

Institut für Pathologie  
Krankenhaus München-Bogenhausen  
Leiter: Prof. Dr. med. Andreas Nerlich

**Molekularbiologischer Nachweis des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes in  
altägyptischen Mumien unter besonderer Berücksichtigung neuer Evolutionstheorien**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Nasim Motamedi

aus  
München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Nerlich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Locher

Priv. Doz. Dr. rer. nat. Gabriele Rieder

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. rer. nat. A. Zink

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

16.07.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
a. Tuberkulose .....	5
1. Tuberkulose damals und heute .....	5
2. Struktureller und molekularer Aufbau .....	9
b. Bedeutung der Paläopathologie .....	13
c. Geschichte Ägyptens .....	15
d. Fragestellung .....	19
1. Einteilung in genetische Gruppen .....	20
2. Eine neue Evolutionstheorie .....	21
<b>B. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
a. Untersuchte Grabkomplexe .....	23
1. Prä-/frühdynastische Zeit (3800 bis 2707/2657 v. Chr.) .....	23
2. Mittleres Reich (2119 bis 1794/1793 v. Chr.) .....	25
3. Neues Reich (1550 bis 1070/1069 v. Chr.) .....	29
4. Dritte Zwischenzeit (1070/1069 bis 664 v. Chr.) .....	29
5. Mittleres Reich bis Spätzeit (2119 bis 332 v. Chr.) .....	29
6. Neues Reich bis Spätzeit (1550 bis 332 v. Chr.) .....	29
b. Fundmaterial und Probenmaterial .....	33
c. Materialien .....	36
1. Verwendete Geräte .....	36
2. Einwegmaterial und Hilfsmittel .....	37
3. Chemikalien .....	38
4. Reagenzien und Enzyme .....	39
5. Primer .....	40
6. Standardlösungen und Puffer .....	41
d. Methodik .....	45
1. Probenaufbereitung und DNA-Extraktion .....	45
2. PCR .....	46
3. Spoligotyping .....	47
4. DNA-Amplifikation .....	49
5. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex Nachweis und spezifische Deletions- und Mutationsanalysen .....	51
6. Sequenzierung .....	54
e. Arbeit mit aDNA .....	55
f. Statistische Auswertung .....	57
<b>C. Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
a. Nachweis humaner DNA .....	59
1. $\beta$ -Aktin .....	59
2. Geschlechtsdiagnostik .....	59
b. Nachweis mykobakterieller DNA .....	60
1. IS6110 .....	60
2. TbD1 .....	63
3. RD9 .....	64
4. <i>mtp40</i> .....	64
5. <i>oxyR</i> .....	64
6. <i>pncA</i> .....	65
7. <i>katG</i> .....	65
8. <i>gyrA</i> .....	65
c. Spoligotyping .....	66

d.	Nachweis humaner und mykobakterieller DNA .....	67
<b>D.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
a.	Nachweis von aDNA.....	69
b.	DNA-Amplifikation .....	72
1.	Humane Gene und Nachweis von <i>IS6110</i> .....	72
2.	Genetische Gruppeneinteilung und Evolutionsstammbaum .....	75
3.	Spoligotyping .....	80
c.	Gesamtbetrachtung.....	82
	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>112</b>

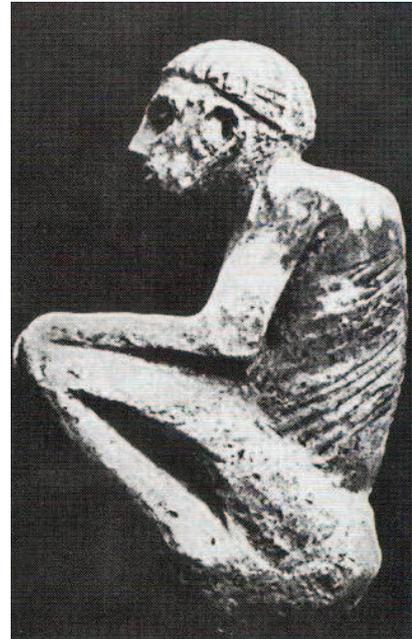
## A. Einleitung

### a. Tuberkulose

#### 1. Tuberkulose damals und heute

##### 1.1. Historische Bedeutung

Die Tuberkulose ist eine sehr bedeutsame Erkrankung, die seit Jahrtausenden Ärzte und Betroffene gleichermaßen beschäftigt. Bereits um 400 v. Chr. hat Hippokrates sowohl die respiratorische, als auch die spinale Form beschrieben, die er mit dem Begriff „Phthisis“<sup>1,2</sup> belegte. In den Veden, antiken Hindu-Texten, ist die Erkrankung erwähnt, wo sie „Rajayakshma“, zu Deutsch „König der Krankheiten“ genannt wird. Selbst im Alten Testament gibt es zwei Passagen, in denen in der hebräischen Fassung der Begriff „Schachepeth“ auftritt. Dieser entspricht dem modernen hebräischen Wort „Schachefet“, „Tuberkulose“.<sup>3,4</sup>



**Abbildung 1: Tonstatuette aus Assuan aus einer Privatsammlung (Paris)**

Leider sind aus dem alten Ägypten bisher keine schriftlichen Aufzeichnungen bekannt, die sich explizit mit der Tuberkulose als eigenes Krankheitsbild auseinandersetzen. Im Papyrus Ebers, einem heute noch erhaltenen Werk aus der 17. Dynastie, wird die Therapie von Husten besprochen.<sup>5</sup> Genauer unterschieden wird zwischen den möglichen Ätiologien aber nicht. Es ist anzunehmen, dass die Ägypter dank ihrer sehr fortgeschrittenen Wissenschaft vielleicht doch mehr über diese Erkrankung mit ihrem sehr typischen Verlauf wussten. Der Verdacht ergibt sich aus den heute bekannten Wandmalereien und Skulpturen aus ägyptischen Gräbern. Klinische Bilder, die der Krankheit zugehören, sind hier als historische Dokumente aufzufinden. In Assuan ist eine prädynastische Tonfigur gefunden worden, die sehr stark an das klinische Bild der Pott'schen Erkrankung, der tuberkulösen Osteoarthropathie der Wirbelsäule, erinnert (siehe Abbildung 1).<sup>6</sup> Solche Bilder führten zu der Überlegung, dass humanpathogene Mykobakterien schon im alten Ägypten vorhanden sein mussten. Dank molekularbiologischer Techniken konnte man diesen Verdacht und einige der damit zusammenhängenden Theorien bestätigen.<sup>7,8</sup>

## 1.2. Verbreitung und klinisches Bild

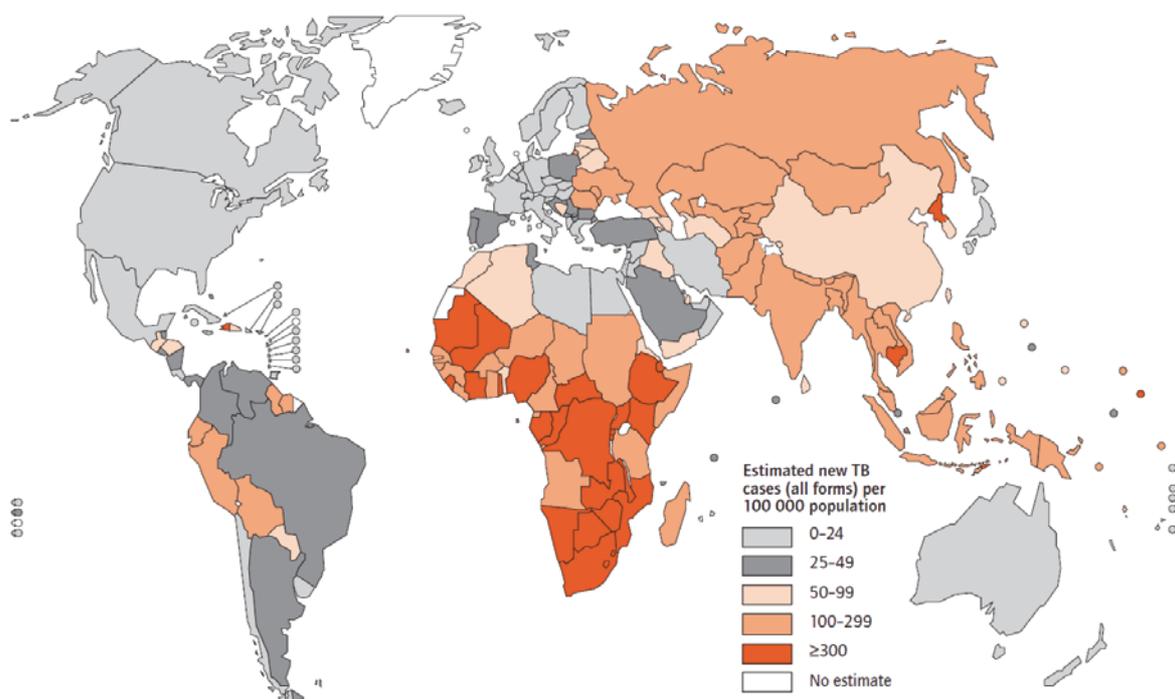
Im Jahre 1868 impfte der französische Arzt Jean-Antoine Villemin Hasen mit tuberkulösem Material von Menschen und Nutzvieh. So belegte er als Erster, dass die Tuberkulose eine ansteckende Erkrankung ist. Nur vierzehn Jahre später, im Jahr 1882, publizierte Robert Koch seine Abhandlung über das ätiologische Agens der Tuberkulose.<sup>9</sup> Zu ihrer Zeit hatte die Erkrankung eine noch größere Bedeutung als heute: Koch zufolge war jeder siebte Todesfall durch Tuberkulose verursacht. Im 16. und 17. Jahrhundert war sie der Grund für ein Viertel aller Todesfälle.<sup>10</sup> Unter dem Namen „Weiße Pest“ war sie damals die häufigste Todesursache in Europa. 65% der Erkrankten mit offener Lungentuberkulose verstarben innerhalb von vier Jahren.<sup>11</sup> Bis zur Einführung der Pasteurisierung von Milchprodukten gingen etwa 6% der Todesfälle durch Tuberkulose auf *M. bovis* zurück.<sup>12</sup> 1907 entwickelte Clemens von Pirquet den Tuberkulin-Test und wandte ihn drei Jahre später an, um latente Infektionen in asymptomatischen Kindern nachzuweisen. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden Sanatorien eingerichtet, in denen respiratorische Beschwerden im Allgemeinen und Tuberkulose im Speziellen behandelt wurden.

Seit 1944 ist es möglich, die Tuberkulose medikamentös zu behandeln. Damals kam das Antibiotikum Streptomycin auf den Markt.<sup>13</sup> Beflügelt durch die großen Erfolge der medikamentösen Therapie, wurde in den 1970er Jahren angenommen, dass sie, ähnlich den Pocken, bald besiegt sein könne. Im Jahre 1994 wurde Tuberkulose jedoch von der WHO als „Global Emergency“ deklariert.<sup>14</sup>

Heute ist laut Zahlen der WHO etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit einem der Erreger des Tuberkulosekomplexes infiziert.<sup>15</sup> Das bedeutet, dass dieses Kollektiv klinisch erkrankt ist oder einen Erreger der Gruppe unbemerkt in sich trägt und potentiell im Falle einer Immunschwäche eine floride Infektion mit der Gefahr der Ansteckung Dritter ausbilden kann. Etwa 10% der Infizierten entwickeln im Laufe ihres Lebens das klinische Bild der Schwindsucht beziehungsweise einen offenen Infekt mit Kontagiosität. Unter Immunsupprimierten sind die Zahlen höher.<sup>16</sup> Tuberkulose wird fast ausschließlich über Tröpfchen übertragen. Sie gilt als Krankheit mit hoher Virulenz. Durchschnittlich steckt jeder Infizierte ohne adäquate medikamentöse Therapie 10 bis 15 weitere Menschen an. Für das Jahr 2006 wurde eine Krankheitsprävalenz von 206/100.000 Einwohnern weltweit angegeben (zur Inzidenz siehe Abbildung 2 und Tabelle 1). Das entspricht einer Gesamtzahl von 13,7 Millionen Betroffenen. Besonders hoch sind die Zahlen in Gebieten, die mit dem „Acquired Immune Deficiency Syndrome“ (AIDS) zu kämpfen haben. Dies gilt vor Allem für das

Subsahara-Afrika. Allerdings gab es in den letzten Jahren auch in Südostasien einen drastischen Zuwachs an Neuerkrankungen.<sup>13</sup>

Seit 1993 gilt die pulmonale Tuberkulose als AIDS-definierende Erkrankung. Im Vergleich zu früheren Jahrzehnten steigt vor allem die Zahl der extrapulmonalen Manifestationen der Erkrankung. Unter von AIDS betroffenen Patienten mit Tuberkulose liegt sie bei über 50%.<sup>17,18,19</sup> Je ausgeprägter die Immunsuppression ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer Extrapulmonaltuberkulose.<sup>20</sup> In bis zu 35% der Fälle einer extrapulmonalen Tuberkulose ist das Skelettsystem betroffen, im Falle der Pott'schen Erkrankung zumeist die Brustwirbelsäule.<sup>21,22,23</sup> Die Infektion beginnt im anteroinferioren Teil des Wirbels. Darauf folgt eine Discitis mit Zerstörung der beiden anliegenden Wirbel. Durch Sinterung der betroffenen Wirbel ergibt sich die typische Keilform und klinisch der charakteristische Gibbus.<sup>24</sup> Obwohl die Inzidenz rückläufig ist, gab die WHO für das Jahr 2005 weltweit 8,8 Millionen Neuerkrankungen an. Dieser Umstand gibt Gesundheitsorganisationen Anlass zur Sorge, da die Tuberkulose über einen langen Zeitraum behandelt werden muss, um eine Genesung sicher zu stellen.



**Abbildung 2: Offizielle Erkrankungsrate für Tuberkulose im Jahr 2007 (Neuerkrankungen und Rezidive/100.000 Einwohner)**

Durch nachlässige Einnahme von Medikamenten beziehungsweise durch ungenügende Verfügbarkeit von Arzneien in bestimmten Regionen sind neuerdings jedoch multiresistente Erreger aufgetreten, die mit den derzeit verfügbaren Präparaten nicht ausreichend behandelt

werden können. Als solcher Fokus gelten beispielsweise die Staaten der ehemaligen Sowjetunion.<sup>25,26</sup> Der dort vorhandene MDR-TB („Multidrug-Resistant Tuberculosis“) ist besonders für Westeuropa von großer Bedeutung, da ein großer Anteil der hier eingeschleppten Erreger aus Osteuropa kommt.<sup>27</sup> Allgemein betrachtet sind Gruppen mit Migrationshintergrund gehäuft betroffen. Auch in Frankreich sind Fallzahlen unter Einwanderern, vor allem bei jüngeren Patienten, bis zu achtmal höher als in der Vergleichsgruppe.<sup>28</sup> Migranten aus Regionen mit hoher Prävalenz für Tuberkulose sind derzeit neben HIV-Infizierten die Hauptkeimträger in Westeuropa.<sup>29</sup> Außerdem sind die Fallzahlen in den Gruppen mit niedrigem sozialökonomischen Status, wie bei Arbeitslosigkeit, niedrigem Einkommen, schlechtem Gesundheitszustand, geringem Bildungsstatus und engem Zusammenwohnen in größeren Gruppen erhöht.<sup>30</sup>

**Tabelle 1: Auszug aus dem WHO-Report für Tuberkulose 2007.** Abkürzungen: AFR: Afrika; AMR: Amerika; EMR: ostmediterrane Region; EUR: Europa; SEAR: Südostasiatische Region; WPR: Westpazifische Region<sup>31</sup>

	Neuerkrankungen und Rezidive	Neuerkrankungen			Wiederbehandlung ohne Rezidiv	Andere *	Prozentsatz der Neuerkrankungen mit pos. Abstrich
		Positiver Abstrich	Negativer Abstrich/ unbekannter Status	Extrapulmonale Manifestation			
AFR	1186800	550001	364789	208979	65883	–	60
AMR	227.616	124.788	55.740	33.298	12.442	2.106	69
EMR	282.945	112.804	99.392	64.282	–	–	53
EUR	365.346	96.101	157.334	49.831	60.719	413	38
SEAR	1.789.186	857.371	594.185	242.332	162.661	202	59
WPR	1.274.266	671.719	447.749	87.584	99.053	10.125	60
Global	<b>5.126.159</b>	<b>2.412.784</b>	<b>1.719.189</b>	<b>686.306</b>	<b>406.010</b>	<b>15.495</b>	<b>58</b>
*) Fälle, die in anderen Teilen der Tabelle nicht erfasst werden							

Bis heute wurden mehrere neue Medikamente entwickelt, die in einer Mehrfachtherapie über mehrere Monate gute Ergebnisse liefern. Erreger, die gegen mindestens eines der gängigen Pharmaka resistent sind, sind in allen WHO-Regionen bekannt, lassen sich aber durch Umstellung der Therapie dennoch bekämpfen. Derzeit besteht die Standardtherapie aus einer zweimonatigen Gabe von Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol, gefolgt von einer viermonatigen Gabe von Isoniazid und Rifampicin.<sup>32</sup>

Außerdem sind Nebenwirkungen recht häufig und für Patienten angesichts der Dauer der Therapie äußerst störend. Nicht zu vernachlässigen sind auch die hohen Kosten, die durch die Antibiotika verursacht werden und die schlechte Arzneimittelverfügbarkeit in ärmeren

Regionen der Erde. Zusammengenommen ergeben sich also multiple Probleme, die ein Eindämmen der Krankheit erschweren. Deshalb wurden Programme, wie das sehr verbreitete DOTS („Directly Observed Treatment, Short-course“) zur weltweiten Vereinheitlichung des Therapieschemas erstellt.<sup>33</sup> Zudem wurden globale Initiativen gegründet, die eine gemeinsame Strategie zur konsequenten Reduktion der Patientenzahlen und zur Prophylaxe neuer Erkrankungsfälle etablieren sollen.<sup>34</sup> Dazu gehört auch das von der WHO geleitete GDF („Global Drug Facility“). Ihr erklärtes Ziel ist es, bis zum Jahr 2015 25 Millionen Leben zu retten und 50 Millionen neue Erkrankungsfälle zu verhindern.<sup>35</sup>

## 2. Struktureller und molekularer Aufbau

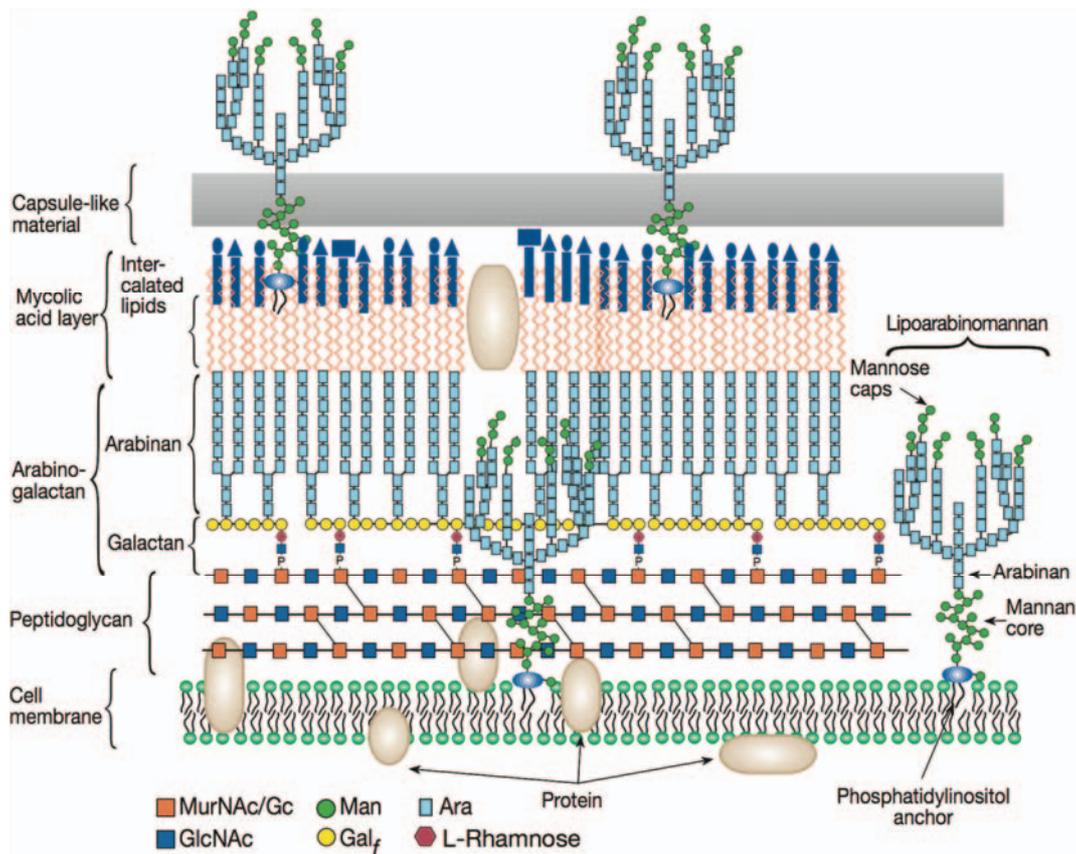
Der Begriff „Mycobacterium“ wurde 1896 von Lehmann und Neumann festgelegt und bedeutet so viel wie „Pilzbakterium“, begründet durch das schimmelpilzartige Wachstum auf flüssigen Medien. In der systematischen Bakteriologie ist es den Actinomyceten zugehörig. Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes sind säurefeste, fakultativ intrazelluläre Stäbchen von etwa 0,4 µm Breite und 3-4 µm Länge (siehe Abbildung 3). Sie bilden keine Sporen und sind unbeweglich.<sup>36</sup>



**Abbildung 3: Aufnahme von *M. tuberculosis* im Transmissionselektronenmikroskop**

60% ihres Zellwandtrockengewichtes wird von Lipiden gebildet. Diese erklären die ausgeprägte Resistenz gegen Umwelteinflüsse. Anders als in Gram-negativen Bakterien gibt es keine äußere Zellmembran, sondern eine dicke, schlecht permeable Wand, die aus mehreren Schichten aufgebaut ist (siehe Abbildung 4). Innen liegt die Plasmamembran, in die Proteine, Phosphatidylinositolmannoside und Lipoarabinomannan eingelassen sind. Dann folgt eine Schicht, die aus den Makromolekülen Peptidoglykan, Arabinogalaktan, Muramin- und Mykolsäuren, langkettigen gesättigten Fettsäuren (C60-90), Lipopolysacchariden und Lipoarabinomannan besteht. Der Kapsel, die aus Polysacchariden und Lipoproteinen besteht, sitzen außen Mykoside, mykolsäurehaltige Glykolipide und Glykolipid-Peptide auf. Die

Glykolipide, zu denen auch Lipoarabinomannan gehört, haben eine starke immunmodulatorische Aktivität. Der hier ebenfalls präsente Cord-Faktor, das Trehalose-6,6-Dimykolat, bewirkt das zopfförmige Aneinanderlagern der Erreger in Kultur und gilt als Virulenzfaktor.<sup>37,38,39</sup> Mykobakterien sind in hohem Grade gegen Austrocknung resistent und können so über mehrere Monate in trockener Umgebung überleben. Zudem sind sie gegen Kälte äußerst unempfindlich und überstehen Minustemperaturen über Jahre. Abtöten kann man sie mittels Pasteurisierung.



**Abbildung 4: Aufbau der Zellwand von Mykobakterien.** Abkürzungen: MurNAc/Glc: N-Acetyl-/ N-Glykolyl-Muraminsäure ; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Man: Mannose; Gal<sub>f</sub>: Galactofuranose; Ara: Arabinose

Die Erreger, die das klinische Bild der Tuberkulose hervorrufen, werden unter dem Begriff *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex zusammengefasst. Sie stimmen zu 99,9% in ihrem genetischen Datensatz überein und besitzen alle identische 16S rRNA-Sequenzen. Das Genom des *M. tuberculosis*-Referenzstamms wurde 1998 komplett sequenziert und besteht aus 4.411.529 Basenpaaren. Der Anteil an Glycin und Cytosin beträgt 65,6%.<sup>40,41,42</sup> Die Rate an Spontanmutationen bei Erregern des *M. tuberculosis*-Komplexes ist zwar ebenso hoch wie bei anderen Bakterien. Dennoch weist diese Erregergruppe einen verhältnismäßig geringeren Genpolymorphismus auf.<sup>43</sup> 52% der Gene kann man einer Funktion zuordnen, 27% der Genprodukte entsprechen vorbekannten Polypeptiden, 15 % zeigen keine Ähnlichkeit zu

erfassten Proteinen. Vermutlich sind sie für Mykobakterien-spezifische Funktionen zuständig. Es liegen 56 Kopien unterschiedlicher Insertionssequenzen vor. Viele der Gene kodieren für Proteine der Lipidbiosynthese, für die Zellkapsel und für den Zellmetabolismus. Die Bakterien enthalten Enzyme zur Herstellung von Lipiden und Polyketiden, die typischerweise in Säugern oder Pflanzen gefunden werden. Etwa 250 mykobakterielle Enzyme zum Fettsäureabbau sind bekannt. Aufgrund der hohen Zahl wird angenommen, dass Energie neben dem Kohlenhydratmetabolismus auch durch den Abbau aufgenommener Wirtslipide gewonnen wird.<sup>44,45</sup> Alle Enzyme, die im aeroben Metabolismus von Bedeutung sind, sind präsent. Solche, die bei anaeroben Elektronentransportketten vorkommen ebenso. Repetitive Sequenzen kommen in großer Anzahl vor. Diese macht man sich für die Diagnostik auf DNA-Ebene zu Nutze.<sup>16, 46,47,48</sup>

Der *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex setzt sich wie folgt zusammen.

***M. tuberculosis*** ist ein obligat aerober Erreger, der am häufigsten den Menschen befällt. Traditionell wird die Diagnose gestellt, wenn durch Beimpfung eine Infektion in Meerschweinchen, jedoch nicht in Hasen, Geflügel oder Wühlmäusen hervorzurufen ist. Bei der Bakterienkultur wird das Wachstum durch Glycerol- oder Pyruvatzugabe ins Medium gefördert.<sup>16,36</sup>

***M. bovis*** wird typischerweise bei Nutztvieh gefunden, beim Menschen eher im Zusammenhang mit Viehhaltung oder nach dem Konsum von unpasteurisierten Milchprodukten. Bei diesem Erreger sieht man einen extrapulmonalen Befall häufiger als bei *M. tuberculosis*. Er ist schwerer anzuzüchten als *M. tuberculosis*, ist in der Form plumper und nicht pigmentiert. Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* bevorzugt er mikroaerophile Bedingungen. Zudem ist er gegen Pyrazinamid resistent und hat das breiteste Wirtsspektrum aller bisher bekannten Mykobakterien.<sup>49</sup> Es wurde bereits in Ziegen, Schweinen, Schafen, Pferden, Katzen, Hunden, Wüstenfuchsen, Rotwild, Bisons, Dachsen, Büffeln, Opossums, Hasen, Frettchen, Wildschweinen, Oryxen, Antilopen, Kamelen, Lamas, Alpacas und Primaten nachgewiesen.<sup>50</sup>

***M. africanum*** ist der Überbegriff für eine heterogene Gruppe von Erregern, die ihren Ursprung vermutlich in Äquatorialafrika haben. Phänotypisch ist *M. africanum* zwischen *M. bovis* und *M. tuberculosis* anzusiedeln. Es ist mikroaerophil, wächst im Nährmedium langsamer als *M. tuberculosis* und ist empfindlich für Pyrazinamid.<sup>51</sup>

*M. microti* ist ein aerobes, nicht pigmentiertes Bakterium, das besonders häufig bei kleinen Wildtieren auftaucht. Erstmals isoliert wurde es 1930 in Großbritannien. Beim Menschen sind erst wenige Fälle bekannt. Der Erreger zeichnet sich durch sein besonders langsames Wachstum im Nährmedium aus. In Wühlmäusen ruft er generalisierte Infektionen hervor.<sup>46,52,53</sup>

*M. canetti* (auch *M. canettii*) ist ein Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes, der 1997 zum ersten Mal beschrieben wurde.<sup>54</sup> Laut derzeitigem Forschungsstand unterscheidet er sich von *M. tuberculosis* nur in den koloniebildenden Eigenschaften und der Generationszeit, jedoch nicht im Befallsmuster. Er kommt nicht häufig vor, ist aber potentiell humanpathogen.<sup>12</sup>

Das *Bacille Calmette-Guérin*, bekannt als Impfstoff BCG, ist ein dauerhaft attenuierter Stamm von *M. bovis*.<sup>11</sup> Das Präparat schützt vor Allem vor der meningitischen Erscheinungsform der Tuberkulose in der Kindheit, jedoch nicht ausreichend vor der pulmonalen Form und hat darüber hinaus schon zu disseminierten Infektionen bei Immungeschwächten gerührt. Daher wird die Impfung in westlichen Ländern nicht mehr durchgeführt.<sup>16,55</sup>

## **b. Bedeutung der Paläopathologie**

Im 19. Jahrhundert wurde die moderne Archäologie gegründet. Zunächst wurden Informationen vorrangig über Analysen von Schriften und Kunstgegenständen der Grabstätten gesucht. Natürlich hat man zu der Zeit mitunter auch andere Grabinhalte untersucht. Es gab durchaus Untersuchungen von Mumien direkt vor Ort. Im Jahre 1698 schrieb Benoit de Maillet, der französische Konsul in Kairo, von der Untersuchung einer Mumie. Sein Augenmerk richtete sich jedoch auf den beigelegten Schmuck, weniger die Mumie selbst.<sup>56</sup> Zum größten Teil diente diese Tätigkeit damals dem Spaß der Touristen. So war es im frühen neunzehnten Jahrhundert ein lustiger Zeitvertreib der britischen Oberschicht, in Ägypten gefundene Mumien - sie waren zu dem Zeitpunkt noch nicht gesetzlich vor Raub geschützt - nach England verschiffen zu lassen und diese für so genannten „Mummy Parties“ zu verwenden. Die Gäste der Festlichkeit packten die Mumien Stück für Stück aus und durften die in den Bandagen gefundenen Preziosen zum Eigengebrauch behalten. Die Mumie selbst, also die reinen sterblichen Überreste der einbalsamierten Person, wurden zumeist als Brennmaterial verwendet, als Abfallprodukt entsorgt oder bestenfalls als Souvenirs auf dem heimischen Regal verwahrt.<sup>57</sup>

Routinemäßige Untersuchungen durch Wissenschaftler begannen erst Jahre später. Eine der ersten medizinischen Untersuchungen einer ägyptischen Mumie wurde im Jahre 1825 vom britischen Arzt Augustus Bozzi Granville durchgeführt.<sup>58</sup> J. N. Czermac veröffentlichte 1875 Ergebnisse histologischer Untersuchungen zur Arteriosklerose in ägyptischen Mumien.<sup>59</sup> Die ersten groß angelegten Grabungskampagnen der Region zogen auch eine größere Zahl an Forschungsarbeiten nach sich. Die britischen Anatomen Grafton Elliot Smith und Warren Dawson und der Chemiker Alfred Lucas lieferten in der ersten Dekade des letzten Jahrhunderts schon grobe Erkenntnisse zu ägyptischen Mumien. Marc Armand Ruffer, ein medizinischer Naturwissenschaftler aus Frankreich, etablierte den Begriff „Paläopathologie“ für diesen Forschungszweig, als dessen Begründer er gemeinhin gilt.<sup>60</sup> Ab dem Jahr 1908 schrieb er eine Reihe von Artikeln, die sich unter Anderem systematisch mit Infektionskrankheiten, orthopädischen Themen und internistischen Erkrankungen auseinandersetzten. Er entwickelte neue Techniken zur Rehydratation der Gewebe, um sie mikroskopisch untersuchen zu können und veröffentlichte epidemiologische Daten. Im selben Jahr leitete die Ägyptologin Margaret Murray eine öffentliche Obduktion an zwei ägyptischen Mumien an der Universität von Manchester.<sup>61</sup>

Wirklich effizient wurden die Analysen mit dem Fortschritt der Medizintechnik. Da viele Mumien aufgrund ihres Alters angegriffen oder bereits von Grabräubern aufgesucht worden waren, konnte man sie häufig nicht von ihren Leinentüchern befreien, ohne sie vollends zu zerstören. Durch die Entstehung nicht- beziehungsweise minimal-invasiver Techniken wie der Computertomographie, Endoskopie oder der erst vor Kurzem entwickelten Rasterkraftmikroskopie, können Mumien heute detaillierter untersucht werden. Rosalie David nutzte in den siebziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts diese neuen Möglichkeiten bei interdisziplinären Untersuchungen an ägyptischen Mumien des Manchester Museums im Rahmen des von ihr benannten Mumienprojekts.<sup>70</sup> Einen weiteren großen Sprung machte dieser Wissenschaftszweig mit der Einführung neuer molekularbiologischer Techniken, unter denen die „Polymerase Chain Reaktion“ (PCR, siehe unter Kapitel B.d.2.) eine der bedeutendsten geworden ist.<sup>62</sup>

So ist ein interdisziplinäres Feld entstanden, in dem sich Mediziner, Biologen und Archäologen treffen. Die hier gefundenen Erkenntnisse kommen all diesen Bereichen zu Gute. Aus molekularbiologischer Sicht kann man Evolutionsvorgänge auf DNA-Ebene nachvollziehen, Theorien belegen und vorsichtige Datierungen vornehmen. Zudem kann man erforschen, wie gut DNA über lange Zeiträume erhalten bleibt, wie sie sich verändert und wo die Grenzen ihrer Nutzung zum Informationsgewinn sind. Durch gefundene Grabbeigaben in Verbindung mit dem körperlichen Status der Mumien können Rückschlüsse auf die Ernährung, damit verbundene Erkrankungen, um somit auf den Lebensstil der betrachteten Gesellschaften gezogen werden. Diese kann man mit den schriftlichen Überlieferungen abgleichen und somit ein vollständigeres Bild über das damalige Leben erhalten, was Historikern und Archäologen gleichermaßen bei ihrer Arbeit hilft. Über Krankheiten, wie der hier besprochenen Tuberkulose, die bis heute großen Einfluss auf die gesamte Menschheit haben, jedoch immer noch nicht bis ins letzte Detail verstanden werden, können neue Informationen über die Entwicklung der Erreger, Infektionswege und etwaige Einflussfaktoren gewonnen werden. Nachdem so gut wie alle klassischen archäologischen Disziplinen bereits sehr ausgereift und dadurch auch weitgehend ausgeschöpft sind, eröffnet dieser junge Forschungsbereich Archäologen neue Möglichkeiten, um Einblicke in das Leben vergangener Zeiten zu finden.

### c. Geschichte Ägyptens

Gefundene Werkzeuge aus der Altsteinzeit geben Hinweise darauf, dass die Nilregion schon seit vielen Jahrtausenden bewohnt wird. Jedes Jahr in den Monaten August und September tritt der Fluss über die Ufer und überschwemmt die angrenzenden Ländereien mit fruchtbarem Schlamm. Dementsprechend ist der Boden für landwirtschaftliche Zwecke sehr gut geeignet und so ist es nicht verwunderlich, dass sich dort schon früh unterschiedliche Völkergruppen ansiedelten.

Den gemeinsamen Staat „Ägypten“ gab es zwar noch nicht; Zeichen kulturellen Lebens werden jedoch immer wieder bei Ausgrabungen entdeckt. Die sogenannte vorgeschichtliche Phase (5000 bis etwa 3150 v. Chr.), wird in die Zeitabschnitte Merimde, Badari und Negade I bis III aufgeteilt.

Die darauf folgende Dynastie 0, brachte an zehnter Position König Narmer hervor, der Ägypten einte und so den Grundstein für eine gemeinsame kulturelle Entwicklung der Region legte. Die 1. und 2. Dynastie bilden zusammen die Frühzeit, in der das Papyrus, Hieroglyphen und der Kalender erfunden wurden. Die Hauptstadt war Memphis, eine Stadt an der Grenze von Ober- und Unterägypten. Aus dieser Zeit stammen auch die so genannten Mastabas, flach angelegte Gräber, die als Vorform der Pyramiden gelten.

Im Alten Reich, das sich von der 3. bis zur 6. Dynastie erstreckte, kam es in Ägypten zu einer ersten Blütezeit mit der Ausbildung einer anspruchsvollen Mathematik und damit auch von Architektur und Astronomie. In dieser Zeit entstanden die berühmten Pyramiden von Gizeh, das letzte noch existierende Weltwunder.

In der sich anschließenden Ersten Zwischenzeit (7. bis 11. Dynastie) kam es zu Unruhen im Land, es regierten zeitweise mehrere Könige nebeneinander und der Staat als übergeordneter Macht- und Verwaltungsapparat löste sich auf. In ausgegrabenen Schriftstücken wird eine Atmosphäre von sozialer Kälte und Brutalität beschrieben.

Zu dieser Zeit bildete sich ein neues Machtzentrum in Theben. Der dortige Herrscher der 11. Dynastie, Montuhotep I. konnte das Land wieder einigen. Dies markierte den Beginn des Mittleren Reiches. Er führte eine Verwaltungsstruktur in Anlehnung an die des Alten Reiches ein. Handwerk und Kunst erblühten wieder. Eine zuvor nicht da gewesene Literaturlandschaft entwickelte sich und der Bau von Tempelanlagen wurde wieder aufgenommen. Langsam wurde Theben zum politischen, kulturellen und religiösen Zentrum des Landes. Man ging

wieder militärisch gegen benachbarte Länder vor, suchte Handelsbeziehungen und etablierte eine Vormachtsstellung innerhalb der Region.



**Abbildung 5: Karte des alten Ägyptens.** Ausgrabungsorte der untersuchten Gewebe sind rot markiert

Mit der 13. Dynastie setzte eine neue Destabilisierung ein. Ägypten zerfiel in zahlreiche kleine Königreiche, die sich gegenseitig bekriegten. Eroberte Regionen gingen wieder verloren und schließlich fiel Ägypten unter die Fremdherrschaft der „Hyksos“, einer herrschenden Elite, die den Herrschernamen nach zu schließen, semitischen Ursprungs war. Ihre Hauptstadt lag in Auaris im Ostdelta. Zwischenzeitlich zogen sich die ägyptischen Pharaonen nach Theben zurück. Es war König Ahmose, der, von dort aus agierend, die Fremden aus dem Land vertrieb und somit die Zeit des Neuen Reichs schuf. Obwohl er eigentlich einem Herrscherhaus der 17. Dynastie angehörte, findet man ihn in den damals angelegten Königslisten an der Spitze der 18. Dynastie. Vermutlich sollte so die Entstehung einer neuen Epoche und somit seine Stellung als Befreier Ägyptens betont werden. Theben wurde nun wieder Reichshauptstadt und ein an dem Mittleren Reich orientierter Staatsapparat wurde eingeführt. Pyramidenanlagen für Könige waren nicht mehr üblich. So entstand das

berühmte „Tal der Könige“, eine Nekropole aus Felsgräbern. Ägypten wurde nun zur Großmacht und nahm umliegende Gebiete ein. Es gelang aber durch eine pragmatische Politik, gute Beziehungen zu den eroberten Ländern beizubehalten und so die eigene Position in der Region zu festigen. Überhaupt lag das Hauptaugenmerk in dieser Phase auf einer stabilen politischen Situation. Die Königswürde war ab sofort sowohl über den Pharaos, als auch über die Gottesgemahlin, also der Ehefrau des Souveräns, übertragbar und der Titel „Königssohn von Kusch“ wurde für einen Vizeregenten in Nubien eingeführt. Der Abschluss des ersten überlieferten Friedensvertrags der Geschichte fiel ebenfalls in diese Zeit. Im Neuen Reich regierten sehr bekannte Persönlichkeiten, wie Echnaton und seine Frau Nofretete, die eine monotheistische Religion einzuführen versuchten, die Königin Hatschepsut und Ramses II., der den berühmten Felsentempel in Abu Simbel errichten ließ. Der letzte Regent der 20.

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>3100-2755 B.C.E.</b> Dynasties 1-2 - Early Dynastic Period Upper Egypt conquers lower Egypt, uniting the Two Lands (3100 B.C.E.)</li> <li>▪ <b>2755-2230 B.C.E.</b> Dynasties 3-8 - Old Kingdom Period of strong government, stability, power, and wealth Age of the pyramids: Step pyramid of Djoser, Pyramids at Giza, Great Sphinx Construction of the tomb of Unis-ankh (ca. 2400 B.C.E.), which is replicated at The Field Museum</li> <li>▪ <b>2230-2040 B.C.E.</b> Dynasties 9-10 - 1st Intermediate Period Economic problems and climate changes lead to divisions between Upper and Lower Egypt</li> <li>▪ <b>2134-1786 B.C.E.</b> Dynasties 11-12 - Middle Kingdom Egypt is reunited and experiences another period of prosperity Egypt conquers Nubia Increased trade with distant lands builds Egypt's wealth and power</li> <li>▪ <b>1786-1567 B.C.E.</b> Dynasty 13-17 - 2nd intermediate period Egypt is overrun by the Hyksos people from Asia</li> <li>▪ <b>1567-1085 B.C.E.</b> Dynasty 18-20 - New Kingdom The Hyksos are driven out and a period of empire-building begins Tut'ankhamun (King Tut) reigns (1361-1352 B.C.E.)</li> <li>▪ <b>1085-712 B.C.E.</b> Dynasties 21-24 - 3rd intermediate period Egypt is ruled by foreign kings from Libya, Nubia, and Assyria</li> <li>▪ <b>712 - 332 B.C.E.</b> Dynasties 25-31 - Late period Egyptian kings regain power Persians occupy Egypt</li> <li>▪ <b>332 B.C.E.-323 C.E.</b> Ptolemaic-Roman period Alexander the Great conquers Egypt (332 B.C.E.) Upon Alexander's death, his general, Ptolemy, begins a new dynasty in Egypt (323 B.C.E.) The reign of Cleopatra VII ends when Egypt is conquered and becomes a province of Rome (30 B.C.E.)  Egypt is conquered by Arabs and brought into the world of Islam (641 C.E.)</li> </ul>
--

Dynastie war Ramses XI. Jetzt geriet der ägyptische Staat in immer größere finanzielle Bedrängnis. Unzufriedenheit machte sich breit. So kam es zu den ersten überlieferten Arbeiterstreiks der Geschichte - jegliche politische Ordnung löste sich auf. In dieser Situation übernahm ein Usurpator die Macht und etablierte eine Militärdiktatur.

Dies läutete die dritte Zwischenzeit ein, die sich von der 21. bis 24. Dynastie zog. In dieser Phase war Tanis, eine kurze Zeit auch Bubastis, die Hauptstadt des Reiches. Es kam zu bürgerkriegsähnlichen Zuständen, konkurrierende Dynastien stritten um die Vormacht und teilweise wurde Ägypten von libyschen Königen regiert. In diese Periode fallen viele Grabräubereien, die zum Teil sogar von Staatsbediensteten angeordnet wurden.

Abbildung 6: Zeittafel der Geschichte Ägyptens (Jahreszahlen weichen von v. Beckerath ab)

Der Beginn der Spätzeit wird von Ägyptologen unterschiedlich datiert (25. bis 27. Dynastie). Begründet ist dies durch die großen Veränderungen, denen das Land unterworfen war. Es war die Zeit der Fremdherrschaft. Herrscher aus Kusch, Assyrien, der historischen Stadt Sais, Persien, Griechenland und schließlich aus Rom eroberten nacheinander das Land und hinterließen ihre Spuren. Der Kunststil unterschied sich stark von dem der vorherigen Phasen und glich sich dem griechisch-römischen Stil an. Die letzte Pharaonin war Kleopatra, die mit ihrem vermuteten Selbstmord am Ende der Geschichte des antiken Ägypten steht. Das Land wurde nun zur römischen Provinz erklärt und als solche über Jahrhunderte vom Machtzentrum in Rom ausgebeutet.<sup>63,64,65</sup>

#### **d. Fragestellung**

In dieser Dissertation wurden altägyptische Mumien mittels molekularbiologischer Techniken auf human-, geschlechts- und mykobakterienspezifische Genloci untersucht und näher definiert.

Hierzu wurden Mumien aus einer Zeitspanne von über 3500 Jahren untersucht. Es wurde zwischen Geschlecht, Alter, pathologischen Veränderungen und der Zugehörigkeit zur jeweiligen Epochen differenziert.

Die zugehörigen Proben wurden auf zwei Fragestellungen hin weiter untersucht. Zum Einen wurde überprüft, wo die zeitlichen Grenzen für die Detektion von Ancient DNA (aDNA) liegen und wie verlässlich sie bei Proben nachweisbar ist, bei denen die Diagnose einer Tuberkulose bereits makroskopisch zu stellen ist. Beim erfolgreichen Nachweis mykobakterieller DNA folgten dann genauere Typisierungen unter Verwendung der gefundenen Erreger-DNA. Zum Anderen wollte man mittels Untersuchung unauffälliger oder unspezifisch veränderter Knochen zusätzliche Aussagen zur Krankheitsepidemiologie, in Abhängigkeit von der Stärke pathologischer Veränderungen, machen.

Darüber hinaus konnte man so abschätzen, in wie weit die Möglichkeiten der molekularbiologischen Diagnostik über die der bisher bekannten und etablierten Untersuchungsmethoden hinausgingen und somit ob sie ein Potential als zukünftige Standarddiagnostik haben.

Im Folgenden wird eine aktuelle Theorie zur Evolution von Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes und eine zuvor publizierte genetische Gruppeneinteilung vorgestellt. Diese wurden mittels der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf ihre Plausibilität überprüft und erste Datierungen ermöglicht.

## 1. Einteilung in genetische Gruppen

Da Deletionen im Genom unidirektionale Ereignisse sind, kann man sie für phylogenetische Untersuchungen nutzen. Eine genetische Gruppeneinteilung der Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes wurde erstmals von Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup> vorgenommen (siehe Abbildung 7). Sie diente als Grundlage für Teile des von Brosch *et al.*<sup>66</sup> erstellten Stammbaums zur Evolution der Mykobakterien (siehe Abbildung 8). Gruppe 1 (blauer Pfeil in Abbildung 8) hat im Kodon 463 des *katG*-Gens CTG und im Kodon 95 des *gyrA*-Gens die Sequenz ACC. Da dies die Sequenzen des gemeinsamen Vorläufers sind, findet man diese Konstellation auch in allen anderen Tuberkuloseerregern. Gruppe 2 (grüner Pfeil in Abbildung 8) weist die Sequenz CGG in *katG* und ACC in *gyrA* auf. Gruppe 3 (roter Pfeil in Abbildung 8) hat die Sequenz CGG in *katG* und AGC in *gyrA*. Daher wurde von Brosch angenommen, dass sich die Erreger dieser Gruppen konsekutiv von der jeweiligen Vorgängergruppe mit diesen Punktmutationen abgespalten haben. Erreger der Gruppe 1 unterscheiden sich in der Nukleotidsequenz dieser beiden Gene nicht vom *M. tuberculosis*-Vorläufer und entsprechen potentiell folgenden Erregertypen: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* und *M. microti*.

Erreger der Gruppe 2 oder 3 gehören zu den modernen Stämmen des *M. tuberculosis*-Komplexes.<sup>42</sup>

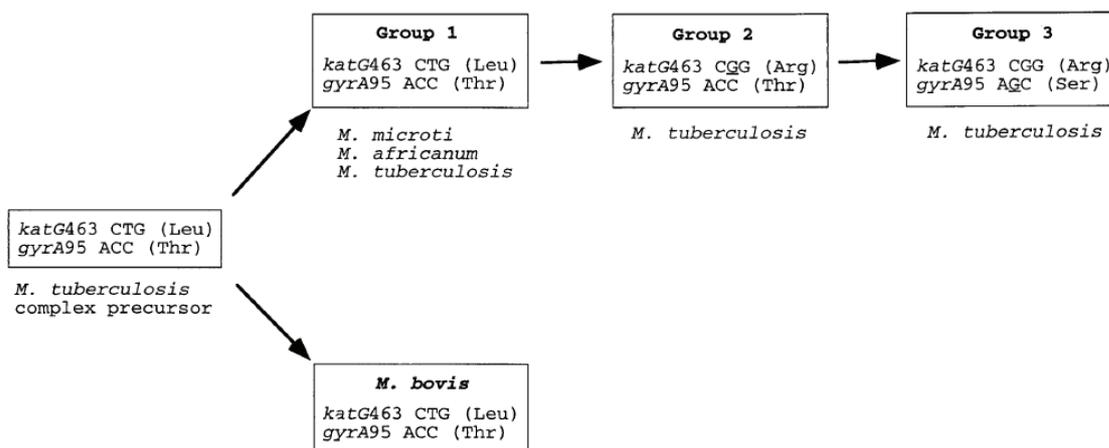


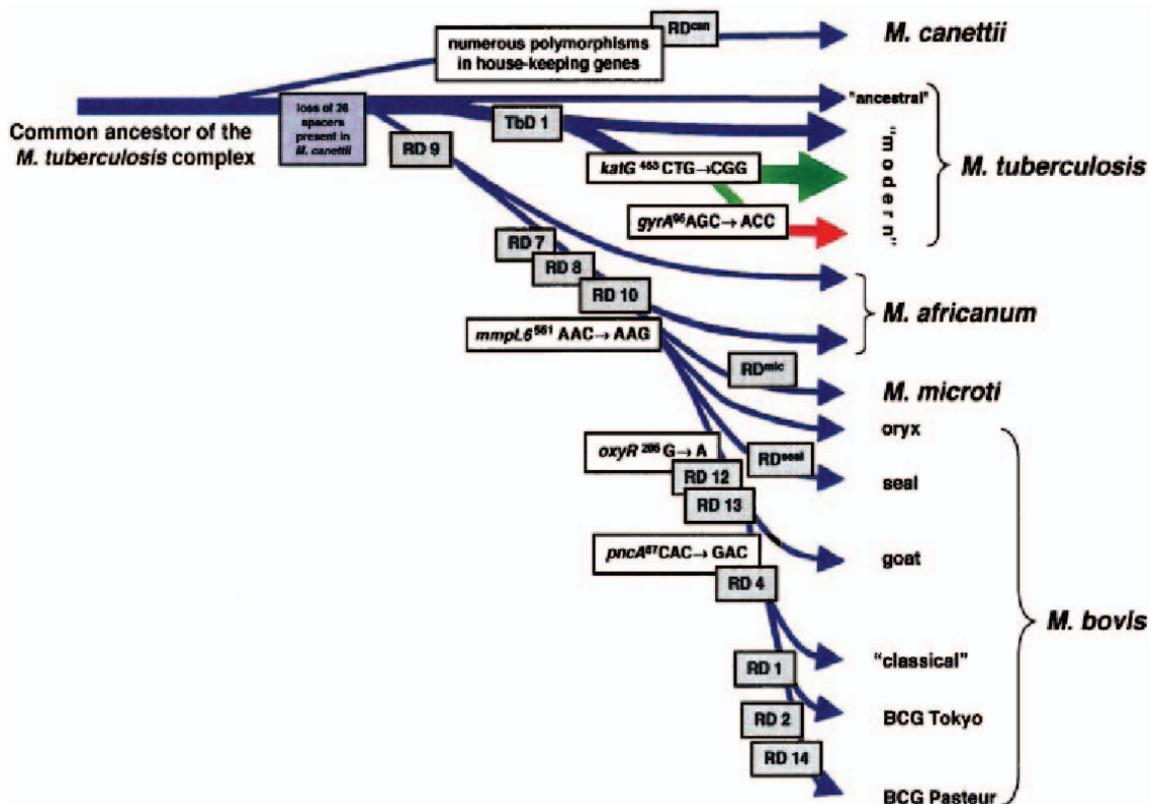
Abbildung 7: Gruppeneinteilung in phylogenetisch ältere und moderne Stämme des *M. tuberculosis*-Komplexes nach Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup>

## 2. Eine neue Evolutionstheorie

Die Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe Gordon *et al.*<sup>47</sup> konzentrierte sich auf verschiedene „Regions of Difference“ (RD1-10), die im Genom der unterschiedlichen Mykobakterien deletiert sind. Die Benennung der RDs geht auf Mahairas *et al.*<sup>67</sup> zurück, die RD1 bis RD3 bei der genetischen Untersuchung des BCG-Stamms beschrieben. Mittlerweile wurde anhand dieser und der inzwischen entdeckten RDs 4 bis 10 ein Stammbaum für *M. microti* und Subtypen von *M. bovis* und *M. africanum* erstellt.<sup>47</sup> Oben wurde bereits RD9 besprochen, das in den Analysen dieser Arbeit genutzt wurde.

Eine weitere in diesem Zusammenhang beschriebene und genutzte Deletion ist die von Brosch *et al.*<sup>66</sup> definierte TbD1-Region. Mit ihr unterscheidet die Arbeitsgruppe zwischen der modernen und der ursprünglichen Form von *M. tuberculosis*.

Van Embden *et al.*<sup>68</sup> untersuchten *M. canetti* mit einem erweiterten Spoligotyping (siehe unten), das mehr als die 43 Spacer der etablierten Technik aufsucht. Hier fielen Spacer auf, die in keinem anderen Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes vorhanden waren. Zudem fehlten alle oben beschriebenen Mutationen und Deletionen, die die anderen Erreger des Komplexes definieren. Daraus wurde geschlossen, dass sich *M. canetti* direkt vom gemeinsamen Vorläufer abgespalten haben muss. Unter Einbeziehung der genetischen Gruppeneinteilung nach Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup> (siehe Abbildung 7) ergibt sich der in Abbildung 8 präsentierte Stammbaum, der von der Arbeitsgruppe Brosch *et al.*<sup>66</sup> erstellt wurde. Dieser Stammbaum widerspricht der gängigen Lehrmeinung, *M. tuberculosis* habe sich als Folge der Domestikation von Vieh aus *M. bovis* entwickelt. Vielmehr geht sie von einer weitgehend voneinander unabhängigen Entwicklung aus.<sup>69</sup> Sowohl die Arbeitsgruppe von Sreevatsan<sup>42</sup> als auch die von Brosch<sup>66</sup> versuchte aufgrund historischer Überlieferungen von Epidemien Datierungen für die Deletionen und Mutationen abzuschätzen. In Broschs Publikation wird von der Deletion des Gens TbD1 vor 15000 bis 20000 Jahren ausgegangen. Verlässliche Daten lassen sich aber nur durch die Untersuchung antiker Proben ermitteln.<sup>47</sup>



**Abbildung 8:** Von Brosch *et al.* erstellter Evolutionsstammbaum des *M. tuberculosis*-Komplexes. Schema der sukzessive aufgetretenen Punktmutationen (graue Kästchen) und Deletionen (blaue Kästchen). Blaue Pfeile stehen für Erreger, die durch CTG an Kodon 463 von *katG* und ACC an Kodon 95 von *gyrA* definiert sind (Gruppe 1 nach Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup>), der grüne Pfeil steht für Gruppe 2 (CGG an Kodon 463 von *katG* und ACC an Kodon 95 von *gyrA*), der rote Pfeil steht für Gruppe 3 (CGG an Kodon 463 von *katG* und AGC an Kodon 95 von *gyrA*)

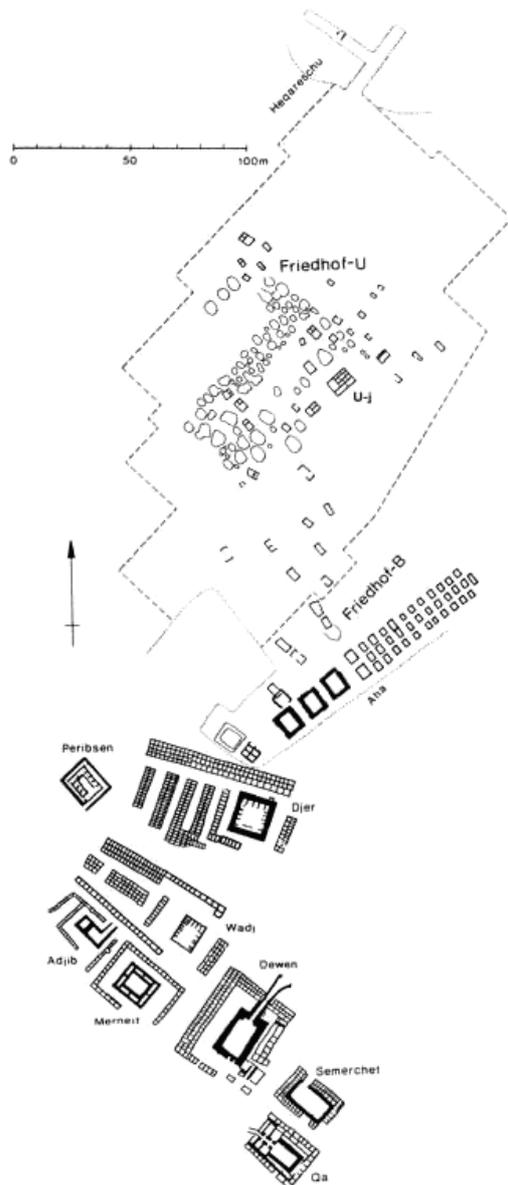
Anmerkung: die korrekte *gyrA*-Mutation an Kodon 95 ist ACC->AGC

## B. Material und Methoden

### a. Untersuchte Grabkomplexe

Im folgenden Abschnitt werden die Grabkomplexe vorgestellt, aus denen die untersuchten Proben stammen. Das Schema der Benennung der Proben erfolgte zunächst nach dem Fundort und anschließend nach der Nummer der Grabungskampagne. Anschließend wurden die einzelnen Proben durchnummeriert.

#### 1. Prä-/frühdynastische Zeit (3800 bis 2707/2657 v. Chr.)



Abydos ist eine antike Stadt der frühdynastischen Zeit mit zugehöriger Königsnekropole und liegt etwa 500 km südlich von Kairo auf dem westlichen Nilufer (siehe Abbildung 5). Im Mittleren Reich (ab 2119 v. Chr.) stieg es zum Hauptschauplatz der Verehrung des Totengottes Osiris auf. Für viele Ägypter wurde es zu einem Statussymbol, in Abydos eine Stele aufstellen oder sich dort bestatten zu lassen. Bis in die Spätzeit hinein ließen sich Herrscher und hohe Beamte in dieser Nekropole große Tempelanlagen erbauen. Der frühe Friedhof Umm el-Qaab liegt etwa 2 km weiter westlich. Er beherbergt die meisten Herrscher der 0.-2. Dynastie.<sup>70,71</sup> Insgesamt wurden 13 Proben aus dieser Nekropole näher untersucht (siehe Katalog).

Abbildung 9: Lageplan der untersuchten Gräber des Friedhofs Umm el-Qaab bei Abydos

### **1.1. Aha**

Das Grab des Aha (3032/2982 bis 3000/2950 v. Chr.), dem Begründer der ersten Dynastie, liegt in Abydos auf dem Umm el-Qaab. Ihm wird die hier besprochene B-16-Grabanlage zugeschrieben. Aha, auch Hor Aha oder Menes genannt, gründete Memphis, die Hauptstadt des Alten Reiches an der Nahtstelle zwischen Ober- und Unterägypten. In der altägyptischen Geschichtsschreibung wird ihm die Vereinigung Ägyptens zu einem Nationalstaat zugesprochen. Archäologische Funde sprechen jedoch dagegen und machen eine damals forcierte Legendenbildung zugunsten des Königs wahrscheinlich. Seine Begräbnisstätte ist von einer etwa 11 m hohen Mauer umgrenzt. Der Bezirk hat eine Länge von 155 m und eine Breite von 50 m. Er ist von zahlreichen Nebengräbern umgeben, in denen königliche Bedienstete beigesetzt wurden. Vermutlich gab es hier auch Opferbegräbnisse. Dieses Ritual wurde jedoch am Ende der 1. Dynastie wieder abgeschafft.<sup>72,73</sup>

### **1.2. Den**

Hor Den (2939/2889 bis 2892/2842 v. Chr.), auch Dewen genannt, regierte mindestens vierzig Jahre lang. Diese Zeit gilt als der politische und kulturelle Zenith der 1. Dynastie, in der der Staatsapparat umgestaltet wurde und erfolgreiche Kriegszüge unternommen wurden. Drei der ihm zugeordneten Gräber befinden sich in Saqqara. Die hier untersuchte Anlage des Hor Den befindet sich auf dem Umm el-Qaab, ist 55 m lang, 40 m breit und in der Zone der Grabkammer 6 m tief. Es sind mehrere Nebengräber vorhanden, in denen sich Sargabdrücke und längere Haarlocken auffanden. Es wird davon ausgegangen, dass dort Frauen bestattet wurden. Das für diese Arbeit genutzte Probenmaterial stammt vom Haldenabbau in der Umgebung des Grabes.<sup>74,75,76,77</sup>

### **1.3. Semerchet**

Der Hor Semerchet (2886/2836 bis 2878/2828 v. Chr.) war wahrscheinlich ein Sohn des Hor Den. Er regierte etwa neun Jahre lang. Der U-Friedhof wird ihm aufgrund des Fundes einer Stele mit seinem Namen zugeschrieben. Auf diesem großen Bezirk liegen mehrere Gräber. Viele sind von Grabräubern teilweise oder ganz zerstört worden. Bei den bisherigen Ausgrabungskampagnen lag das Augenmerk vor allem auf der Keramik und den zoologischen Beigaben in diesen Gräbern.<sup>78</sup>

## **1.4. Qa'a**

Hor Qa'a, auch Qa genannt, (2878/2828 bis 2853/2803 v. Chr.), vermutlich ein Sohn des Semerchet, war der letzte König der 1. Dynastie und regierte etwa 26 Jahre lang. Auch ihm werden Gräber in Saqqara und Abydos zugeschrieben. Die hier besprochenen Untersuchungen beschränken sich auf das Grab in Abydos. Zu den bemerkenswertesten Funden der Anlage gehören zwei Grab-Stelen, die heute in Museen in Kairo und Pennsylvania ausgestellt werden. Bei der ersten Grabuntersuchung am Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte der britische Archäologe W.M. Flinders Petrie zum Teil unangetastete Bestattungen. Das Areal befindet sich am südwestlichen Rand des Plateaus der Königsgräber. Es ist in mehreren Bauphasen errichtet worden. Hierfür wurden an die zentrale 5 x 10 m große Königskammer nach dem Prinzip einer Zwiebelstruktur immer wieder neue Grabräume angebaut. Die Proben für die hier besprochenen Untersuchungen stammen von der äußeren Kammerreihe, die aus Räumen einer Größe zwischen 1,50 und 3,40 m besteht.<sup>79</sup>

## **2. Mittleres Reich (2119 bis 1794/1793 v. Chr.)**

### **2.1. Dra' Abu el-Naga**

Dra' Abu el-Naga ist der moderne Name des nördlichen Anteils der Totenstadt Theben, einer der belegungsstärksten Nekropolen des Alten Ägypten. Er wurde von der 11. Dynastie (Mittleres Reich ab 2119 v. Chr.) bis in die koptische Zeit, also über eine Spanne von etwa 2500 Jahren, genutzt. Viele Grabschächte weisen auf die Bedeutung der Nekropole als heiligen Bestattungsplatz hin. Man sieht ein weites Spektrum von unterschiedlich stark ausgebauten Grabkomplexen. Die Privatgräber sind teilweise sehr einfach strukturiert und enthalten nur spärliche Beigaben. Man findet hier jedoch auch prächtige Königsgräber und Pyramiden. Der Grund liegt in der langen Dauer der Friedhofsnutzung. Diese erfolgte zu Zeiten, in denen die Stadt Theben eine mäßige Bedeutung im politischen, kultischen und kulturellen Bereich hatte, schloss aber auch Phasen ein, in denen sie Reichshauptstadt und Kultstätte für das Alte Ägypten war. Die meisten Gräber sind, zum Teil schon in pharaonischer Zeit, geplündert worden. Daher sind viele Mumien und Grabbeigaben teilweise oder ganz zerstört und konnten nur noch in Fragmenten geborgen werden.

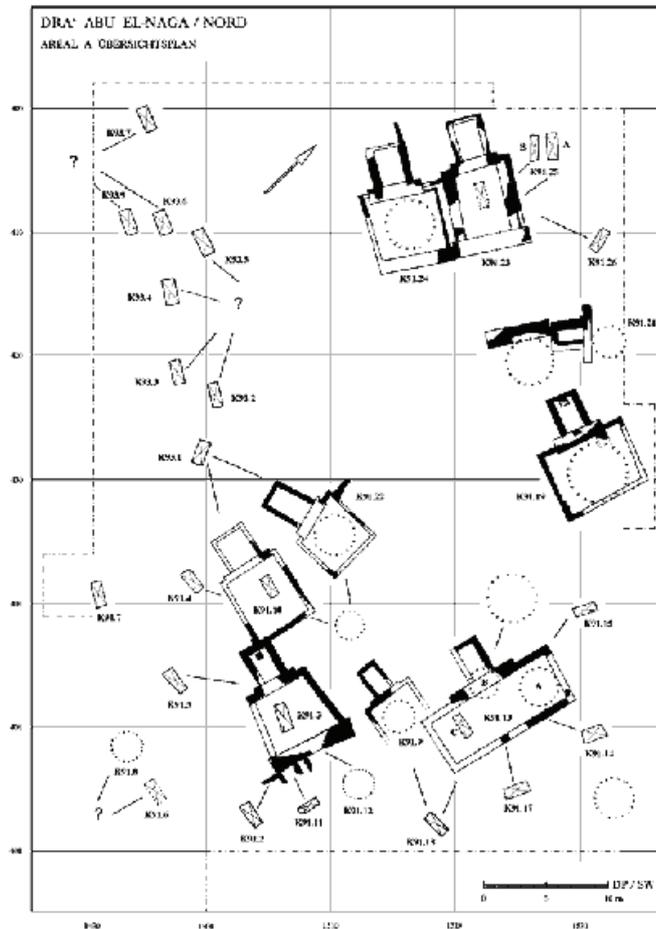
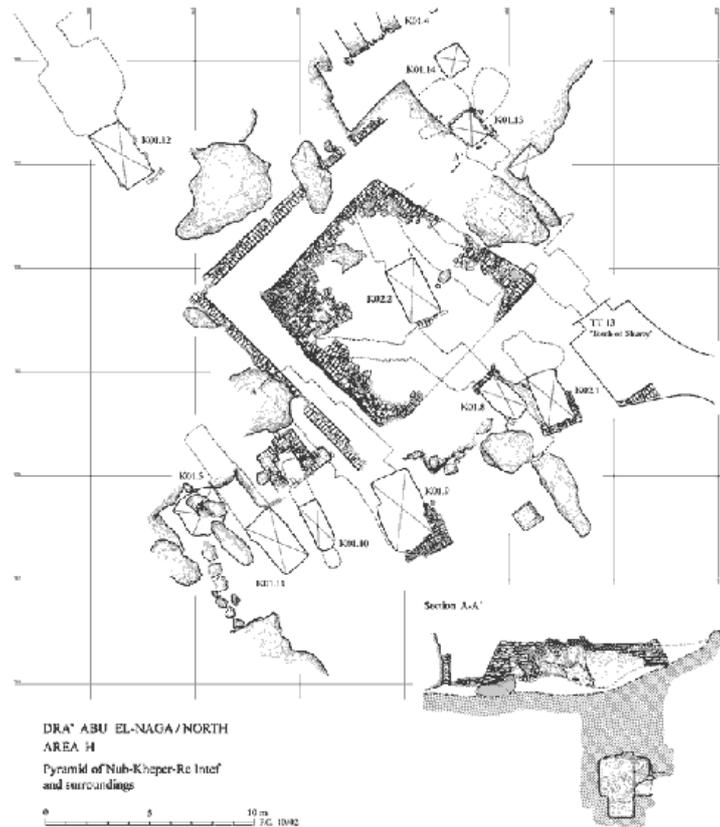


Abbildung 10: Dra' Abu el-Naga/Nord

## 2.2.DAN K01.1/4/8/12 und K02.2

Diese Gräber liegen in unmittelbarer Nähe zur Pyramide des Königs Nub-Cheper-Re Intef (17. Dynastie, etwa 1625 bis 1622 v. Chr.). Sie waren zum Ausgrabungszeitpunkt größtenteils mit Schutt angefüllt. Das bröckelige Gemäuer weist Reparaturversuche auf, die bis in die Antike zurück reichen. K01.1 liegt nördlich der Pyramide und gehörte dem „Kapitän des Hohepriesters des Amun“ Nebanensu. Es stammt aus der Zeit von Thutmosis III./Amenophis II. (1479 bis 1397 v. Chr.). Nach den Dekorationen ist zu schließen, dass K01.4 in der Zeit der ausgehenden 17. Dynastie erbaut und während mindestens zwei weiteren Perioden genutzt wurde. Gefundene Sargreste aus der Ramessidenzeit (1292 bis 1070/1069 v. Chr.), lassen eine recht exakte Datierung der dritten Nutzungsphase zu. Diese Stätte gehört zu den so genannten „Saff-Gräbern“, also Portikusgräbern oder Gräbern vom Pfeilertyp.



**Abbildung 11: Areal H: Plan der Pyramide, der Kultkapelle des Teti und der umliegenden Schächte**

K01.8 liegt direkt östlich der Pyramide. Dieser Schacht zeigt einen Knick im Bau, der sehr ungewöhnlich ist und somit zu der, inzwischen bestätigten, Vermutung geführt hat, dass er um einen früher bestehenden, direkt unter der Pyramide befindlichen Schacht herum konstruiert worden sei.

K01.12 bezeichnet eine Schachtanlage, die direkt neben K01.1 liegt. Sie gehört zu den besser erhaltenen Privatgräbern dieses Areals. Inschriften auf einer Kalksteinstele verraten den Namen des Besitzers: Jayseneb. Das Grab wird folglich in die zweite Hälfte der 13. Dynastie (1794/1793 bis 1648/1645 v. Chr.) datiert. Es besteht aus mehreren Räumen, denen Archäologen unterschiedliche Funktionen zuschreiben. Die Vorkammer war wohl zur Lagerung von Nahrungsmitteln gedacht. Darüber hinaus gibt es einen Hauptraum für den Sarkophag und einen kleinen Seitenraum, der vermutlich für einen Kanopenkasten angelegt wurde.

Der Schacht K02.2 liegt im Zentrum der Pyramide des Nub-Cheper-Re Intef, ist aber älter als diese. Es wird angenommen, dass die hier bestattete Person eine besondere Bedeutung hatte, da man große architektonische Schwierigkeiten in Kauf nahm, um die erwähnte Pyramidenanlage direkt darüber zu erbauen.<sup>80,81</sup>

### 2.3. Doppelgrabanlage „M“ unter dem TT 196-Komplex

Die Grabanlage TT 196 gehörte Padihorresnet, einem Obervermögensverwalter aus der 26. Dynastie (664 bis 525 v. Chr.), also der 3. Zwischenzeit. Unter dem dritten Hof der Grabanlage fand man eine Doppelgrabanlage aus dem Mittleren Reich. Aufgrund ihrer Korridorlage in Richtung zum „Metropolitan House“, dem ehemaligen Stützpunkt von Wissenschaftlern des „Metropolitan Museums“ in New York, hat es die Bezeichnung „M“ erhalten. Aller Wahrscheinlichkeit nach bestand das Grab ursprünglich aus zwei Gräbern, die dann nachträglich vereint wurden. Bei den Ausgrabungsarbeiten fiel vor Allem die immense Menge an Schutt auf, der zu großen Teilen aus Papiermüll des „Metropolitan House“ aus den zwanziger Jahren besteht. Darüber hinaus ist das Grab mehrfach geplündert und jeweils mindestens einmal überschwemmt und angebrannt worden. Die Fundstücke waren daher zum Zeitpunkt der Ausgrabung teilweise stark beschädigt. Zwar gibt es archäologische Anzeichen für Nachbelegungen des Grabes, jedoch präsentierten alle untersuchten Mumien die typischen Konservierungstechniken des Mittleren Reiches.<sup>82</sup>

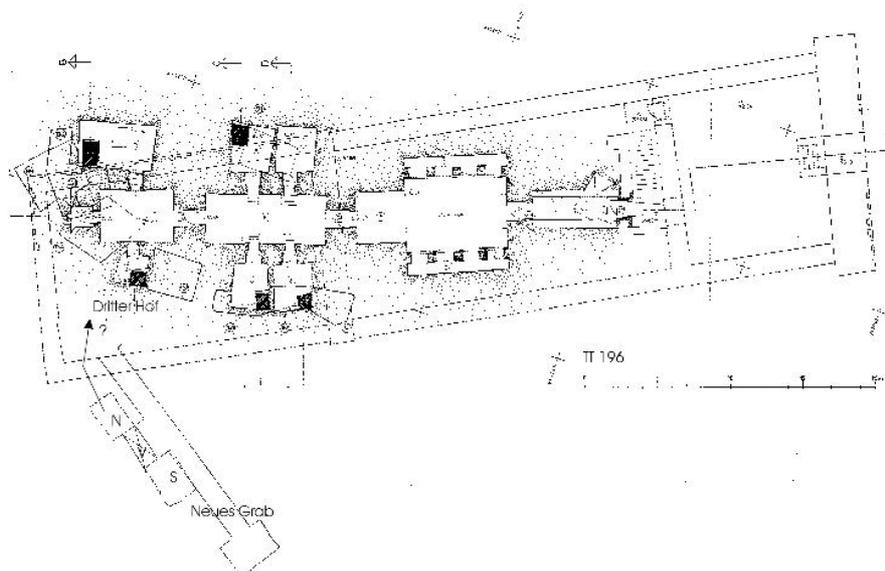


Abbildung 12: Lageplan der Doppelgrabanlage „M“ in Theben-West

### **3. Neues Reich (1550 bis 1070/1069 v. Chr.)**

#### **TT 85 Schacht 2 und TT 95 Kammer 1**

In diesen Räumen wurden die häufig erfolgten Nachbelegungen ausgeschlossen. Hier gefundene Mumien und Mumienteile, sind im Folgenden dem Probenkollektiv des Neuen Reichs zugehörig. Für genauere Angaben zu den Gräbern siehe unter Kapitel B.a.6.3.

### **4. Dritte Zwischenzeit (1070/1069 bis 664 v. Chr.)**

#### **TT 95 Längs-/Querhalle**

Das Grab TT 95 wird im Kapitel B.a.6.3 genauer beleuchtet. Die Längs- und Querhalle sind laut archäologischen Untersuchungen ausschließlich während der dritten Zwischenzeit genutzt worden.

### **5. Mittleres Reich bis Spätzeit (2119 bis 332 v. Chr.)**

#### **DAN K95.1**

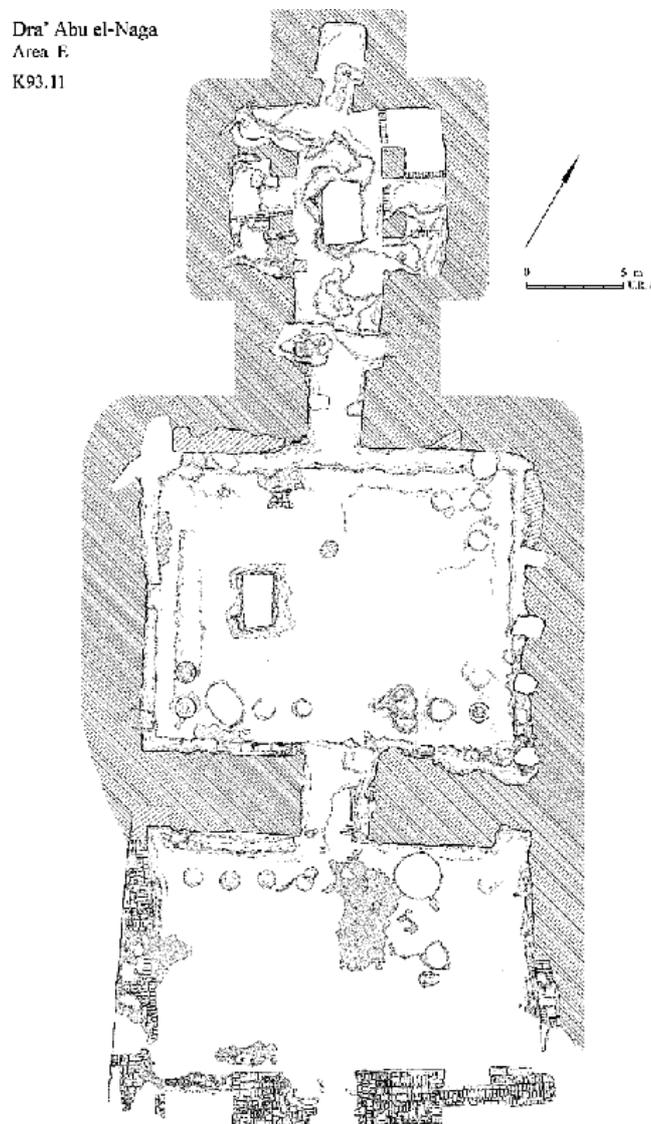
Das Grab DAN K95.1 ist ein Saff-Grab. Analysen von Fundobjekten lassen darauf schließen, dass es in der ausgehenden 11. Dynastie angelegt wurde. Westlich der Pfeilerhalle wurden zwei vertikale, etwa 6 Meter tiefe Schächte aus der 17./18. Dynastie gefunden. Diese waren jedoch zum Zeitpunkt des Fundes bereits stark geplündert und daher für Analysen nur begrenzt nutzbar.

### **6. Neues Reich bis Spätzeit (1550 bis 332 v. Chr.)**

#### **6.1. DAN K93.11**

K93.11 ist das nördliche Grab eines Doppelgrabkomplexes. Östlich befindet sich eine 12 m hohe Terrassierungsmauer, die zwei Vorhöfe begrenzt. Der Grundrissplan lässt auf eine Königsbestattung des frühen Neuen Reiches schließen. Das Grab ist König Amenophis I. (1525 bis 1504 v. Chr.) und seiner Mutter Ahmes-Nefertari zugewiesen worden. Es wurde zu der Zeit Ramses VI. (1142/1140 bis 1134/1132 v. Chr.) von Ramsesnacht, dem Hohepriester des Amun wieder verwendet. Dieser ließ die zwei Vorhöfe und Anteile des Innenraums in

eine Kultkapelle umgestalten. Noch während der ramessidischen Zeit (1292 bis 1070/1069 v. Chr.) wurden Teilbereiche der Anlage mutwillig zerstört. Man vermutet einen Zusammenhang mit dem historisch aufgezeichneten „Krieg des Hohenpriesters“, einer Belagerung durch den nubischen König, die vermutlich im 12. Regierungsjahr Ramses' XI. (1103/1099 bis 1070/1069 v. Chr.) stattgefunden hat. Erneute Verwendung fand die Anlage in der Dritten Zwischenzeit und der Spätzeit (21. bis 26. Dynastie). Während der 21./22. Dynastie (1070/1069 bis etwa 735 v. Chr.) wurden die vorhandenen Hauptschächte wieder belegt. In der 26. Dynastie baute man zusätzliche Schächte und Kammern für Bestattungen entlang der Wände des zweiten Vorhofs.<sup>83,84</sup>



**Abbildung 13: Skizze des Felsgrabs K93.11**

## **6.2. DAN K94.1**

Hierbei handelt es sich um ein nicht fertig gestelltes Grab im Areal F, das am Hang in Richtung Karnak liegt. Es besteht aus einem äußeren und einem inneren Vorhof. Die Kammer ist 9,53 m lang, 2,12 m breit und 2,25 m hoch. Gefundene Grabbeigaben und verwendete Ziegel weisen darauf hin, dass die Anlage in mindestens zwei Perioden (vom Ende der 17. bis Anfang der 18. Dynastie und in der 25. Dynastie) genutzt wurde. Bislang ist der ursprüngliche Besitzer jedoch unbekannt.<sup>85</sup>

## **6.3. TT 84/85/95/183/453**

Die hier besprochenen Anlagen wurden im Neuen Reich gebaut und bis in die Spätzeit genutzt. Die Gräber TT 84 (mit TT 453), 85 und 95 waren für hohe Beamte der 18. Dynastie vorgesehen. Sie befinden sich am Sheikh abd el-Qurna, einem Hügel, der südlich von Dra' Abu el-Naga gelegen ist.

TT 84 wurde für Iamunedjeh, dem obersten Herold unter Thutmose III (1479 bis 1425 v. Chr.), gebaut. Aufgrund seiner Erwähnung in Gräbern aus späterer Bauzeit, wird davon ausgegangen, dass er noch bis in die Regierungszeit Amenhoteps II. (1428 bis 1397 v. Chr.) lebte. Der zweite Besitzer des Grabes ist allem Anschein nach Meri, erster Prophet des Amun unter Amenhotep II. Er ließ sich später TT 95 errichten. Vermutlich wurde ihm dieses Grab zur Verfügung gestellt, bevor mit dem Bau des anderen begonnen wurde. Der Name des ursprünglichen Besitzers ist an einigen Stellen, aber nicht in allen Inschriften, gestrichen. Es ist daher unklar, warum Meri dieses Grab besaß, ob er es tatsächlich usurpiert hatte oder nur fortführen wollte. Es besteht aus zwei Ebenen und wurde von Kampp dem Grabtyp Ve zugeordnet mit einer „T-förmigen Grundform [...], die in der Westwand der Querhalle, zu beiden Seiten, kapellenartige Seitennischen besitzen“<sup>86</sup>. Belegt ist nach derzeitigem Stand nur der Vorhofschaft. Man geht davon aus, dass es bis in die koptische Zeit genutzt wurde.

Die obere Ebene mit der Bezeichnung TT 453 besteht aus einer undekorierten Kapelle, die über der Seitenkapelle von TT 84 sitzt. Sie hat einen eigenen Vorhof ohne zusätzlichen Schacht. Hier wurden weitere Individuen entdeckt.

TT 85 gehörte Amenemheb, der auch unter dem Namen Mehu auftaucht. Er war Befehlshaber der Armee unter Thutmose III. (1479 bis 1425 v. Chr.) und Amenhotep II. (1428-1397 v.

Chr.). Es findet sich hier eine besonders große Grabanlage, die über einem früheren senkrechten Grabschacht errichtet wurde. Der Grundriss entspricht einer Sonderform des Grabtyps VIIa nach Kampp mit einem Vorhof. Dort befindet sich eine Felsbosse, unter der sich ein Vorhofschacht erstreckt. Eine zweite Bestattungsanlage erreicht man über die erste Querhalle des Innenraums. Von dort zieht sich eine so genannte „Sloping Passage“, eine unterirdische Anlage, bis zur dekorierten Sargkammer. Es gibt Anzeichen, die auf eine Wiederbenutzung des Grabes in der 25./26. Dynastie hinweisen. Außerdem finden sich auf der Anlage Reste einer Siedlung der koptischen Zeit.<sup>87</sup>

Nach der Übernahme des Grabes TT 84 ließ sich Meri zusätzlich die Anlage TT 95 erbauen. Es weist eine Bauform vom Typ VIII nach Kampp auf. Die Querhalle hat eine doppelte Pfeilerstellung, die in diesem Grab historisch zum ersten Mal auftaucht. Für die nicht fertig gestellte Längshalle waren ebenfalls Pfeiler geplant. Bislang wurde keine Kammer gefunden, die Hinweise auf den Verbleib des Grabinhabers gibt. In einer nicht näher definierten späteren Phase wurde der Schacht der Querhalle für Nachbestattungen genutzt.

TT 183 wird Nebsumenu, einem Vermögensverwalter unter Ramses II. (1279 bis 1213 v. Chr.), zugeschrieben. Es liegt am Fuße des Hügels von el-Khokha und präsentiert die Form eines Grabes vom Typ Vb nach Kampp. Die Anlage besteht aus einer etwa 8 m breiten Querhalle, einer etwa 11 m langen Längshalle und einer Kapelle, in deren linker Seitenwand sich der Eingang zu einer „Sloping Passage“ findet. Die Grabinnenräume zeigen keinerlei Besonderheiten. Mehrere Durchbrüche in der Kapellenwand weisen auf spätere Belegungen des Grabes hin.<sup>86</sup>

## b. Fundmaterial und Probenmaterial

Für die besprochenen Untersuchungen wurde ein Kollektiv von 1037 unterschiedlichen Individuen herangezogen. Die Fundstücke wurden in der Grabanlage nach anthropologischen Kriterien untersucht. Hierzu gehört die Einteilung nach Geschlecht und Altersgruppe. Dies gilt selbstverständlich ausschließlich für Fundstücke, die individuellen Mumien klar zuzuordnen waren. Einzelne Knochen oder kleine Gewebekomplexe waren nicht mehr auf Alter und Geschlecht charakterisierbar und wurden als „nicht definiert“ benannt. Tabelle 2 zeigt die Herkunft der einzelnen Proben.

**Tabelle 2: Gesamtkollektiv der in Ägypten gewonnenen Proben.** Die Gräber der prä- und frühdynastischen Zeit liegen in Abydos, die anderen in Theben

Zeitstellung	Grab	Individuen
prä-/frühdynastische Zeit (3800 - 2707/2657 v. Chr.)	U-Friedhof, Aha, Semerchet, Qa'a, DEN	189
Mittleres Reich (2119 - 1794/1793 v. Chr.)	TT 196-Komplex (Grab „M“)	211
Mittleres Reich (2119 - 1794/1793 v. Chr.)	DAN K01.1/4/8/12, DAN K02.2	32
Neues Reich (1550 - 1070/1069 v. Chr.)	TT 95 Kammer 1, TT 85 Schacht 2	11
3. Zwischenzeit (1070/1069 - 664 v. Chr.)	TT 95 Längs-/Querhalle	40
Mittleres Reich bis Spätzeit (2119 – 332 v. Chr.)	DAN K95.1/97.1	164
Neues Reich bis Spätzeit (1550 - 332 v. Chr.)	TT 84/85/95/183/453, DAN K91.1 - K97.1	390
Gesamt		1037

Aus dieser Sammlung wurden insgesamt 160 Proben für weitere Untersuchungen ausgewählt. Diese weitere Auswahl wurde nach unterschiedlichen Kriterien getroffen. Zunächst wurde Gewebe analysiert, das makroskopische Veränderungen aufwies, die auf eine klinische Tuberkulose schließen ließen. Hierbei handelte es sich um Wirbelkörper mit typischen Veränderungen, wie lokalisierten Läsionen, Sinterungen und eine typische Keilwirbelform, die zur charakteristischen Gibbusbildung der Wirbelsäule führt (siehe Abbildung 16). Vereinzelt standen Weichgewebeteile zur Verfügung. Hierbei handelt es sich vor Allem um Lungengewebe, das Verwachsungen mit der Pleura aufwies, wie man sie charakteristischerweise bei der Tuberkulose antrifft. Im weiteren Verlauf wurden im Vergleich dazu Proben betrachtet, die unspezifisch verändert waren. Beispielsweise fand man hier Periostreaktionen, Kallusbildungen oder Verformungen sonstiger Art (siehe Abbildung 14 und 15). Zuletzt wurden gänzlich unauffällige Knochen aus unterschiedlichen Gräbern der jeweiligen Epoche ausgesucht, um Aussagen zu epidemiologischen Aspekten machen zu können.

Die Aufteilung der Proben mit morphologischen Veränderungen ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

**Tabelle 3: Probenauswahl bezüglich Veränderungen.** Tb: Tuberkulose

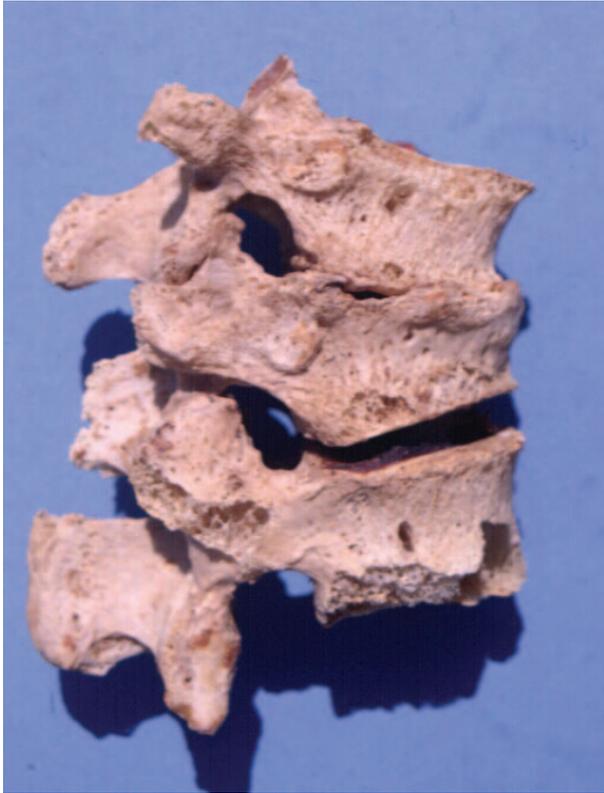
	Tb-typische Veränderungen	unspezifische Veränderungen	unauffällig bzgl. Tb
prä-/frühdynastische Zeit	1/13	5/13	7/13
Mittleres Reich	3/68	12/68	53/68
Neues Reich bis Spätzeit	7/79	20/79	52/79
Gesamt	11/160	37/160	112/160

Nach Ausschöpfung aller Möglichkeiten ergaben sich folgende Zahlen: von den 160 untersuchten Proben sind insgesamt 15 (9%; 95%-KI: 5%-15%) als Frauen, 31 (19%; 95%-KI: 14%-26%) als Männern identifiziert worden. 114 der Proben (71%; 95%-KI: 64%-78%) konnten keinem Geschlecht zugewiesen werden. 67 Proben (42%; 95%-KI: 34%-50%) stammten eindeutig von adulten und 12 (8%; 95%-KI: 4%-13%) von immaturren Individuen. Die losen Knochen wurden im weiteren Verlauf dem adulten Kollektiv zugeteilt. 81 der Proben (51%; 95%-KI: 43%-59%) gehörten dieser Gruppe an.

Der jeweilige prozentuale Anteil wird in Tabelle 4 wiedergegeben.

**Tabelle 4: Probenauswahl**

	ausgewählt	Gesamtkollektiv	Prozentsatz
prä-/frühdynastische Zeit	13	189	7%
Mittleres Reich	68	243	28%
Neues Reich bis Spätzeit	79	605	13%
Gesamt	160	1037	15%



**Abbildung 14 und 15: Unspezifische Entzündungsreaktionen an Knochenproben (Periostauflagerungen)**



**Abbildung 16: Eröffneter Situs mit Pleuraverwachsungen und charakteristischer Gibbusbildung (Kopf befindet sich an der linken oberen Ecke, Hüfte rechts)**

## **c. Materialien**

### **1. Verwendete Geräte**

ABI PRISM™ 310 Gene Analyser, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

Brutschrank, Heraeus Instruments, Düsseldorf

Computer, Deskpro, Compaq, Houston, Texas, USA

Dentalbohrmaschine, MN Dental Instruments, München

DNA Thermocycler Typ Primus, MWG AG, Biotech, Ebersberg

DNA Thermocycler Typ Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

Elektrophoresekammer Typ Mupid 21 (10x15cm), Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan

Image Master®, Amersham Pharmacia Biotech VDS (Video Documentation System for Gel Electrophoresis), Uppsala, Sweden

Kugelschwingmühle Typ MM2, mit Zirkonium-Mahlbechern, Retsch, Haan

Magnetrührer Typ MR 2002, Heidolph, Kelheim

Mikrowellenherd Typ MWE 700, Bauknecht, Schorndorf

Präzisionswaage Typ Navigator™, Ohaus®, Gießen

Rotationsmischer, Agitateur rotatif, Marke unbekannt

Speed Vac Typ DNA 110, Savant Instruments, Farmingdale, New York, USA

Thermomixer Typ compact, Eppendorf, Hamburg

UV-Lampe, 245 nm, Marke unbekannt

UV-Transilluminator Typ Mighty Bright, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Vortexer Typ MS 2, IKA-Labortechnik, Staufen

Werkbank, steril, Typ Herasafe, Heraeus Instruments, Düsseldorf

Zentrifuge Typ 2-4, Sigma, Osterode am Harz

Zentrifuge Typ 1.OR, Heraeus Universalzentrifuge, Laborteam Schultheiss, München

Zentrifuge Typ 5417R, Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Typ 5415R, Eppendorf, Hamburg

## **2. Einwegmaterial und Hilfsmittel**

Dental-Diamant-HM-Fräse, MN Dental Instruments, München

Dental-Diamant-Trennscheibe, MN Dental Instruments, München

Dye Ex<sup>TM</sup> Spin Kits (50), Quiagen GmbH, Hilden

Eppendorf Reaktionsgefäße safe lock (2,0 ml), Eppendorf, Hamburg

Genetic Analyser Sample Tubes (0,5 µl), Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, California, USA

Microcon<sup>TM</sup>-30 Filter, Millipore GmbH, Billerica, Massachusetts, USA

Multi-PCR-Tubes (0,2 ml), PEQ LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Multireaktionsgefäße (0,65 ml), Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Biozym, Oldendorf

Pipettenspitzen mit Filter (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Biozym, Oldendorf

PS-Tubes (4,5 ml), Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Reaktionsgefäße (0,6 ml), Biozym, Oldendorf

Skalpellschneidmesser (22), BAYHA, Tuttlingen

Thermo Tubes (0,2 µl), peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Safeskin<sup>®</sup>, Kimberly-Clark, Irving, Texas, USA

Zentrifugenröhrchen PP (14 ml), Josef Peske oHG, Aindling

### **3. Chemikalien**

Aceton, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Agarose, SeaKem<sup>®</sup> LE agarose, Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf

Aqua ad injectabilia, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Aqua bidest, H. Kerndl GmbH, Weißenfeld

Bromphenol-Blau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Chemiluminescent ECL-detection liquid, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden

Diatomeen-Erde, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dithiothreitol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

DNA-Leiter (50 bp), Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA

DNA ZAP, Solution 1 und 2, Ambion Inc., Austin, Texas, USA

EDTA (Ethyldinitrotetraacetat Dinatrium-Dihydrat), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Eisessig, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Ethanol Absolut, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Ethidiumbromid (10mg/ml), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Guanidium-Thiocyanat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

HCl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Natriumhypochloritlösung (4%), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

SSPE-Puffer, Gibco BRL Life Technologies, Inc., Eggenstein

Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Tris (Tri[hydroxymethyl]aminomethan), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Tris-Cl, Merck Eurolab, GmbH, Ismaning

#### **4. Reagenzien und Enzyme**

Ampli*Taq* Gold™ DNA-Polymerase (5U/μl), PE Biosystems, Foster City, California, USA

Big Dye Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt

Desoxynucleotid Trisphosphate, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden

DNA Polymerisations-Mix (20mM), Applied Biosystems, Weiterstadt

BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit enthält A-, C-, G-, T-Dye Terminator; dITP, dATP, dCTP, dTTP; Tris-Cl (pH9,0); MgCl<sub>2</sub>; thermal stable pyrophosphatase; Ampli*Taq* DNA Polymerase), ABI PRISM™ P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt

Enhanced chemiluminescence (ECL) system, Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden

Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns, Quantum Prep® , Biorad Laboratories, Hercules, California, USA

Hae III, Roche Diagnostics, Mannheim

MgCl<sub>2</sub>-Solution (25mM), P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt

PCR Gold Puffer (10x, enthält: 150 mM Tris/HCl, pH 8,05, 500mM KCl), Gene Amp<sup>®</sup>, Applied Biosystems, Weiterstadt

Primer Act ½ (50pmol), Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm

POP-6<sup>TM</sup> (Performance Optimized Polymer 6), ABI PRISM, P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt

Proteinase K, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Spoligotyping Kit, Isogen, Maarsen, The Netherlands

Termination ready mix, Applied Biosystems, Weiterstadt

Tth Polymerase, HT Biotechnology Ltd., Cambridge, United Kingdom

## 5. Primer

Alle Primer wurden anhand der Sequenz des Referenzstamms *M. tuberculosis H37Rv* gewählt.

**Tabelle 5: Primer**

Gen-Locus	Ziel-Region	Ampl. Richtung	Primer (5' -3')	Ampl. Produkt	Parameter	Anzahl an Zyklen	Ref.-Nummer
IS6110	Insertions-Sequenz	F	CTCGTCCAGCGCCGC TTCGG	123bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 68 °C und 72 °C	45	88
		R	CCTGCGAGCGTAGGC GTCGG				
katG	Katalase-Peroxidase	F	TCAGCCACGACCTCG TCGG	163bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 65 °C und 72 °C	43	89
		R	AGGCGGATGCGACC ACCGTT				
gyrA	DNA-Gyrase A-Unterg.	F	CGAGACCATGGGCA ACTACCA	131bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 65 °C und 72 °C	43	“
		R	CATTGCCTGGCGAGC CGAA				
TbD1 int	<i>M. Tuberculosis</i>	F	AAGGACGAAAGGAT CGTCAA	135bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 63 °C und 72 °C	40	66
		R	AAAACAGCAAGATC GGCAAC				
TbD1 fla	Specific Deletion 1	F	CGGTTATCGAAAGGC TAACG	96bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 62 °C und 72 °C	40	“
		R	TACCGTCGATCGTGT CAAAG				

Gen-Locus	Ziel-Region	Ampl. Richtung	Primer (5' -3')	Ampl. Produkt	Parameter	Anzahl an Zyklen	Ref.-Nummer
RD9 int	Region Of Difference 9	F	GTGGTCATCGAGGTC CAGAT	204bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 60 °C und 72 °C	40	“
		R	GCCTGGGTGCATTAC CTACT				
RD9 fla		F	GTGACGGTATCGTCG AGCAG	178bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 55 °C und 72 °C	40	“
		R	TACCTGGAGGACCA GCTGAA				
<i>mtp40</i>	Phospholipase	F	CTGGTCGAATTCGGT GGAGT	152bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 64 °C und 72 °C	45	90
		R	ATGGTCTCCGACACG TTCGAC				
<i>oxyR</i>	<i>oxyR</i> -Pseudo-Gen	F	CGCGCTGTCAGAGCT GACTTT	150bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 60 °C und 72 °C	45	“
		R	TCTGCGGAATCAGTG TCACC				
<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	F	ATCAGCGACTACCTG GCCGA	180bp	jew. 1 Min. bei 94 °C, 66 °C und 72 °C	45	“
		R	GATTGCCGACGTGTC CAGAC				
<i>actB</i>	β-Aktin	R	CCTTCCTGGGCATGG AGTCCTG	202bp	1 Min. bei 94 °C, jew. 3 Min. bei 60° und 72°	45	91
		F	GGAGCAATGATCTTG ATCTTC				
<i>AMELX/AMELY</i>	Amelogenin	X	CCCTGGGCTCTGTAA AGAATAGTG	106bp	1 Min. bei 94 °C, jew. 2 Min. bei 60° und 72°	45	92
		Y	ATCAGAGCTTAAACT GGGAAGCTG	112bp			
<i>SRY</i>	Testis Determining Factor	F	ATAAGTATCGACCTC GTCGGAAG	93bp	1 Min. bei 94 °C, jew. 2 Min. bei 58° und 72°	45	93,94
		R	GCACTTCGCTGCAGA GTACCGAAG				
<i>Dra</i>	Direct Repeat-Locus	F	GGTTTTGGGTCTGAC GAC	unterschiedlich	jew. 1 Min. bei 96 °C, 55 °C, 30 Sek. bei 72 °C	45	42
<i>Drb</i>		R	CCGAGAGGGGACGG AAAC				
BigDye® Cycle Sequencing Kit					jew. 30 Sek. bei 95 °C, 10 Sek. bei 50-55 °C, 4 Min. bei 60 °C	50	95

## 6. Standardlösungen und Puffer

Agarosegel (2/4%):

4/8 g Agarose

200 ml 1x TAE-Puffer

20 µl Ethidiumbromid-Lösung

Diatomeen-Erde:

Diatomeen-Erde	5,0 g
H <sub>2</sub> O	20 ml
HCl (37,4% v/v)	171,2 µl

Ethidiumbromid-Lösung 0,1% (w/v):

Ethidiumbromid (10mg/ml)	0,1 µl
TAE-Puffer	1,0 ml

GuSCN-Lösung 4 M (Guanidiniumisothiocyanat-Lösung):

Guanidium-Thiocyanat	4,72 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	440,0 µl
Triton X-100	0,13 g
Tris-Cl (0,1 M; pH 6,4)	ad 10,0 ml

Ladepuffer (6x):

Bromphenolblau	75 mg
Glycerol (30%)	4,5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 15 ml

TAE-Puffer (20x):

Tris	48,4 g
Eisessig	11,4 ml
EDTA (0,5 M ; pH 8,0)	3,72 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Tth Puffer (pH 9,0):

Tris-HCl	5 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	7 mM

Mastermix: PCR: Die folgende Mischung wurde auf ein Endvolumen von 20 µl angesetzt.

Tris-HCl (pH 8,3)	10 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTP's	200 nM
Primer 1	1 µM
Primer 2	1 µM
Ampli Taq-Gold	0,025 U/µl
DNA-Template	0,5 µl

Spoligotyping (siehe unten): Die Mischung wurde auf ein Endvolumen von 50 µl angesetzt. Hierfür wurde das Endvolumen mit destilliertem, sterilem Wasser aufgefüllt.

Tris-HCl (pH 8,3)	5 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	7 mM
dNTP's	200 mM
DRa	20 pmol
DRb	20 pmol
Tth Polymerase	0,5 U
DNA-Template	10 ng

Mastermix zum Sequenzieren:

Die Mischung wurde auf ein Endvolumen von 20 µl angesetzt. Hierfür wurde das Endvolumen mit destilliertem, sterilem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

Terminator Ready Reaction Mix	8.0 µL
Template	abhängig von der Probengröße
Primer	3.2 pmol

Restriktionsenzymverdau:

*Hae*III 10 U

PCR-Produkt 8 µl

## **d. Methodik**

### **1. Probenaufbereitung und DNA-Extraktion**

Weichgewebe, wie beispielsweise Lungenmaterial, wurde laparoskopisch oder direkt nach Eröffnung der Körperhöhle ohne Kontaminationen entnommen. Danach wurde das gewonnene Material keimfrei in Röhrchen verpackt und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde eine Datenbank, geordnet nach den Ausgrabungsorten der Fundstücke, eingerichtet. Sie enthält zu jeder Probe alle erhobenen Daten und Fakten.

Um sicher zu gehen, dass das Material steril in den Extraktionsprozess eingeht, wurden die ersten Arbeitsschritte an einer Sicherheitswerkbank vorgenommen. Er wurde nach jedem Arbeitsschritt mit DNA ZAP gereinigt und anschließend mindestens zehn Minuten lang einer Bestrahlung mit UV-C ausgesetzt. Alle Arbeitsmaterialien wurden ebenfalls nach jedem Schritt gereinigt und so lange bestrahlt beziehungsweise autoklaviert, bis man Restbestände an DNA ausschließen konnte.

#### **1.1. Materialgewinnung**

Am zu bearbeitenden Knochen wurde in der Nähe einer eventuellen Läsion eine Gewebestelle gewählt, die makroskopisch intakt war und damit die Entnahmestelle vor Kontaminationen schützte. In großer Umgebung zu dieser Stelle wurde die Oberfläche mit 0,5%iger Natriumhypochloritlösung und Wasser gereinigt. Diese wurde anschließend abgefräst, sodass man nun Zugang zum eigentlichen Probenmaterial fand. Mit einer sterilen Kreissäge entsprechender Größe wurde ein Stück herausgeschnitten, wobei entstehende Kleinpartikel kontinuierlich abgesaugt wurden. Im Anschluss wurde das Gewebe bei 25 Hz bis zur vollständigen Pulverisierung in einer Kugelschwingmühle zermahlen. 1-2 g des Pulvers wurde mit 5 ml EDTA (0,5 M), Proteinase K (5 µg) und 10 µl DTT (1M) versetzt und zwei Tage lang in einem Hybridisierungsofen bei 56 °C schwenkend inkubiert.

#### **1.2. DNA-Extraktion**

Die genutzte Extraktionsmethode der DNA orientierte sich an der von Höss und Pääbo beschriebenen Methode, bei der Silicat verwendet wird.<sup>96</sup> Hierfür wurden die Proben für 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und Überstand abgenommen. Die Proben wurden vier Mal

abwechselnd 4 Minuten auf 99 °C aufgeheizt und im Anschluss für eine Minute in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Die Lösung wurde mit 1 ml Guanidin-Isothiocyanat-Lösung (GuSCN 4M) und 50 µl Diatomeenerde versetzt.

Nachdem bei Raumtemperatur für 120 min rotierend inkubiert wurde, wurden die Proben 5 Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit 1,5 ml 70%igem Ethanol bei einer Temperatur von -18°C, und einmal mit 1,5 ml Azeton gewaschen - jeweils mit dem Zwischenschritt einer Zentrifugation, wie oben beschrieben. Hierauf wurde das Sediment bei 37° C getrocknet. Anschließend wurde es in 120 µl sterilem Wasser aufgelöst und für 15 Minuten bei 56° C inkubiert, wobei die Lösung in fünfminütigem Abstand auf dem Vortex-Mixer aufgeschüttelt wurde. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch ein letztes Mal für 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert, um restliche Feststoffe aus der Lösung zu entfernen.

Das Konzentrieren der Nukleinsäuren erfolgte mit Microcon 30-Filtern nach Angaben des Herstellers.

## **2. PCR**

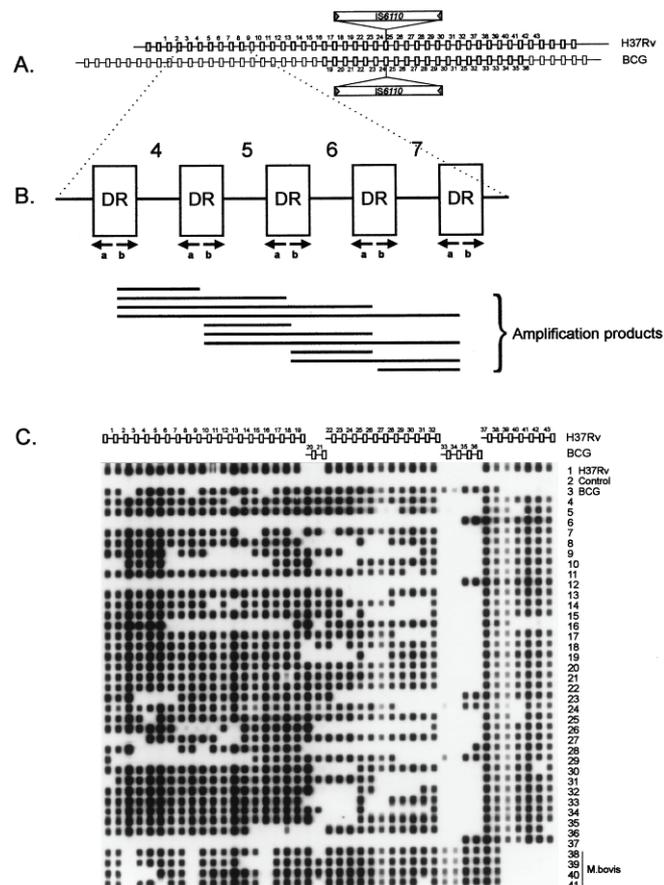
Die so genannte PCR-Technik (kurz für „Polymerase Chain Reaction“) wurde 1985 von Saiki *et al.*<sup>97</sup> entwickelt. Sie ermöglichte erstmals, auch minimale Mengen von DNA gezielt zu detektieren und ganze Nukleotidequenzen nachzuweisen. Da das Arbeitsmaterial der Paläopathologen sehr alt ist, lassen sich Zersetzungsprozesse trotz des oft erstaunlich guten Zustandes der Mumien nicht verhindern. Daher sind häufig nur Spuren der relevanten DNA aufzufinden.<sup>98</sup> Somit ist die PCR besonders für die Paläopathologie ein unverzichtbares Mittel, um über die Morphologie hinaus Aussagen über Mumien machen zu können.

### **2.1. Agarosegel-Elektrophorese**

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Nachdem der letzte PCR-Zyklus beendet war, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.<sup>99,100</sup> Hierfür wurde die unter Kapitel B.c.6. beschriebene Rezeptur für 2%iges Agarosegel unter Zugabe von 0,1%iger Ethidiumbromidlösung verwendet. Das Gel wurde aufgelöst und für den nächsten Schritt in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Wanne gelegt. Nun wurden jeweils 10

µl der Proben mit 2 µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen eines 2%igen Agarosegels mit Ethidiumbromid-Zusatz eingefüllt. Als Referenz wurde in die erste Tasche eine 50 Basenpaar-Standardlösung eingefüllt. Die PCR-Produkte wurden bei 100 V aufgetrennt. Das Gel wurde mittels Geldokumentationsgerät ausgewertet.<sup>62</sup>

### 3. Spoligotyping



**Abbildung 17:** (A) Struktur der DR-Region im mykobakteriellen Genom. Die Chromosomen von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* BCG enthalten 48 bzw. 41 DRs (hier als Rechtecke dargestellt), die von Regionen mit einer Länge von 35 bis 42 bp unterbrochen sind (Spacer) – die Spacer korrespondieren mit 37 Spacern des Genoms von *M. tuberculosis* H37Rv und 6 Spacern von *M. bovis* BCG (B) Prinzip der *in vitro* Amplifikation der DR-Region mittels PCR. Bei der Amplifikation kann jedes DR von Primern als Zielregion erkannt werden – daher besteht das Amplifikationsprodukt aus einem Gemisch unterschiedlich langer DNA-Stränge – dargestellt ist eine Kombination von Fragmenten, die sich aus einer Region mit fünf DRs ergeben könnte (C) Musterbeispiele bearbeiteter Stämme im Spoligotyping. 35 gehören zu *M. tuberculosis* und 5 zu *M. bovis*. Die Abfolge der Spacer auf der Membran entspricht der Abfolge im Genom (Proben: 1-3 Kontrollen für *M. tuberculosis*, Negativkontrolle, *M. bovis*; 4-37: Spoligotypes unterschiedlicher *M. tuberculosis*-Stämme; 38-41: Spoligotypes unterschiedlicher *M. tuberculosis*-Stämme)

Der Begriff „Spoligotyping“ steht für „Spacer Oligotyping“. Es ist eine von Kamerbeek *et al.*<sup>101</sup> entwickelte Methode, mit der man in einem Schritt DNA replizieren und den entsprechenden Erreger identifizieren kann. Die Technik beruht auf der Detektion von „Direct Repeats“ (DR). Hierbei handelt es sich um sich wiederholende Regionen von 36 bp Länge,

die von nicht-repetitiven Spacer-Sequenzen von 35 bis 41 bp unterbrochen sind (siehe Abbildung 17 A und B). Sie sind zum ersten Mal von Groenen *et al.*<sup>102</sup> zur Typisierung von Tuberkulose-Erregern herangezogen. Nach der Sequenzierung der gesamten DR-Region unter Benutzung der Standard-Stämme *M. tuberculosis H37Rv* und *M. bovis BCG* ergaben sich charakteristische Bilder, welche sich im Folgenden auf alle Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes anwenden ließen. Die verschiedenen Erreger unterschieden sich in der Anzahl der DRs und in der Anwesenheit jeweiliger Spacer-Sequenzen. Dieser Polymorphismus wird auf homologe Rekombinationen zurückgeführt.<sup>101</sup> Für diese ist vermutlich die Insertionssequenz IS6110 verantwortlich, da sie in der DR-Region der meisten Stämme des *M. tuberculosis*-Komplexes vorhanden ist. Es wurden 43 solcher „Spacer Oligonukleotid“-Sequenzen definiert, die man nun für die Spoligotyping-Technik nutzt.<sup>46</sup> Nach der DNA-Extraktion aus dem Ausgangsmaterial wurde ein PCR-Ansatz erstellt (siehe unter B.c.6.). Darauf folgte eine PCR-Amplifikation, wie in Tabelle 5 unter „Dra“ und „DRb“ beschrieben. Als nächster Schritt wurden 20 µl des PCR-Produkts mit 150 µl 2x SSPE 0,1%iger SDS-Lösung versetzt und zur Hitzedenaturierung für 10 Minuten bei 99° C auf einem Heizblock aufgeheizt und anschließend in Eiswasser abgekühlt.

Auf einer kommerziell erhältlichen biotechnologisch hergestellten Membran sind 43 Oligonukleotide, die mit den 43 charakteristischen Spacer-Sequenzen zwischen den DR-Regionen der Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes korrespondieren, in vertikaler Linienführung aufgebracht und kovalent angebunden. Führt man nun an diesen Erregern eine PCR mit DR-spezifischen Primern durch, werden die entsprechend dazu korrespondierenden Regionen amplifiziert (siehe Abbildung 17 C). Bringt man die PCR-Produkte in horizontaler Linienführung auf, ergibt sich über die Komplementbindung an die auf die Membran aufgetragenen Oligonukleotide ein, für jeden Erreger spezifisches, Muster. Wird nun Peroxidase und Luminol hinzugefügt, können emittierte Fluoreszenzsignale detektiert werden. Hiermit wurden die Erregermuster auf einem sensitiven Fotofilm sichtbar gemacht und ausgewertet. Unterschiede in der Genomstruktur von Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes sind so schnell zu beurteilen, da sich eindeutige Gemeinsamkeiten innerhalb der einzelnen Erregergruppen gezeigt haben. Beispielsweise fehlten die Spacer 39 bis 43 bei allen *M. bovis*-Erregern, die somit von *M. tuberculosis*-Erregern einfach zu unterscheiden sind.

Die Spoligotyping-Membran wurde zunächst in 2x SSPE und 0,1% SDS bei 60 °C gewaschen. Nach dem Auftragen der von jeweils 130 µl der Proben wurde sie in 2x SSPE und 0,1% SDS bei 60 °C für 60 Minuten inkubiert. Danach wurde die Membran zwei Mal 10 min

lang mit 250 ml 2x SSPE 0,5%iger SDS-Lösung bei 60 °C gewaschen und ein weiteres Mal mit 10 ml der vorgenannten Lösung und 1,25 U Streptavidin-Peroxidase für 45-60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Danach wurde die Membran erneut zwei Mal mit 250 ml 2x SSPE 0,5%iger SDS-Lösung bei 42 °C gewaschen und mit 250 ml 2x SSPE für 5 min bei Raumtemperatur gespült. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Detektionslösung. Nach der Belichtung und Entwicklung eines kommerziell erhältlichen Radiographie-Films war das Muster des jeweiligen Mykobakteriums abzulesen.

Es wurde eine Datenbank für Spoligotyping-Typisierungen eingerichtet.<sup>103</sup> Mit ihr kann man ein ermitteltes Muster mit bereits erfassten vergleichen und so Daten über verschiedene Eigenschaften der unterschiedlichen Erreger und deren Epidemiologie erhalten. Damit kann das jeweilige Bakterium im Klinikalltag auf schnelle Art und Weise identifiziert werden und möglicherweise Aussagen über die Herkunft und den Ausbreitungsmodus gemacht werden.<sup>104</sup> Derzeit enthält diese Datenbank über 13000 verschiedene Erregermuster, eingeteilt in 813 Übergruppen und 1300 Orphan Patterns.

#### **4. DNA-Amplifikation**

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden sowohl auf humane, als auch mykobakterielle DNA untersucht.

$\beta$ -Aktin ist in jeder eukaryotischen Zelle enthalten. Deshalb diente das zugehörige Gen *actB* als Positivkontrollen für amplifizierbare humane DNA.

*SRY* und Amelogenin werden als Geschlechtsmarker genutzt. Bei Funden, die nach anthropologischen Gesichtspunkten nicht klar zu identifizieren waren, wurden *SRY* und Amelogenin eingesetzt, um das genotypische Geschlecht zu ermitteln oder um einen bestehenden Verdacht bezüglich des Geschlechts zu erhärten.

##### **4.1. $\beta$ -Aktin**

$\beta$ -Aktin ist eine der drei Aktin-Hauptgruppen. Es tritt beim Menschen in sechs verschiedenen Isoformen auf. Das Protein ist Teil des Zytoskeletts. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Genabschnitt von 202 bp mittels PCR amplifiziert. Es dient als Nachweismethode für humane

DNA. So wurde überprüft, ob amplifizierbare, humane DNA in den Proben aufzufinden war.<sup>105</sup>

#### **4.2. Amelogenin**

Amelogenin ist ein essentielles Protein der Zahnschmelzmatrix in Säugern. Die zugehörigen Gene AMELX und AMELY befinden sich auf den geschlechtsdeterminierenden Chromosomen X und Y. Diese Gensequenz weist auf dem Chromosom X eine Deletion von 6 bp auf. Daraus resultieren unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte für die beiden Chromosomen. Für die hier besprochenen Untersuchungen wurde eine Sequenz des Gens amplifiziert, die bei X-chromosomaler Herkunft eine Länge von 106 bp und bei Y-chromosomaler Herkunft eine Länge von 112 bp hat. Durch die Anwesenheit des Gens auf beiden Gonosomen werden in männlichen Individuen zwei Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert, wohingegen bei weiblichen Individuen nur das Fragment von 106 bp vorkommt. So kann man nach Gelelektrophorese der Amplifikate, je nachdem ob eine oder zwei Banden vorhanden sind, direkt ablesen ob der Proband männlichen oder weiblichen Geschlechts ist.<sup>66,106,107,108</sup>

#### **4.3. SRY**

*SRY* ist ein Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms Y und kodiert für den „Testis-Determining Factor“ (TDF) während der Embryogenese. Dieser leitet bei Säugetieren die Ausbildung der Hoden ein, die dann durch die darauf folgende Hormonproduktion die Entwicklung des männlichen Phänotyps bewirken. Da genotypischen Frauen dieses Gen im Erbgut fehlt, bleibt die Entstehung der Testes aus und es ergibt sich physiologischerweise der weibliche Phänotypus. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde ein Genabschnitt von 93 bp verwendet.<sup>109,110,111,112,113</sup>

## 5. *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex Nachweis und spezifische Deletions- und Mutationsanalysen

### 5.1. IS6110

IS6110 ist ausschließlich bei Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes nachweisbar. Daher gilt der Nachweis von Anteilen dieser Basenabfolge derzeit als Goldstandard der Suchtests für Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes mittels PCR.<sup>114</sup>

IS6110 ist eine „Insertion Like Sequence“. Das bedeutet, dass es Charakteristiken einer Insertionssequenz aufweist. Insertionssequenzen sind mobile, kurze DNA-Stücke, die sich gegenläufig wiederholende Endsequenzen enthalten. In diesem Fall steht das für invertierte Sequenzen von 28 bp mit drei fehlgepaarten Basenpaaren und repetitiven Elementen mit einer Länge von 3 bp an den Enden der Nukleotidabfolge.<sup>115,116,117,118</sup> Es weist Ähnlichkeiten zu der IS3-Sequenz der Familie der Enterobacteriaceae auf.<sup>119,120,121</sup> Zwischen 0 und 25 Kopien von IS6110 liegen im Genom von Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes vor.

Die Sensitivität wird in der Literatur mit 4-80 % angegeben, die Spezifität mit 80-100%.<sup>122,123,124,125,126,127</sup> Für diese Arbeit wurde eine 123 bp lange Basenabfolge amplifiziert.

Zur Bestätigung der Nachweisspezifität für IS6110 wurde bei unklaren Resultaten mittels Restriktionsenzym nachuntersucht. Hierzu wurde *HaeIII*, eine Typ II-Restriktionsendonuklease von *Haemophilus aegypticus* verwendet, Das Ausgangsprodukt hatte eine Länge von 123 bp, die zu zwei Fragmenten mit 94 bp beziehungsweise 29 bp aufgespalten wurden. Hierzu wurden *HaeIII* und das PCR-Produkt für zwei Stunden bei 37° C inkubiert und einer Elektrophorese auf einem 4%igen Agarosegel unterzogen. (siehe unter Kapitel B.d.2.1).<sup>128</sup>

### 5.2. TbD1

Der Begriff TbD1 steht für „*M. tuberculosis* Specific Deletion 1“. Diese Deletion ist bei Sequenzierungen verschiedener Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes aufgefallen. Dort fehlt das gesamte *mmpS6*-Gen und das *mmpL6*-Gen ist inkomplett. Beide Gene kodieren für Transmembranproteine.

Beim Vergleich des Deletionsmusters fällt auf, dass die Genregion lediglich bei einem kleinen Bakterienkollektiv nicht vorhanden ist. Diese Gruppe umfasst alle *M. canetti*-Bakterien und

die „ancestral“-Form von *M. tuberculosis*. Die TbD1-Region ist so zum Differenzieren alter und moderner Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes geeignet.<sup>129</sup> Diese Methode wird daher verstärkt zur Klärung von Evolutionsfragen bezüglich *M. tuberculosis* eingesetzt - auch im Zusammenhang mit der geographischen Verteilung.<sup>130</sup> Für die hier durchgeführten PCR-Untersuchungen wurden ein deletionsflankierender Genabschnitt und eine Sequenz innerhalb der Deletionsregion verwendet. Sie hatten eine Größe von 96 bp und 135 bp.

Zur Amplifikation der flankierenden Regionen werden die Ansatzstellen der Primer mit großem Abstand zueinander gewählt. Ist der fragliche Genabschnitt deletiert, findet sich ein kurzes, stabiles Amplifikat, das weiter ausgewertet werden kann. Ist es jedoch nicht deletiert, bleibt aufgrund der Entfernung der Primeransatzstellen zueinander eine effiziente Amplifikation aus.<sup>131</sup> Sind also bei der PCR Amplifikate der flankierenden Region aufzufinden, geht man von einer Deletion von TbD1 aus.

### 5.3. RD9

„Regions of Difference“ (RDs) sind Genelemente, mit denen man nahe Genverwandtschaften veranschaulichen kann. Sie können mobile Elemente, Insertionssequenzen oder für Aminosäuren kodierende Gene sein. RD9 ist für die Arbeit mit Mykobakterien besonders interessant, da es, wie in Abbildung 8 ersichtlich, nur noch in *M. tuberculosis* und *M. canetti* präsent und damit gut geeignet ist, um diese Erreger von anderen des *M. tuberculosis*-Komplexes abzugrenzen. Die Forschungsgruppe von Brosch und Gordon<sup>132,133</sup> typisierte unterschiedliche RDs und analysierte die Erreger des Komplexes auf die jeweiligen deletierten. RD9 fehlte beispielsweise in *M. africanum* und *M. microti* und *M. bovis*. Subtypen von *M. bovis* sind so leichter genotypisch zu bestimmen. Findet man hingegen in einer Probe das Gen RD9 auf, kann man von der Präsenz von *M. canetti* oder *M. tuberculosis* ausgehen. Diese Genomanteile lieferten also eine Basis für die Entwicklung des Evolutionsstammbaums der Arbeitsgruppe um Brosch.<sup>66</sup> In dem deletierten Genabschnitt befinden sich zwei „Open Reading Frames“ (ORFs), die für Rv2073c, wahrscheinlich einer Oxidoreduktase, und Rv2074, einem Protein mit derzeit unbekannter Funktion, kodieren. Außerdem werden Gensequenzen durch die Deletion abgebrochen, wie beispielsweise das Produkt von Rv2075c. Es kodiert für ein ausgeschleustes Polypeptid und das Protein CobL, vermutlich eine Precorrin Methyltransferase, das bei der Synthese von Cobalamin beteiligt ist.

Auch hier stehen jeweils eine Basenabfolge des flankierenden Bereichs und eine innerhalb der RD für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Die Deletion lässt sich neben dem Ausbleiben des Genproduktes für RD(int) durch die Amplifikation der flankierenden Region bestätigen.<sup>133</sup> Diese hatten in den hier dargestellten Untersuchungen eine Länge von 178 bp und 204 bp.

#### **5.4.mtp40**

*Mtp40* ist ein Teil des *mpcA*-Gens, das für Bestandteile der Phospholipase C kodiert. Es kommt ausschließlich in Mykobakterien vor und ist daher für ihre PCR-Diagnostik geeignet.<sup>134</sup> Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein 152 bp langes Fragment amplifiziert.

*Mtp40* wird angewandt, um zwischen den primär humanpathogenen Mykobakterien (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, vermutlich *M. canetti*) und den primär für Tiere schädlichen Mykobakterien *M. bovis* und *M. microti*, in denen es deletiert ist, zu unterscheiden.<sup>135,136,137</sup>

#### **5.5.oxyR**

*oxyR* kann bei allen Mykobakterien nachgewiesen werden. Bei *M. tuberculosis* handelt es sich jedoch um ein Pseudogen.<sup>138,139</sup> *OxyR* reguliert *ahpC*, das für eine Alkylhydroperoxid-Reduktase kodiert. Dieses Enzym steuert die Antwort auf oxidative Prozesse in Zellen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Isoniazidempfindlichkeit von Tuberkuloseerregern eng mit diesem Gen zusammenhängt.<sup>140</sup>

Aufgefallen ist in publizierten Untersuchungen, dass bei *M. bovis* als einziges Bakterium des Komplexes ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin an der Nukleotidposition 285 von *oxyR* stattgefunden hat.<sup>141</sup> Diese ist bei Brosch *et al.*<sup>66</sup> in den in Abbildung 8 aufgeführten Stammbaum und somit in die Evolutionstheorie der Mykobakterien eingebaut worden. Für diese Arbeit wurde eine 150 bp lange Basenabfolge sequenziert.

## 5.6. *pncA*

*PncA* kodiert für die Pyrazinamidase. Dieses Enzym nutzt man in der Wissenschaft, um Mykobakterien medikamentös zu bekämpfen. Pyrazinamid ist ein so genanntes „Prodrug“, also ein Medikament, das erst durch die biochemische Prozessierung im Körper zu einer pharmakologisch aktiven Substanz wird. Mykobakterien, die keine Pyrazinamidase bilden, sind somit resistent gegen Pyrazinamid. Inzwischen sind viele Mutationen dieses Gens untersucht. Eine Punktmutation an Kodon 57 von CAC zu GAC, führte zu einer Abtrennung einiger *M. bovis*-Subtypen. Das in dieser Arbeit genutzte Segment hatte eine Länge von 180 bp.<sup>142</sup>

## 5.7. *katG* und *gyrA*

Im Jahre 1997 wurde eine neue Einteilung der modernen *M. tuberculosis*-Erreger veröffentlicht, die sich zweier Genloci bediente: *katG* und *gyrA*.<sup>42</sup> *KatG* kodiert für eine Katalase, die bei rezenteren Erregerstämmen eine Punktmutation im Kodon 463 von CTG zu CGG zeigt (siehe Abbildung 18 unter Gruppe 2 und 3 und Abbildung 19 roter und grüner Pfeil). *GyrA* kodiert für die A-Untereinheit einer DNA-Gyrase. In den modernen *M. tuberculosis*-Stämmen zeigt sich hier eine Punktmutation von ACC zu AGC im Kodon 95. Mit der Einteilung machte die Arbeitsgruppe erste Schritte zur Entwicklung eines Evolutionsmodells der Tuberkuloseerreger. Diese konnte Brosch<sup>66</sup> aufnehmen und in sein Modell einbauen. Die Gruppeneinteilung des modernen *M. tuberculosis* kann in Abbildung 8 von oben nach unten in den Farben blau und rot abgelesen werden. Die hier untersuchten Amplifikate hatten eine Länge von 163 bp und 131 bp für *katG* und *gyrA*.

## 6. Sequenzierung

Proben, die die von Brosch *et al.*<sup>66</sup> beschriebenen Gensequenzen in der PCR zeigten, wurden zudem sequenziert. Hierzu wurden die Banden auf dem Agarosegel ausgeschnitten und enthaltene DNA nach Angaben des Herstellers mit dem „Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction-Kit“ isoliert. Darauf folgte eine Sequenzierung mit dem „BigDye<sup>®</sup> Cycle Sequencing Kit“ auf einem ABI PRISM 310 Genetic Analyser.

### e. Arbeit mit aDNA

Bei der Arbeit mit moderner DNA steht die Frage nach einer möglichen Kontamination eher im Hintergrund. Dies rührt von der in den Proben enthaltene DNA-Menge her: moderne Proben enthalten viel DNA. Sollten Verunreinigungen entstehen, fallen diese prozentual kaum ins Gewicht. Bei sehr alten Proben sind jedoch häufig nur noch minimale Mengen an DNA vorhanden. Diese kann man aufgrund der sehr effektiven PCR-Technik auswerten, die auch noch Ergebnisse bei der Arbeit mit einzelnen Zellen liefert.<sup>143,144</sup> Hier kann eine minimale Verunreinigung zu fehlerhaften Resultaten führen. Prinzipiell kann jede Kontamination vermieden werden, sofern sie nicht in den angekauften Hilfsmaterialien, wie PCR-Tubes bereits zuvor besteht.<sup>145,146,147</sup>

Allgemein wurden bei dieser Arbeit die von Hofreiter *et al.*<sup>148</sup> aufgestellten Regeln im Umgang mit aDNA befolgt. Schon bei der Inspektion in der Ausgrabungsstätte wurden die Mumien in die unterschiedlichen Perioden der ägyptischen Geschichte eingeteilt. Hierbei orientierte man sich an Informationen der Archäologen, untersuchte die Proben aber zusätzlich auf typische Zeichen verschiedener Mumifikations- und Konservierungstechniken, die zu den jeweiligen Zeiten genutzt wurden. Traf man hier auf Ungereimtheiten, wurde die Einordnung in eine klar umgrenzte Zeitperiode vermieden.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden beim Arbeiten strenge Vorsichtsmaßnahmen eingehalten. Zunächst war es essentiell, das Material kontaminationsfrei zu halten. Hierfür wurden nur steril hergestellte, DNA- und RNA-freie Substanzen, Behältnisse und Arbeitsmaterialien, wie Pipettenspitzen und Tubes genutzt. Geräte und Geräteteile, die mit dem Probenmaterial in Berührung kamen, wurden nach jeder Verwendung gereinigt und im Anschluss sterilisiert. Im eigenen Labor hergestellte Lösungen wurden vor der Nutzung autoklaviert. Während des Arbeitens wurden die verwendeten Einweghandschuhe häufig gewechselt und Arbeitsflächen nach jedem Vorgang mit DNA ZAP und UV-Strahlung behandelt. Für die PCR wurden die Schritte des Ansetzens des Mastermixes, der DNA-Zugabe und der DNA-Amplifikation in jeweils unterschiedlichen Räumen durchgeführt. Zu keinem Zeitpunkt wurde in ihnen mit modernen Tuberkulosestämmen gearbeitet. Tubes wurden vor der Verwendung mit UV-Licht bestrahlt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde auf Positivkontrollen verzichtet. Während der Extraktion, der PCR und auf dem Agarosegel wurde jeweils mindestens eine Kontrollprobe mit sterilem, DNA-freiem Wasser als Negativkontrolle mitgeführt. Um belastbare Ergebnisse vorweisen zu können, wurden ausschließlich hochspezifische

Methoden, wie die Verwendung von Sequenzen wie *IS6110* verwendet. Ergebnisse wurden unter Zuhilfenahme mehrerer Diagnosetechniken verifiziert. Beispielsweise wurden die Ergebnisse der PCR mittels Spoligotyping und zusätzlicher Sequenzierung geprüft. Darüber hinaus wurden die Resultate in einem weiteren mikrobiologischen Labor an der Universität Regensburg getestet, um systematische Fehler auszuschließen.

## **f. Statistische Auswertung**

Für die statistische Bewertung der erhobenen Daten wurden unter Berufung auf Rothman<sup>149</sup> die exakten Grenzen des jeweiligen 95%-Konfidenzintervalls berechnet. Ausschlaggebend für diese Entscheidung war die kleine Größe der einzelnen betrachteten Untergruppen des Gesamtkollektivs.<sup>150</sup> Die exakten Grenzen der Konfidenzintervalle wurden in Klammern angegeben.

Beispiel: 50/100 (50%; 95%-KI: 40%-60%)

Der Nachweis gelingt bei 50 von 100 untersuchten Proben, prozentual bei 50 %. Die exakten Grenzen des 95%igen Konfidenzintervalls liegen bei 40% und 60%.

### C. Ergebnisse

Für diese Arbeit wurden 160 Proben von 1037 altägyptischen Mumien von der prädynastischen bis zur Spätzeit (3800 bis 332 v. Chr.) ausgewählt. Hierfür wurden die Gewebeprobe auf klinische Merkmale einer Tuberkulose untersucht und nach dem Grad der pathognomonischen Veränderung in drei Gruppen („unauffällig“, „unspezifisch verändert“ und „Tuberkulose-typisch verändert“) eingeteilt. Darüber hinaus wurden die gefundenen Mumien bezüglich Geschlecht, Alter und Epochenzugehörigkeit definiert. Diese Proben wurden mittels PCR-Technik auf das bei allen Eukaryonten vorhandene Gen für  $\beta$ -Aktin und die geschlechtsspezifischen Gene *SRY* und Amelogenin untersucht.

Zudem wurden die Proben auf *IS6110* untersucht. Diese Sequenz gilt als derzeitiger Goldstandard zum Nachweis von Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes. Anhand des Nachweises sollten über diese Erreger epidemiologische Aussagen zum Befall in Abhängigkeit von den oben genannten Kriterien gemacht werden.

Anschließend wurden die Genloci *TbD1*, *RD9*, *pncA*, *gyrA*, *katG* und *oxyR* betrachtet. Mutationen dieser Gene stellen laut Brosch *et al.*<sup>66</sup> Landmarken in der Evolution der Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes dar (siehe Abbildung 8).

Anhand der Analyse dieser Genloci sollten die Proben dieses Kollektivs mit der Evolutionstheorie verglichen und in den von Brosch publizierten Stammbaum eingeordnet werden. Darüber hinaus sollte anhand der Gene *katG*, und *gyrA* die genetische Gruppeneinteilung der Erreger des *tuberculosis*-Komplexes nach Sreevatsan vorgenommen werden (siehe Abbildung 7).

Die Diagnose des jeweiligen Erregers wurde zudem mit der Spoligotyping-Technik überprüft.

Eine tabellarische Aufstellung aller Ergebnisse findet sich im Katalog.

## a. Nachweis humaner DNA

### 1. $\beta$ -Aktin

Der Nachweis von erhaltener, nicht inhibierter menschlicher DNA in Form des Gens für  $\beta$ -Aktin, war bei insgesamt 71 der 160 Proben (44%; 95%-KI: 37%-52%) möglich. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich war der Nachweiserfolg dabei unabhängig vom Alter der Proben.

**Tabelle 6: Nachweis von  $\beta$ -Aktin in untersuchten Proben.** In Klammern: die exakten Grenzen der Konfidenzintervalle bei 95% Signifikanzniveau

	Gesamtanzahl	positiver Nachweis	Prozentsatz
prä-/frühdynastische Zeit	13	5	38% (14% - 68%)
Mittleres Reich	68	29	43% (31% - 55%)
Neues Reich bis Spätzeit	79	37	47% (36% - 58%)
Gesamt	160	71	44% (37% - 52%)

### 2. Geschlechtsdiagnostik

Amelogenin und *SRY* wurden eingesetzt, um Sicherheit in der Geschlechtsdiagnostik zu erhalten. Bei der genetischen Untersuchung mittels Amelogenin wurde bei 28 von 160 Proben (18%; 95%-KI: 12%-24%) ein positiver Nachweis erzielt. *SRY* ist nur bei männlichen Individuen vorhanden. Es wurde bei 11 der 160 Proben (7%; 95%-KI: 3%-12%) nachgewiesen. Tabelle 7 gibt die Resultate genetischer und anthropologischer Untersuchungen gekoppelt als Gesamtergebnis der Geschlechterzuteilung wieder.

**Tabelle 7: Geschlechtsverteilung der Proben**

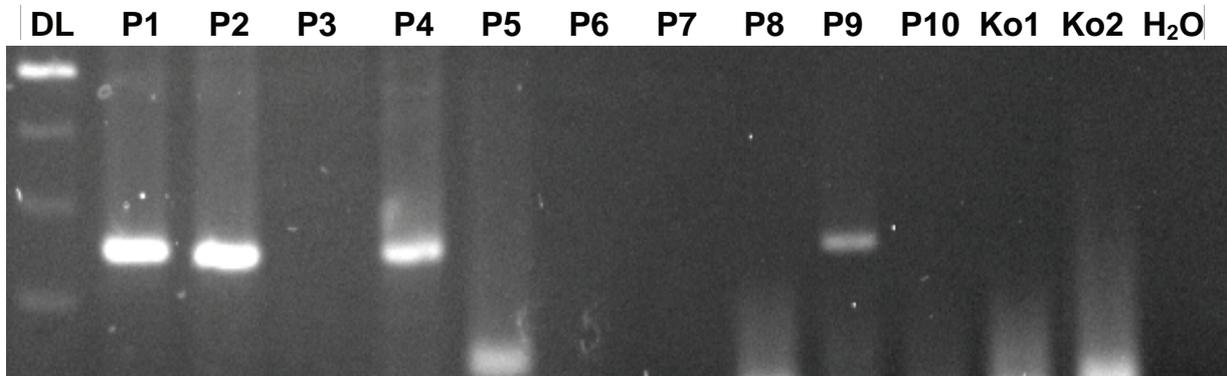
	Gesamtanzahl	Mann	Frau	nicht definiert
prä-/frühdynastische Zeit	13	1	2	10
Mittleres Reich	68	11	1	56
Neues Reich bis Spätzeit	79	19	12	48
Gesamt	160	31	15	114

Kumuliert war der Nachweis von humaner DNA in Form von  $\beta$ -Aktin, *SRY* und Amelogenin bei 80 der 160 untersuchten Proben (50%; 95%-KI: 42%-58%) erfolgreich.

## b. Nachweis mykobakterieller DNA

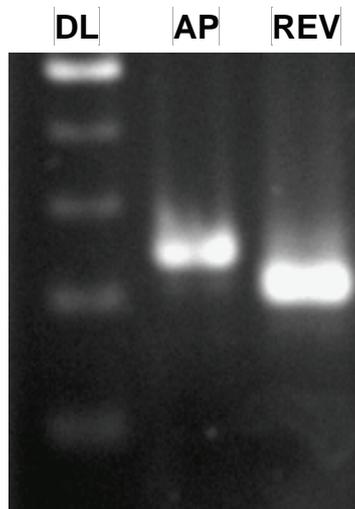
### 1. IS6110

IS6110 konnte bei 45 der 160 Proben (28%; 95%-KI: 21%-36%) aufgefunden werden.



**Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese nach PCR von IS6110.** Abfolge: 50 bp DNA-Leiter (DL), 10 Proben (P1: DEN T-NW, P2: TT183-20, P3: TT196/93, P4: TT196/MW7, P5: TT95-34, P6: TT85-2-120, P7: DAN 31, P8: TT196-2/152, P9: DAN 74, P10: DAN 117), 2 Negativkontrollen der Amplifikation (Ko), Negativkontrolle der Agarosegelelektrophorese (H<sub>2</sub>O). Bande von P1, 2, 4 und 9 bei 123 bp

PCR-Produkte wurden zur Kontrolle mit *Hae*III geschnitten und die Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Schneiden des 123 bp langen Fragments ergibt zwei kleinere Fragmente einer Länge von 94 bp und 29 bp. In Abbildung 19 ist exemplarisch die Probe TT196/MW7 aufgeführt.



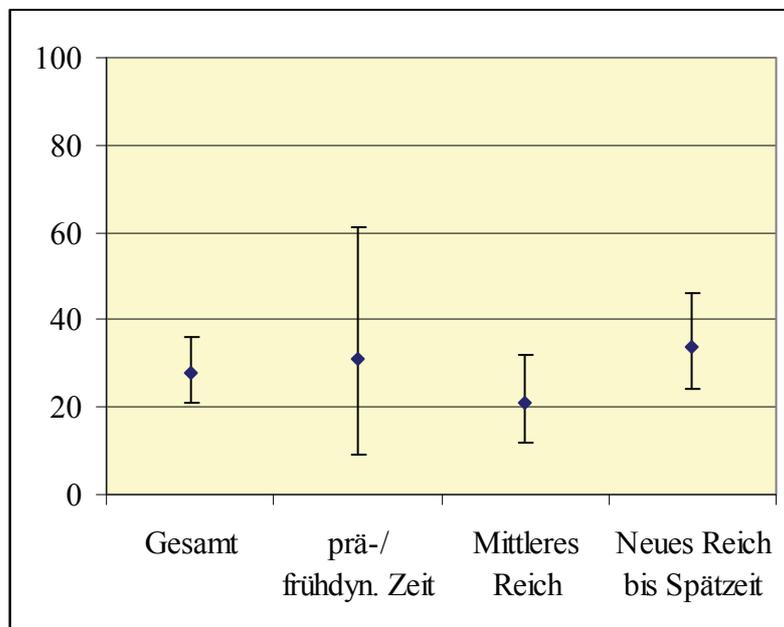
**Abbildung 19: Kontrolle der Spezifität mittels Restriktionsenzym.** Abfolge: 50 bp DNA-Leiter (DL), Amplifikationsprodukt der PCR mit 123 bp (AP: TT196/MW7) und nach dem Schneiden mit *Hae*III mit 94 bp (REV)

Der erfolgreiche Nachweis von IS6110 bei Proben unterschiedlicher Epochen wird in Tabelle 8 wiedergegeben und ist in Abbildung 20 dargestellt.

Die Proben wurden nach unterschiedlichen Kriterien in Untergruppen eingeteilt. Der jeweilige Anteil des erfolgreichen Nachweises von IS6110 wurde verglichen, um Aussagen über Korrelationen zwischen der Anwesenheit von Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes und den einzelnen Kriterien zu ermöglichen.

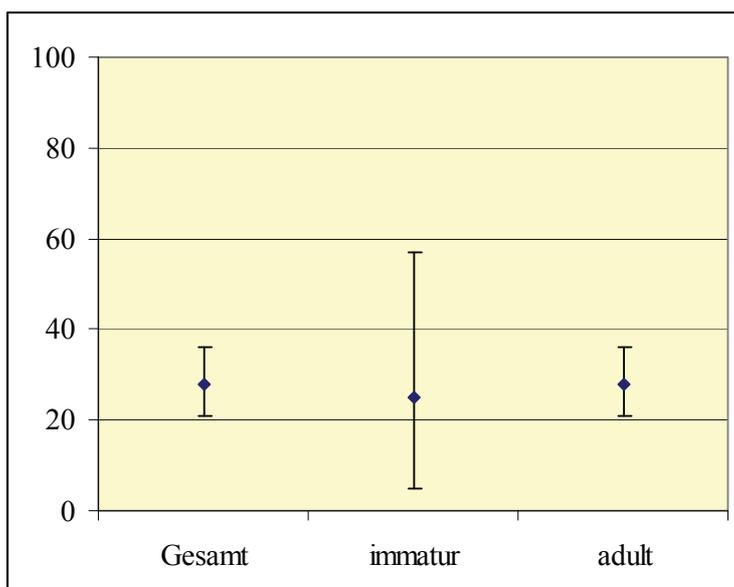
**Tabelle 8: Molekularbiologischer Tuberkulosenachweis bei Mumien unterschiedlicher Epochen.** In Klammern: die exakten Grenzen der Konfidenzintervalle bei 95% Signifikanzniveau

	Gesamtanzahl	IS6110 pos.	Prozent
prä-/frühdynastische Zeit	13	4	31% (9% - 61%)
Mittleres Reich	68	14	21% (12% - 32%)
Neues Reich bis Spätzeit	79	27	34% (24% - 46%)
Gesamt	160	45	28 % (21% - 36%)



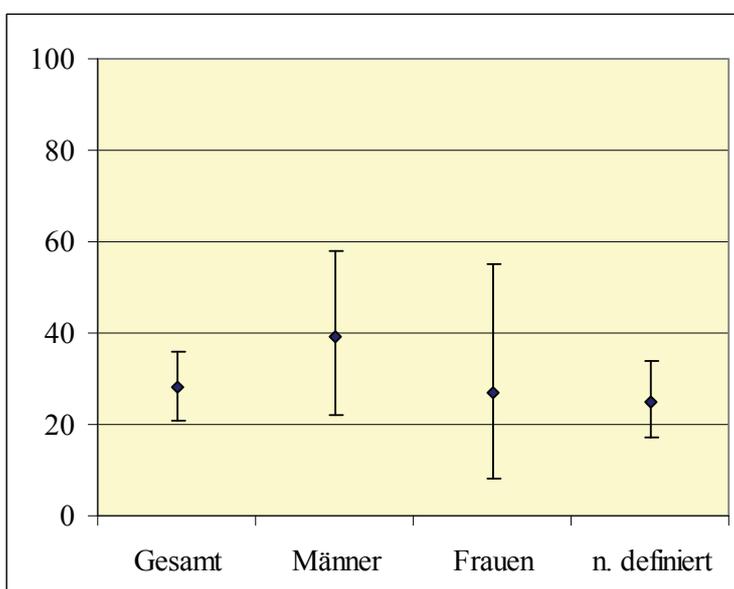
**Abbildung 20: von IS6110 im Gesamtkollektiv und in unterschiedlichen Epochen.** Darstellung in Prozent mit Angabe der exakten Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls

Im immaturren Kollektiv war bei 3 von 12 Proben (25%; 95%-KI: 5%-57%), im adulten bei 42 von 148 Proben (28%; 95%-KI: 21%-36%) Mykobakterien nachzuweisen (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Nachweis von IS6110 im Gesamtkollektiv und in Abhängigkeit vom Alter der Individuen.** Darstellung in Prozent mit Angabe der exakten Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls

Für den Nachweis von IS6110 ergaben sich in der Gruppe männlicher Individuen Werte von 12/31 (39%; 95%-KI: 22%-58%), für weibliche von 4/15 (27%; 95%-KI: 8%-55%) und für, bezüglich des Geschlechts, nicht definierte Mumien 14/57 (25%; 95%-KI: 14%-38%) (siehe Abbildung 22).

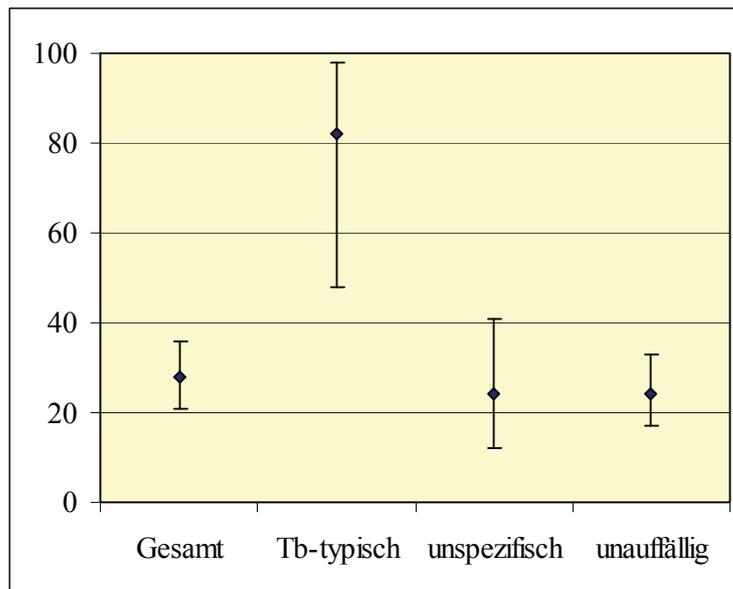


**Abbildung 22: Nachweis von IS6110 im Gesamtkollektiv, in Gewebe von männlichen, weiblichen und bezüglich des Geschlechts nicht definierte Mumien.** Darstellung in Prozent mit Angabe der exakten Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls

Der Mykobakterienbefall verteilte sich ungleichmäßig auf die einzelnen Kollektive mit unterschiedlich stark verändertem Gewebe. Heraus stach der Wert von 82% (95%-KI: 48%-98%) für den erfolgten IS6110-Nachweis der Gewebe mit für die Tuberkulose typischem Veränderungsmuster (siehe Tabelle 9 und Abbildung 23).

**Tabelle 9: Tuberkulosenachweis bei unterschiedlich veränderten Proben.** In Klammern: die exakten Grenzen der Konfidenzintervalle bei 95% Signifikanzniveau

	Gesamtanzahl	IS6110 pos.	Prozent
Tuberkulose-typisch	11	9	82% (48% - 98%)
unspezifisch	37	9	24% (12% - 41%)
unauffällig bzgl. Tuberkulose	112	27	24% (17% - 33%)
Gesamt	160	45	28 % (21% - 36%)



**Abbildung 23: Nachweis von IS6110 im Gesamtkollektiv, in Tuberkulose-typisch verändertem Gewebe, in unspezifisch verändertem und unauffälligem Gewebe.** Darstellung in Prozent mit Angabe der exakten Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls

## 2. TbD1

Insgesamt wurden 43 der 160 Proben (27%; 95%-KI: 20%-34%) auf die in Kapitel B.d.5. beschriebenen Mutationen und Deletionen untersucht. Bei insgesamt 37 (86%; 95%-KI: 72%-95%) konnte mindestens eine der beiden nachgewiesen werden.

14 der 43 getesteten Proben (33%; 95%-KI: 19%-49%) zeigten Ergebnisse für die TbD1-Region. Bei 8 der 14 Proben (57%; 95%-KI: 29%-82%) war TbD1 nachzuweisen. Bei 6 der 14 Proben (43%; 95%-KI: 18%-71%), die bereits mittels etablierter Verfahren (IS6110-Methode und Spoligotyping) eindeutig als *M. tuberculosis* typisiert waren, war diese Sequenz deletiert. Die Proben mit deletiertem Genabschnitt TbD1, stammten ausschließlich aus dem Neuen Reich, also aus der Zeit zwischen 1550 und 332 v. Chr. (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Positiver TbD1-Nachweis im Kollektiv**

	Gesamtanzahl	TbD1 int	TbD1 fla
prä-/frühdynastische Zeit	4	2	0
Mittleres Reich	11	4	0
Neues Reich bis Spätzeit	28	2	6
Gesamt	43	8	6

### 3. RD9

Erkenntnisse für diese Region ergaben sich bei 9 der 43 Proben (21%; 95%-KI: 10%-36%). Bei insgesamt 6/43 (14%; 95%-KI: 5%-28%) war RD9 präsent. Die zugehörigen Erreger waren also *M. tuberculosis* zugehörig.

RD9 fla wurde bei drei Proben des Grabes „M“ unter TT196 aus dem Mittleren Reich (2119 bis 1794/1793 v. Chr.) amplifiziert. Dies bedeutet, dass RD9 bei diesen drei Proben deletiert war. Eine Abspaltung der RD9-deletierten Erreger *M. africanum*, *M. bovis* und *M. microti* muss somit spätestens während des Mittleren Reichs stattgefunden haben (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Nachweis von RD9 im Probengut**

	Gesamtzahl	RD9 int	RD9 fla
prä-/frühdynastische Zeit	4	1	0
Mittleres Reich	11	1	3
Neues Reich bis Spätzeit	28	4	0
Gesamt	43	6	3

### 4. *mtp40*

Insgesamt wurde bei einer Probe (DAN K95.1-21) aus der Phase vom Mittleren Reich bis zur Spätzeit (2119 bis 332 v. Chr.) von 22 untersuchten Proben (5%; 95%-KI: 0%-23%) positiv auf *mtp40* getestet. Das aufgefundene Gen steht für eine Zugehörigkeit des Erregers zu *M. tuberculosis*, *M. africanum* oder *M. canetti*.

### 5. *oxyR*

Bei 8 der 43 Proben (19%; 95%-KI: 8%-33%) war das *oxyR*-Gen aufzufinden. Die positiven Proben stammten aus einer Zeitspanne von dem Mittleren Reich bis zur Spätzeit (2119 bis

332 v. Chr.). Es war ausschließlich die ursprüngliche Form, also mit Guanin an Position 285, aufzufinden. Adenin, das in *M. bovis* an dieser Position vorkommt, wurde in keiner Probe nachgewiesen.

## 6. *pncA*

7 von 43 Proben (16%; 95%-KI: 7%-31%) fielen für Cytosin an Position 169 von *pncA* positiv aus. Auch sie stammen aus der Phase des Mittleren Reichs bis zur Spätzeit (2119 bis 332 v. Chr.). Dies ist die Ursprungsform des Gens. Keine Probe enthielt an besagter Stelle Guanin. Dieses Ergebnis bedeutet, dass keine modernen Formen des *M. bovis* im untersuchten antiken Material vorhanden waren.

## 7. *katG*

*KatG* war ausschließlich als CGG-Sequenz im Kodon 463 bei 5 Proben des Neuen Reichs bis zur Spätzeit (1550 bis 332 v. Chr.) enthalten. Das entspricht 18% der 28 Proben (95%-KI: 6%-37%) aus Gräbern dieser Zeit und 12% aller 43 getesteten Proben (95%-KI: 4%-25%). Dieses steht in der genetischen Einteilung nach Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup> für die Gruppen 2 und 3, also für das moderne *M. tuberculosis*. Diese Erreger des Neuen Reichs bis zur Spätzeit waren also als *M. tuberculosis* der Gruppen 2 oder 3 zu definieren.

## 8. *gyrA*

*GyrA* wurde bei insgesamt 26 von 43 Proben (60%; 95%-KI: 44%-75%), verteilt über alle Epochen, aufgefunden (siehe Katalog). In Form von ACC an Kodon 95 - der ursprünglichen Form - war es bei 13 der Proben (30%; 95%-KI: 17%-46%) nachweisbar. Die moderne Form, also AGC, die von Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup> als Gruppe 3 definiert wurde, war in keiner der Proben aufzufinden.

### c. Spoligotyping

Die 45 für IS6110 positiven Proben wurden zusätzlich mit Hilfe der Technik des „Spoligotyping“ untersucht. Davon konnten bei 16 Proben (36%; 95%-KI: 22%-51%) rekonstruierbare Muster ermittelt werden. Die Muster wurden danach mit der von Filliol *et al.*<sup>103</sup> angelegten Datenbank abgeglichen, um so die zugehörigen Stämme zu finden. Einfache Erkennungsmerkmale sind die Deletionen von DRs der Positionen 39 bis 43 bei *M. bovis*, der Positionen 33 bis 36 bei *M. tuberculosis* und ein Verlust des Spacers 39 bei *M. africanum*. Bei diesem Erreger gibt es häufig auch Deletionen an Position 8 und 9. Findet man also ein Muster, in dem die Position 39 frei ist und die meisten der Spacer 33 bis 36 und 40 bis 43 vorhanden sind, darf man von der Präsenz von *M. africanum* ausgehen.<sup>151</sup>

Die untersuchten Stämme gehörten demnach in 3 von 16 Proben (19%; 95%-KI: 4%-46%) zu *M. africanum* und in 13 von 16 Proben (81%; 95%-KI: 54%-96%) zu *M. tuberculosis*. *M. bovis* war in keiner Probe zu finden (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Schema der Ergebnisse in der Spoligotyping-Untersuchung. tb.: tuberculosis; bov.: bovis

Probe	Spoligotyping-Muster	Erreger
DEN T-NW	■□□■□■■□□■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
DEN T-00	□□□■□■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 196-M5	□■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. africanum</i>
TT 196-MW7	■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. africanum</i>
TT 196-MW18	■□■■□■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. africanum</i>
TT 196-78	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
DAN 93.11	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 85-2-35	■□■■□■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 95-2	□■□□□□□□□■□■□■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 95-PC122	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 95-PC169	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 95-PC40	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 453-PC9	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 183-20	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
TT 453- PC14	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
DAN 95.1-1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□	<i>M. tuberculosis</i>
M. tb H37Rv	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□	<i>M. tb.</i> -Kontrolle
M. bov BCG P3	■□■■■■■■□□■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□	<i>M. bov.</i> -Kontrolle

#### d. Nachweis humaner und mykobakterieller DNA

Wie in Kapitel B.d. beschrieben, wurde das Kollektiv auf unterschiedliche Sequenzen humaner und mykobakterieller DNA untersucht. Bei insgesamt 95 der 160 betrachteten Proben war die DNA-Amplifikation mittels PCR mindestens einer der untersuchten humanen beziehungsweise mykobakteriellen Sequenzen erfolgreich. Somit ist es gelungen, insgesamt bei einem Prozentsatz von 59% (95%-KI: 51%-67%) aDNA zu detektieren.

Bei 7 Proben aus der prä- und fröhdynastischen Zeit, also bei 54% (95%-KI: 25%-81%) der Proben dieses über 4500 Jahre alten Kollektivs war noch amplifizierbare DNA enthalten (siehe Tabelle 13). In zwei der sieben Proben waren zwar mykobakterielle, aber keine humanen Sequenzen nachzuweisen (Proben DEN T-NW, DEN T-OO).

**Tabelle 13: Kumulierter erfolgreicher DNA-Nachweis für humane und mykobakterielle DNA.** In Klammern: die exakten Grenzen der Konfidenzintervalle bei 95% Signifikanzniveau

	Gesamtanzahl	positiver Nachweis	Prozentsatz
prä-/fröhdynastische Zeit	13	7	54% (25% - 81%)
Mittleres Reich	68	35	51% (39% - 64%)
Neues Reich bis Spätzeit	79	53	67% (56% - 77%)
Gesamt	160	95	59% (51% - 67%)

## D. Diskussion

Die Tuberkulose ist weltweit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten überhaupt. Dennoch gibt es noch sehr viele Unklarheiten darüber, wie lange es den Erreger der Krankheit in dieser Form bereits gibt und wie er sich entwickelt hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand antiker Proben zunächst die Nachweisbarkeit humaner und mykobakterieller DNA in sehr altem Material untersucht. Im Anschluss wurden die Erreger weiter typisiert und auf eine Korrelation zu der von Brosch *et. al.*<sup>66</sup> postulierten Evolutionstheorie für den *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex überprüft.

Hierfür wurden 160 Proben altägyptischer Mumien aus einer Spanne von der prädynastischen bis zur Spätzeit auf Ancient DNA untersucht und näher definiert. Zuvor wurden die Mumien bezüglich der Herkunftszeit, dem Ausmaß pathologischer Veränderungen, des Geschlechts und des Alters definiert. Die Geschlechtsdiagnostik wurde mittels PCR-Nachweis von *SRY* und Amelogenin gestützt. Zudem wurde der für Eukaryonten spezifische Marker  $\beta$ -Aktin nachgewiesen.

Im Anschluss wurden die Proben mittels PCR auf die für die Tuberkulosedagnostik etablierte Region *IS6110* untersucht. Die für *IS6110* positiven Proben wurden mittels Spoligotyping typisiert.

Eine weitere Charakterisierung erfolgte mittels Untersuchung auf Punktmutationen und Deletionen, die von Brosch *et al.*<sup>66</sup> und Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup> beschrieben worden sind. Der Nachweis dieser Veränderungen im mykobakteriellen Genom hat zur Aufstellung einer genetischen Gruppeneinteilung und später eines gesamten Stammbaums dieser Erreger geführt. Anhand des hier untersuchten Probenkollektivs sollten diese Theorien überprüft werden.

### a. Nachweis von aDNA

Ein häufiges Problem beim erfolgreichen Nachweis von aDNA sind die klimatischen Bedingungen, bei denen das untersuchte Material gelagert wurde.<sup>62</sup> Dabei ist generell der Zustand der Mumien und daraus folgend der enthaltenen DNA entscheidend.

Die hier untersuchten Mumien waren in den Gräbern durch das Klima dieser Umgebung sehr gut erhalten. In Wüstengebieten ist die Luftfeuchtigkeit gering. Zudem liegen die Gräber größtenteils unterirdisch. Dadurch ist die Umgebungstemperatur äußerst stabil und liegt zudem weit niedriger als die Außentemperaturen in Wüstengebieten. Somit sind die erforderlichen Voraussetzungen für eine gute Konservierung des Gewebes erfüllt. Allerdings ist zu erwähnen, dass die Gräber in der Vergangenheit häufig schon von Plünderern überfallen worden sind. Daher waren viele Mumien zerstört und nur noch einzelne Knochenteile aufzufinden. Für diese Arbeit wurden ausschließlich antike Proben verwendet. Einige derer, die bearbeitet wurden, sind über 5000 Jahre alt. Es ist also legitim, die Frage zu stellen, ob bei derart altem Material befriedigende Ergebnisse zu erlangen sind.<sup>152,153</sup> Nachdem Zellen zugrunde gehen, wird die vorhandene DNA aufgrund von Oxidationsprozessen zersetzt. Faktoren wie die Lagerungstemperatur, Luftfeuchtigkeit, pH-Wert, Flora und vor Allem die Anzahl der Mikroorganismen in der Umgebung beeinflussen die Geschwindigkeit dieses Zersetzungsprozesses.<sup>98,154,155</sup> Vorhandene DNA dürfte also theoretisch nach wenigen tausend Jahren nicht mehr nachweisbar sein.<sup>156</sup> In vergangenen Jahren arbeiteten viele Forschungsgruppen, wie beispielsweise um Höss<sup>157</sup>, Poinar<sup>158</sup>, Colson<sup>159</sup> und Hofreiter<sup>150</sup>, mit Material unterschiedlichen Alters. Dabei ist es gelungen, selbst bei bis zu 100.000 Jahre alten Proben sequenzierbare DNA finden.<sup>160</sup>

Die DNA-Extraktion orientierte sich an der von Höss und Pääbo<sup>96</sup> beschriebenen Methode. Diese wurde von Hummel mit anderen beschriebenen Methoden im Laborversuch verglichen und als eine verlässliche und effektive Methode beschrieben.<sup>62</sup> Bei der Bearbeitung mittels PCR-Technik wurden nach Möglichkeit Sequenzen von nicht mehr als 200-300 Basenpaaren verwendet. Bei längeren Ketten wächst die Wahrscheinlichkeit für Abbrüche innerhalb des DNA-Stranges und sinkt somit für den jeweiligen DNA-Nachweis.<sup>161,162</sup> Es ist von einer indirekten Proportionalität zwischen der Länge der PCR-Zielregion und der Wahrscheinlichkeit eines DNA-Nachweises auszugehen.<sup>163,164,165</sup> Aus diesem Grund ist es leichter mit Sequenzen zu arbeiten, die mehr als einmal im Genom vorkommen. Die Überprüfung der Proben des hier untersuchten Kollektivs auf die von Brosch *et al.*<sup>66</sup>

postulierte Evolutionstheorie war jedoch auf die Arbeit mit den von der Forschungsgruppe beschriebenen Single-Copy Genen *gyrA*, *katG*, *oxyR* und *pncA* angewiesen.<sup>66</sup> Sie waren häufig nicht nachweisbar. Die Sensitivität der PCR für aDNA ist bei diesen Genen also recht gering.

Durch die bei der Mumifikation verwendeten Chemikalien, wie Bitumen und Konservierungssalze, und die Lagerungsbedingungen geht vorhandene DNA Komplexbindungen ein. Hierdurch werden die Reaktionsabläufe während der PCR inhibiert und es können keine Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden. Häufig erkennt man zusätzlich gelöste Teilchen bereits an der gelblich-braunen Farbe des Reaktionsgemisches.<sup>166,167</sup> Um an dieser Stelle entgegen zu wirken, wurde bei der DNA-Gewinnung besonders sorgfältig gearbeitet und der Diatomeen-Methode der Vorzug gegeben.

In Kombination mit GuSCN gehen DNA-Stränge mit Diatomeenerde oder Silicat-beziehungsweise Glaspartikeln Bindungen ein. Für kleine Mengen von DNA ist Silicat das Reagens der Wahl. Der DNA-Strang ist etwa 200 - 1.000 mal größer als ein Silicatpartikel und legt sich hierbei um letzteres. Bei größeren Mengen an DNA, werden die Bindungen durch das große Volumen der Komplexe zu fest und DNA lässt sich nicht wieder im Wasser auflösen. Daher greift man hier auf Diatomeenerde zurück. Diatome sind mit Algen verwandte Einzeller, deren Zellwände fast ausschließlich aus Kieselsäure bestehen. Diese ist um einiges größer als die ursprünglich genutzten Silicatpartikel. Daher sind Bindungskomplexe mit den Nukleinsäuren nicht ganz so fest. Folglich sind die Scherungskräfte, die beim Mischen entstehen, ausreichend, um die Bindungen zu lösen. So wird die Ablösung der DNA von der Diatomeenerde sichergestellt und es ist ausreichend DNA in der flüssigen Phase vorhanden, um weitere Reaktionsschritte einleiten zu können.<sup>168</sup>

Typ I-Kollagen wirkt als starker Inhibitor in der PCR. Es ist in hohem Maße im organischen Anteil von Knochen und somit im hier bearbeiteten Knochenpulver enthalten, jedoch in Wasser schlecht löslich. So fiel die Entscheidung auf ein Extraktionsprotokoll, dass nach der Zugabe von EDTA nur noch mit der wässrigen Lösung der Knochenpulversuspension arbeitet, um diesen Störfaktor zu eliminieren.<sup>169,170</sup> Waren weiterhin keine Extraktionsprodukte nachweisbar, wurde mit Alkohol gereinigt oder eine Nachextraktion durchgeführt.<sup>62</sup>

Bei den Untersuchungen für diese Arbeit konnte beobachtet werden, dass DNA sowohl mittels PCR-Technik, als auch beim Spoligotyping in jüngerem Probenmaterial nicht entschieden besser nachzuweisen war (siehe Tabellen 12 und 13).

Die Arbeit auf Nukleinsäureebene ist demnach auch für antikes Material äußerst sensitiv. Nicht eindeutige Ergebnisse wurden dennoch immer mit großer Vorsicht verwertet und im Zweifelsfall als negativ eingestuft, um eine etwaige Verfälschung der Daten zu vermeiden.

## **b. DNA-Amplifikation**

### **1. Humane Gene und Nachweis von IS6110**

Humane DNA in Form von  $\beta$ -Aktin und der Geschlechtsmarker *SRY* und Amelogenin war bei 80 von 160 Proben (50%; 95%-KI: 42%-58%) nachweisbar.

Als Eingangstest für humane DNA wurde das Gen für  $\beta$ -Aktin verwendet, da es für den primären Nachweis eukaryotischer DNA sensitiv und spezifisch ist.<sup>171,172</sup> In dem hier besprochenen Kollektiv war es bei 71 der 160 Proben (44%; 95%-KI: 37%-52%) nachweisbar. Mehrere Faktoren führen zu diesem recht geringen Anteil. Das Amplifikationsprodukt von  $\beta$ -Aktin hat eine Länge von 202 bp. Bei einer Kettenlänge von über 200 bp, steigt die Wahrscheinlichkeit für Strangabbrüche aufgrund degenerativer Prozesse rapide an.<sup>161,162,163</sup> Dies kommt bei antiken Proben besonders stark zum Tragen. Zudem handelt es sich um ein eukaryotisches Gen. Als solches ist es Oxidationsprozessen im Vergleich zu mykobakterieller DNA weitgehend schutzlos ausgesetzt, da letztere von der mykobakteriellen Schleimkapsel umgeben ist.

Insgesamt 114 der 160 Proben (71%; 95%-KI: 64%-78%) konnten trotz Ausschöpfung der verfügbaren Möglichkeiten, also mittels Inspektion nach anthropologischen Kriterien und PCR-Diagnostik, keinem Geschlecht zugeteilt werden. Das lässt sich darauf zurückführen, dass die Mumien oft beschädigt und häufig nicht mehr vollständig waren. Zumeist wurden frei liegende Knochen untersucht, die keiner bestimmten Mumie zugeordnet werden konnten. In diesen Fällen war es nicht möglich eine Einteilung nach anthropologischen Kriterien vorzunehmen. Die Bestimmung erfolgte hierbei durch Nachweis der Gene *SRY* und Amelogenin mittels PCR. Sie gelten als sehr verlässliche Parameter.<sup>173,174,175,176</sup> Wie bei anderen Sequenzen ist auch bei diesen Genen der Nachweis bei sehr alten Proben nicht immer erfolgreich. Ihre hohe Spezifität empfiehlt jedoch die weitere Verwendung dieser Gene auch für antike Proben.

Die eindeutigen Ergebnisse der genetischen Geschlechtsbestimmung wurden zur Überprüfung und Bestätigung der anthropologischen Einteilung der gefundenen Mumienteile genutzt. 33 Proben wurden nach morphologischen Kriterien einem Geschlecht zugeteilt. Diese wurden zusätzlich genetisch untersucht. Bei 3 Proben ist ein Gennachweis fehlgeschlagen (Proben DAN M2, DAN M3 und DEN Zw). Bei 29 der 30 Proben (97%; 95%-KI: 83%-100%) war eine klare Übereinstimmung von morphologischem und genetischem Geschlecht zu verzeichnen. Bei der verbleibenden Probe stimmte das genetische und morphologische

Geschlecht nicht überein. Dies ist entweder auf eine irreführende Morphologie der Knochenfragmente oder eine fehlerhafte Amplifikation zurückzuführen. Durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen im betreffenden Strangbereich könnte die Erkennungssequenz der Primer verändert und so nicht amplifizierbar sein. Für Amelogenin wurden einige Fälle beschrieben, in denen die X-chromosomale Deletion von 6 bp auch auf dem Y-Chromosom vorhanden war und männliche Individuen so fälschlicherweise als weiblich eingestuft wurden.<sup>66</sup> Häufiger ist bei alter DNA jedoch der Effekt des „Allelic Dropout“, bei dem es aufgrund geringer Molekülzahl zum Ausfall des Amplifikationsproduktes eines oder beider Chromosomen, kommt.<sup>62,177</sup> Um diesem Problem zu entgehen, basierte die Geschlechtsdiagnostik in dieser Arbeit auf zwei Genloci: *SRY* und das Gen für Amelogenin.

Diese hohe Übereinstimmung zwischen morphologischer und molekularbiologischer Bestimmung bedeutet, dass die verwendeten morphologischen Kriterien zur anthropologischen Geschlechterzuteilung sehr verlässlich sind und für zukünftige Ausgrabungskampagnen und weitere Untersuchungen gut genutzt werden können. Auch von der Arbeitsgruppe Hummel *et al.*<sup>178</sup> wurde die Übereinstimmung morphologischer Kriterien mit der molekularen Geschlechtsbestimmung geprüft. Sie kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass mit entsprechender Arbeitserfahrung unter Verwendung der gängigen Kriterien eine sehr verlässliche Aussage über das Geschlecht eines erwachsenen Individuums gemacht werden könne. Aus den übereinstimmenden Ergebnissen für die Genotypisierung und den morphologischen Befund ist auch zu schließen, dass keine Kontamination des Arbeitsmaterials stattgefunden hat. Der genutzte methodische Ansatz ist also der Arbeit mit aDNA angemessen.

Mykobakterielle DNA wurde mit Hilfe der „Insertion like Sequence“ *IS6110* detektiert. Bei 45 der 160 untersuchten Proben (28%; 95%-KI: 21%-36%) war *IS6110* nachzuweisen. Unter Zuhilfenahme eines 95%-Konfidenzintervalls lagen die Wertegrenzen für Tuberkulose-typisch verändertes Gewebe (82%; 95%-KI: 48%-98%) weit über dem von unauffälligem (24%; 95%-KI: 12%-41%) und unspezifisch (24%; 95%-KI: 17%-33%) verändertem (siehe Abbildung 23). Bei Geweben, die also Auffälligkeiten zeigten, die für eine klinische Tuberkulose typisch sind, waren mykobakterielle Gene auffällig häufiger nachweisbar als bei Geweben, die keine oder nur unspezifische Pathologien zeigten.

Dieses Ergebnis bestätigt die besprochenen Arbeitstechniken auf dreierlei Weise: von vielen Kritikern der Arbeit mit aDNA wird verlautbart, dass der positive Nachweis von

mykobakterieller DNA lediglich auf externe Kontaminationen zurückzuführen sei. Träfe diese These zu, müsste sich der positive Nachweis gleichmäßig auf das Kollektiv verteilen. Die hier präsentierten Daten suggerieren den gegenteiligen Schluss: in pathognomonisch verändertem Gewebe fällt der Nachweis entschieden häufiger positiv aus. Hingegen unterscheiden sich die Zahlen für unauffälliges und unspezifisch verändertes Gewebe nicht merklich (siehe Abbildung 23). Die ungleichmäßige Verteilung von Bakterien des *tuberculosis*-Komplexes in Geweben mit unterschiedlich starker Veränderung, deckt sich mit Angaben aus Arbeiten anderer Forschungsgruppen, die Mumien in Litauen, England, Ungarn und China untersucht haben.<sup>89,179,180,181</sup> Dieses Ergebnis erhärtet den Verdacht, dass in Individuen mit makroskopischen Veränderungen im Sinne einer Tuberkulose tatsächlich wesentlich häufiger humanpathogene Mykobakterien nachzuweisen seien. Im Gegenzug bestätigt dies auch Blickdiagnosen bei Ausgrabungen.

Beim altersbezogenen Tuberkulosebefall wurden für adulte und für immature Individuen Werte gefunden, die sich nicht wesentlich voneinander und von den Werten des Gesamtkollektivs unterscheiden (siehe Abbildung 21). Auch sieht man keine Unterschiede im Befall männlicher und weiblicher Individuen (siehe Abbildung 22). Nachdem bislang in der Literatur keine Unterschiede in der Infektionswahrscheinlichkeit in Bezug auf Geschlecht oder Alter erwähnt ist, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Bei den Untersuchungen wurde bei 28% (95%-KI: 21%-36%) des Gesamtkollektivs ein Nachweis für IS6110 erzielt. Bei den Geweben mit für Tuberkulose typischen Veränderungen war IS6110 in 82% (95%-KI: 48%-98%) der Fälle nachzuweisen (siehe Tabelle 9 und Abbildung 23). Dem hohen Anteil der Durchseuchung bei Individuen mit charakteristischen morphologischen Veränderungen steht die Zahl der für IS6110 positiven Proben bei unauffälligen und unspezifisch veränderten Geweben gegenüber. 9 von 37 unspezifisch veränderten Proben (24%; 95%-KI: 12%-41%) beziehungsweise 27 von unauffälligen 112 Proben (24%; 95%-KI: 17%-33%) enthielten detektierbare IS6110 (siehe Tabelle 9 und Abbildung 23). Da hier keine Differenz zu verzeichnen ist, findet sich auch kein Anhalt dafür, dass bei unspezifisch veränderten Geweben gegenüber unauffälligen Proben häufiger Mykobakterien aufzufinden seien.

Der Nachweiserfolg für IS6110 verteilte sich weitgehend gleichmäßig auf die unterschiedlichen Epochen (21% bis 31%) und zeigte im besprochenen Probenkollektiv keine klare Korrelation zum Alter der Probe (siehe Tabelle 8 und Abbildung 20). Dass die Infektion

bei einem derart großen Anteil molekularbiologisch bestätigt worden ist, spricht für eine sehr gute Haltbarkeit der mykobakteriellen DNA.

Mykobakterielle DNA ist aufgrund der Schleimkapsel des Erregers weitaus besser gegen schädliche Einflüsse von außen geschützt als humane DNA. Dazu kommt die größere DNA-Stabilität aufgrund des hohen Anteils an Guanin und Cytosin und spezielle prokaryotische Mechanismen zum besseren Schutz der DNA, wie die oben genannte Biokristallisation.<sup>43,49</sup> Darüber hinaus finden sich im Kontrast zu anderen Bakterien trotz derselben Rate an Spontanmutationen, vergleichsweise weniger Punktmutationen im mykobakteriellen Genom. Zur Diagnostik werden größtenteils Deletionsnachweise verwendet, die für punktuelle DNA-Veränderungen weniger anfällig sind.<sup>42</sup> Mumien vom amerikanischen Kontinent, die in die Zeit vor der Kolonialisierung datiert wurden,<sup>182,183</sup> sowie Mumien aus dem Mittleren Osten<sup>184</sup> und aus Europa<sup>89,180,185,186,187,188</sup> wurden von anderen Arbeitsgruppen untersucht und zeigten eine ebenso gute Nachweisbarkeit der mykobakteriellen DNA. Die Arbeitsgruppe von Matheson<sup>189</sup> bestätigte zudem, dass der Nachweis humaner DNA im Vergleich zu mykobakterieller DNA in identischen Gewebeproben wesentlich seltener positiv ausfällt. Dies ist auch bei den hier besprochenen Ergebnissen erkennbar.

## 2. Genetische Gruppeneinteilung und Evolutionsstammbaum

Mit Hilfe der beschriebenen Punktmutationen wurde bei einem Teil der Proben die von Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup> erstellte Gruppeneinteilung vorgenommen. Somit können moderne *M. tuberculosis*-Stämme von anderen Erregern unterschieden werden.

**Tabelle 14: Einteilung in genetische Gruppen nach Sreevatsan (vgl. Abbildungen 7 und 8)**

Zeitfenster	Grab	Probename	Genetische Gruppe
Prädynastisch/Frühzeit	Abydos/Grab Den	DEN T-NW	1,2
	Abydos/U-Friedhof	U 559	1,2
Mittleres Reich	THEBEN/TT 196	TT 196/M5	1,2
	THEBEN/TT 196	TT 196/MW1	1,2
	THEBEN/TT 196	TT 196/MW10	1,2
	THEBEN/TT 196	TT 196/MW18	1,2
	THEBEN/TT 196	TT 196-2/78	1,2
	THEBEN/TT 196	TT-M163	1,2
Neues Reich/Spätzeit	DAN K95.1	DAN 18	1,2
	DAN K93.11	DAN 50(KM)	1,2

Zeitfenster	Grab	Probenname	Genetische Gruppe
	DAN K93.11	DAN 74	1,2
	THEBEN/TT 84	TT 84-70	1,2
	THEBEN/TT 183	TT 183-20	2
	THEBEN/TT 453	TT 453-14	2,3
	THEBEN/TT 453	TT 453-9	2,3
	THEBEN/TT 95	TT 95-122	2,3

Bei 16 der 45 für IS6110 positiven Proben (36%; 95%-KI: 22%-51%) ist es gelungen eine Gruppeneinteilung oder zumindest eine Einschränkung der Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes vorzunehmen (siehe Tabelle 14). In der Abgleichung mit den aus dem Spoligotyping erhaltenen Daten, fand man einen Anteil von *M. tuberculosis* von 81% (95%-KI: 54%-96%). Die Proben der prä- und fröhdynastischen Zeit und des Mittleren Reiches waren in die Gruppen 1 und 2 einzuordnen. Alle Proben, die eindeutig den genetischen Gruppen 2 oder 3 zuzuordnen waren, stammten aus den Gräbern des Neuen Reichs bis zur Spätzeit (1550 bis 332 v. Chr.). So kann man die Entstehungszeit des modernen Tuberkuloseerregers spätestens auf das Neue Reich datieren (siehe Abbildungen 7 und 8). Die anderen Proben enthielten ausschließlich *M. africanum*.

Die von Brosch *et al.*<sup>66</sup> postulierte Evolutionstheorie widerspricht der Lehrmeinung, *M. tuberculosis* habe sich bei der Domestikation von Vieh aus *M. bovis* entwickelt.<sup>190,191</sup> Sie belegt mit den auch für diese Arbeit verwendeten Mutationsanalysen, dass sich *M. bovis* und *M. tuberculosis* aus einem gemeinsamen Vorgänger entwickelt haben muss (siehe Abbildung 8).

Auch in dem hier untersuchten Kollektiv war *M. bovis* in keiner Probe nachzuweisen.

Es wird nun angenommen, dass es eine parallele Entwicklung der beiden Erreger gab. Das älteste Individuum, bei dem *M. bovis* nachgewiesen wurde, stammt aus Sibirien und ist vor etwa 2.000 Jahren verstorben.<sup>192</sup> Bislang untersuchte, ältere Materialien enthielten jedoch nur Erreger, die im Evolutionsstammbaum proximaler angesiedelt sind. Die hier ermittelten Daten stützen so die Theorie, dass *M. tuberculosis* nicht aus *M. bovis* entstanden ist. Aufgrund der auffallend geringen allelischen Variation geht man von einer evolutionären Flaschenhals-Situation vor etwa 15.000-20.000 Jahren aus, in der sich der heute bekannte *M. tuberculosis*-Erreger entwickelt hat.<sup>42,193</sup> Nachdem bereits bei den Untersuchungen innerhalb des hier betrachteten Kollektivs, das Individuen einer Zeitspanne von nur rund 3500 Jahren beinhaltet,

phylogenetische Entwicklungstendenzen abzulesen waren, ist zu vermuten, dass *M. tuberculosis* sogar noch jünger ist.

Weiterhin wurden die Proben auf die Theorie von Brosch *et al.*<sup>66</sup> untersucht. Anhand mehrerer Punktmutationen und Deletionen im Genom der Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes wurde von ihnen ein Stammbaum dieser Erreger erstellt. Insgesamt wurden 43 der für IS6110 positiven Proben auf besagte Mutationen und Deletionen untersucht. Bei 37 (86%; 95%-KI: 72%-95%) der Proben war mindestens einer der Genloci nachzuweisen.

Die Deletion von TbD1 markiert die Abspaltung der modernen *M. tuberculosis*-Stämme von der ursprünglichen Form. Bei 14 der 43 Proben (33%; 95%-KI: 19%-49%) konnten Aussagen über TbD1 gemacht werden (siehe Tabelle 10). Der Genabschnitt war bei 6 der 14 in Kapitel C.b.2. besprochenen Proben (43%; 95%-KI: 18%-71%) deletiert, in denen IS6110 nachgewiesen wurde. Nach Brosch *et al.*<sup>66</sup> unterscheidet diese Deletion zwischen modernen und ursprünglichen *M. tuberculosis*-Stämmen. Folglich gehören die Erreger dieser Proben den modernen *M. tuberculosis*-Stämmen an. Alle stammten aus dem Neuen Reich bis zur Spätzeit (Proben TT84-70, TT85-2-21, TT95-40, TT95-122, TT183-20, TT453-14).

RD9 ist eine weitere Deletion, die einen wichtigen Punkt im Stammbaum der Erreger des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes darstellt. Diese Deletion markiert die Abspaltung der Erreger *M. africanum*, *M. microti* und *M. bovis*. Ist diese Region anwesend, kann man von der Anwesenheit von *M. tuberculosis* ausgehen. Drei der Proben aus dem Mittleren Reich (2119 bis 1794/1793 v. Chr.) wiesen eine Deletion dieser Region auf (Proben TT196/MW1, TT196/MW7 und TT196/MW10). Diese Deletion steht für eine Anwesenheit von *M. africanum*. RD9-assoziierte Regionen waren in neun Proben nachweisbar (Proben U559, TT196/MW1, TT196/MW7, TT196/MW10 und TT196/MW18, TT85-2-35, TT95-122, TT183-20 und TT453-9). Darunter befindet sich eine Probe aus der prä- beziehungsweise frühdynastischen Zeit (Probe U559). Es zeigte sich bei den PCR-Untersuchungen als ein sehr konsistentes, sensitives und spezifisches Gen. Es ist also bei der Arbeit mit sehr alter DNA als diagnostisches Mittel gut geeignet.

*Mtp40* ist ein in *M. bovis* und *M. microti* deletiertes Gen. Es lässt also zwischen diesen Erregern und den primär humanpathogenen Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes unterscheiden. In der Forschungswelt gibt es Dispute über die Brauchbarkeit von *mtp40* in

Hinsicht auf eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Erregern, da es häufig zu fehlerhaften Ergebnissen kommt.<sup>194,195,196</sup> Bei dem hier untersuchten Kollektiv, das 160 Proben umfasst, ist es lediglich bei einer Probe (1%; 95%-KI: 0%-3%) gelungen, diesen Genlocus zu detektieren (Probe DAN 21). Hierbei handelt es sich um eine Probe aus einem Grab, das vom Neuen Reich bis zur Spätzeit belegt wurde (DAN K95.1). Wegen der gefundenen Deletion müsste diese Probe eigentlich *M. bovis* enthalten. Die etablierte Methode des Spoligotypings widerlegt jedoch diese Annahme. Das Fehlen der für *M. bovis* typischen Punktmutationen und Deletion lässt den, von den Ergebnissen des Spoligotypings gestützten, Schluss zu, dass *M. bovis* in keiner untersuchten Probe enthalten war. Laut Vera-Cabrera<sup>194</sup> gibt es eine erhöhte Rate an Transpositionen benachbarter IS6110-Elemente. Da das Gen für Phospholipase C in einer solchen Region liegt, kann durch derartige Transpositionen das so unvollständig gewordene *mtp40*-Gen nicht mehr über PCR aufgefunden werden. Es resultieren also falsch negative Ergebnisse für *mtp40*. Für groß angelegte Untersuchungen mit aDNA ist die Spezifität daher nicht ausreichend.

Die für diese Arbeit sequenzierten Regionen werden auf Punktmutationen untersucht. Da DNA bei altem Material stark beschädigt ist, ist die Sensitivität hier eingeschränkt. Dennoch liefern Sequenzanalysen dieser Genabschnitte viele wertvolle Informationen zur Bearbeitung evolutionsbiologischer Fragestellungen.

Im untersuchten Material war *M. bovis* nicht enthalten. *pncA* weist ebenfalls bei einigen Subtypen von *M. bovis* eine Punktmutation auf. Hier ist in Kodon 57 ein Basenaustausch von CAC zu GAC zu finden. Bei der PCR-Sequenzierung an Position 169 des *pncA*-Gens fand sich im hier untersuchten Kollektiv ebenfalls ausschließlich Cytosin. Die Resultate lassen daher auf eine ausreichende Spezifität des *pncA*-Gens schließen (Proben DAN 21, TT196-2/25, TT196-2/78, TT196-2/MW1, TT453-9, TT95-40, TT183-20).

Eine Punktmutation von Guanin zu Adenin an Position 285 von *oxyR* ist bei *M. bovis* vorhanden und lässt eine leichte Unterscheidung zwischen *M. bovis* und anderen Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes zu. Es wurde in 8 der 43 Proben (19%; 95%-KI: 8%-33%) nachgewiesen (Proben TT196/M5, TT196/MW7, TT196-2/78, DAN 1 (PC21), DAN21, TT95-40, TT95-122, TT453-9). Allerdings wurde an dieser Position ausschließlich Guanin aufgefunden. Auch dieses Ergebnis spricht gegen *M. bovis*.

Das Fehlen von *M. bovis* in diesem Materialpool von 160 unterschiedlichen Proben, die aus einer Zeitspanne von etwa drei Jahrtausenden stammen, unterstützt die Theorie Broschs<sup>66</sup>,

dass *M. tuberculosis* nicht, wie lange Lehrmeinung war, aus *M. bovis* entstanden ist, sondern dass vielmehr Deletionen, die zu einem späteren Zeitpunkt stattgefunden haben, zu einer Entwicklung von *M. bovis* geführt haben müssen.

Diese Mutation steht bei Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup> für die Entstehung der evolutionär jüngeren *M. tuberculosis*-Formen der Gruppe 2 und 3. Dieser Fund bedeutet also, dass diese Bakterien zu den modernen *M. tuberculosis*-Erregern gehören. *katG* konnte nur in Proben des Neuen Reiches bis zur Spätzeit nachgewiesen werden (Proben DAN 18, TT95-122, TT453-14, TT453-9, TT183-20). Hierbei war ausschließlich CGG im Kodon 653 aufzufinden. Dies ist die rezenter Form und beschränkt die Proben dieses Kollektivs auf Gruppe 2 und 3 nach Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup>, also auf phylogenetisch jüngere Formen von *M. tuberculosis*.

Eine Punktmutation in *gyrA* an Kodon 95 von ACC zu AGC spaltet die modernen Stämme von *M. tuberculosis* noch einmal in phylogenetisch ältere und jüngere Stämme. Diese entsprechen den Gruppen 2 und 3 des *M. tuberculosis*-Komplexes bei Sreevatsan *et al.*<sup>42</sup>. Es wurde bei insgesamt 26 von 43 Mumien (60%; 95%-KI: 44%-75%) nachgewiesen (siehe Katalog). Aufzufinden war lediglich die ursprüngliche Form des Kodons. Eine klare Zuteilung zu der Gruppe 3, und damit eine erste Datierung für die Entstehung dieser, musste also ausbleiben. Allerdings gestaltete sich die Arbeit mit diesem Gen schwierig, denn von den 26 auf *gyrA* positiv getesteten Proben war mittels Sequenzierung lediglich bei der Hälfte ein eindeutiges Ergebnis bezüglich des untersuchten Kodons 95 zu ermitteln. In der Analyse durch PCR fand man mitunter unspezifische Ergebnisse für *gyrA*. Der Grund könnte in einer Fehlsequenz zwischen humaner und mykobakterieller DNA zu finden sein. Da die Sequenzierung eine sehr verlässliche Technik ist, ist es ratsam sich für belastbare Ergebnisse in der Zukunft vorrangig auf diese Methode zu stützen. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurde die Sequenzierung für gescheitert erklärt. Darin liegen die unterschiedlichen Ergebnisse für PCR und Sequenzierung begründet. Der große Unterschied des erfolgreichen Nachweises liegt bei den 28 Proben des Neuen Reiches. *gyrA* konnte dort bei 18 Proben (64%; 95%-KI: 44%-81%) amplifiziert werden, jedoch wurde nur bei 6 von ihnen eine Sequenzierung mit eindeutigem Ergebnis erzielt.

Bei der Arbeit anderer Forschungsgruppen mit moderner DNA werden die Nachweise der auch hier behandelten mykobakteriellen Genloci als sensitiv und spezifisch bewertet.<sup>197,198</sup> Daraus ergeben sich nun Bestrebungen, diese für eine schnelle und effektive Standarddiagnostik im klinischen Alltag verfügbar zu machen.<sup>199,200</sup>

Zusammen genommen waren bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit moderne *M. tuberculosis*-Formen, also mit einer Deletion im Bereich TbD1 und der oben beschriebenen Punktmutation in *katG*, lediglich in Proben ab dem Neuen Reich zu finden. Eine Deletion der RD9-Region und somit der Erreger *M. africanum* war ausschließlich in Proben aus dem Mittleren Reich zu finden. *M. africanum* hat sich also spätestens im Mittleren Reich entwickelt. Proben aus der prä- und frühdynastischen Zeit wiesen keinerlei Deletionen und Mutationen auf. Es handelt sich also möglicherweise um phylogenetisch ältere Erreger des *M. tuberculosis*-Komplexes. Hinweise auf *M. bovis* waren in keiner der 160 Proben aufzufinden.

Mit diesen Daten ist erstmals für den geographischen Raum des alten Ägyptens eine zeitliche Abschätzung der einzelnen Schritte auf dem von Brosch *et al.*<sup>66</sup> gezeichneten Stammbaum der Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes möglich. Zudem spricht das Fehlen von *M. bovis* in sämtlichen Proben für die Theorie, dass sich *M. tuberculosis*, entgegen der gängigen Lehrmeinung, nicht aus *M. bovis* entwickelt haben kann.

### 3. Spoligotyping

Die für IS6110 positiven Proben wurden mittels Spoligotyping weiter untersucht. Mit dieser Technik fertigt man mit Hilfe zwischen „Direct Repeats“ liegender Oligonukleotide Muster an, die durch den Vergleich mit Referenzmustern Informationen zur Stammzugehörigkeit des untersuchten Erregers geben.<sup>102,103</sup> Bei 16 der 45 Proben (36%; 95%-KI: 22%-51%) konnten Muster ermittelt werden, die mit Spoligotyping-Datenbanken abgeglichen, den Erreger ermitteln ließen. 3 der 16 Proben (19%; 95%-KI: 4%-46%) wurden als *M. africanum* und 13 von 16 als *M. tuberculosis* (81%; 95%-KI: 54%-96%) identifiziert. *M. bovis* war in keiner Probe aufzufinden (siehe Tabelle 12).

Zwei Proben mit einem Nachweis von *M. tuberculosis* stammen aus der prä- bis frühdynastischen Zeit (Proben DEN T-NW und DEN T-OO). Das zugehörige Grab befindet sich in Abydos und wird Hor Den aus der ersten Dynastie zugeschrieben, der von 2939/2889 bis 2892/2842 v. Chr. herrschte. Der Bau des Grabes stammt ebenso aus der Zeit. So ist die älteste Probe mit dem Nachweis eines modernen *M. tuberculosis*-Erregers als etwa 5000 Jahre alt einzuschätzen.

Da die aufzufindenden DRs lediglich eine Länge von 36 bp haben und der Abstand untereinander zwischen 35 und 41 Basenpaaren liegt,<sup>40</sup> ist es selbst bei stärker degenerierter

DNA möglich aussagekräftige Muster zu erstellen. Hierfür sind DNA-Bruchstücke von 55-60 bp Länge ausreichend.<sup>201</sup> Laut Kremer *et al.*<sup>202</sup> sind Ergebnisse des Spoligotypings zu 100% reproduzierbar.

Auch andere Arbeitsgruppen untersuchten Mumien mithilfe des Spoligotypings. Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes wurden dort mittels Spoligotyping bei ungarischen Mumien aus dem 18. Jahrhundert,<sup>89</sup> mittelalterlichen englischen Mumien<sup>90</sup> und einem vor etwa 17500 Jahren verstorbenen Bison nachgewiesen.<sup>203</sup>

Dennoch sind die Ergebnisse vorsichtig zu verwerten, da Deletionen in der DR-Region auch immer mit dem Erhaltungszustand der DNA zusammenhängen könnten.<sup>90</sup> Um falsche Aussagen zu vermeiden, wurden stärker beschädigte Muster als nicht verwertbar eingestuft. Zusätzlich wurden die Resultate aus dem Spoligotyping mit denen der Mutationsanalysen verglichen. Dass die Erregerdiagnostik unter Verwendung von Mutationsanalysen und Spoligotyping deckungsgleich ist, wurde in mehreren Publikationen besprochen.<sup>42,204</sup> In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse des Spoligotypings mit der Mutationsanalyse bestätigt werden. Daraus ist zu folgern, dass das Spoligotyping sowohl für die Untersuchung moderner, als auch alter Proben gut geeignet ist.

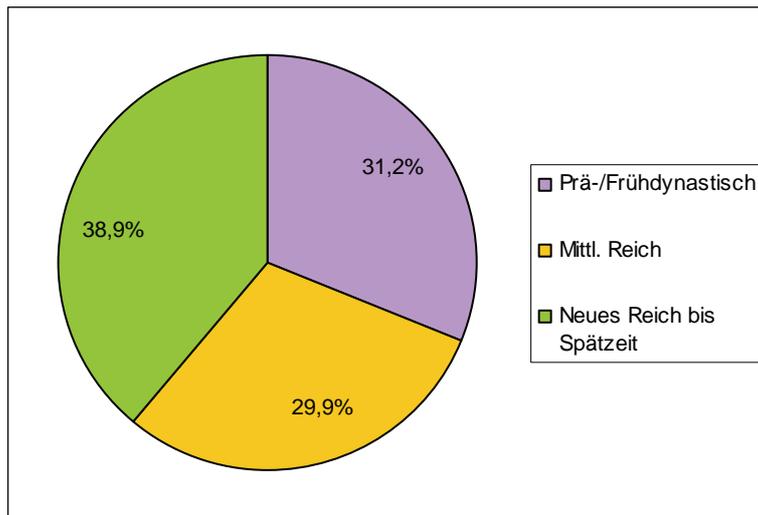
### c. Gesamtbetrachtung

In den Proben war sowohl humane, als auch mykobakterielle DNA nachweisbar. Ein Nachweis mykobakterieller beziehungsweise humaner DNA war zusammen genommen bei 95 von 160 Proben (59%; 95%-KI: 51%-67%) der untersuchten Proben erfolgreich (siehe Abbildung 24). Selbst bei den Proben der prädynastischen Zeit war in 7 von 13 Fällen (54%; 95%-KI: 25%-81%) amplifizierbare DNA nachzuweisen. Darunter befanden sich jeweils drei Proben aus den Gräbern des Den (DEN T-NW, DEN T-OO, DEN T-N H(A1)) und des Semerchet (U ZW, U 503, U559) und eine Probe aus dem Grab des Qa'a (Q-W).

Der Wert für den positiven DNA-Nachweis war bei Proben aus dem Neuen Reich und der Spätzeit unwesentlich höher als bei den anderen (siehe Abbildung 24). Dies ist erstaunlich, wenn man bedenkt, dass sich das Kollektiv aus Proben aus etwa drei Jahrtausenden zusammensetzt. Man kann also davon ausgehen, dass die hier untersuchten Mumien von dem damaligen Ägyptern durch antike chemische und physikalische Methoden in Verbindung mit den trockenen und kühlen Verhältnissen in den Gräbern sehr gut konserviert worden sind. Der Zersetzungsprozess wird außerhalb der Gräber aufgrund von Manipulation, höherer Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit stark beschleunigt. Dennoch konnte selbst bei über der Hälfte der Proben aus der prädynastischen Zeit (3800 bis 2707/2657 v. Chr.) DNA nachgewiesen werden. Es ist also gelungen, bei bis zu 5000 Jahre alten Proben DNA aufzufinden. Der Nachweis von aDNA ist in der Literatur bei sehr altem Probenmaterial bereits beschrieben, wie im Fall eines vor 17500 Jahren gestorbenen Bisons.<sup>69</sup>

Die Arbeits- und Auswertungsbedingungen dieser Untersuchung waren klar definiert und wurden streng befolgt. Man kann also etwaige Kontaminationen als Grund für den Nachweis von DNA vernachlässigen. Zudem wurde durch die Überprüfung der Übereinstimmung der genetischen zur anthropologischen Geschlechtszuteilung (97%) eine verlässliche interne Kontrolle zum Kontaminationsausschluss mitgeführt.

Nach den theoretischen Berechnungen von Lidahl *et al.*<sup>156</sup> müsste vorhandene DNA nach 5000 Jahren einen Zerstörungsgrad erreicht haben, der einen Nachweis unmöglich macht. Die hier ermittelten Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass der Erhalt von DNA nicht allein vom Alter der Proben, sondern auch vom allgemeinen Erhaltungszustand abhängig ist.



**Abbildung 24: Prozentsatz der Proben bei denen ein DNA-Nachweis möglich war**

## E. Zusammenfassung

Tuberkulose ist eine Erkrankung, die Menschen unabhängig von Alter, Geschlecht, Herkunft und Sozialstatus befällt. Es wird davon ausgegangen, dass etwa ein Drittel der Menschheit einen Erstinfekt durchlebt hat, einen Tuberkuloseerreger in sich trägt und potentiell wieder einen Ausbruch der Erkrankung erleiden könnte.

Die Erregergruppe zu diesem Krankheitsbild wird als *M. tuberculosis*-Komplex bezeichnet. Dazu zählen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* und *M. canetti*.

Bis heute gibt es weder eine zufriedenstellende Therapie, noch ein verlässliches Präventionsmittel im Sinne einer Impfung, die in allen Teilen der Welt verfügbar wären. Gerade aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, die Erregergruppe dieser Krankheit bis ins Detail zu erforschen. Hierzu gehört der Aufbau, die physikalischen und chemischen Eigenschaften, Präferenzen bei der Nährbodenbeschaffenheit, sowie klimatischen und anderen Bedingungen. Um begreifen zu können, warum es sich hier um klinisch derart bedeutende Erreger handelt, muss man Einblick in die Entwicklung dieses Bakteriums gewinnen. Entscheidende Teilbereiche sind sein evolutionärer molekularbiologischer Weg, der in dieser Arbeit mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden im alten Ägypten verfolgt wurde.

Hierfür wurden Proben von 1037 altägyptischen Mumien aus den Nekropolen in Abydos und Theben genommen. Diese wurden von der prädynastischen bis zur Spätzeit (3800 bis 332 v. Chr.), also über eine Periode von etwa 3500 Jahren, belegt. Noch in der Ausgrabungsstätte wurden die Individuen bezüglich des Geschlechts, des Alters und klinischer Auffälligkeiten untersucht. Dabei wurde zwischen Gewebsveränderungen, die typisch für eine Tuberkulose sind, unspezifischen Veränderungen und gänzlich unauffälligem Gewebe unterschieden. Für weiter führende Analysen wurden 160 Knochen und Weichteile ausgewählt.

Nach der Extraktion der in den Proben enthaltenen DNA mittels etablierten Protokolls, wurde PCR mit anschließender Sequenzierung eingesetzt. Hierzu wurden PCRs auf den humanspezifischen Marker  $\beta$ -Aktin und die geschlechtsspezifischen Marker Amelogenin und *SRY* durchgeführt. Insgesamt war bei 50% (95%-KI: 42%-58%) der Proben ein Nachweis humaner DNA in Form von mindestens einem der genannten Sequenzen möglich.

Zur Detektion von mykobakterieller DNA wurde die etablierte IS6110-Sequenz verwendet. Sie ist eine „Insertion-like Sequence“, die in bis zu 25 Kopien im Genom der Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes vorkommt. Sie fiel bei 45 der 160 Proben (28%; 95%-KI: 21%-36%) positiv aus. Bei Tuberkulose-typisch verändertem Gewebe fand sich ein signifikant erhöhter Wert von 82% für den positiven Nachweis. Ansonsten präsentierten sich die Werte für einen positiven IS6110-Nachweis bei den unterschiedlichen Ausprägungen der Gewebeveränderung, Altersgruppen, Alter der Mumie und Geschlechter innerhalb des Intervalls gleichmäßig. Kumuliert ist bei 95 der 160 Proben (59%; 95%-KI: 51%-67%), ein DNA-Nachweis gelungen. Darunter befinden sich drei Proben aus einem fast 5000 Jahre alten Königsgrab. Zudem wurden die 45 für IS6110 positiven Proben mittels Spoligotyping untersucht. Bei dieser Technik können unter Verwendung von 43 Oligonukleotiden des mykobakteriellen Genoms, die von „Direct Repeats“ getrennt sind, stammspezifische Muster von Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes erstellt werden (s. unter Kapitel B.d.3.). Bei 16 der 45 Proben (36%; 95%-KI: 22%-51%) konnten Erregermuster rekonstruiert und mit einer Internetdatenbank abgeglichen werden. 13 der 16 gefundenen Erreger gehörten zu *M. tuberculosis* (81%; 95%-KI: 54%-96%). Die restlichen Proben wurden *M. africanum* zugeordnet.

Weiterhin wurde die Evolutionstheorie zu Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes nach Brosch *et al.*<sup>66</sup> betrachtet (s. unter Kapitel A.d.2.). Diese Arbeitsgruppe hat anhand von Punktmutationen und Deletionen im Genom dieser Erreger einen neuen Stammbaum für die Gruppe erstellt (vgl. Abbildung 8). Hierfür wurden die von der Forschungsgruppe beschriebenen Mutationen und Deletionen im Probengut aufgesucht, um die gefundene Erreger-DNA einordnen zu können. Insgesamt wurden 43 Proben auf die von Brosch beschriebenen Gene geprüft. Bei 37 der Proben (86%; 95%-KI: 72%-95%) konnte mindestens einer der Genloci detektiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchung mittels Spoligotyping deckten sich mit der Stammzuteilung mithilfe der Mutations- und Deletionsanalysen. Die Proben aus dem Neuen Reich bis zur Spätzeit (1550 bis 332 v. Chr.) enthalten die moderneren Formen von *M. tuberculosis*. Diese haben sich also spätestens in dieser Epoche entwickelt. Sämtliche Proben, die *M. africanum* enthielten, stammten aus dem Mittleren Reich (2119 bis 1794/1793 v. Chr.). *M. africanum* ist somit spätestens im Mittleren Reich entstanden. Bei den Erreger aus der prä- und frühdynastischen Zeit (3800 bis 2707/2657 v. Chr.) war es noch nicht zu den beschriebenen Deletionen gekommen. Sie sind somit phylogenetisch älter.

Keine der untersuchten Proben enthielt *M. bovis*.

Somit korrelieren die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten mit der chronologischen Abfolge der Evolutionstheorie Broschs<sup>66</sup>. Diese Theorie widerspricht der Lehrmeinung, *M. tuberculosis* habe sich aufgrund der Domestikation von Vieh aus *M. bovis* entwickelt. Die Datierung konnte also die Theorie Broschs belegen und zum Setzen von Datierungsgrenzen für Mutationen und Deletionen verwendet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bearbeiteten Proben aus unterschiedlichen Epochen detaillierte Ergebnisse liefern, die Abschätzungen, bezüglich der zeitlichen Einteilung der Evolutionsschritte von Mykobakterien, der Epidemiologie von Tuberkulose im alten Ägypten und der Verwendbarkeit von alter DNA zulassen. Sie bieten hilfreiche Anhaltspunkte für die weitere Forschungsarbeit in diesen Bereichen. In den nächsten Jahren wird es so möglich sein, eine fundierte, bezüglich zeitlicher Grenzen, ausgearbeitete Evolutionstheorie für die Mykobakterien des *tuberculosis*-Komplexes zu erstellen.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reeves C, Egyptian Medicine, Shire Egyptology, Princes Risborough, 1992

Abbildung 2: Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2009.411)

Abbildung 3: Kress Y, McDonough K: Science in the Pursuit of Health; Disease Carriers; Wadsworth Center; New York State Department of Health

Abbildung 4: Brennan PJ, Crick DC (2007): The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**: 475–488

Abbildung 5: Alan M. Rosiene, Ph.D., Florida Institute of Technology, 150 W. University Blvd. Melbourne, FL 32901

Abbildung 6: The Field Museum, 1400 S. Lake Shore Dr, Chicago, IL 60605-2496, All Rights Reserved 2007

Abbildung 7: Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM (1997): Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (18): 9869-9874

Abbildung 8: Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST (2002): A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (6): 3684-3689

Abbildung 9: Dreyer G, Mitteilungen des deutschen archäologischen Intituts Abteilung Kairo, Band 43, Verlag Philipp von Zabern, Mainz 1986

Abbildung 10: Polz D, Mitteilungen des deutschen archäologischen Intituts Abteilung Kairo, Band 49, Verlag Philipp von Zabern, Mainz, 1993

Abbildung 11: Polz D, Seiler A. Die Pyramidenanlage des Königs Nub-Cheper-Re Intef in Dra' Abu el-Naga. Verlag Philipp von Zabern, Mainz, 2003

Abbildung 12: Graefe E, Die Doppelgrabanlage "M" aus dem Mittleren Reich unter TT 196 im Tal el-Asasif in Theben-West, Shaker Verlag, Aachen, 2007

Abbildung 13: Polz, D, Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts Abteilung Kairo, Band 59, Verlag Philipp von Zabern, Mainz, 2003

Abbildung 14: Photographie des Ausgrabungsmaterials (Probe TT 196-2/25)

Abbildung 15: Photographie des Ausgrabungsmaterials (Probe TT 453-15a)

Abbildung 16: Photographie des Ausgrabungsmaterials (Probe DAN 93.11-50)

Abbildung 17: Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997): Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and *tuberculosis* control. J Clin Microbiol, 35: 907-914

Abbildung 18 und 19: Photographien nach Gelelektrophorese der Proben

Abbildungen 20 bis 24: Graphische Darstellung eigener Daten

## Literaturverzeichnis

Jahreszahlen des antiken Ägypten richten sich nach Jürgen von Beckerath (1997): Chronologie des pharaonischen Ägypten: die Zeitbestimmung der ägyptischen Geschichte von der Vorzeit bis 332 v. Chr., Verlag Philipp von Zabern, Mainz

Alle im Text genannten Daten zu den besprochenen Genen sind, sofern nicht anders angegeben, der Internet-Datenbank für Nukleotide des „National Center for Biotechnology Information“ entnommen.

---

1 Major RH (1959): Classic Descriptions of Disease 3. Auflage, Charles C Thomas, Springfield

2 Oury M (1992): Die Geschichte der Tuberkulose, in: Toellner, R. (Hg.), Illustrierte Geschichte der Medizin, Erlangen, 8: 2735-2756

3 Daniel VS, Daniel TM (1999): Old Testament Biblical References to Tuberculosis. Clinical Infectious Diseases, 29: 1557–1558

4 Levitikus 26:16 and Deuteronomium 28:22, Altes Testament

5 Joachim H (1890): Papyrus Ebers – Das älteste Buch über Heilkunde, Reimer Verlag, Berlin

6 Reeves C (1992): Egyptian Medicine. Shire Egyptology, Princes Risborough

7 Hartung U (2002): Umm el-Qaab II, Importkeramik aus dem Friedhof U in Abydos (Umm el-Qaab) und die Beziehungen Ägyptens zu Vorderasien im 4. Jahrtausend v. Chr. AV 92 Verlag Philipp von Zabern, Mainz

8 Dreyer G (1998): Umm el-Qaab I, Das prädynastische Königsgrab U-j und seine frühen Schriftzeugnisse. AV 86, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

- 
- 9 Grange JM, Bishop PJ, (1862): Die Ätiologie der Tuberculose, Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März 1882 gehaltenen Vortrag. Berliner Klinische Wochenschrift, 10. April 1882, Berlin
- 10 Brock TD (1988): Robert Koch - A Life in Medicine and Bacteriology. Science Tech Publishers, Madison
- 11 Hahn H, Kaufmann S.H.E, Schulz Tf, Suerbaum S (2009): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- 12 Cole ST (2002): Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex. Microbiology, 148: 2919-2928
- 13 Daniel TM (2006): The history of tuberculosis, Respir Med, 100: 1862-1870
- 14 TB - A Global Emergency, WHO Report, WHO/TB/94.177
- 15 Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009, WHO/HTM/TB/2009.411
- 16 Topley WWC, Wilson GS, Balows A, Sussman M, Collier LH (1997): Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9. Auflage, Hodder Arnold, London
- 17 Rieder HL, Snider DE Jr, Cauthen GM (1990): Extrapulmonary tuberculosis in the United States. Am Rev Respir Dis, 141: 347-351
- 18 Chaisson RE, Schechter GF, Theuer CP, Rutherford GW, Echenberg DF, Hopewell PC (1987): Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical features, response to therapy, and survival. Am Rev Respir Dis, 136: 570-574
- 19 Shafer RW, Kim DS, Weiss JP, Quale JM (1991): Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Medicine (Baltimore), 70: 384-397

- 
- 20 Jones BE, Young SM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer F, Barnes PF (1993): Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis*, 148: 1292-1297
- 21 Grosskopf I, Ben David A, Charach G, Hochman I, Pitlik S (1994): Bone and joint tuberculosis-a 10-year review. *Isr J Med Sci*, 30: 278-283
- 22 Watts HG, Lifeso RM (1996): Tuberculosis of bones and joints. *J Bone Joint Surg Am*, 78: 288-298
- 23 Lifeso RM, Weaver P, Harder EH (1985): Tuberculous spondylitis in adults. *J Bone Joint Surg Am*, 67: 1405-1413
- 24 Golden MP, Vikram HR (2005): Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician*. 72 (9): 1761-1768
- 25 Falzon D, Infuso A, Ait-Belghiti F (2006) In the European Union, TB patients from former Soviet countries have a high risk of multidrug resistance. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10: 954-958
- 26 Toungousova OS, Bjune G, Caugant DA (2006): Epidemic of tuberculosis in the former Soviet Union: social and biological reasons. *Tuberculosis (Edinb)*, 86: 1-10
- 27 Migliori GB, Centis R (2002): Problems to control TB in eastern Europe and consequences in low incidence countries. *Monaldi Arch Chest Dis*, 57: 285-290
- 28 Decludt B (2002): Epidemiology of tuberculosis. *Rev Prat*, 52: 2106-2110
- 29 Centers for Disease Control and Prevention (1993): Tuberculosis--Western Europe, 1974-1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 42: 628
- 30 Cantwell MF, McKenna MT, McCray E, Onorato IM (1998): Tuberculosis and race/ethnicity in the United States. Impact of socioeconomic status. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:1016

- 
- 31 Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization, WHO/HTM/TB/2007.376
- 32 Global Tuberculosis Programme. Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes. WHO/GTB/96.210
- 33 DOTS Expansion Working Group Strategic Plan 2006-2015. WHO 2006
- 34 Tuberculosis. Fact Sheet No 104. WHO 03/2007
- 35 Stop TB Partnership – Annual Report 2005. WHO/HTM/STB/2006.36
- 36 Sneath PHA (1984): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1. Auflage, Williams & Wilkins, Baltimore
- 37 Brennan PJ, Nikaido H (1995): The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64: 29–63.
- 38 Daffe M, Draper P (1998): The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microbial Physiol* 39: 131–203
- 39 McNeil MR, Brennan PJ (1991): Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol*, 142: 451-463
- 40 Boddingtonhaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC (1990): Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*, 28: 1751-1759
- 41 Brennan PJ, Crick DC (2007): The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 7: 475–488

- 
- 42 Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM (1997): Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 9869-9874
- 43 Musser JM, Amin A, Ramaswamy S (2000): Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. *Genetics*, 155: 7–16
- 44 Wheeler PR, Ratledge C (1994): Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington, DC: ASM 353–385
- 45 Höner zu Bentrop K, Russell DG (2001): *Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment*. *Trends Microbiol*, 9: 597-605
- 46 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997): Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. *J Clin Microbiol*, 35: 907-914
- 47 Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST (1999): Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*, 32: 643-655
- 48 Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG (1998): Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544

---

49 Liebana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D (1996): Assessment of genetic markers for species differentiation within the Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol, 34: 933–938

50 O'Reilly LM, Daborn CJ (1995): The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: A review. Tubercle and Lung Disease, 76: 1-46

51 David HL, Jahan MT, Jumin A, Grandry J, Lehmann EH (1978): Numerical taxonomy of Mycobacterium africanum. Int J Syst Bacteriol, 28: 467-472

52 Kremer K, van Soolingen D, van Embden J, Hughes S, Inwald J, Hewinson G (1998): Mycobacterium microti: more widespread than previously thought. J Clin Microbiol, 36: 2793-2794

53 Cavanagh R, Begon M, Bennett M, Ergon T, Graham IM, De Haas PE, Hart CA, Koedam M, Kremer K, Lambin X, Roholl P, Soolingen Dv D (2002): Mycobacterium microti infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. J Clin Microbiol, 40: 3281-3285

54 Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD (1997): A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol, 47: 1236-1245

55 Singleton P, Sainsbury D (2001): Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 3. Auflage, John Wiley & Sons Ltd., Sussex

56 Ikram S, Dodson A (1998): The Mummy in Ancient Egypt: Equipping the Dead for Eternity. Thames and Hudson Ltd, London

57 David R, Archbold R (2001): Wenn Mumien erzählen, Collection Rolf Heyne, München

- 
- 58 Granville AB (1825): An essay on Egyptian Mummies. W. Nicol, London
- 59 Aufderheide AC, Rodríguez-Martín C (1998): The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology, Cambridge University Press, Cambridge
- 60 Ruffer MA (1921): Studies in the Paleopathology of Egypt. The University of Chicago Press, Chicago
- 61 Smith GE, Ruffer MA (1910): Pott'sche Krankheit an einer ägyptischen Mumie, Zur historischen Biologie der Krankheitserreger. 3. Heft, Verlag von Alfred Töpelmann, Gießen
- 62 Hummel S (2002): Ancient DNA Typing. 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin
- 63 Schlögl HA (2006): Das alte Ägypten, Verlag C. H. Beck oHG, München
- 64 Breasted JH (2001): Geschichte Ägyptens, GLB Parkland, Köln
- 65 Silverman DP (2001): Das alte Ägypten, Frederking und Thaler, München
- 66 Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST (2002): A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 3684-3689
- 67 Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK (1996): Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. J Bacteriol, 178: 1274-1282
- 68 Van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM (2000): Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. J Bacteriol. 182: 2393-2401

---

69 Stead WW (1997): The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. Clin Chest Med, 18: 65-77

70 von Beckerath J (1997): Münchner Ägyptologische Studien. Band 46, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

71 von Beckerath J (1999): Münchner Ägyptologische Studien. Band 49, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

72 Dreyer G (1986): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 43, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

73 Kaiser W (1986): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 43, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

74 Dreyer G (1990): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 46, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

75 Kaiser W (1985): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 41, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

76 Kaiser W (1991): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 47, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

77 Dreyer G (1993): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 49, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

78 Dreyer G (2000): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 56, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

79 Dreyer G (1996): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. Band 52, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

---

80 Rundbriefe des deutschen archäologischen Instituts, Abteilung Kairo. 2002, 2003, 2004

81 Polz D, Seiler A (2003): Die Pyramidenanlage des Königs Nub-Cheper-Re Intef in Dra' Abu el-Naga. Verlag Philipp von Zabern, Mainz

82 Graefe E (2007): Die Doppelgrabanlage "M" aus dem Mittleren Reich unter TT 196 im Tal el-Asasif in Theben-West. Shaker Verlag, Aachen

83 Polz D (1999): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts Abteilung Kairo. Band 55, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

84 Polz D (1992): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts Abteilung Kairo. Band 48, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

85 Polz D (1995): Mitteilungen des deutschen archäologischen Instituts Abteilung Kairo. Band 51, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

86 Kampp F (1996): Die thebanische Nekropole. Zum Wandel des Grabgedankens von der 18. bis zur 20. Dynastie. Band 1 und 2, Verlag Philipp von Zabern, Mainz

87 Porter B, Moss RLB, Burney EW (1994): The Theban Necropolis Part One: Private Tombs. 2. Auflage, Griffith Institute, Oxford

88 Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT (1990): Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 161: 977–981

89 Fletcher HA, Donoghue HD, Taylor GM, van der Zanden AGM, Spigelman M (2003): Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from a family of 18th century Hungarians. *Microbiology*, 149: 143–51

- 
- 90 Taylor GM, Goyal M, Legge AJ, Shaw RJ, Young D (1999): Genotypic analysis of mycobacterium tuberculosis from medieval human remains. *Microbiology*, 145: 899-904
- 91 Ghossein RA, Ross DG, Salomon RN, Rabson AR (1994): A search for mycobacterial DNA in sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*, 101: 733-737
- 92 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: 636-638, 640-641
- 93 Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C (1998): Reliability of DNA-based sex tests. *Nature Genetics*, 18: 103
- 94 McKeown B, Stickley J, Riordan A (2000): Gender assignment by PCR of the SRY gene: an improvement on amelogenin. *Progress in Forensic Genetics*, 8: 433-435
- 95 Applied Biosystems (2002): BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Protocol, Part Number 4337036 Rev. A
- 96 Höss M, Pääbo S (1993): DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acid Res*, 21: 3913-3914
- 97 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354
- 98 Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W (1988): Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int*, 39: 59-70
- 99 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

---

100 Rickwood D, Hames BD (1990): Gel electrophoresis of nucleic acids. Oxford University Press, Oxford

101 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997): Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35: 907-914

102 Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD (1993): Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol*, 10: 1057-1065

103 Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Dang DA, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniowski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Kassa-Kelembho E, Ho ML, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Mostrom P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasoloforazanamparany V, Ridell M, Rossetti ML, Stauffer F, Suffys PN, Takiff H, Texier-Maugein J, Vincent V, de Waard JH, Sola C, Rastogi N (2003): Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol*, 41: 1963-1970

104 Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, Mokrousov I, Vincent V, Rastogi N (2001): Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis*, 7: 390-396

105 Humphries SE, Whittall R, Minty A, Buckingham M, Williamson R (1981): There are approximately 20 actin genes in the human genome. *Nucleic Acids Res*, 9: 4895-4908

---

106 Nakahori Y, Takenaka O, Nakagome Y (1991): A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics*, 9: 264-269

107 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

108 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: 636-638

109 Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1990): A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346: 245-250

110 Burgoyne PS (1988): Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 322: 63-72

111 Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-244

112 McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M (1993): A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 3368-3372

113 Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M (1990): Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348: 448-450

- 
- 114 van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM (1993): Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 31: 406-409
- 115 Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B (1990): Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 28: 2668-2673
- 116 Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, Pialoux G, Gicquel B, Garrigue G (1991): Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet*, 338: 364-366
- 117 Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT (1991): IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes*, 5: 73-80
- 118 Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL (1990): IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res*, 18: 188
- 119 Ishiguro N, Sato G (1988): Nucleotide sequence of insertion sequence IS3411, which flanks the citrate utilization determinant of transposon Tn3411. *J Bacteriol*, 170: 1902-1906
- 120 Prère MF, Chandler M, Fayet O (1990): Transposition in *Shigella dysenteriae*: isolation and analysis of IS911, a new member of the IS3 group of insertion sequences. *J Bacteriol*, 172: 4090-4099
- 121 Timmerman KP, Tu CP (1985): Complete sequence of IS3. *Nucleic Acids Res*, 13: 2127-2139

---

122 Ninan SA (1997): Comparative study of different methods of identification of *Mycobacterium tuberculosis* in gastric aspirate of children suffering from pulmonary tuberculosis. MD thesis, AIIMS

123 Lodha R, Kabra SK (2004): Newer diagnostic modalities for tuberculosis. *Indian J Pediatr*, 71: 221-227

124 Delacourt C, Doveda JD (1995): Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr*, 126: 703-709

125 Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, and K. D. Eisenach KD (1997): Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 35: 799–801

126 Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C (1998): Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 36: 937-943

127 Taylor GM, Goyal M, Legge AJ, Shaw RJ, Young D (1999): Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from medieval human remains. *Microbiology*, 145: 899-904

128 Bohle RM, Heidemann A, Borkhardt A, Velcovsky HG, Altmannsberger HM (1994): Detection of mycobacterial DNA from paraffin-embedded tissue with epithelioid granulomas of lung and lymph nodes. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 78: 189-194

129 Sun YJ, Bellamy R, Lee AS, Ng ST, Ravindran S, Wong SY, Locht C, Supply P, Paton NI (2004): Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol*, 42: 1986-1993

130 Rao KR, Kauser F, Srinivas S, Zanetti S, Sechi LA, Ahmed N, Hasnain SE (2005): Analysis of genomic downsizing on the basis of region-of-difference

---

polymorphism profiling of *Mycobacterium tuberculosis* patient isolates reveals geographic partitioning. *J Clin Microbiol*, 43: 5978-5982

131 Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskövi A, Loder A, Bretzel G, Van Soolingen D, Hale YM, Salfinger M (2002): Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol*, 40: 2339-2345

132 Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST (2000): Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol*, 290: 143-152a

133 Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST (1999): Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*, 32: 643-655

134 Vera-Cabrera L, Howard ST, Laszlo A, Johnson WM (1997): Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 35: 1190-1195

135 Koivula T, Svenson SB, Kallenius G (2002): The *mtp40* gene is not present in *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 82: 183-185

136 Leão SC (1993): Tuberculosis: new strategies for the development of diagnostic tests and vaccines. *Braz J Med Biol Res*, 26: 827-833

137 Parra CA, Londoño LP, Del Portillo P, Patarroyo ME (1991): Isolation, characterization, and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: identification of a species-specific sequence. *Infect Immun*, 59: 3411-3417

138 Deretic V, Philipp W, Dhandayutapani S, Mudd MH, Curcic R, Garbe T, Heym B, Via LE, Cole ST (1995): *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with

---

inactivated oxidative stress regulatory gene: Implications for sensitivity to isoniazid. *Mol Microbiol*, 17: 889-900

139 Sherman DR, Sabo PJ, Hickey MJ, Arain TM, Mahairas GG, Yuan Y, Barry CE 3rd, Stover CK (1995): Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6625-6629

140 Pagan-Ramos E, Master SS, Pritchett CL, Reimschuessel R, Trucksis M, Timmins GS, Deretic V (2006): Molecular and physiological effects of mycobacterial *oxyR* inactivation. *J Bacteriol*, 188: 2674-2680

141 Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Dominguez L (1999): *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol*, 49: 1263-1273

142 Kyung Wha Lee, Jae-Myung Lee, Ki-Such Jung (2001): Characterization of *pncA* Mutations of Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Korean Med Sci*, 16: 537-543

143 Wages JM, Fowler AK (1993): Amplification of low copy number sequences. *Amplifications*, 11: 1-3

144 Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N (1992): Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 5847-5851

145 Kwok S (1990): Procedures to minimize PCR-product carry over. *PCR protocols*, Academic Press, San Diego

146 Hauswirth WW (1994): Ancient DNA. *Experientia*, 50: 521-523

- 
- 147 Schmidt T, hummel S, Hermann B (1995): Evidence of contamination in PCR laboratory disposables. *Naturwissenschaften*, 82: 423-431
- 148 Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S (2001): Ancient DNA. *Nat Rev Genet*, 2: 353-359
- 149 Rothman, KJ (2002). *Epidemiology: An Introduction*. Oxford University Press, Inc, New York
- 150 Sachs, L (1992). *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- 151 Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, Filliol I, Boulahbal F, Vincent V, Rastogi N (2001): Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol*, 39 (1): 57-65
- 152 Gilbert MT, Barnes I, Collins MJ, Smith C, Eklund J, Goudsmit J, Poinar H, Cooper A (2005): Long-term survival of ancient DNA in Egypt: response to Zink and Nerlich (2003). *Am J Phys Anthropol*, 128: 110-114
- 153 Zink AR, Nerlich AG (2005): Long-term survival of ancient DNA in Egypt: Reply to Gilbert *et al. et al.* *Am J Phys Anthropol*, 128: 115-118
- 154 Eglinton G, Logan GA (1991): Molecular preservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 333: 315-327
- 155 Tuross N (1994): The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*, 50: 530-535

- 
- 156 Lindahl T (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709-715
- 157 Höss M, Pääbo S, Vereshchagin NK (1994): Mammoth DNA sequences. *Nature*, 370: 333
- 158 Poinar GO Jr (1994): The range of life in amber: significance and implications in DNA studies. *Experientia*, 50: 536-542
- 159 Colson IB, Bailey JF, Vercauteren M, Sykes BC (1997): The preservation of ancient DNA and bone diagenesis. *Ancient Biomolecules*, 1: 109-117
- 160 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
- 161 Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W, Utermann G, Sykes B, Pääbo S (1994): Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*, 264: 1775-1778
- 162 Hardy C, Casane D, Vigne JD, Callou C, Dennebouy N, Mounolou JC, Monnerot M (1994): Ancient DNA from Bronze Age bones of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Experientia*, 50: 564-570
- 163 Hagelberg E, Sykes B, Hedges R (1989): Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342: 485
- 164 Pääbo S (1993): Ancient DNA. *Sci Am*, 269: 60–66
- 165 Höss M, Jaruga P, Zastowny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S (1996): DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res*, 24: 1304-1307
- 166 Cooper A (1992): Removal of colourings, inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contamination from ancient DNA samples. *Anc DNA Newslett*, 1: 31-32

---

167 Pääbo S (1990): Amplifying ancient DNA. PCR Protocols, Academic Press, San Diego

168 Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol, 28: 495-503

169 Hagelberg E, Clegg JB (1991): Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. Proc Biol Sci, 244: 45-50

170 Scholz M, Giddings I, Pusch CM (1998): A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. Anal Biochem, 259: 283-286

171 Tang YW, Sefers SE, Li H, Kohn DJ, Procop GW (2005): Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. J Clin Microbiol, 43: 4830-4833

172 Ponte P, Gunning P, Blau H, Kedes L (1983): Human actin genes are single copy for alpha-skeletal and alpha-cardiac actin but multicopy for beta- and gamma-cytoskeletal genes: 3' untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. Mol Cell Biol, 3: 1783-1791

173 Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim A (1995): Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y *amelogenin/amelogenin/amelogenin* alleles. Gene, 167: 327-332

174 Lázár L, Bán Z, Szakács O, Nagy B, Beke A, Oroszné NJ, Rigó J Jr, Papp Z (2003): Fetal sex determination with real time PCR of fetal DNA in maternal plasma. Orv Hetil, 144: 2405-2409

- 
- 175 Davalieva K, Dimcev P, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D (2006): Non-invasive fetal sex determination using real-time PCR. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 19: 337-342
- 176 Santacroce R, Vecchione G, Tomaiuolo M, Sessa F, Sarno M, Colaizzo D, Grandone E, Margaglione M (2006): Identification of fetal gender in maternal blood is a helpful tool in the prenatal diagnosis of haemophilia. *Haemophilia*, 12: 417-422
- 177 Findlay I, Matthews P, Quirke P (1998): Multiple genetic diagnoses from single cells using multiplex PCR: reliability and allele dropout. *Prenat Diagn*, 18: 1413-1421
- 178 Hummel S, Bramanti B, Finke T, Herrmann B (2000): Evaluation of morphological sex determinations by molecular analyses. *Anthrop Anz*, 58: 9-13
- 179 Faerman M, Jankauskas R, Gorski A, Bercovier H, Greenblatt CL (1997): Prevalence of human tuberculosis in a medieval population of Lithuania studied by ancient DNA analysis. *Ancient Biomolecules*, 1: 205-214
- 180 Mays S, Fysh E, Taylor GM (2002): Investigation of the link between visceral surface rib lesions and tuberculosis in a medieval skeletal series from England using ancient DNA. *Am J Phys Anthropol*, 119: 27-36
- 181 Fusegawa H, Wang BH, Sakurai K, Nagasawa K, Okauchi M, Nagakura K (2003): Outbreak of tuberculosis in a 2000-year-old Chinese population. *Kansenshogaku Zasshi* 77: 146-149
- 182 Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA (1995): Pre-Colombian tuberculosis in Northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am J Phys Anthropol* 98: 37-45
- 183 Braun M, Cook DC, Pfeiffer S (1998): DNA from *Mycobacterium tuberculosis* complex identified in North American, pre-Colombian human skeletal remains. *J Archaeol Sci* 25: 271-277

- 
- 184 Donoghue HD, Spigelman J, Zias J, Gernaey-Child AM, Minnikin DE (1998): Mycobacterium tuberculosis complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Lett Appl Microbiol*, 27: 265-269
- 185 Mays S, Taylor GM, Legge AJ, Young DB, Turner-Walker G (2001): Paleopathological and biomolecular study of tuberculosis in a medieval skeletal collection from England. *Am J Phys Anthropol* 114: 298-311
- 186 Taylor GM, Crossey M, Saldanha J, Waldron T (1996): DNA from Mycobacterium tuberculosis identified in mediaeval human skeletal remains using polymerase chain reaction. *J Archaeol Sci* 23:789-798
- 187 Baron H, Hummel S, Herrmann B (1996): Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones. *J Archaeol Sci* 23: 667-671
- 188 Haas CJ, Zink A, Molnár E, Szeimies U, Reischl U, Marcsik A, Ardagna Y, Dutour O, Pálfi G, Nerlich AG (2000): Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. *Am J Phys Anthropol* 113: 293-304
- 189 Matheson C, Donoghue HD, Fletcher H, Holton J, Thomas M, Pap I, Spigelman M (2001): Tuberculosis in ancient populations: a linkage study. *Ancient Biomolecules* 3: 295
- 190 Cockburn A (1963): *The Evolution and Eradication of Infectious Disease*, John Hopkins Press, Baltimore
- 191 Haas F, Haas SS (1996). *The origins of Mycobacterium tuberculosis and the notion of its contagiousness*. Tuberculosis, Little, Brown and Company, Boston
- 192 Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y (2007): First report of Mycobacterium bovis DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology*, 153: 1243-1249

- 
- 193 Kapur V, Whittam TS, Musser JM (1994): Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? *J Infect Dis*, 170: 1348-1349
- 194 Vera-Cabrera L, Hernandez-Vera MA, Welsh O, Johnson WM, Castro-Garza J (2001): Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition. *J Clin Microbiol*, 39: 3499-3504
- 195 Weil A, Plikaytis B B, Butler W R, Woodley C L, Shinnick T M (1996): The *mtp40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 34: 2309-2311
- 196 Koivula T, Svenson SB, Källenius G (2002): The *mtp40* gene is not present in *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 82: 183-185
- 197 Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskövi A, Loder A, Bretzel G, Van Soolingen D, Hale YM, Salfinger M (2002): Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol*, 40: 2339-2345
- 198 Rao KR, Kauser F, Srinivas S, Zanetti S, Sechi LA, Ahmed N, Hasnain SE (2005): Analysis of Genomic Downsizing on the Basis of Region-of-Difference Polymorphism Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* Patient Isolates Reveals Geographic Partitioning. *J Clin Microbiol*, 43: 5978-5982
- 199 Rhee JT, Piatek AS, Small PM, Harris LM, Chaparro SV, Kramer FR, Alland D (1999): Molecular epidemiologic evaluation of transmissibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 37: 1764-1770
- 200 Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL (2003): PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*, 41: 1637-1650

---

201 Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR (2004): Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis*, 4: 584-592

202 Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD (1999): Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*, 37: 2607-2618

203 Gernaey AM, Minnikin DE, Copley MS, Dixon RA, Middleton JC, Roberts CA (2001): Mycolic acids and ancient DNA confirm an osteological diagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 81: 259-265

204 Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH (1988): Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 26: 2240-2245

## Anhang

### Katalog

Im Folgenden ist der detaillierte Katalog aller bearbeiteten Proben mit den zugehörigen Ergebnissen in Tabellenformat aufgeführt.

Abkürzungen:

0	kein erfolgreicher Gen-Nachweis	gen.	genetische(s) (Gruppe/Geschlecht)
		<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
1	<i>oxyR</i>	morph.	Morphologisches (Geschlecht)
2	<i>pncA</i>		
3	<i>mtp40</i>	neg.	negativ
4	<i>katG</i>	pos.	positiv
5	<i>gyrA</i>	Spoligo	Spoligotyping
6	TbD1 int	Tb	Tuberkulose
7	TbD1 fla	zus.	zusätzliche (Gene)
8	RD9 int	♂	männlich
9	RD9 fla	♀	weiblich

Proben-ID	Grabungsstätte	Pathologie	Altersklassen	Geschlecht	morph. Geschlecht	gen. Geschlecht
B 16 4a N (A2)	Abydos/B-Friedhof	unspezifisch	adult			
DEN T-N H(A1)	Abydos/Den Nord Halde	unauffällig	adult			♀
DEN T-00	Abydos/Grab Den	unauffällig				
DEN T-NNO	Abydos/Grab Den	unspezifisch				
DEN T-NW	Abydos/Grab Den	unauffällig				
DEN T-O	Abydos/Grab Den	unauffällig				
DEN Zw	Abydos/Grab Den	unauffällig	adult		♂	
Q W5 (A3)	Abydos/Grab Qa'a	unspezifisch	adult	♀		♀
Q-W	Abydos/Grab Qa'a	unauffällig	adult			
U 503	Abydos/Semerchet	unspezifisch				
U 559	Abydos/Semerchet	Tb-typisch	adult	♀	♀	
U ZW	Abydos/Semerchet	unauffällig	adult	♂	♂	
U 475	Abydos/U-Friedhof	unspezifisch				
DAN 117	DAN	unauffällig				
DAN 121	DAN	unauffällig				
DAN 24	DAN	unauffällig				
DAN 37	DAN	unspezifisch				
DAN 41	DAN	unauffällig				
DAN 92a	DAN	unspezifisch				
DAN 94	DAN	unspezifisch				
DAN 0	DAN	unspezifisch	adult			
DAN C	DAN	unauffällig	adult	♀	♂	♀
DAN E	DAN	unauffällig	adult	♀	♀	
DAN 7	DAN K01.1	unauffällig				
DAN 2	DAN K01.12	unauffällig	adult			
DAN LWK	DAN K01.12	unauffällig	adult			
DAN 14	DAN K01.12 K A3	unauffällig	adult			
DAN 1	DAN K01.12 S A1	unauffällig				

Proben-ID	$\beta$ -Actin	IS6110	weiterer DNA-Nachweis	zus. Gene	gen. Gruppe	Spoligo	Erreger
B 16 4a N (A2)	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DEN T-N H(A1)	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DEN T-00	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		pos.	<i>M. tuberculosis</i>
DEN T-NNO	neg.	neg.					
DEN T-NW	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5,6	1,2	pos.	<i>M. tuberculosis</i>
DEN T-O	neg.	neg.					
DEN Zw	neg.	neg.					
Q W5 (A3)	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	6		neg.	
Q-W	neg.	neg.					
U 503	pos.	neg.					
U 559	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	5,8	1,2	neg.	
U ZW	pos.	neg.					
U 475	neg.	neg.					
DAN 117	neg.	neg.	Amelogenin				
DAN 121	neg.	neg.					
DAN 24	pos.	neg.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
DAN 37	neg.	neg.					
DAN 41	neg.	neg.					
DAN 92a	pos.	neg.					
DAN 94	neg.	neg.					
DAN 0	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN C	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN E	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN 7	neg.	neg.					
DAN 2	pos.	neg.					
DAN LWK	pos.	neg.					
DAN 14	neg.	neg.					
DAN 1	neg.	neg.					

Proben-ID	Grabungsstätte	Pathologie	Altersklassen	Geschlecht	morph. Geschlecht	gen. Geschlecht
DAN 7	DAN K01.12 S A3	unauffällig	immatur			
DAN 8	DAN K01.12 S A9	unauffällig	adult			
DAN 9	DAN K01.12 S A9	unauffällig	adult			
DAN1.4-3	DAN K01.4	unauffällig	adult			
DAN1.4-6	DAN K01.4	unspezifisch	adult			
DAN A11	DAN K01.8	unauffällig	immatur			
DAN A4	DAN K01.8	unauffällig	immatur			
DAN A5	DAN K01.8	unauffällig	adult			
DAN KW-E	DAN K01.8	unauffällig	adult			
DAN KW-F	DAN K01.8	unauffällig	adult			
DAN S6	DAN K01.8	unauffällig				
DAN S7	DAN K01.8	unauffällig	immatur			
DAN S8	DAN K01.8	unauffällig	adult	♂	♂	
DAN WK	DAN K01.8/ K01.12	unauffällig	adult			
DAN M2	DAN K02.2	unspezifisch	adult	♂	♂	
DAN M3	DAN K02.2	unauffällig	adult	♀	♀	
DAN M4	DAN K02.2	unauffällig	immatur			
DAN M5	DAN K02.2	unauffällig	immatur			
DAN 3	DAN K93.11	unauffällig	adult	♂	♂	♂
DAN 33	DAN K93.11	Tb-typisch	adult	♂	♂	♂
DAN 50(KM)	DAN K93.11	Tb-typisch	immatur	♂	♂	
DAN 6	DAN K93.11	unauffällig	adult	♂	♂	
DAN 74	DAN K93.11	unauffällig	adult	♂	♂	♂
DAN 75	DAN K93.11	unauffällig	adult	♂		
DAN BWK	DAN K93.11	unauffällig				
DAN M1	DAN K93.11	unauffällig	adult	♂	♂	♂
DAN M2	DAN K93.11	unauffällig	adult	♂	♂	♂
DAN M7	DAN K93.11	unauffällig	adult	♀	♀	♀

Proben-ID	$\beta$ -Actin	IS6110	weiterer DNA-Nachweis	zus. Gene	gen. Gruppe	Spoligo	Erreger
DAN 7	pos.	neg.					
DAN 8	pos.	pos.					
DAN 9	neg.	neg.					
DAN1.4-3	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN1.4-6	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN A11	pos.	neg.					
DAN A4	neg.	neg.					
DAN A5	pos.	neg.					
DAN KW-E	pos.	neg.					
DAN KW-F	neg.	neg.					
DAN S6	neg.	neg.					
DAN S7	pos.	neg.					
DAN S8	pos.	neg.					
DAN WK	neg.	neg.					
DAN M2	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN M3	neg.	neg.					
DAN M4	neg.	neg.					
DAN M5	pos.	neg.					
DAN 3	neg.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN 33	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN 50(KM)	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5	1,2	pos.	<i>M. tuberculosis</i>
DAN 6	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN 74	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	5	1,2		
DAN 75	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN BWK	neg.	neg.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
DAN M1	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
DAN M2	neg.	neg.					
DAN M7	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				

Proben-ID	Grabungsstätte	Pathologie	Altersklassen	Geschlecht	morph. Geschlecht	gen. Geschlecht
DAN 106	DAN K94.1	unspezifisch	adult			
DAN 22	DAN K94.1	unauffällig	adult	♂		♂
DAN 31	DAN K94.1	unspezifisch	immatur	♂	♂	♂
DAN 1 (PC 21)	DAN K95.1	unauffällig	adult	♂	♂	
DAN 18	DAN K95.1	unauffällig				
DAN 1-PC66	DAN K95.1	unauffällig				
DAN 21	DAN K95.1	unauffällig				
DAN 46	DAN K95.1	unspezifisch	adult	♀		
DAN C1-PC20	DAN K95.1	unauffällig				
DAN PC3	DAN K95.1	unauffällig	adult	♀	♀	
DAN PC50	DAN K95.1	unauffällig				
DAN S3	DAN K95.1	unauffällig	adult	♂	♂	
DAN-x	DAN K95.1	unauffällig				
TT183-20	THEBEN/TT183	Tb-typisch	adult	♀	♀	
TT183-29	THEBEN/TT183	unspezifisch	adult			
TT183-KW	THEBEN/TT183	unauffällig	immatur			
TT183-OW	THEBEN/TT183	unauffällig				
TT183-S3	THEBEN/TT183	unauffällig	adult	♀	♀	
TT183-S4	THEBEN/TT183	unauffällig	adult	♂	♂	
TT183-T45b	THEBEN/TT183	unauffällig	adult	♂	♂	
TT196/101	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/104	THEBEN/TT196	unspezifisch				
TT196/132	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/137	THEBEN/TT196	unspezifisch				
TT196/148	THEBEN/TT196	unspezifisch	adult			
TT196/23	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/48	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/80	THEBEN/TT196	unspezifisch				

Proben-ID	β-Actin	IS6110	weiterer DNA-Nachweis	zus. Gene	gen. Gruppe	Spoligo	Erreger
DAN 106	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
DAN 22	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
DAN 31	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
DAN 1 (PC 21)	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	1		pos.	<i>M. tuberculosis</i>
DAN 18	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	4,5	1,2	neg.	
DAN 1-PC66	neg.	neg.					
DAN 21	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	1,2,3		neg.	
DAN 46	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
DAN C1-PC20	neg.	neg.					
DAN PC3	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
DAN PC50	pos.	neg.					
DAN S3	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
DAN-x	pos.	neg.					
TT183-20	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	2,4,5,7,8	2	pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT183-29	pos.	pos.	Amelogenin, SRY				
TT183-KW	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT183-OW	neg.	neg.					
TT183-S3	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT183-S4	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT183-T45b	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/101	neg.	neg.					
TT196/104	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/132	neg.	neg.					
TT196/137	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/148	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/23	pos.	pos.	Amelogenin, SRY				
TT196/48	neg.	neg.					
TT196/80	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				

Proben-ID	Grabungsstätte	Pathologie	Altersklassen	Geschlecht	morph. Geschlecht	gen. Geschlecht
TT196/89	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/93	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/94	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/96	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/M5	THEBEN/TT196	unauffällig		♂	♂	
TT196/MW1	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW10	THEBEN/TT196	unauffällig		♂		♂
TT196/MW11	THEBEN/TT196	unauffällig		♂		♂
TT196/MW12	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW13	THEBEN/TT196	unauffällig		♂		♂
TT196/MW14	THEBEN/TT196	unauffällig		♂		♂
TT196/MW15	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW16	THEBEN/TT196	unspezifisch				
TT196/MW17	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW18	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW19	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW2	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW20	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW3	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW4	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW5	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW6	THEBEN/TT196	unspezifisch				
TT196/MW7	THEBEN/TT196	unspezifisch				
TT196/MW8	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196/MW9	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT196-2/144	THEBEN/TT196	unauffällig	adult	♂		♂
TT196-2/152	THEBEN/TT196	unspezifisch	adult			
TT196-2/182	THEBEN/TT196	unspezifisch	adult			

Proben-ID	β-Actin	IS6110	weiterer DNA-Nachweis	zus. Gene	gen. Gruppe	Spoligo	Erreger
TT196/89	neg.	neg.					
TT196/93	neg.	neg.					
TT196/94	neg.	neg.					
TT196/96	neg.	neg.					
TT196/M5	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	1	1,2	pos.	<i>M. africanum</i>
TT196/MW1	pos.	pos.	Amelogenin, SRY, s. unter "zus. Gene"	2,5,6,9	1,2	neg.	
TT196/MW10	neg.	pos.	Amelogenin, SRY, s. unter "zus. Gene"	5,6,9	1,2	neg.	
TT196/MW11	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW12	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW13	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW14	pos.	pos.	Amelogenin, SRY, s. unter "zus. Gene"			neg.	
TT196/MW15	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW16	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW17	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW18	neg.	pos.	Amelogenin, SRY	8	1,2	pos.	<i>M. africanum</i>
TT196/MW19	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW2	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW20	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW3	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW4	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW5	pos.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW6	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW7	pos.	pos.	Amelogenin, SRY, s. unter "zus. Gene"	1,6,9		pos.	<i>M. africanum</i>
TT196/MW8	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196/MW9	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196-2/144	pos.	pos.	Amelogenin, SRY				
TT196-2/152	neg.	neg.	Amelogenin, SRY				
TT196-2/182	pos.	pos.	Amelogenin, SRY, s. unter "zus. Gene"	0		neg.	

Proben-ID	Grabungsstätte	Pathologie	Altersklassen	Geschlecht	morph. Geschlecht	gen. Geschlecht
TT196-2/202	THEBEN/TT196	Tb-typisch	adult			
TT196-2/25	THEBEN/TT196	unspezifisch	adult			
TT196-2/42	THEBEN/TT196	Tb-typisch	adult			
TT196-2/78	THEBEN/TT196	unauffällig	adult	♂		♂
TT196-2/82	THEBEN/TT196	unauffällig	immatur			
TT196-2/S13	THEBEN/TT196	unauffällig	adult			
TT-M163	THEBEN/TT196	Tb-typisch			♂	♂
TT-Ma	THEBEN/TT196	unauffällig	adult	♂		♂
TT-Mb	THEBEN/TT196	unauffällig				
TT453-14	THEBEN/TT453	unauffällig				
TT453-15	THEBEN/TT453	unspezifisch	adult			
TT453-9	THEBEN/TT453	unauffällig	adult	♀	♀	
TT84-3	THEBEN/TT84	unauffällig				
TT84-4	THEBEN/TT84	unspezifisch	adult	♀	♀	♀
TT84-70	THEBEN/TT84	Tb-typisch	adult	♂	♂	♂
TT85-2-?	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-12	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-120	THEBEN/TT85-2	unspezifisch				
TT85-2-21	THEBEN/TT85-2	unspezifisch	adult	♂		♂
TT85-2-22	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-35	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-36	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-37	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-48	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-51	THEBEN/TT85-2	Tb-typisch	adult			
TT85-2-61	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-A	THEBEN/TT85-2	unauffällig				
TT85-2-B	THEBEN/TT85-2	unauffällig				

Proben-ID	$\beta$ -Actin	IS6110	weiterer DNA-Nachweis	zus. Gene	gen. Gruppe	Spoligo	Erreger
TT196-2/202	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT196-2/25	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	2,5		neg.	
TT196-2/42	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	0		neg.	
TT196-2/78	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	1,2,5	1,2	pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT196-2/82	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT196-2/S13	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT-M163	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	5,6	1,2	neg.	
TT-Ma	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT-Mb	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT453-14	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	4,7	2,3	pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT453-15	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	0		neg.	
TT453-9	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	1,2,4,8	2,3	pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT84-3	neg.	neg.					
TT84-4	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT84-70	neg.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	5,7	1,2	neg.	
TT85-2-?	neg.	neg.					
TT85-2-12	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
TT85-2-120	neg.	neg.					
TT85-2-21	pos.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i> , s. unter "zus. Gene"	7		neg.	
TT85-2-22	pos.	neg.					
TT85-2-35	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5,6,8		pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT85-2-36	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
TT85-2-37	neg.	neg.					
TT85-2-48	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
TT85-2-51	neg.	pos.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT85-2-61	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
TT85-2-A	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5,6		neg.	
TT85-2-B	neg.	neg.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	

Proben-ID	Grabungsstätte	Pathologie	Altersklassen	Geschlecht	morph. Geschlecht	gen. Geschlecht
TT85-3-PC70	THEBEN/TT85-3	unauffällig				
TT95-122	THEBEN/TT95	Tb-typisch	immatur	♂	♂	
TT95-13	THEBEN/TT95	unauffällig	adult	♀	♀	
TT95-158	THEBEN/TT95	unspezifisch				
TT95-164	THEBEN/TT95	unspezifisch	adult			
TT95-169	THEBEN/TT95	unspezifisch	adult			
TT95-171	THEBEN/TT95	unspezifisch				
TT95-20	THEBEN/TT95	unauffällig				
TT95-202	THEBEN/TT95	unauffällig				
TT95-28	THEBEN/TT95	unspezifisch	adult	♂		♂
TT95-2-A	THEBEN/TT95	unauffällig				
TT95-2-B	THEBEN/TT95	unauffällig				
TT95-34	THEBEN/TT95	unspezifisch	adult			
TT95-35	THEBEN/TT95	unspezifisch	adult	♂	♂	♂
TT95-40	THEBEN/TT95	Tb-typisch	immatur			
TT95-41	THEBEN/TT95	unspezifisch	adult	♀		♀
TT95-44	THEBEN/TT95	unauffällig	adult	♀		♀
TT95-8	THEBEN/TT95	unauffällig				
TT95-PC148/3	THEBEN/TT95	unauffällig				
TT95-PC95-15	THEBEN/TT95	unauffällig				

Proben-ID	β-Actin	IS6110	weiterer DNA-Nachweis	zus. Gene	gen. Gruppe	Spoligo	Erreger
TT85-3-PC70	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
TT95-122	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	1,4,7,8	2,3	pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT95-13	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT95-158	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
TT95-164	neg.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT95-169	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	0		pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT95-171	neg.	neg.					
TT95-20	neg.	neg.	s. unter "zus. Gene"	5		neg.	
TT95-202	neg.	neg.	s. unter "zus. Gene"	0		neg.	
TT95-28	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT95-2-A	pos.	neg.					
TT95-2-B	neg.	pos.	s. unter "zus. Gene"	5		pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT95-34	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT95-35	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT95-40	pos.	pos.	s. unter "zus. Gene"	1,2,7		pos.	<i>M. tuberculosis</i>
TT95-41	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT95-44	pos.	neg.	Amelogenin, <i>SRY</i>				
TT95-8	neg.	pos.					
TT95-PC148/3	neg.	neg.					
TT95-PC95-15	neg.	neg.					

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Andreas Nerlich und meinem Betreuer Herrn PD Dr. rer. nat. Albert Zink für das Bereitstellen des Themas und der Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. med. Alexander Crispin, MPH vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für die große persönliche und fachliche Unterstützung danke ich herzlich der gesamten Familie Motamedi, Herrn Dr. rer. nat. Xaver Sewald, Fräulein MA Anja Huber und Frau Dipl.-Ing. Nataša Miličić.

Nasim Motamedi

Schluderstr. 2

80634 München

Tel.: 089/28747413

Email: nasimotamedi@hotmail.com

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Geboren am: 04.05.1981 in München  
Geschlecht: weiblich

### Schule:

1987 – 1991: Besuch der Grundschule an der Dieselstraße in München  
1991 – 2000: Besuch des Willi-Graf-Gymnasiums in München  
Abschluss: Abitur

### Hochschulstudium:

2000-2007: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München

2002: Ärztliche Vorprüfung  
2003: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2006: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2006-2007: Praktisches Jahr  
2007: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Approbation als Ärztin

### Praktika und berufliche Tätigkeiten:

2003	Studentische Hilfskraft im „Zentrum für naturheilkundliche Forschung“ der TU München
2003-2004:	Co-Assistenzkraft zur Studentenbetreuung für den Präparierkurs im Institut für Anatomie der LMU München
Famulaturen:	Chirurgische und kinderchirurgische Notaufnahme der Universitätsklinik Isfahan/Iran Radiologische Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Abteilung für Pathologie am Städtischen Lehrkrankenhaus München Bogenhausen HNO-Praxis Dr. Flora in München
Praktisches Jahr:	Chirurgie: Rotation innerhalb der erwachsenen- und kinderchirurgischen Stationen des „Hôpitaux Universitaires de Genève“  Innere Medizin (halbes Tertial): kardiologische Station des Krankenhauses München – Schwabing (Lehrkrankenhaus der LMU)  Innere Medizin (halbes Tertial): hämatologische und gastroenterologische Station des „Royal North Shore Hospital“ in Sydney/Australien  Anästhesie: Universitätsklinik der LMU in München
Ärztliche Hospitation: 2007	Kinderärztliche Praxis Dr. Huber & Dr. Dirscherl in München
Hospitation: 2008	Arbeitsgruppe von Dr. Sparwasser an der TU München
Ab 16.6.2008	Anstellung als Assistenzärztin in der Virologie des Max-von-Pettenkofer-Institutes in München
<u>Sprachkenntnisse:</u>	Englisch, fließend in Schrift und Sprache Französisch, gute Kenntnisse in Schrift und Sprache Farsi, fließend in Sprache, Grundkenntnisse in Schrift Italienisch, Grundkenntnisse in Schrift und Sprache

### Forschungstätigkeit:

Experimentelle Doktorarbeit bei Prof. Dr. med. Andreas Nerlich am „Institut für Pathologie“ des Krankenhauses München Bogenhausen:

„Molekularbiologischer Nachweis des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes in altägyptischen Mumien unter besonderer Berücksichtigung neuer Evolutionstheorien“, 2003-2009

### Artikel:

Zink A., Köhler S., **Motamedi N.**, Reischl U., Wolf H., Nerlich A.G.  
Preservation and identification of ancient *M. tuberculosis* complex DNA in Egyptian mummies. Proceedings of the Vth World Congress on Mummy Studies, Torino, Italy, Journal of Biological Research 80: 84-87, 2005

Zink, A.R., Molnar E., **Motamedi N.**, Marcsik A. Nerlich A.G. Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. International Journal of Osteoarchaeology, 17 (4): 380-391, 2007

Zink A.R., Molnár E., **Motamedi N.**, Pálffy G., Marcsik A., Thalhammer S., Heckl W.M., Nerlich A.G. Molecular History and Evolution of Tuberculosis - Evidence from Mummies and Skeletal Remains. Proceedings of the 8th International Conference on Ancient DNA & Associated Biomolecules, Lodz, Poland. 2007

### Abstracts:

Zink A.R., Köhler S., **Motamedi N.**, Reischl U., Wolf H., Nerlich A.G.  
Identification and evolutionary trends of the *M. tuberculosis* complex in ancient Egypt. The 7th International Conference on Ancient DNA & Associated Biomolecules. Brisbane, Australia. Abstracts S. 78, 2004

Zink A.R., Köhler S., **Motamedi N.**, Reischl U., Wolf H., Nerlich A.G.  
Molecular evolution of the *M. tuberculosis* complex in ancient Egypt. 15th European meeting of the Paleopathology Association, Durham, UK. Abstracts S. 107, 2004

Zink A., Köhler S., **Motamedi N.**, Reischl U., Wolf H., Nerlich A.G.  
Preservation and identification of ancient *M. tuberculosis* complex DNA in Egyptian mummies. Vth World Congress on Mummy Studies, Torino, Italy, Abstracts S.121, 2004