinheiten (FU) der Peaks protokolliert. Die Berechnung der zusammenzugebenden PCR-Produktmengen wurde nach der empirisch gefundenen Formel $(1000/FU) \cdot 5$ [µl] durchgeführt. Die unterschiedlich fluoreszenzgelabelten Systeme (blau, grün, gelb) wurden im Verhältnis 1: 3: 4 vermischt, da sie verschieden sensitiv detektiert werden.

12.4 Einheiten und Abkürzungen

%	Prozent
®	Copyright
™	eingetragene Marke
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
A.D.	anno Domini, nach Christus
aDNA	ancient DNA
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
bidest	bidestillata, zweifach destilliert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C.I.95%	95%iges Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
cM	Zentimorgan, Rekombinationsdistanz
cR	Zentiray, physische Distanz
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ed(s)	<i>engl.</i> editor(s), Herausgeber
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
et al.	et alii, und weitere
evtl.	eventuell
6-Fam	6-Carbofluorescein
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde

Hex	6-Carboxyl-2',4',7',4,7-Hexachlorofluorescein
i.d.R.	in der Regel
Jhd.(s).	Jahrhundert(s)
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
M	molar, mol/l
mA	Milliampère, 10^{-3} A
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter, 10^{-3} l
mM	millimolar, mmol/l
mtDNA	mitochondriale DNA
µl	Mikroliter, 10^{-6} l
n.d.	non determinandum, nicht zu bestimmen
nm	Nanometer, 10^{-9} m
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction
pH	potentia hydrogenii, Protonenaktivitätsexponent
pM	picomolar, pmol/l
pmol	picomol, 10^{-12} l
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
ROX	6-Carboxylrhodamin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
STR	<i>engl.</i> short tandem repeat
s/w	schwarz/weiß
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Poymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trsi-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tri[hydroxymethyl]aminomethan
U	Unit, Einheit für Enzymaktivität
U/min	Umdrehungen pro Minute

UV	ultraviolett
V	Volt
v. Chr.	vor Christi Geburt
vgl.	vergleiche
w/v	<i>engl.</i> weight per volume, Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

12.5 Verwendete Geräte und Chemikalien

Geräte:

DNA-Extraktor GenePure™ Typ 341A, Applied Biosystems

DNA-Extraktor EZ1, Qiagen

DNA-Sequencer Modell 373 stretch mit Genescan Collection Software 672, Applied Biosystems

DNA Thermal Cycler Typ Mastercycler® Gradient, Eppendorf

DNA Thermal Cycler Typ Mastercycler® Personal, Eppendorf

Dremel®Multi™Handbohrer 395 mit 3,2 mm Hochgeschwindigkeitsfräser-Aufsatz

Elektrophoresekammer Horizon™ 1060BD (5 x 8 cm), Gibco BRL

Elektrophoresekammer Horizon™ 1060BD (11 x 14 cm), Gibco BRL

Glaskapillaren, 310 Capillaries 47-cm x 50 um 5/pkg, Applied Biosystems

Kugelschwingmühle Typ MM2 mit Zirkonium-Mahlbechern, Retsch

Magnetrührer Ikamag®RET, Ikamag®Rh, Janke und Kunkel Ika-Werk

Polaroid™-Film, ISO 3000°, Typ 667, Polaroid

Polaroid™-Kamera MP4 Land Camera, Polaroid™ mit Orange Filter Typ 15 für Ethidiumbromidfärbung, Polaroid

Matrixdrucker iDP-560RS, Secoman

Präzisionswaage excellence Typ E 1200s, Sartorius

Präzisionswaage research, Sartorius

Quadra 650, Apple Computer Inc.

Rotator (Eigenbau), 15 U/min

Schüttelapparat Typ 3011, GFL

Stromversorgung Power Supply Typ P25, 400 V/1000 mA, Biometra

Stromversorgung Electrophoresis Power Supply Typ ST504, Gibco BRL

Stromversorgung Electrophoresis Power Supply Typ ST606, Gibco BRL

Thermomixer Typ 5437, Eppendorf

Thermostat Typ 5320, Eppendorf

Transilluminator Typ IL-350K, 254 nm, Bachofer

Trockenschrank, Memmert

UV-Handlampen Typ UVK-12, 254 nm, Neolab

UV-Spektralphotometer Typ S.750, Secoman

UV-Spektralphotometer Typ DU 500, Beckmann

variable Mikroliterpipetten Typ Reference® 4810, Satz 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

Wasser-Destilliergerät Typ Muldestar, Wagner & Munz

Zentrifuge miniSpin, Eppendorf

Zentrifuge Typ 5402, Eppendorf

Zentrifuge Typ 5415C, Eppendorf

Zentrifuge Typ 5415R, Eppendorf

Chemikalien:

1 kb DNA-Leiter (Molekulargewichts-Längenstandard), Life Technologies

2 x Lyse-Puffer, DNA purification grade, Applied Biosystems

310 10X Buffer with EDTA, Applied Biosystems

310 POP-6™ Polymer, Applied Biosystems

Acrylamid / Bisacrylamid 29:1, 40% (w/v), Amresco®

Agarose Ultra Qualität, Roth

Alconox (Detergenz), Aldrich

Ammoniumpersulfat, ACS grade, Amreco®

Ampuwa® (steriles Wasser), Fresenius

Aqua bidest, eigene Herstellung

Borsäure, p.a., Merck

Bromphenolblau Natriumsalz, p.a., Serva

Chloroform, DNA purification grade, Applied Biosystems

Dextran-Blau, Fluka

EDTA (Ethylendinitrotetraacetat Dinatriumsalz-Dihydrat): Titriplex®III, Merck

Ethanol absolut, p.a., Abgabestellen der Bundesmonopolverwaltung: Zander-Göttingen, Nordbrand-Nordhausen (Abfüllung Universitätsklinikumsapotheke Göttingen)

Ethidiumbromid, wässrige Lösung 1% (w/v), 10 mg/ml, Serva

Extran® Typ Ap 13 alkalisch mit Detergenzien, Merck

Formamid, Sigma

Genescan-500™ ROX-Kit (spurinterner Standard, loading buffer), Applied Biosystems

Glassmilk® Typ Ultra Clean®, 15 Ultra Bind, Bio 101, QBioGene

Harnstoff, Rotiphorese®, Roth

Isopropanol p.a., Merck

LSV, Längenstandard, Roche

Natriumacetatpuffer, 2 M, pH 4,5, DNA purification grade, Applied Biosystems

Natriumhydroxyd (s), p.a., Merck

Proteinase K, DNA purification grade, Applied Biosystems

Proteinase K, Qiagen

Roti®-Phenol/Chloroform, Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol 25:24:1, Roth

Salzsäure rauchend 37%, Merck

TEMED (Tetramethylethyldiamin), Amresco®

TEMED (Tetramethylethyldiamin), Fluka

Tris, Trizma™ Base, p-a-, Sigma

PCR-Reagenzien und Enzyme

AmpliTaq Gold™ DNA-Polymerase (5U/μl), Perkin Elmer Cetus

Ampuwa®, Fresenius

dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Set, Sigma-Aldrich

GeneAmp® 10xPCR Buffer II & MgCl₂ Solution 25 mM, Perkin Elmer Cetus

Mineralöl NUJOL, Perkin Elmer Cetus

12.5.1.1.1 Kits

QIAGEN Multiplex PCR Kit, Qiagen

ABI PRISM SNaPshot™ Multiplex Kit, Applied Biosystems

Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega

EZ1 DNA Tissue Kit, Qiagen

QIAquick™ Gel Extraction Kit, Qiagen

MinElute PCR Purification Kit, Qiagen

Einwegmaterialien:

Dental-Diamantsägeblätter Typ Diaflex-T H 350 220, Horico

Einmaluntersuchungshandschuhe Peha®-safe, Peha®-soft, Hartmann

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml) safe-lock, Eppendorf

Eppendorf Reaktionsgefäße (2,0 ml) safe-lock, Eppendorf

GeneAmp® PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml), Perkin Elmer Cetus

Gesichtsmasken: Surgine face mask, Johnson + Johnson

Kimwipes® Präzisionstücher, Kimberley-Clark

Kleenex® Tücher, Kimberley Clark

Tissue Kit für Biorobot EZ1, Qiagen

Parafilm® M, American National Can™

Pipettenspitzen: blaue Spitzen 1ml, Sarstedt

Pipettenspitzen: gelbe Spitzen 100µl, Sarstedt

Pipettenspitzen: Standardtips 2,5ml, Eppendorf

Pipettenspitzen: Standardtips 10µl, Eppendorf

Präzipitetten: 13 mm Precipitette™-II Cartridge, Applied Biosystems

Längenstandards:

1 KB Leiter (Größen in bp)

75	134	154	201	220	298	344	396	506	517	1018
1636	2036	3054	4072	5090	6108	7126	8144	9162	10180	11198
12216										

LSV (Größen in bp)

51	57	64	80	89	123/124	184	192	213	234	267
----	----	----	----	----	---------	-----	-----	-----	-----	-----

GS 500 ROX (Größen in bp)

35	50	75	100	139	150	160	200	250	300	340
	350	400	450	490	500					

Mein Dank gilt

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernd Herrmann für die freundliche Aufnahme im Institut, die anregenden Gespräche sowie die „Einführung in die Realität universitärer Arbeit“, die mich sicher in weiteren Entscheidungen meines Lebens beeinflussen wird,

meiner Betreuerin Frau Dr. Susanne Hummel, von der ich das "Handwerkszeug" der aDNA-Analyse gelernt habe und die immer als Ansprechpartnerin für Probleme aller Art für mich da war. Aus den vielen konstruktiven Diskussionen mit ihr sind wichtige Anregungen für meine Arbeit entstanden,

meiner Laborcrew Melanie Kahle, Saskia Flörl, Jutta Pollmann, Rebecca Schütt und Judith Stauch für ihre zuverlässige Mitarbeit,

Frau Sabine Becker und Herrn Ed George für ihre zuverlässige Unterstützung in Belangen aller Art,

Herrn Prof. Dr. med. Kristian Reich und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung des Projektes „Analyse von SNPs zur Rekonstruktion phänotypischer Merkmale“,

Frau Dr. Sandra Hering und Frau Dr. Jeanette Edelmann für die Bereitstellung wichtiger Daten für die Etablierung des X-STR-Analysesystems,

Herrn Dipl. Biol. Stefan Suchi für seinen geduldigen Beistand bei der statistischen Auswertung meiner Daten,

Herrn Dr. Stefan Flindt, Herrn Dr. Lothar Klappauf, Frau Dr. Barbara Bramanti und Frau Regine Krull sowie der Gemeinde Enger für die freundliche Überlassung des untersuchten archäologischen Skelettmaterials,

allen DNA-Spendern, die mich in meinen Untersuchungen durch das freundliche Bereitstellen ihres Zellmaterials unterstützt haben,

Stefan und Nele für die Knochenarbeit des Korrekturlesens dieser Arbeit,

allen den Kollegen und ehemaligen Kollegen, die mich in meiner Arbeit unterstützt haben,

meiner Familie und meinen Freunden für alles andere.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln des Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert.

Lebenslauf

Diane Manuela Schmidt

geboren am 8. März 1975 in Hatzfeld

Staatsangehörigkeit: deutsch

1981 - 1982	Polytechnische Oberschule Frankfurt/Oder
1982 - 1989	Polytechnische Oberschule Marienberg
1990 - 1992	Realschule Rinteln
1992-1995	Gymnasium Rinteln
17.05.1995	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/1995-07/2001	Studium der Chemie und Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
1.7.1998-30.6.2001	Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Historische Anthropologie und Humanökologie der Georg-August-Universität zu Göttingen
06/2000 - 12/2001	Anfertigung der Staatsexamensarbeit im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Bernd Herrmann am Institut für Historische Anthropologie und Humanökologie der Georg-August-Universität zu Göttingen mit dem Titel „DNA-Extraktion aus konservierten Lebensmitteln“
30. 05. 2001	Abschluß des Studiums durch Bestehen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien
1.7.2001-30.6.2004	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Zoologie und Anthropologie, Abt. für Anthropologie und Humanökologie der Universität Göttingen und Beginn des Promotionsvorhabens „Entwicklung neuer Markersysteme für die ancient DNA-Analyse. Erweiterung des molekulargenetischen Zugangs zu kultur- und sozialgeschichtlichen Fragestellungen der Prähistorischen Anthropologie“ im Rahmen des BMBF-Projekts „Paläogenetik als Schlüssel zum Kulturerbe - Entwicklung innovativer Techniken in der aDNA-Analytik“.

Göttingen, im Mai 2004

Diane Schmidt