

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U. Löhrs

Paläopathologische Untersuchungen zur chronischen Anämie mit molekularer Analyse von aDNA zum Plasmodien-Nachweis (Malaria) in Skelettmaterial aus dem 15. – 18. Jahrhundert aus Süddeutschland (Rain am Lech)

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

vorgelegt von
Kerstin Herberth
aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Nerlich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. Unschuld
Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. A. Zink

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2004

Danksagung:

Ich danke

Prof. Dr. med. A Nerlich für die Überlassung des Themas
und die freundliche Zusammenarbeit.

Dr. rer. nat. A. Zink danke ich für die viele Hilfe und die wertvollen Ratschläge.

Dem Freundeskreis Alt Rain e.V. danke ich, weil er mir die Möglichkeit zur
Knochenprobenentnahme gab.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	MALARIA	6
1.1.1	<i>Allgemeines</i>	6
1.1.2	<i>Bedeutung für die Menschheit</i>	7
1.1.3	<i>Historisches</i>	8
1.2	THEMA UND FRAGESTELLUNG	11
2	MATERIAL	12
2.1	FUNDORT	12
2.1.1	<i>Die Stadt Rain am Lech</i>	12
2.1.2	<i>Historische Einordnung</i>	13
2.2	FUNDMATERIAL	13
2.3	AUSWAHL DES PROBENMATERIALS	18
2.4	VERWENDETE GERÄTE	20
2.5	EINWEGMATERIAL UND HILFSMITTEL	21
2.6	CHEMIKALIEN	21
2.7	REAGENZIEN UND ENZYME	22
2.8	STANDARD LÖSUNGEN UND PUFFER	23
3	METHODEN	24
3.1	BESTIMMUNG DER HÄUFIGKEIT VON HYPEROSTOSEN UND CRIBRA	24
3.2	PROBENENTNAHME UND –AUFBEREITUNG	24
3.3	DNA-EXTRAKTION	25
3.4	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION	26
3.4.1	<i>Allgemeines</i>	26
3.4.2	<i>Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen</i>	26
3.5	DNA-AMPLIFIKATION	27
3.5.1	<i>Amplifikation von humaner DNA</i>	28
3.5.2	<i>Amplifikation von plasmodialer DNA</i>	29
3.6	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	32
3.7	SEQUENZIEREN	33
3.7.1	<i>Allgemeines</i>	33
3.7.2	<i>Sequenzierung der PCR-Produkte</i>	34
4	ERGEBNISSE	36
4.1	HÄUFIGKEIT VON HYPEROSTOSEN UND CRIBRA ORBITALIA	36
4.2	NACHWEIS VON HUMANER DNA	40
4.3	NACHWEIS VON PLASMODIEN-DNA	41
4.4	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSEN	43
5	DISKUSSION	46
5.1	PROBLEMATIK DER MORPHOLOGISCHEN EINTEILUNG DER KNOCHEN	46
5.2	CRIBRAHÄUFIGKEITEN	47
5.3	PROBLEM DES NACHWEISES VON ANCIENT DNA	49
5.3.1	<i>Biogene, physikalische und chemische Dekomposition</i>	49
5.3.2	<i>Kontamination</i>	51
5.3.3	<i>Inhibition</i>	52
5.3.4	<i>Lagerungsbedingungen der Knochen aus Rain am Lech</i>	53

5.4	AMPLIFIKATION VON HUMANER DNA.....	53
5.5	PCR- UND SEQUENZIERUNGS-ERGEBNISSE VON PLASMODIALER DNA.....	54
6	ZUSAMMENFASSUNG	62
7	LITERATURVERZEICHNIS	64

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Allgemeines

Malaria ist eine akute oder chronische, rezidivierende, fieberhafte Erkrankung, die durch Protozoen der Gattung Plasmodium verursacht wird. Der Name leitet sich aus dem italienischen ab und steht in Zusammenhang mit der Vorstellung von krankmachender "schlechter Luft" in Sumpfgebieten: "mal aria" [POSER & BRUYN 1999].

Der Entwicklungszyklus aller Malariaparasiten unterteilt sich in einen geschlechtlichen Zyklus, der in der Anopheles-Mücke stattfindet und in Abhängigkeit von der Außentemperatur zwischen acht und 16 Tagen dauert, sowie einen ungeschlechtlichen Zyklus, der im Menschen abläuft. Die für den Menschen infektiösen Stadien der Malariaparasiten entwickeln sich ausschließlich in Stechmückenweibchen der Gattung Anopheles. Nach dem Eintritt in den Körper mit dem Speichel der Mücke, durchläuft der Malariaparasit eine initiale reproduktive Phase in der Leber (exoerythrozytäre Phase), um anschließend die Erythrozyten zu besiedeln (erythrozytäre Phase). Dies resultiert in der Destruktion der roten Blutkörperchen und der Freisetzung weiterer infektiöser Stadien. Der Vorgang der Vermehrung in den Erythrozyten und vor allem ihr anschließender Untergang mit Freisetzung von pyrogenen Substanzen der Parasiten bewirkt die Symptomatik der Erkrankung. Charakteristisch ist das plötzliche Auftreten von hohem Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Muskelschmerzen. Befallen die infektiösen Stadien wieder neue Erythrozyten, so kommt es zum Abklingen der Symptome. Das Fieber sinkt und hinterlässt den Patienten erschöpft, um nach Vervollendung des nächsten erythrozytären Zyklus, je nach Art zwei oder drei Tage später, wieder aufzuflammen. Der Abbau der zerstörten Erythrozyten findet in der Milz statt, die sich infolge dessen stark vergrößert [MARTY & ANDERSON 1995].

Für den Menschen von Bedeutung sind die vier Arten Plasmodium vivax, ovale, malariae und falciparum. P. malariae ist der Erreger der sogenannten Malaria quartana, bei der sich die Fieberschübe durch die Synchronisierung des erythrozytären Entwicklungszyklus alle 72 Stunden wiederholen. Die Frequenz von P. malariae hat schon in früheren Zeiten signifikant fluktuiert: es war die häufigste Form in den Jahren, in denen Malaria in Europa endemisch war, ist aber heutzutage selten geworden. Eine Infektion mit P. vivax oder ovale führt zur Malaria tertiana, mit einem Auftreten der Fieberschübe alle 48 Stunden. Die exo-

erythrozytäre Phase dieser beiden Erreger kann in den Leberzellen persistieren, sich therapeutischen Mitteln entziehen und zu wiederkehrenden Erkrankungen führen. Als häufigster Erreger ist *P. vivax* weltweit sehr verbreitet, *P. ovale* hingegen ist selten. Die Malaria tertiana und quartana verlaufen in der Regel gutartig. *P. falciparum* führt zu der gefährlichsten Verlaufsform, der Malaria tropica oder, auf Grund des foudroyanten Verlaufs, auch Malaria maligna genannt. Infektionen mit dieser Plasmodiumart manifestieren sich mit sehr hohem Fieber ohne typischen Rhythmus [KAYSER et al. 1998]. Bei fehlender Behandlung können schwere zerebrale Komplikationen wie Seh- und Koordinationsstörungen, Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma auftreten. Auch ein Lungenödem, Atem- sowie Niereninsuffizienzen wurden beobachtet. Zusammen mit einem Kreislaufschock, einer Hypoglykämie, Flüssigkeits- und Elektrolytimbalancen, Spontanblutungen und einer disseminierten intravasalen Koagulation verläuft die Malaria tropica sehr fulminant und ist in 30% der Fälle tödlich [AUFDERHEIDE & RODRÍGUEZ-MARTÍN 1998].

1.1.2 Bedeutung für die Menschheit

Trotz intensiver Bekämpfungsmaßnahmen ist die Malaria auch heute noch eine der weltweit bedeutendsten Infektionskrankheiten. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [2003] ist sie in 90 Ländern von Afrika, Asien, Ozeanien, Zentral- und Südamerika und in der Karibik endemisch, so dass etwa 20% der Weltbevölkerung in malariaverseuchten Gebieten leben. Die Malaria führt zu mehr als 300 Millionen akuten Krankheitszuständen und tötet mindestens eine Millionen Menschen jedes Jahr. 90% der Todesfälle treten in Afrika, südlich der Sahara, auf. Am häufigsten betroffen sind Kinder: täglich sterben mehr als 3000 Kinder unter fünf Jahren in Afrika an Malaria [WHO 2003]. Besonders die von Plasmodium falciparum verursachte Malaria tropica kann bei Kleinkindern und Personengruppen mit mangelndem Immunschutz rasch zum Tode führen. Durch den anfangs grippeähnlichen Infektionsverlauf, dessen Symptome von vielen anderen, in den Risikogebieten verbreiteten, Infektionskrankheiten kaum zu unterscheiden sind, wird eine Behandlung oftmals zu spät eingeleitet oder verursacht unnötige Kosten innerhalb eines Gesundheitssystems dessen Grenzen längst überschritten sind. Zur Letalität tragen in vielen betroffenen Gebieten zusätzlich zu den mangelnden Ressourcen auf allen Ebenen der Gesellschaft - vom staatlichen Gesundheitswesen bis zur einzelnen Familie -, eine allgemeine Gleichgültigkeit gegenüber Krankheitssymptomen bei Kleinkindern, sowie die schlechte Gesundheitsversorgung weiter Teile der von Malaria am härtesten betroffenen Bevölkerungsgruppen bei. Betrachtet man die Auswirkungen dieser Infektionserkrankung über einen längeren Zeitraum, so erkennt man die weitreichenden sozialen und ökonomischen Konsequenzen.

zen. Jugendliche erhalten eine ungenügende Bildung, da sie einerseits wegen einer Malariainfektion wochenlang der Schule fern bleiben müssen und andererseits die Lernfähigkeit durch eine *Malaria tropica* dauerhaft vermindert werden kann. Des Weiteren kommt es zu Produktionsausfällen, weil Erkrankte mehrere Tage bis Wochen arbeitsunfähig oder in ihrer Leistungsfähigkeit stark eingeschränkt sind. Eine Infektion führt für die Betroffenen oft zu hohen Behandlungskosten und verringert den Allgemeinzustand durch bleibende Organschäden, wochenlang andauernde Schwächung des Körpers und Sekundärkrankheiten wie zum Beispiel bakterielle Infektionen. Diese komplexen Umstände und die fehlende Bereitschaft privater Unternehmen in die Malariaforschung zu investieren, als auch seitens der Eltern, bei den ersten Anzeichen einer Erkrankung professionelle Hilfe aufzusuchen - sofern dies überhaupt möglich ist - führen noch immer zu einer Vielzahl von unnötigen Todesfällen, die bei einer richtigen und vor allem frühzeitigen Behandlung weitestgehend verhindert werden könnten.

Aber auch in den "nicht betroffenen Ländern" wird die Malaria zunehmend zu einem Problem: So wurden allein im Jahr 2001 in der Bundesrepublik Deutschland rund 1040 Malariafälle mit acht Toten registriert. Durch die so genannte Flughafen-Malaria wurden in den letzten Jahren zirka 80 Personen infiziert, ohne ein malariaverseuchtes Land bereist zu haben. Betroffen sind meist Gebiete um die Zentralflughäfen in Mitteleuropa, Nordamerika und Australien [JELINEK & MÜHLBERGER 2001]. Mittlerweile nimmt die Zahl der Malariafälle weltweit wieder zu und bleibt somit ein sehr ernstzunehmendes Problem.

1.1.3 Historisches

Malaria ist wahrscheinlich älter als der Mensch selbst. Sie befällt, in ähnlicher Form, wie sie den Menschen heimsucht, auch viele Vögel, Säugetiere, Reptilien, Amphibien und Fische. Außerdem ist sie in praktisch allen Wirbeltieren zu finden. Schon in den Aufzeichnungen der Sumerer, Ägypter, Inder oder Chinesen wird ein krankhafter Zustand, oft als „Wechsel- oder Sumpffieber“ bezeichnet, beschrieben. Die genaueste Schilderung der Erkrankung lieferte Hippokrates (460-377 v. Chr.) in seiner Schrift „Über Luft, Wasser und Ortslagen“ [BERENBAUM 1997]. Er beschreibt nicht nur detailliert die Regelmäßigkeit der Fieberschübe und die umfassenden körperlichen Auswirkungen der Krankheit, sondern stellte auch den Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und der Nähe zu den Sumpfgebieten her. Auch im alten Rom war Malaria spätestens ab 200 v. Chr. verbreitet. Darauf weist die Existenz von Tempeln hin, die der *Dea Febris*, der Fiebergöttin, geweiht waren. Als Quelle der Ansteckung erkannten auch die Römer Sumpfgebiete. Marcus Terentius Varro (116-27 v. Chr.) schrieb in seinem Werk „*Res Rustica*“ („Die Sache der

Bauern“, einem Buch über die Landwirtschaft): „Man prüfe auch, ob es dort sumpfigen Boden gibt... denn gewisse winzige, für das Auge nicht sichtbare Tierchen brüten dort und gelangen mit der Luft über Mund und Nase in den Körper, wo sie Krankheiten hervorrufen, die schwerlich zu heilen sind.“ [BERENBAUM 1997]. Nach dem Niedergang des Römischen Reiches finden sich keine verlässlichen Quellen mehr, aber es darf angenommen werden, dass es immer wieder zu Epidemien kam und mit dem Bevölkerungswachstum und einer zunehmenden Reisetätigkeit verbreitete sich die Malaria langsam über ganz Europa. Im 12. Jahrhundert reichten die Malariagebiete von Spanien bis Polen und Russland und im 15. Jahrhundert galt sie als eine häufige Krankheit in Osteuropa. In England waren saisonal auftretende Fieberanfälle im 14. –16. Jahrhundert zahlreich und bis zum 17. und 18. Jahrhundert war Malaria noch weiter verbreitet und wurde von Soldaten und Expeditionsteilnehmern aus Afrika und Indien immer wieder neu eingeschleppt. Sowohl G. Chaucer (1343-1400) als auch W. Shakespeare (1564-1616) erwähnten die Krankheit in ihren Werken. In Deutschland trat die Malaria in einzelnen Gebieten seit den napoleonischen Kriegen (1803-1815) bis hin zum zweiten Weltkrieg immer wieder auf. Zwischen dem 17. und 19. Jahrhundert erreichte die Malaria-Verseuchung weltweit ihren höchsten Stand und Mitte des 19. Jahrhunderts gab es in ganz Europa nur noch sehr wenige malariafreie Gebiete. Am stärksten betroffen waren Italien, die Balkanländer und alle Mittelmeerregionen. Doch selbst nördlich gelegene Länder mit rauem, kühlem Klima wie Holland und die Ufer der Ostsee wurden zu Malariaherden. Schwer befallen waren aber auch die anderen Teile der Erde: Afrika, fast ganz Asien und der amerikanische Doppelkontinent, mit Ausnahme seiner nördlichsten und südlichsten Gebiete, waren infiziert. Australien blieb als einer der wenigen Kontinente von diesem Schicksal verschont.

Das 19. Jahrhundert brachte in Europa Hoffnung, denn 1820 glückte J. B. Caventou und J. Pelletier die Isolierung des Chinins, des eigentlichen Wirkstoffs der Chinarinde. Die Chinarinde wurde in der Mitte des 17. Jahrhunderts als erstes wirksames Mittel aus Peru nach Europa eingeführt, doch erst die Isolierung des Chinins machte die synthetische Herstellung eines billigen Präparates möglich, welches allen zugute kam. Das prophylaktisch wirkende und chemisch beständige Medikament nahm rasch den Platz der traditionellen Chinarinde ein.

Nachdem L. D. Beupers durch seine Arbeiten in Mittelamerika die tragende Funktion der Mücke bei der Verbreitung des Gelbfiebers aufgezeigt hatte, sah man auch einen Zusammenhang zwischen diesem Insekt und der Malaria. Von 1870 an begann sich in gefährdeten Gebieten der Gebrauch von Moskitonetzen durchzusetzen. Im Jahr 1880 ent-

deckte der französische Militärarzt Charles L. A. Laveran den Malariaparasiten im Blut erkrankter Soldaten. Er erhielt 1907 für seine Entdeckung den Nobelpreis. Nachdem die Briten Patrick Manson und Sir Ronald Ross 1898 im Magen und in den Speicheldrüsen von Mücken ähnlich Organismen wie die durch Laveran beschriebenen fand, gelang einem italienischen Team unter Giovanni B. Grassi 1899 der Nachweis der Überträgerfunktion der weiblichen Anopheles-Mücken. Damit waren die beiden wichtigsten Entdeckungen gemacht: man kannte den Erreger, das Plasmodium, und den Überträger, die Anopheles. Dieses Wissen machte den gezielten Angriff gegen die Malaria möglich. Es wurde ein Kampf gegen die Anopheles-Mücke gestartet. In stehende Gewässer schüttete man gezielt Öl, um den dort lebenden Stechmückenlarven die Sauerstoffzufuhr zu unterbinden und damit das Atmen unmöglich zu machen. Larvenfressende Fischarten wurden in die Brutgewässer ausgesetzt und Sümpfe trockengelegt. Die adulten Stechmücken vernichtete man durch das Versprühen von Insektiziden, vor allem DDT. Nach und nach konnten auch verschiedene wirksame medikamentöse Malariamittel hergestellt werden.

Ermutigt durch die frühen Erfolge startete die WHO 1956 ein vielversprechendes Malaria-Bekämpfungsprogramm. Durch den gleichzeitigen Angriff gegen den Parasiten (mit Chloroquin) und den Überträger (mit DDT) sollte die Malaria weltweit ausgerottet werden. Das Programm verlief zunächst sehr erfolgreich. Die Zahl der bekannten Malariafälle, die 1943 noch über 300 Millionen betragen hatte, fiel auf 100 Millionen im Jahr 1970 [SIMPSON 1999]. Doch aufgrund der Entwicklung von Medikamentenresistenzen durch die Parasiten und von Resistenzen gegen Insektizide durch die Mückenvektoren erlitt die Kampagne der WHO schwere Rückschläge. Mitte der 60er Jahre stieg die Zahl der Malariaerkrankungen weltweit wieder an und im Jahr 1972 musste das Ausrottungsprogramm als gescheitert deklariert werden, ohne dass die WHO versucht hätte, die Malaria in den von der Krankheit am meisten betroffenen Ländern Afrikas zu bekämpfen [BERENBAUM 1997]. Die Aufmerksamkeit wandte sich nun der Kontrolle und Eindämmung der Krankheit zu. Obwohl die Erwartungen enttäuscht wurden, konnten doch beachtliche Erfolge erzielt werden. Europa ist seit 1975 malariafrei, meldet also drei Jahre hintereinander keinen von seinem Boden ausgehenden Malariafall mehr. Auch im größten Teil der asiatischen Sowjetunion, Chinas, Japans, Hongkongs, der Maskaren, des amerikanischen Kontinents nördlich und südlich der Tropen, Südafrikas und in Teilen Nordafrikas ist die Malaria besiegt.

Abschließend ist zu sagen, dass die Durchsetzung eines solchen Ausrottungs- beziehungsweise Eindämmungsprogrammes kompetenter engagierter Menschen, ausreichender und über mehrere Jahre gesicherter finanzieller Mittel und eines politischen Willens bedarf.

Dieser sollte durch entsprechende Autorität und eine mindestens ein Jahrzehnt währende Kontrolle des betroffenen Gebietes abgestützt sein. Solche Voraussetzungen sind jedoch leider für die am meisten bedrohten Entwicklungsländer fast unerfüllbar.

1.2 Thema und Fragestellung

Neben der Verwendung der Mikroskopie, als praktischste und verlässlichste Methode, um Malariaparasiten im gefärbten Blutaussstrichen zu erkennen hat sich der molekulare Nachweis mittels PCR in den letzten Jahren immer mehr durchgesetzt. Mit dieser neuen Möglichkeit bestand die theoretische Chance Malaria auch in archäologischen Proben nachzuweisen und damit noch offene Fragen z.B. bezüglich der Geschichte und Evolution der Erkrankung sowie der geographischen Verbreitung der Malariaparasiten zu beantworten. Vergleicht man diese sogenannte biomolekulare Archäologie mit der traditionellen Paläopathologie, die auf der Morphologie der Knochen basiert, so ist es heutzutage möglich, Krankheiten, die wie Malaria keine spezifischen Läsionen am Skelett hervorrufen, aufzudecken.

Aus schriftlichen Überlieferungen ist bekannt, dass es im 18. und 19. Jahrhundert in Deutschland, vor allem im Raum Mannheim, begünstigt durch die Lage an Neckar und Rhein, Malariainfektionen gegeben hat [BERENBAUM 1997]. Die Stadt Rain am Lech, aus der das Knochenmaterial für die Versuche dieser Arbeit stammt, liegt im Bereich der Mündung des Lechs in die Donau. Durch wiederholte Überschwemmungen der Landschaft entstand dort ein Sumpfgebiet, eine ideale Brutstätte für Mücken. Einen weiteren Hinweis auf Malariainfektionen lieferte der Physikatsbericht eines Rainer Arztes aus dem Jahr 1857, in dem malariatypische Krankheitszustände bei einigen Bürgern der Stadt beschrieben werden [LÖFFELMEIER 1995]. Aufgrund dieser Indizien wurde die Vermutung aufgestellt, dass im Gebiet Rain am Lech früher Malaria geherrscht haben könnte.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Plasmodien DNA im Material von Rain am Lech nachzuweisen und damit den bisher fehlenden molekularbiologischen Nachweis von Malariainfektionen für den Raum Süddeutschland zu liefern. Um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu verbessern, wurden aus den Skeletten gezielt Knochen mit den makroskopischen Veränderungen einer Cribra orbitalia oder porotischen Hyperostosen, als Hinweis für eine, möglicherweise durch Malaria verursachte, Anämie, ausgewählt. Im Falle eines positiven Ergebnisses galt es herauszufinden, welche der Plasmodienarten bevorzugt auftrat. Des Weiteren sollte die Korrelation zwischen einer Malariainfektion und dem makromorphologischen Merkmal einer Cribra orbitalia untersucht werden.

2 Material

2.1 Fundort

2.1.1 Die Stadt Rain am Lech

Das zu untersuchende Knochenmaterial stammt aus dem Gebeinhaus der Allerheiligenkapelle der Stadt Rain am Lech. Das Gebeinhaus enthält die exhumierten Knochen des städtischen Friedhofes, der auf Grund der Befestigung (Stadtmauer) nicht erweiterbar war und somit die Gräber nach einiger Zeit aufgelassen und neu belegt werden mussten.

Die 7711 Hektar große Stadt liegt in Schwaben im Landkreis Donauwörth, im Donaumoos zwischen Lech und Donau und zählt zur Zeit zirka 8400 Einwohner (Abbildung 1) [www.rain.de].



Abbildung 1: Rain am Lech

Die Allerheiligenkapelle, die sich mitten in der Stadt neben der Pfarrkirche befindet, hat seit der Fertigstellung des Heimatmuseums 1988 keine Funktion mehr. Sie steht seit dem Jahr 1829 im Besitz der Stadt Rain. Diese seltene Situation, dass nicht die Kirche, sondern ein öffentlicher Träger Eigentümer des Karners ist, ermöglichte die Forschungsarbeit an den Gebeinen. Der Freundeskreis Alt Rain e.V., ein Verein der Stadt Rain, der seit dem 10. Juni 1996 besteht, hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Allerheiligenkapelle und den darin befindlichen Altar zu sanieren. Im Rahmen dieser Sanierungsarbeiten bestand für unser Team die Möglichkeit die Knochen für einen begrenzten Zeitraum zu entnehmen und diese zu untersuchen.

2.1.2 Historische Einordnung

Das exakte Gründungsdatum der Stadt Rain am Lech ist nicht überliefert. Erste Erwähnungen weisen auf eine Gründung durch den bayerischen Herzog Otto II. gegen 1250 AD hin. Rain war von Beginn an als eine Grenz- und Festungsstadt mit Stadtmauer konzipiert, was den Platz für den Friedhof um die Stadtpfarrkirche sehr begrenzte. In den Jahren 1464-1471 wurde deshalb zusätzlich die als Gebeinhaus dienende Allerheiligenkapelle mit ihrer Gruft gebaut. In regelmäßigen Abständen räumte man den überfüllten Friedhof und lagerte die Gebeine in die Kapelle aus [DORN 1985]. Durch die ansteigende Bevölkerungszahl und die Verwicklung der Stadt in verschiedenste Kriege (Tabelle 1) sowie drei Pest-Epidemien (1348-1351, 1634 und 1649) wurde ein weiterer Friedhof nötig. Aus diesem Grund entstand 1600 die St. Rochuskirche mit dem zugehörigen Rochusfriedhof außerhalb der Stadtmauern.

Tabelle 1: Kriege in und um Rain

Jahr:	Krieg:
-1380-1388	Augsburger Krieg
-1446	Wittelsbacher Krieg
-1504	Landshuter Erbfolgekrieg
-17. Jahrhundert	30jähriger Krieg (mehrmals)
-1702-1704	Spanischer Erbfolgekrieg
-1742-1745	Österreichischer Erbfolgekrieg

Für viele Jahre wurden der Stadtpfarrfriedhof und der Rochusfriedhof parallel zueinander genutzt. Im Jahr 1803 wurden, im Rahmen der Säkularisation, die Beerdigungen auf dem inneren Friedhof beendet. Da die Kapelle ihre Funktion als Gebeinhaus damit verlor, kann man davon ausgehen, dass die darin gelagerten Knochen aus dem 15. bis 18. Jahrhundert stammen [DORN 1985], zumal die Kapelle seit ca. 1400 n. Chr. als Karner benutzt werden konnte.

2.2 Fundmaterial

Bei der Räumung des Karners wurden insgesamt 16940 Gebeine vorgefunden (Tabelle 2). Da die Gräber bei der Auslagerung aus dem Friedhof aufgelöst und die Knochen ungeordnet in die Allerheiligenkapelle eingeräumt wurden, war eine individuelle Zuordnung der Knochen nicht mehr möglich.

Tabelle 2: Anzahl der im Karner enthaltenen Gebeine

Knochen:	Menge:
Schädel	2547
Femur rechts	2491
Femur links	2180
Tibiae rechts	1780
Tibiae links	1780
Os coxae rechts	1655
Os coxae links	1655
Humeri rechts	1426
Humeri links	1426
gesamt	16940

Bei einer Anzahl von 2547 Calvarien kann von einer Mindestzahl von 2547 Individuen ausgegangen werden. Die Anzahl der Verstorbenen wird für den Zeitraum von 1696-1800 laut dem Sterberegister von Rain am Lech mit 2282 Personen angegeben. Rechnet man diese Summe an Todesfällen entsprechend der geschätzten Einwohnerzahl im Zeitraum von 1400-1800 hoch, so kommt man auf eine Zahl von rund 5100 Verstorbenen. Somit werden bei dieser Untersuchung 2547 von geschätzten 5100 Bestatteten erfasst. Das entspricht der Hälfte aller Todesfälle von 1400-1800.

Bei der Entnahme der Gebeine wurden diese sortiert, katalogisiert und makroskopische Pathologien notiert. Bei 1097 der Calvaria und bei 461 der Langknochen wurden folgende Auffälligkeiten gefunden: Traumata, Hyperostosen, degenerative Veränderungen, Entzündungen, Tumoren, Osteome, Entwicklungsstörungen, Normvarianten, Sonstige, Osteome und Exostosen. Die prozentualen Verteilungen, insbesondere der pathologischen Veränderungen, sind in Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

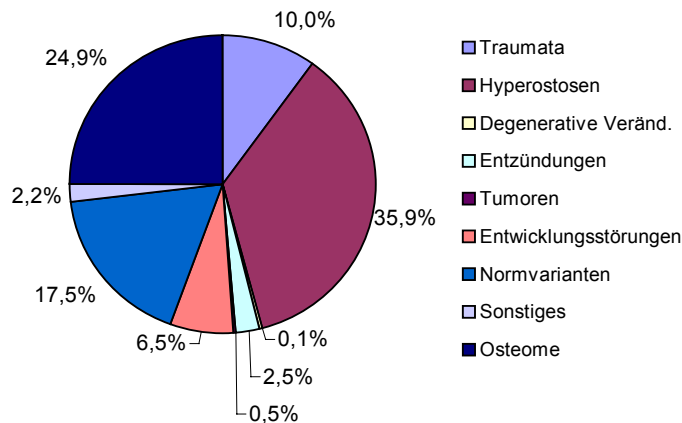


Abbildung 2: Auffälligkeiten der Calvaria

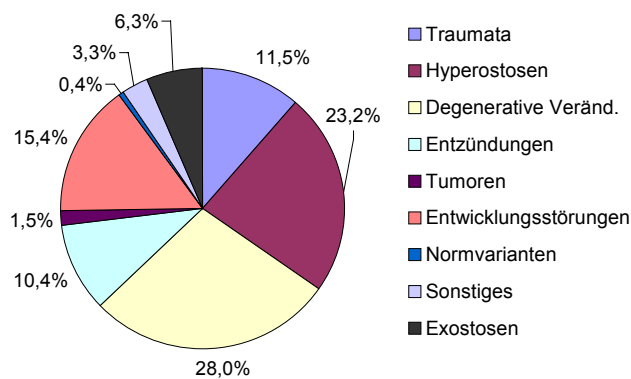


Abbildung 3: Auffälligkeiten der postkraniellen Skelette

Bei den vorgefundenen Calvaria bestanden an makroskopischen Pathologien am häufigsten Hyperostosen mit 35,9% (394/1097). An zweiter Stelle waren Osteome mit 24,9% (273/1097). Die Schädel wurden des weiteren speziell auf Cribra orbitalia untersucht. Aufgrund des sehr häufigen Vorkommens werden diese Ergebnisse getrennt aufgeführt (siehe 4.1). Von 2547 untersuchten Schädeln fand man bei 797 Veränderungen im Sinne einer Cribra orbitalia. Der Prozentsatz der Cribrahäufigkeit lag somit bei 31,4%.

Wie aus Abbildung 3 zu entnehmen ist, fielen bei den Langknochen mit 28,0% (129/461) vor allem degenerative Gelenkveränderungen auf. Am zweithäufigsten waren ähnlich wie bei den Schädeln die Hyperostosen mit 23,2% (107/461).

Das Team der Arbeitsgruppe Paläopathologie der LMU München führte unter der Leitung von Dr. Albert Zink eine Geschlechts- und ektokranielle Altersbestimmung anhand der Schädel in Anlehnung an FEREMBACH et al. [1979] durch. Die Daten wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Immature Individuen wurden anhand der Länge von Langknochen und dem Zahnstatus in die Altersstufen Neonatus (0-6 Monate), Infans I (6 Monate-6 Jahre), Infans II (7-12 Jahre) und Juvenil (13-20 Jahre) eingeteilt. Anhand des Nahtschlusses der Cranium-Nähte wurden adulte Individuen in Altersstufen von jeweils rund 10 Jahren untergliedert. Bei einigen Calvaria war die genaue Zuordnung zu einer Altersklasse jedoch nicht möglich. Das Geschlecht wurde morphologisch bei 2049 erwachsenen Schädeln bestimmt. Das sind 80,4% aller vorgefundenen Schädel. 498 Calvaria waren den Altersklassen Neonatal, Infans I und Infans II (0-12 Jahre) zuzuordnen. Diese wurden in die Untersuchung nicht miteingeschlossen, da die morphologische Geschlechtsbestimmung im Kindesalter mit großen Unsicherheiten behaftet ist [ZINK 1999]. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Altersbestimmung der Population aus Rain am Lech dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass der Anteil der Individuen der Altersklasse 21-30 Jahre überwiegt. Insgesamt konnten 2031 Schädel einem Geschlecht zugeordnet werden. Bei 18 Calvaria der Altersstufen juvenil bis älter als 60 Jahre oder Alter unbestimmt konnte kein Geschlecht festgelegt werden. 80 der 2547 Schädel konnten aufgrund des schlechten Erhaltungszustandes lediglich auf die Altersstufe „erwachsen“ festgelegt werden.

Tabelle 3: Altersverteilung der Population aus Rain

Altersstufe	Anzahl der Individuen
Neonatus	2
Infans I	202
Infans II	288
Infans I oder II	6
Juvenil	146
21-30 Jahre	820
31-40 Jahre	522
41-50 Jahre	268
51-60 Jahre	132
älter 60 Jahre	81
erwachsen, Alter unbestimmt	80
gesamt	2547

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Alters- und Geschlechtsbestimmung der Individuen aus Rain am Lech kombiniert dargestellt.

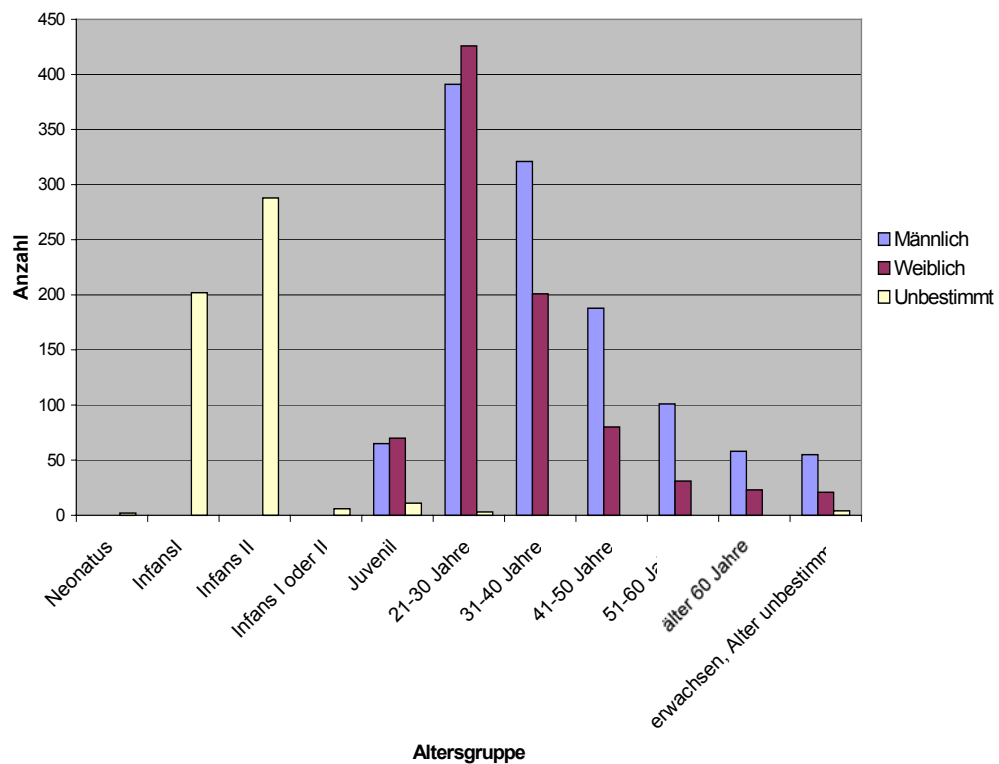


Abbildung 4: Alters- und Geschlechtsverteilung der Population aus Rain

2.3 Auswahl des Probenmaterials

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden diejenigen Knochen verwendet, welche die makroskopischen Veränderungen einer Cribrra orbitalia oder porotische Hyperostose zeigten. Den Begriff Cribrra orbitalia findet man bereits sehr früh in der medizinischen Literatur. WELCKER beschreibt im Jahr 1888 an den Orbitadächern auftretende Porositäten und führt die Bezeichnung Cribrra orbitalia ein. Im angelsächsischen Sprachraum findet überwiegend der Begriff „porotic hyperostosis“ Verwendung [z.B. ANGEL 1966; EL-NAJJAR et al. 1976], wobei hier oft auch Auflagerungen des Schädeldaches mit eingeschlossen werden. In der Tat treten Veränderungen an der Schädeloberfläche fast ausschließlich in Verbindung mit Cribrra orbitalia auf, wohingegen die Hyperostose des Orbitadaches vielfach als isoliertes Merkmal in Erscheinung tritt [STUART-MACADAM 1989]. Porotische Hyperostosen finden sich dann am häufigsten am parietalen und okzipitalen Schädel [CAPASSO 1998], treten aber auch an Langknochen auf. Das makroskopische Aussehen beruht auf einer Hypertrophie des blutbildenden Knochenmarks, die zu einer Spongiosierung des Orbitadaches führt [STEINBOCK 1976]. Mikromorphologisch kann man eine außerordentliche Verdickung der Diploe mit einer radialen Anordnung der Trabeculae und eine Ausdünnung der Kompakta erkennen [ANGEL 1966; CAPASSO 1998]. Dabei ist die Tabula externa arrodirt und die Tabula interna erscheint ausgedünnt [CAPASSO 1998]. Es entsteht makroskopisch eine sieb- oder corallenartige Struktur, die meist symmetrisch an den Orbitadächern zu erkennen ist. Aufgrund dieses Erscheinungsbildes werden die Veränderungen anschaulich auch als spongiöse Hyperostosen bezeichnet [SCHULTZ 1986]. Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen Beispiele für die makroskopischen Veränderungen.

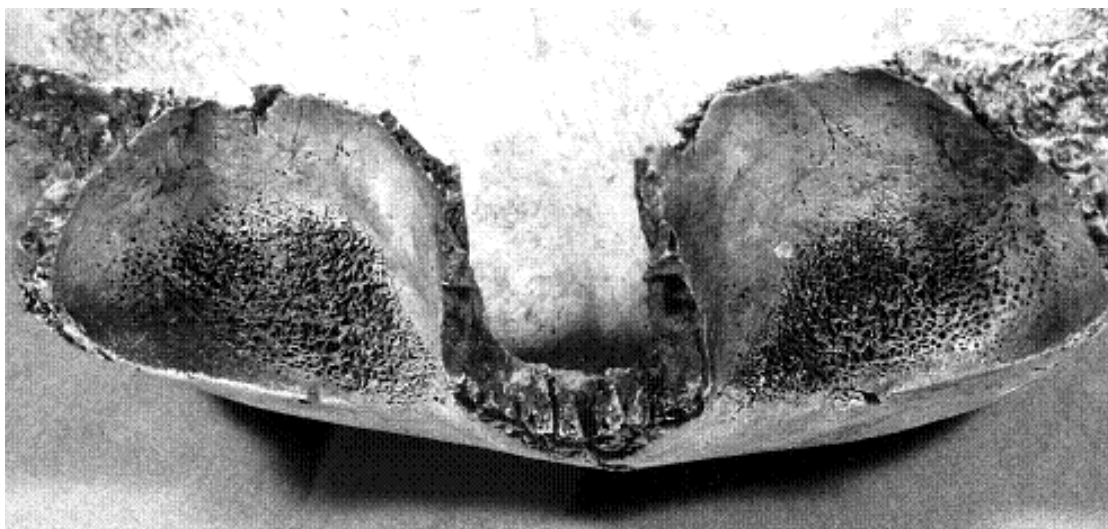


Abbildung 5: Cribrra orbitalia:
Porositäten an den Orbitadächern; Ansicht von caudal.



Abbildung 6: Hyperostose:
Metaphyse einer Tibia mit hyperostotischen Auflagerungen; Ansicht von ventral.



Abbildung 7: Porotische Hyperostose:
Auflagerungen des Schädeldaches im Bereich des Os parietale und occipitale; Ansicht von dorsal.

Die Ursachen dieser Veränderungen sind vielfältig. Häufig wird die Cribra jedoch als unspezifisches Anzeichen einer anämischen Erkrankung angesehen, die somit auch auf eine Malariainfektion zurückzuführen sein könnte. Da damit ein Hinweis für den Befall des Körpers mit Plasmodien gegeben ist, wurde nur solche Knochen für die weiteren Untersuchungen ausgewählt, die Zeichen einer dieser beiden Veränderung zeigten.

Insgesamt wurden 20 Knochen für die molekularbiologischen Untersuchungen ausgewählt. Darunter zehn Langknochen (vier Femores, sechs Tibiae), die flächig bis streifige Auflagerungen zeigten (siehe Abbildung 6) und zehn Schädelknochen, von denen vier sieb- bis korallenartige Veränderungen an den Orbitadächern, im Sinne einer Cribra orbitalia zeigten (siehe Abbildung 5), sowie sechs mit porotischen Hyperostosen (siehe Abbildung 7) im Bereich des Os parietale bzw. occipitale.

2.4 Verwendete Geräte

Autoklaven, Heraeus Instruments

Brutschrank, Heraeus Instruments

Computer, ABI PRISM™ 310 Gene Analyser, Perkin Elmer

Computer, Deskpro, Compaq

Computer, Image Master®, Pharmacia Biotech VDS (Video Documentation System for Gel Electrophoresis)

Dentalbohrmaschine, MN Dental Instruments, München

DNA Thermocycler Typ Primus, MWG AG, Biotech

DNA Thermocycler Typ Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer

Elektrophoresekammer Typ Mupid 21 (10x15cm), Cosmo Bio Co., LTD.

Gefrierschrank Typ economic super, Bosch

Kühlschrank Typ ecc (energy computed controll), Liebherr

Kugelschwingmühle Typ MM2, mit Zirkonium-Mahlbechern, Retsch

Magnetrührer Typ MR 2002, Heidolph

Mikrowellenherd Typ MWE 700, Bauknecht

Präzisionswaage Typ Navigator™, Ohaus®

Rotationsmischer, Agitateur rotatif, Marke unbekannt

Speed Vac Typ DNA 110, Savant

Stromversorgung, Mupid-21, Cosmo Bio Co., LTD.

Thermomixer Typ compact, Eppendorf

UV-Lampe, 245 nm, Marke unbekannt

UV-Transluminator Typ Mighty Bright, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco
Vortexer Typ MS 2, IKA- Labortechnik
Werkbank, steril, Typ Herasafe, Heraeus Instruments
Zentrifuge Typ 2-4, Sigma
Zentrifuge Typ 1.OR, Heraeus Universalzentrifuge, Laborteam Schultheiss
Zentrifuge Typ 5417R, Eppendorf
Zentrifuge Typ 5415CR, Eppendorf

2.5 Einwegmaterial und Hilfsmittel

Aluminiumfolie S, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dental-Diamant-HM-Fräse, MN Dental Instruments, München
Dental-Diamant-Trennscheibe, MN Dental Instruments, München
Dye ExTM Spin Kits (50), Quiagen GmbH, Hilden
Eppendorf Reaktionsgefäße safe lock (2,0 ml), Eppendorf
Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns, Quantum Prep[®], Biorad
Laboratories
Genetic Analyser Sample Tubes (0,5 µl), Perkin Elmer, Applied Biosystems Division
Kleenex[®] Tücher, Kimberley-Clark
MicroconTM 30 Filter, Millipore GmbH, Eschborn
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), Eppendorf
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
Reaktionsgefäße (0,6 ml), Biozym, Oldendorf
Skalpellklinge (22), BAYHA
ThermoTubes (0,2µl), PEQ LAB Biotechnologie GmbH
Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Safeskin[®], California
Zentrifugenröhrchen PP (14 ml), Josef Peske oHG, Aindling

2.6 Chemikalien

Aceton, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
Agarose, SeaKem[®] LE agarose, Biozym Diagnostik

Aqua ad injectabilia, B. Braun, Melsungen AG
Aqua bidest, H. Kerndl GmbH, Weißenfeld
Bromphenol-Blau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Diatomeen-Erde, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNA-Leiter (100 bp), Promega Corporation, Wisconsin (USA)
DNA ZAP, Solution 1 und 2, Ambion Inc., Texas (USA)
EDTA (Ethyldinitrotetraacetat Dinatrium-Dihydrat), Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen
Eisessig, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
Ethanol absolut, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Guanidinium-Thiocyanat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HCl, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
Natriumhypochloridlösung (4%), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris (Tri[hydroxymethyl]aminethan), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris-Cl, Merck Eurolab, GmbH, Ismaning

2.7 Reagenzien und Enzyme

Ampli*Taq* Gold™ DNA-Polymerase (5 U/μl), Applied Biosystems, Weiterstadt
DNA Polymerisations-Mix (20 mM), Applied Biosystems, Weiterstadt
DNA Sequencing Kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction enthält A-, C-,
G-, T-Dye Terminator; dTTP, dATP, dCTP, dTTP; Tris-HCl (pH 9,0); MgCl₂;
thermal stable pyrophosphatase; Ampli*Taq* DNA Polymerase), ABI PRISM™ P.E.
Applied Biosystems
MgCl₂-Solution (25 mM), Applied Biosystems, Weiterstadt
PCR Gold Puffer (10 x, enthält: 150 mM Tris/HCl, pH 8,05, 500 mM KCl), GeneAmp® ,
Applied Biosystems, Weiterstadt
Primer ACT 1/2 (50 pmol), Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm
Primer MAL 1/2, MAL 3/4, MAL 5/6, MAL 7/8a/8b, MAL 9/10, MAL 11/12 (50 pmol),
Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm
POP-6™ (Performance Optimized Polymer 6), ABI PRISM, P.E. Applied Biosystems,
Weiterstadt

Proteinase K, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Termination ready mix, Applied Biosystems, Weiterstadt

2.8 Standard Lösungen und Puffer

Diatomeen-Erde:

- Diatomeen-Erde	5,0 mg
- H ₂ O	25,0 ml
- HCl (32% w/v)	250,0 µl

Ethidiumbromid-Lösung:

- Ethidiumbromid	0,1 µl
- TAE-Puffer	1,0 ml

GSCN-Lösung (Guanidinisocyanat-Lösung):

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

Ladepuffer (6x):

- Bromphenolblau	75 mg
- Glycerol (30 %)	4,5 ml
- Aqua bidest	ad 15 ml

TAE-Puffer (20x):

- Tris-Base	242 g
- Eisessig	57,1 ml
- EDTA (0,5 M; pH 8,0)	18,61 g

3 Methoden

3.1 Bestimmung der Häufigkeit von Hyperostosen und Cribra

Der erste Schritt der Untersuchungen beinhaltet die Beschreibung morphologischer Auffälligkeiten an den Skelettelementen. An dem ausgewählten Material wurden makroskopisch sichtbare Veränderungen aufgezeigt, die in Form, Struktur, Beschaffenheit oder Kontinuität von der normalen Anatomie abweichen. Die Pathologien wurden sofort bei der Entnahme der Knochen aus dem Karner notiert und elektronisch erfasst. Anhand dieser Daten wurde eine Aufstellung der Häufigkeiten für die verschiedenen Veränderungen, unter anderem auch für Hyperostosen und Cribra gemacht (siehe 2.7). Die Cribrahäufigkeit wurden des weiteren, unter Zuhilfenahme der von Dr. Albert Zink und seinem Team zur Verfügung gestellten Daten, bezüglich der Alter- und Geschlechtsverteilung analysiert.

3.2 Probenentnahme und –aufbereitung

Die Entnahme der Knochen aus dem Gebeinhaus machte eine oberflächliche Reinigung notwendig. Dafür wurden die Knochen mit einer weichen Bürste vorsichtig gesäubert. Für die gezielte Entnahme von Knochenmaterial zur molekularen Analyse stand eine Dentalbohrmaschine mit Diamant-Trennscheibe sowie einer Fräse zur Verfügung. Um die Gefahr der Kontamination möglichst gering zu halten, wurden die Knochen in einer sterilen Werkbank bearbeitet. Nach jeder Benutzung wurden mögliche DNA-Reste durch UV-Lichtbestrahlung (254 nm) zerstört. Die Trennscheibe und Fräse wurden nach jeder Benutzung gereinigt und hitzesterilisiert. Vor dem Heraussägen der Probe wurde der entsprechende Bereich, um oberflächliche Kontaminationen zu eliminieren, mit 0,5% Natriumhypochloridlösung gereinigt, anschließend mit der Fräse 1-2 mm der oberflächlichen Knochenschicht abgeschliffen und dabei das Knochenmehl abgesaugt [HUMMEL et al. 1995]. Das zu analysierende Material wurde in einer Größe von ca. 1,5 x 1,5 cm in der Regel dort entnommen, wo sich der vermutete pathologische Prozess abgespielt hat oder wo sich eine morphologische Ausprägung eines pathologischen Geschehens feststellen ließ. Um die Knochenproben bis zur Pulverisierung zu zerkleinern wurden diese bei 25 Hz in eine Kugelschwingmühle gegeben. Das Vermahlen der Probe bewirkt eine Vergrößerung der Oberfläche und somit eine Erleichterung der anschließenden Dekalzifizierung und DNA-Extraktion. Danach wurde das Knochenmehl abgewogen und jeweils 1 g in sterile Tubes

abgefüllt, in denen es kurzfristig bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung lagerte.

3.3 DNA-Extraktion

Die Extraktion von DNA aus Knochenmehl erfolgte in Anlehnung an HAAS et al. [2000]. 1 g Knochenmehl wurde mit 2,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), sowie 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) in einem 14-ml-Zentrifugenröhrchen vermengt. Bei Raumtemperatur fand so für 72 Stunden eine Inkubation im Rotationsmixer statt, wobei jeweils nach 24 Stunden 25 µl Proteinase K (20 mg/ml), zur Denaturierung der Proteine, vor allem von Kollagen, hinzugefügt wurden [EVISON et al. 1997]. Während dieser Inkubationszeit reagiert der Chelatbildner EDTA mit den Ca^{2+} -Ionen aus dem Hydroxylapatit des Knochens unter Bildung eines Calcium-EDTA-Komplexes, was zur Dekalzifizierung des Homogenisats führt. Nach Ablauf der 72 h wurde bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. 0,5 ml des Aliquot, in dem sich die gelöste DNA nun befindet, wurden abpipettiert und mit 1 ml Guanidinisocyanat-Lösung sowie 50 µl Diatomeen-Erde vermengt [BOOM et al. 1990]. Bei Raumtemperatur fand eine weitere Inkubation für 2 h im Rotationsmixer statt, bei der die DNA an die Diatomeen-Erde bindet. Anschließend wurde bei 13 000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde zweimal mit 1,5 ml Ethanol (70%) und einmal mit 1,5 ml Aceton gewaschen. Dazu gibt man jeweils die Lösung zu dem Pellet, mischt das Ganze auf dem Vortexer, zentrifugiert kurz und verwirft den Überstand. Nach dem Trocknen des Pellets im Brutschrank für 10 min bei 56°C, wurde die DNA ausgewaschen. Zu dem Pellet wurden 120 µl steriles H_2O gegeben und dieses dann 15 min bei 56°C im Thermomixer bei 800 rpm geschüttelt. Zu Beginn dieses Vorganges sowie alle 5 min muss gevortext werden. Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm für 10 min wurden 80 µl des Überstandes mit 300 µl H_2O auf einen Microcon-30 Filter gegeben. Diese Zentrifugationsfilter dienen der Aufkonzentration der DNA, die sich nun in der wässrigen Phase befindet. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 11 000 rpm über 15 min, bei der die DNA an den Filter bindet. Der Microcon-30-Filter wurde umgedreht, auf ein neues Tube gesteckt und bei 11 000 rpm für weitere 5 min zentrifugiert. In dem Tube befindet sich anschließend ein Tropfen aufkonzentrierte DNA. Diese wurde in 20 µl sterilem H_2O gelöst und in ein steriles Tube abgefüllt. Bis zum Einsatz in die PCR lagerte die DNA bei -20°C.

3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

3.4.1 Allgemeines

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Sie wurde 1985 von R. SAIKI, H. EHRLICH und K. MULLIS [SAIKI et al. 1985] entwickelt und basiert auf einer enzymatischen Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes, der durch zwei Oligonukleotide (Primer) flankiert wird. Nach der Denaturierung der DNA hybridisieren diese Primer mit je einem der „aufgeschmolzenen“ Einzelstränge der Ziel-Sequenz. Wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung der DNA-Fragmente, spezifischer Bindung der Primer an die Komplementär-Sequenz („annealing“) und DNA-Synthese von den Primern ausgehend, mittels einer DNA-Polymerase („extension“), führen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Theoretisch kommt es dabei zu einer Verdoppelung dieser nach jedem Zyklus [NEWTON & GRAHAM 1994]. Die tatsächlichen Amplifikationsraten sind allerdings niedriger, da die Reaktionsausbeute der einzelnen Zyklen nicht wirklich 100% entspricht. Durch die Verwendung einer hitzestabilen Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* anstelle des ursprünglich verwendeten *E. coli* Klenow-Fragmentes [SAIKI 1988], das bei hohen Denaturierungstemperaturen inaktiviert wurde, konnte die Methode wesentlich verbessert und eine Automatisierung ermöglicht werden.

3.4.2 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Die PCR ist eine sehr gut geeignete molekularbiologische Methode um selbst kleinste Spuren von DNA zu analysieren. Besonders für Untersuchungen von anthropologischen Funden erweist sich ihre Sensibilität als Vorteil, da es sich bei der Analyse von ancient DNA um ein Arbeiten im Mikrospurenbereich handelt. Bedingt durch diese Sensibilität ist jedoch auch die Anfälligkeit der Reaktion gegenüber Kontaminationen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Verfahren zur Minimierung des Kontaminationsrisikos angewandt.

Um Verunreinigung des Probenmaterials mit exogener rezenter DNA, einer Kontaminationsquelle die vor allem bei der Analyse menschlicher DNA berücksichtigt werden muss [KITCHIN et al. 1990] zu vermeiden, wurden folgende Vorkehrungen getroffen:

- Zu jeder Zeit wurden Einmalhandschuhe getragen und häufig gewechselt [HUMMEL & HERMANN 1993].
- Die Probenvorbereitung fand auf einer sterilen Werkbank statt.

- Die Arbeitsflächen wurden regelmäßig mit DNA-ZAP gereinigt.
- Nach jedem Arbeitstag wurde die Werkbank für mindestens drei Stunden mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um möglicherweise an den Oberflächen anhaftende moderne DNA zu inaktivieren [CONE & FAIRFAX 1993].

Um Kreuzkontaminationen, also Verschleppungen von Spuren der Proben untereinander, z.B. durch Mahlstaub, zu vermeiden wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen eingehalten:

- Alle mit den Proben in Berührung gekommenen Gerätschaften wurden gründlich mit Aceton gereinigt [HUMMEL et al. 1995; SCHMID et al. 1995].
- Mehrfach verwendete Materialien wie z.B. Glasgefäße wurden nach Gebrauch gereinigt und autoklaviert.
- Es wurden nur sterile, aliquotierte Reagenzien verwendet [HUMMEL 1992].

Beim sogenannten „carry-over“ [KWOK 1989; LONGO 1990; NIEDERHAUSER et al. 1994] ist die Kontamination durch winzigste Mengen bereits amplifizierter DNA auszuschließen. Schon hochgesaugtes Aerosol mit einigen wenigen Molekülen DNA genügt, um – bei Verwendung der gleichen Pipette für die PCR-Ansätze und die Analyse der PCR-Produkte – ein falsch positives Ergebnis zu erzeugen [NIENHAUS & GEHRMANN 1991]. Um dies zu vermeiden wurden folgende Vorkehrungen getroffen:

- Es wurden ausschließlich Pipetten mit sterilen Filterspitzen verwendet.
- Es wurde eine strikte räumliche Trennung des Labors und sämtlicher Arbeitsgerätschaften wie beispielsweise Kühlschränke, Tiefgefriergeräte sowie Pipetten und Einwegmaterialien in Prä- und Post-PCR-Abteilung bzw. –Geräte vorgenommen [HUMMEL 1992; ORREGO 1990].
- Positivkontrollen wurden grundsätzlich nicht durchgeführt, um die Anzahl der PCR-Produkte nicht zu vergrößern.

Um eventuelle Verunreinigungen zu erkennen wurden geeignete Kontrollen durchgeführt. Dies beinhaltete zwei Extraktionskontrollen (Parallelextraktionen, in denen kein Gewebe eingesetzt wird), sowie eine PCR-Kontrolle (PCR- Ansatz ohne Extrakt).

3.5 DNA-Amplifikation

Alle Inhaltsstoffe des PCR-Ansatzes wurden zu einem Mastermix zusammenpipettiert, auf 0,2 ml-Tubes aufgeteilt und als letzter Schritt die DNA hinzugefügt.

Der Mastermix bestand aus den folgenden Einzelbestandteilen:

- dH₂O
- 10 x PCR-Puffer

- MgCl₂ (25 mM)
- Primer (Sense, 50 pmol)
- Primer (Antisense, 50 pmol)
- Taq-Polymerase (5 U/μl)
- DNA-Template (variable Konzentration)

3.5.1 Amplifikation von humaner DNA

Um zu testen, ob amplifizierbare, das heißt nicht inhibierte DNA in den Proben vorhanden ist, wurde ein 202bp großes Fragment des humanen β-Aktin Gens amplifiziert [GHOSSEIN et al. 1994].

Primersequenzen [GHOSSEIN et al. 1994]:

ACT 1: 5` -CCTTC CTGGG CATGG AGTCC TG- 3`

ACT 2: 5` -GGAGC AATGA TCTTG ATCTT C- 3`

Tabelle 4 zeigt die Konzentrationen und Volumenansätze der einzelnen Reagenzien.

Tabelle 4: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für β-Aktin.

Ingredienz	Ausgangskon- zentration	Zielkonzentra- tion	Volumen für Mastermix	Volumen pro Ansatz
Puffer	10 fach	1 fach	30 μl	2,0 μl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	24 μl	1,6 μl
dNTP	20 mM	0,2 mM	3,0 μl	0,2 μl
Taq-Polymerase	5 U/μl	0,05 U/μl	3,0 μl	0,2 μl
Primer Act 1	50 pM	1 pM	6,0 μl	0,4 μl
Primer Act 2	50 pM	1 pM	6,0 μl	0,4 μl
dH ₂ O			213 μl	14,2 μl
DNA	variabel			1,0 μl

Gesamtreaktionsvolumen pro Ansatz: 20μl

Der Mastermix wurde auf 10 Proben, vier Extraktionskontrollen und eine PCR-Kontrolle aufgeteilt. Die Reaktion wurde im DNA Thermocycler durchgeführt. Die Reaktionszeiten waren wie folgt:

Nach einer initialen Denaturierung der DNA von 10 min bei 95 °C folgten 45 Zyklen aus je:

Denaturierung	1 min bei 94 °C
Annealing	1 min bei 60 °C

Extension 1 min bei 72 °C

Nach dem letzten Zyklus folgt eine verlängerte Synthesepériode von 8 min bei 72°C, um unvollständig synthetisierte Stränge zu vervollständigen. Anschließend erfolgte eine automatische Abkühlung der Proben auf 4 °C. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.5.2 Amplifikation von plasmodialer DNA

Zum Nachweis von Plasmodien wird das für die kleine ribosomale Untereinheit kodierende RNA (18S rRNA) Gen herangezogen [SNOUNOU et al. 1983 b; TAYLOR et al. 1997]. Dieses zeigt gattungs- und speziesspezifische Sequenzen für die vier verschiedenen humanpathogenen Parasiten [MCCUTCHAN et al. 1988; WATERS et al. 1998 a, b; GOMAN et al. 1991]. Für die Amplifikation von plasmodialer DNA wurden sechs verschiedene Primerpaare verwendet. Im folgenden sind die verschiedenen Primersequenzen und die Zusammensetzung der Reaktionsansätze (Tabelle 7, 8) angegeben. Im Vergleich zu dem Ansatz der PCR von β -Aktin verändern sich nur die Konzentrationen von $MgCl_2$ und den Primern.

Primersequenzen [SNOUNOU et al. 1993b]:

MAL 1 : 5'- CGCGT ACTTT GGACC GAATA A -3'

MAL 2 : 5'- TACAG TCCCA GCGAC AGCGG -3'

MAL 3: 5'- TTAAA CTGGT TTGGG AAAAC CAAAT ATATT -3'

MAL 4: 5'- ACACA ATGAA CTCAA TCATG ACTAC CCGTC -3'

MAL 5: 5'- CGCTT CTAGC TTAAT CCACA TAACT GATAC -3'

MAL 6: 5'- ACTTC CAAGC CGAAG CAAAG AAAGT CCTTA -3'

MAL 11: 5'- ATAAC ATAGT TGTAC GTTAA GAATA ACCGC -3'

MAL 12: 5'- AAAAT TCCCA TGCAT AAAAA ATTAT ACAA -3'

Tabelle 5 zeigt die Konzentrationen und Volumenansätze der einzelnen Reagenzien.

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für MAL1/2, MAL3/4, MAL5/6, MAL11/12.

Ingredienz	Ausgangskon- zentration	Zielkonzentra- tion	Volumen für Mastermix	Volumen pro Ansatz
Puffer	10 fach	1 fach	30 µl	2,0 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	30 µl	2,0 µl
dNTP	20 mM	0,2 mM	3,0 µl	0,2 µl
Taq- Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl	3,0 µl	0,2 µl
Primer MAL	50 pM	0,5 pM	3,0 µl	0,2 µl
Primer MAL	50 pM	0,5 pM	3,0 µl	0,2 µl
dH ₂ O			220,5 µl	14,7 µl
DNA	variabel			0,5 µl

Die Angaben in der Literatur bezüglich der Konzentrationen der Inhaltsstoffe, der Annealingtemperatur und –zeit wurden nach eigenen Erfahrungswerten optimiert. Deshalb kann es zu fehlenden Übereinstimmungen mit den Literaturangaben kommen.

Primersequenzen [SNOUNOU et al. 1993a]:

MAL 9: 5'- CCG AAT TCA GTC CCA CGT -3'

MAL 10: 5'- GCT TCG GCT TGG AAG TCC -3'

Primersequenzen [Taylor et al.1997]:

MAL 7: 5'- TAA ATT ACC CAA TTC TAA ADA AGA GAG -3' (D= A+G+T)

MAL 8a: 5'- TTA CCG CGG CTG CTG GCA C -3'

MAL 8b: 5'- CTG GCA CCA GAC TTG CCC -3'

Tabelle 6 zeigt die Konzentrationen und Volumenansätze der einzelnen Reagenzien.

Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für MAL 7/8a/8b, MAL 9/10.

Ingredienz	Ausgangskon- zentration	Zielkonzentra- tion	Volumen für Mastermix	Volumen pro Ansatz
Puffer	10 fach	1 fach	30 µl	2,0 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	24 µl	1,6 µl
dNTP	20 mM	0,2 mM	3,0 µl	0,2 µl
Taq- Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl	3,0 µl	0,2 µl
Primer MAL	50 pM	1 pM	6,0 µl	0,4 µl
Primer MAL	50 pM	1 pM	6,0 µl	0,4 µl
dH ₂ O			220,5 µl	14,7 µl
DNA	variabel			0,5 µl

Gesamtreaktionsvolumen pro Ansatz: 20µl

Der Mastermix wurde wie oben angegeben jeweils auf 10 Proben, vier Extraktionskontrollen und eine PCR-Kontrolle aufgeteilt. Die Reaktion wurde im DNA Thermocycler durchgeführt. Die Reaktionszeiten waren wie oben angegeben, nur die Annealingtemperatur und –zeit, die sich nach den Primern richtet, wurden wie in Tabelle 7 angegeben variiert:

Nach einer initialen Denaturierung der DNA von 10 min bei 95 °C folgten 45 Zyklen aus je:

Denaturierung	1 min bei 94 °C
Annealing	siehe Tabelle 9
Extension	1 min bei 72 °C

Tabelle 7: Angabe der Länge der nachgewiesenen Fragmente, der Annealingtemperatur und -zeit

Primer	Nachgewiesenes Produkt (18S rRNA von)	Größe	Annealingtemperatur	Annealingzeit
MAL1/2	<i>P. falciparum</i>	148 bp	54 °C	1 min
MAL3/4	<i>P. falciparum</i>	205 bp	56 °C	1 min
MAL5/6	<i>P. vivax</i>	120 bp	54 °C	1,5 min
MAL7/8a	<i>P. falciparum, vivax, ovale, malariae</i>	147 bp	56 °C	1 min
MAL7/8b	<i>P. falciparum, vivax, ovale, malariae</i>	135-138 bp	58 °C	30 sec
MAL9/10	<i>P. ovale, malariae</i>	200 bp	55 °C	1 min
MAL11/12	<i>P. malariae</i>	144 bp	58 °C	1 min

Um eine höhere Spezifität der PCR zu erreichen, wurde bei MAL 7/8 eine zweistufige, sogenannte „hemi-nested“ PCR angewandt. Dazu wurde in der ersten Amplifikation (1. Stufe) ein in 3'-Richtung von der eigentlichen Zielsequenz liegender Antisense-Primer (MAL 8a) gewählt, der zusammen mit dem Sense-Primer (MAL 7) ein 147 bp langes Fragment generierte. In der 2. Stufe wurde ein innerhalb dieses ersten Fragments liegender, „innerer“ Antisense-Primer (MAL 8b) in Kombination mit dem Sense-Primer (MAL 7) der ersten Stufe verwendet. Von den Amplifikationsprodukten der ersten Stufe wurde ein Zwanzigstel des Reaktionsvolumens als Ausgangsmaterial in die zweite Stufe eingesetzt. Durch diese Maßnahme konnte die Spezifität und Ausbeute hinsichtlich der Zielsequenz deutlich erhöht werden. Nach der ersten Amplifikation eventuell noch vorhandene, durch unspezifische Bindung außerhalb der Zielsequenz entstandene Fragmente fehlten so im Reaktionsprodukt der zweiten Stufe fast völlig. Darüber hinaus können inhibitorisch wirkende Verunreinigungen der Ausgangs-DNA stark verdünnt werden, so dass gleichzeitig die Effektivität der Amplifikation erhöht wird.

3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Nucleinsäuren liegen im alkalischen und schwach sauren pH-Bereich als Polyanionen vor. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können sie daher nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Auf Grund des konstanten Ladung/Masse-Verhältnisses ist dabei ihre Wanderungsgeschwindigkeit proportional zum Molekulargewicht. Der Proportionalitäts-

bereich kann durch die Wahl der Porengröße, das heißt der Agarosekonzentration des Gels, beeinflusst werden. Nach Färbung des Gels mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die Helizes der DNA-Doppelstränge interkaliert, können die DNA-Banden durch UV-Licht dargestellt werden.

Für die zu erwartenden DNA-Fragmente mit einer Länge von 120 bis 205 bp wurde ein Agarosekonzentration von 4% gewählt. Hierfür wurde 1g Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in 250ml 20 x TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlung auf zirka 50°C wurde die Agarose in einen waagerechten Gelbegrenzer (10cm x 5cm) gegossen und ein Kamm mit 17 Zähnen (je 5mm x 1mm) angebracht. Nachdem ungefähr 15 Minuten später das Gel erkaltet war, wurde zuerst der Kamm und anschließend das Gel aus der Gießvorrichtung entfernt. Das Agarosegel wurde in eine horizontale Gelelektrophoresekammer (10cm x 15cm) gelegt und mit 1000 ml 1 x TAE-Puffer überschichtet. Jeweils 10 µl der PCR-Produkte wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und vorsichtig mit einer Pipette in die Gelkammern eingebracht. Durch den Inhaltsstoff Bromphenolblau im Ladepuffer wird die Lauffront sichtbar. Um die Größe der amplifizierten Fragmente ermitteln zu können, wurden die erste und letzte Kammer jeden Gels mit 2 µl einer 100 bp Leiter, vermengt mit 2 µl Ladepuffer, gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für zirka eine Stunde bei 150 V, dann hatte die Bromphenolblaufront das letzte Viertel des Agarosegels erreicht. Nun konnte das Gel zum Anfärben für 15 min in eine Ethidiumbromidlösung überführt und anschließend in einem Videodokumentationssystem für Gelelektrophorese fotografiert und per Computer festgehalten werden.

3.7 Sequenzieren

3.7.1 Allgemeines

SANGER et al. beschrieben 1977 eine Methode, die es ermöglichte, anhand von Kettenabbrüchen, verursacht durch Inhibitoren, die Basenabfolge eines DNA-Fragmentes zu bestimmen. Als solche Inhibitoren wurden damals Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs), als replizierendes Enzym eine DNA-Polymerase eingesetzt. Die ddNTPs erzeugen einen Kettenabbruch, da ihnen an der 3'-Position der Ribose genau die OH-Gruppe fehlt, an welche normalerweise das nächste Nukleotid angehängt wird. Setzt man in vier Ansätzen je eines der Kettenabbruch induzierenden Nukleotide (ddTTP, ddATP, ddCTP, ddGTP) ein und trennt dann die vier Reaktionsgemische nebeneinander elektrophoretisch

auf, so lässt sich aus der Abfolge der Banden in den vier Bahnen leicht die Sequenz des als Matrize eingesetzten DNA-Abschnittes ablesen [SANGER 1981].

In dieser Arbeit wurde die neue vereinfachte Methode der Fluoreszenzmarkierung angewandt. Dabei wird eine Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Segmentes mit ddNTP-Molekülen durchgeführt, die über eine spezielle patentrechtlich geschützte Technik mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen (DyeDeoxy-TerminatorenTM) verknüpft sind. Im Anschluss an eine Fluoreszenzmessung in der DNA-Sequenziermaschine kann die Sequenz abgelesen werden. Für diese Untersuchungen wurde der ABI PRISMTM 310 Genetic Analyser, eine DNA-Sequenzierer der Firma P.E. Applied Biosystems, verwendet.

3.7.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Für die Sequenzierung wurden diejenigen Proben ausgewählt, die in den PCR-Analysen positive Ergebnisse erbracht haben. Es wurden weitere PCR-Durchläufe gemacht, die je nach Primer unter den oben angegebenen Bedingungen (siehe 3.4.2) durchgeführt wurden. Insgesamt beinhaltete der Reaktionsansatz 100µl, alle Konzentrationen, Zeiten und Temperaturen blieben unverändert. Für die Gelelektrophorese wurde eine 4%-ige low-melting Agarose hergestellt. Dafür wurden die Mengenangaben unter 3.5.1 übernommen, aber eine spezielle low-melting Agarose eingesetzt. Für die Sequenzanalyse wurden speziell diejenigen Proben ausgewählt, die in der Elektrophorese mit dem low-melting Agarosegel distinkte, klare Banden der zu erwartenden Länge hinterließen. Dafür wurden die Banden unter UV-Licht (254 nm) mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten, zerkleinert und je auf den Biorad-Filter eines „Freeze and Squeeze“-Tubes gegeben. Die Tubes wurden für 5 min bei -20°C eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur für 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Bei diesem Verfahren wird die Gelmatrix der Agarose zerstört und die DNA aus dem Gel herausgelöst. Die Gelüberreste bleiben im Filter, der verworfen wird, hängen und die Flüssigkeit am Boden der Tubes enthält die gelöste DNA. Im nächsten Schritt erfolgte die Überführung des Eluates unter Zugabe von 200µl sterilem H₂O in einen Microcon-30-Filter. Wie bei der DNA-Extraktion aus dem Knochenmehl dient dieser Zentrifugationsfilter der Aufkonzentrierung der DNA. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 12 000 rpm wurde der Filter umgekehrt auf ein zweites Tube gesteckt und für weitere 5 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Das Tube enthält danach die hochkonzentrierte DNA, die mit 10 µl sterilem H₂O aufgenommen und in ein neues steriles Tube überführt wurde.

Zum Sequenzieren wurde der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Bei dem gewählten Verfahren handelt es sich um sogenanntes „cycle

sequencing“, einer Kombination aus PCR und Sequenzieren nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger [SANGER 1981; INNIS et al. 1988]. Auch hier sind die unter 3.3.2 erwähnten Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen einzuhalten. Pro DNA-Probe wurden je zwei Reaktionsansätze hergestellt, die jeweils entweder den „Sense“- oder „Antisense“-Primer enthielten.

Der Reaktionsansatz, insgesamt 10 µl, bestand aus:

- 2 µl Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix
- 5 µl der DNA aus der Sequenzier-PCR
- 2 µl steriles H₂O
- 1,0µl des „Sense“-oder“Antisense“- Primers (2 pM)

Die Tubes wurden anschließend in den auf 96°C vorgeheizten Thermocycler überführt. Auf eine einmalige, initiale Denaturierung der DNA für 3 min bei 96°C folgten 25 Zyklen von:

Denaturierung	10 sec bei 96°C
Annealing	5 sec bei 50°C
Extension	4 min bei 60 °C

Nachdem die Sequenzierreaktion abgelaufen war, wurden die nicht inkorporierten Dye Terminatoren mit Hilfe des Dye ExTM Spin Kits aus den Proben entfernt. Zuerst musste das Gel der Zentrifugiersäulen des Kits resuspendiert werden. Dazu wurde die Säule vorsichtig auf den Vortexer gehalten, anschließend die Kappe leicht gelöst, der unteren Verschluss abgebrochen und die Säule auf ein 2 ml Tube gesteckt. Dann wurde für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss an diesen Schritt wurde die Säule auf ein neues Tube übertragen und vorsichtig langsam die gesamte Menge der Probe aus der Sequenzierreaktion auf die Mitte der Säule pipettiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 3 min bei 3000 rpm wurde die Säule entfernt. Das Tube enthält nun die gereinigte DNA. Im Speed Vac wurde die gereinigte DNA ohne Hitze getrocknet und anschließend mit 20 µl TSR (Sequenzierpuffer) vermengt, gevortext, 1 min bei 95 °C denaturiert und zum Schluss kurz auf Eis abgeschreckt. Zuletzt wurden die Proben in 0,5 µl Genetic Analyser Sample Tubes übertragen und in den ABI PRISM 310 Genetic Analyzer eingesetzt, in dem das automatische Sequenzieren durchgeführt wurde. Die erhaltenen Sequenzen wurden manuell, durch einfachen Vergleich, auf Übereinstimmungen mit der DNA der verschiedenen Plasmodienarten überprüft. Für weitere Analysen wurden die Sequenzen im Internet in die „BLAST“ Datenbank für Sequenzvergleiche des National Center for Biotechnical Information der U.S. National Library of Medicine (www.ncbi.nlm.nih.gov) eingegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Häufigkeit von Hyperostosen und Cribra orbitalia

In den Abbildungen 2 und 3 (siehe 2.2) ist der Anteil von Hyperostosen am Gesamtkollektiv der gefundenen Knochen dargestellt. Von 461 pathologisch auffällig veränderten Langknochen weisen 107 porotische Hyperostosen auf. Dies entspricht 23,2%. 394 der 1097 veränderten Schädel, entsprechend 35,9%, zeigen porotische Hyperostosen. Die Cribrahäufigkeit variiert typischerweise in den verschiedenen Altersklassen sowie bezüglich des Geschlechts, deshalb wurden die Knochen speziell bezüglich dieser beiden Merkmale untersucht und eingeteilt.

In Tabelle 8 und Abbildung 8 sind die Häufigkeiten von Cribra orbitalia in den verschiedenen Altersklassen dargestellt.

Tabelle 8: Verteilung der Cribra orbitalia auf die Altersgruppen

Altersklasse	Cribra positiv	Cribra negativ	Häufigkeit pro Altersgruppe
Neonatus (0-6 Monate)	0	0	0,0%
Infans I (6 Monate-6 Jahre)	113	102	52,6%
Infans II (7-12 Jahre)	178	123	59,1%
Juvenil (13-20 Jahre)	61	77	44,2%
21-30 Jahre	237	596	28,5%
31-40 Jahre	107	430	19,9%
41-50 Jahre	64	223	22,3%
51-60 Jahre	28	121	18,8%
61+ Jahre	9	72	10,0%
gesamt	797	1744	31,4%

Insgesamt stand von 2541 Individuen mindestens eine Orbita zur Verfügung. Hiervon weisen 797 eine Cribra orbitalia auf. Das entspricht einem Anteil von 31,4 %. Betrachtet man die Häufigkeit in den einzelnen Jahresstufen, so fällt auf, dass die Cribrahäufigkeit je nach Alter deutlich differiert. Die höchste Cribrarate ist, wie aus Tabelle 8 zu entnehmen, bei der Gruppe Infans II mit 59,1% (178 von 301) zu finden. Von den 215 Individuen der Gruppe Infans I haben 52,6% und von den 301 der Gruppe Infans II 59,1% eine spongiöse Hyperostose ausgebildet. Dagegen liegt der Anteil der Cribra positiven in der Gruppe der 51-60 jährigen nur bei 18,8% und bei den über 61 jährigen nur noch bei 10%. Die altersab-

hängige Häufigkeitsverteilung wird durch die Bildung von Altersgruppen noch deutlicher hervorgehoben. Der Anteil der Betroffenen bleibt bei den Gruppen Infans I bis Juvenil relativ konstant hoch und sinkt dann bei den Altersgruppen der Erwachsenen kontinuierlich ab, von einem Fünftel bis auf ein Minimum von einem Zehntel in der Gruppe 61+ Jahre.

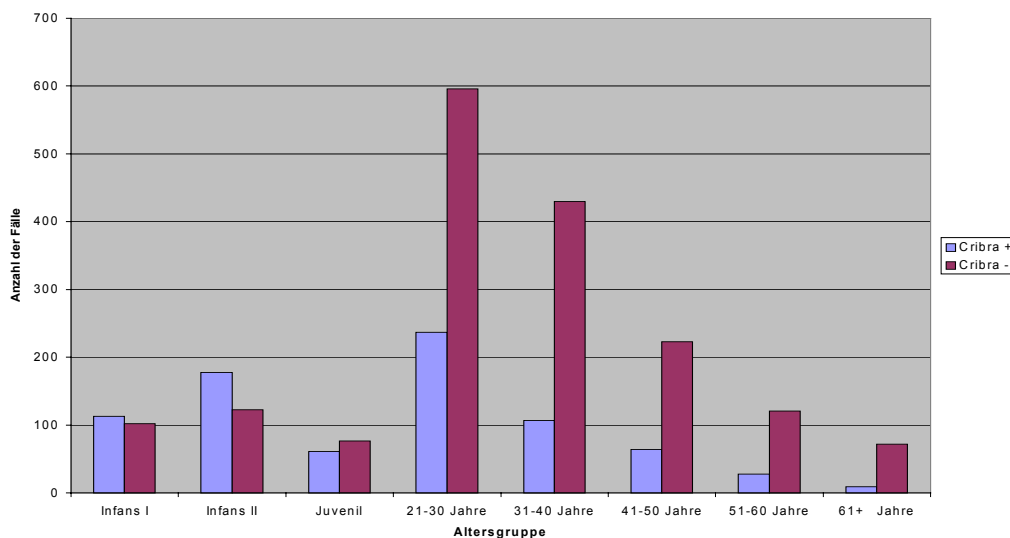


Abbildung 8: Anzahl der Fälle mit und ohne Cribra in Abhängigkeit vom Alter

Das Liniendiagramm in Abbildung 9 zeigt neben der Cribrahäufigkeit in den verschiedenen Altersgruppen, die geschlechtsspezifische Verteilung. Man sieht, dass in allen Altersgruppen der Anteil der Individuen mit Cribra bei den Frauen höher liegt als bei den Männern. Besonders in den Gruppen 41-50, 51-60 und 61+ Jahre ist der weibliche Anteil zum Teil bis zu 15% höher als der männliche.

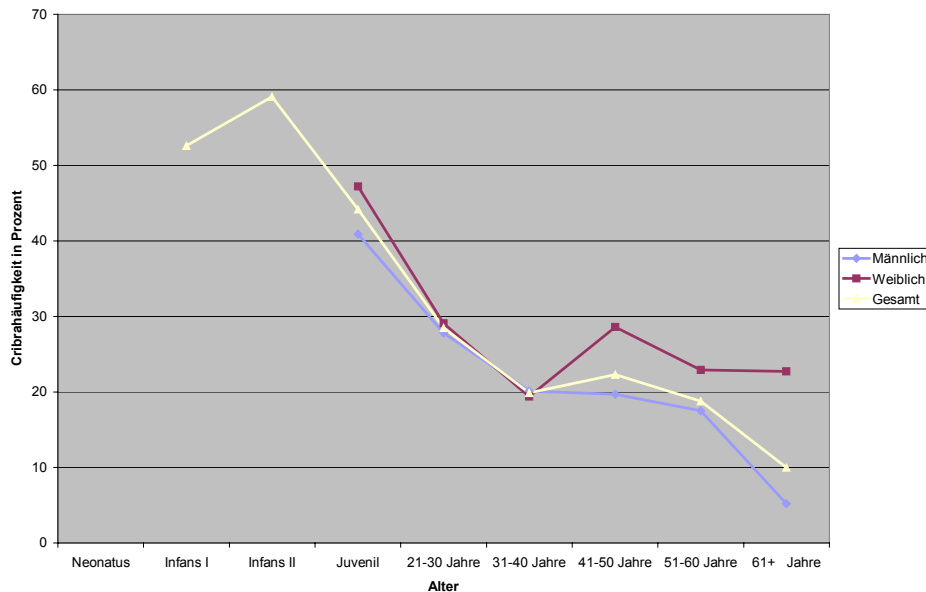


Abbildung 9: Prozentualer Anteil der Individuen mit Cribra pro Altersgruppe und Geschlecht

Die geschlechtsspezifische, aber vom Alter unabhängige, Auswertung der Cribra orbitalia in Abbildung 10 ergibt, wie schon das Liniendiagramm in Abbildung 9, einen etwas höheren Cribraanteil bei den weiblichen Individuen. Die Anzahl der männlichen Skelette mit Cribra ist zwar absolut höher, aber im Verhältnis zu den nicht betroffenen Vertretern der Geschlechtsgruppe ergibt sich ein geringerer Wert als bei den weiblichen. So liegt bei den als männlich bestimmten Individuen der Prozentsatz der Cribrahäufigkeit bei 22,9% (269 von 1174) und bei den weiblichen bei 27,8% (237 von 851). Im Verhältnis dazu macht die Cribra orbitalia bei den zu keinem Geschlecht zuzuordnenden Skeletten, mit 49,1% (291 von 593), einen wesentlich höheren Anteil aus. Dieser Wert scheint im ersten Moment unverhältnismäßig hoch. Beachtet man jedoch, dass die Geschlechtsbestimmung für diese Arbeit nur nach morphologischen Kriterien durchgeführt wurde, muss man davon ausgehen, dass diese Gruppe zum größten Teil aus 0-12-jährigen besteht. Denn die Altersklassen Neonatus, Infans I und Infans II wurden in die morphologische Geschlechtsbestimmung nicht miteingeschlossen, da diese im Kindesalter mit großen Unsicherheiten behaftet ist [Zink 1999] (siehe 2.7). Vergleicht man den Wert der Cribrahäufigkeit in der Gruppe “unbestimmt” mit dem der 0-12-jährigen aus Tabelle 10, so erkennt man, dass die Werte mit 49,1% und 56,4% im selben Größenbereich liegen.

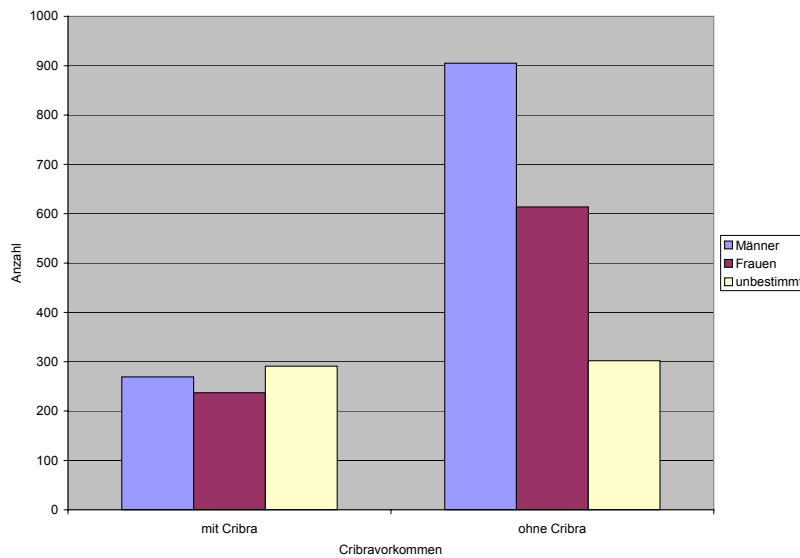


Abbildung 10: Geschlechtsabhängige Verteilung der Cribra orbitalia

Zusätzlich zu der geschlechts- und altersspezifischen Auswertung wurden die Cribrafälle noch nach der auftretenden Stärke unterschieden. Man unterteilt die Veränderungen an den Orbitae in drei Ausprägungsgrade (Grad I-III) [SCHULTZ 1988]. Dies entspricht im wesentlichen der Einteilung von NATHAN & HAAS [1966] in: poröser, cribröser und trabekulärer Typ. Wie in Tabelle 7 angegeben, weisen 31,4% (797 von 2541) der untersuchten Schädel eine Cribra orbitalia auf. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Ausprägungsgrade gliedern sich die Fälle in 212 Individuen mit Grad I (69,5% der Betroffenen), 172 mit Grad II (24,8%) und 23 mit Grad III (5,6%).

In Abbildung 11 wird die Verteilung auf die verschiedenen Ausprägungsgrade in Abhängigkeit vom Geschlecht dargestellt. Man sieht eine Häufung des weiblichen Geschlechts bei den Individuen mit Ausprägungsgrad II, wohingegen mehr männliche Skelette Grad I aufweisen. Für Ausprägungsgrad III sind die Werte ausgeglichen.

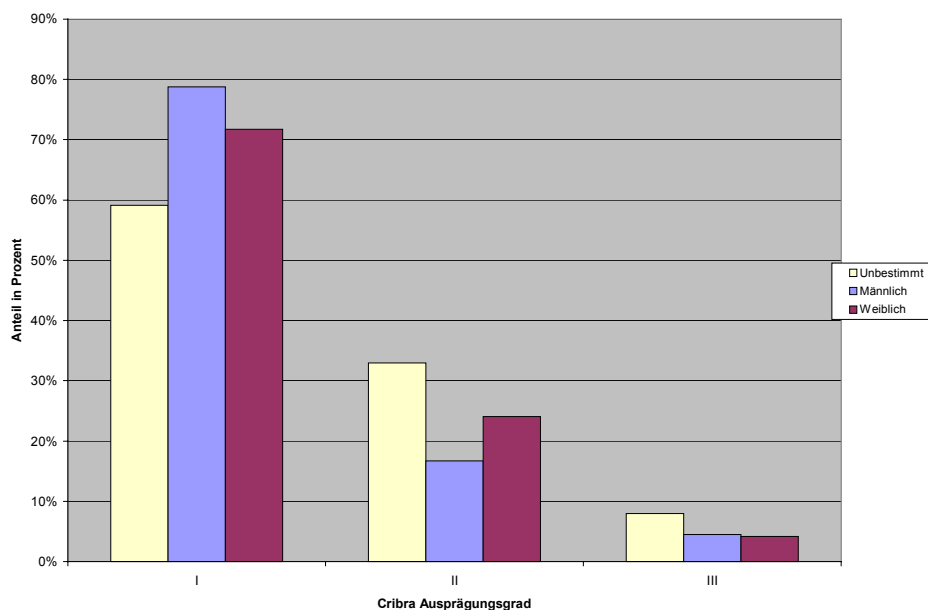


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der Cribra-Fälle nach Geschlecht und Ausprägungsgrad

4.2 Nachweis von humaner DNA

Um zu überprüfen, ob amplifizierbare, das heißt erhaltene und nicht inhibierte DNA in den Knochen vorhanden ist, wurde eine PCR zum Nachweis des humane β -Aktin Gens durchgeführt. 15 der 20 untersuchten Proben zeigten im Agarosegel eine positive Bande bei 202 bp. Somit wurden 75,0% als positiv für humane DNA gewertet. Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse für β -Aktin und plasmodiale DNA.

Tabelle 9: Makromorphologische und Molekularbiologische Ergebnisse der Langknochen

Fall	Makroskopie	β -Aktin	MAL1/2	MAL3/4	MAL5/6	MAL7/8b	MAL9/10	MAL11/12
33	Distale Hyperostosen	+	-	-	+	+	-	-
190	Hyperostosen	+	-	-	-	+	+	-
206	Hyperostosen	+	+	-	-	+	-	-
219	Diaphyse gekrümmt, Hyperostosen	+	-	-	-	+	-	-
233	Diaphyse gekrümmt, Hyperostosen	+	+	-	-	+	+	-
332	Knochenverdickung, Hyperostosen	+	+	+	-	+	-	-
345	Hyperostosen	-	+	+	+	+	+	-
358	Diaphysal, distal Verdickung, Hyperostosen	+	-	-	-	+	-	-
376	Distal starke Hyperostosen	-	-	-	-	-	-	-
414	Distal starke Hyperostosen	+	-	-	-	+	+	-

Tabelle 10: Makromorphologische und Molekularbiologische Ergebnisse der Schädel

Fall	Makroskopie	β -Aktin	MAL1/2	MAL3/4	MAL5/6	MAL7/8b	MAL9/10	MAL11/12
0	Cribra orbitalia	+	-	-	-	+	+	-
126	Beidseits parietal Hyperostosen	+	-	-	-	+	+	-
181	Parietookzipital Hyperostosen	+	-	+	-	+	+	-
500	Cribra orbitalia	-	-	-	-	+	+	-
506	Hyperostosen	+	-	-	-	+	+	-
1054	Cribra orbitalia	+	-	-	-	+	-	-
1056	Cribra orbitalia	+	-	-	-	+	+	-
1325	Hyperostosen	+	-	-	-	+	+	-
1400	Parietale Hyperostosen	-	-	-	-	-	-	-
1429	Parietale Hyperostosen	-	+	-	-	+	-	-

4.3 Nachweis von Plasmodien-DNA

Der Nachweis plasmodialer DNA wurde, wie unter 3.5.2 beschrieben, mit sechs verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabellen 9 und 10 zusammengefasst.

Den größten Anteil positiver Amplifikationen ergaben die Untersuchungen mit den Primern MAL 7/8. Dieses Primerpaar kann jeden der vier verschiedenen humanpathogenen Malariaerreger nachweisen. Von den 20 untersuchten Proben waren 18, entsprechend 90%, positiv. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit MAL 7/8a werden in Tabellen 9 und 10 nicht aufgeführt, da die PCR mit diesem Primerpaar der erste Schritt einer “nested”-PCR ist und erst ein weiterer Durchlauf mit MAL 7/8b die endgültigen Resultate zeigt (siehe 3.4.2). Die anderen Primerpaare lieferten deutlich weniger positive Ergebnisse. MAL 1/2, das *P. falciparum* nachweist, lieferte 25% (5 von 20) positive Amplifikationen. Mit dem Primerpaar MAL 3/4, ebenfalls zum Nachweis von Malaria tropica-Infektionen, erhielten wir in 15% (3 von 20) positive Ergebnisse. Die Primer MAL 5/6 (*P. vivax*) ergaben 25% (5 von 20) und MAL 9/10 (*P. ovale* und *malariae*) positive Amplifikationen. Die Primer MAL 11/12, zum Nachweis von *P. malariae*, zeigten zu keinem Zeitpunkt eindeutige Banden im Bereich von 144 bp in der Agarosegelelektrophorese.

Vergleicht man diese Werte, so erkennt man, dass der Prozentsatz der positiven Ergebnisse sich zwischen den verschiedenen Primerpaaren deutlich unterscheidet. Vor allem mit MAL 7/8 wurden mit 90% auffällig hohe Resultate erzielt. Auch die Gelelektrophorese unterschied sich von den anderen Untersuchungen durch das Auftreten von sehr breiten, hochpositiven Banden bei 135-138 bp. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 12 gegeben. Im Ver-

gleich dazu war die Ausbeute bei MAL 3/4 mit 15%, bzw. bei MAL 11/12 sogar mit 0% bedeutend geringer. Aufgrund dieser Tatsache wurde bereits vermutet, dass unter den Amplifikationen mit den Primern MAL 7/8 auch unspezifische Reaktionen waren.

Eine Probe fiel bei der Amplifikation von plasmodialer DNA dennoch besonders auf. Die Probe 345 zeigte neben MAL 7/8 auch in Durchläufen mit den anderen Primern positive Ergebnisse (siehe Abbildung 13). Eine Wiederholung der Amplifikationen dieser Probe mit den verschiedenen Primern bewies die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. In den weiteren Untersuchungen und beim Sequenzieren wurde deshalb auf diese Probe besonderes Augenmerk gelegt.

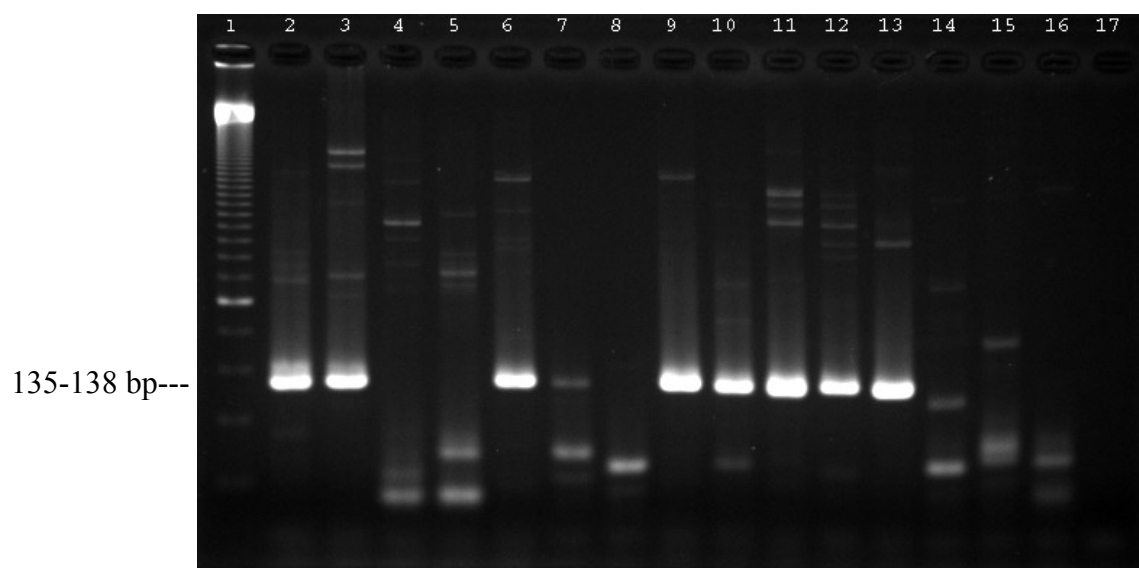


Abbildung 12: Gelelektrophorese mit den Primern MAL 7/8b

Kammer 1: 100 bp-Leiter; *Kammer 2-6 und 9-13:* Proben; *Kammer 7, 8, 15 und 16:* Kontrollen, *Kammer 17:* leer. *Kammern 2, 3, 6 und 9-13* zeigen deutliche Banden bei 135-138 bp.

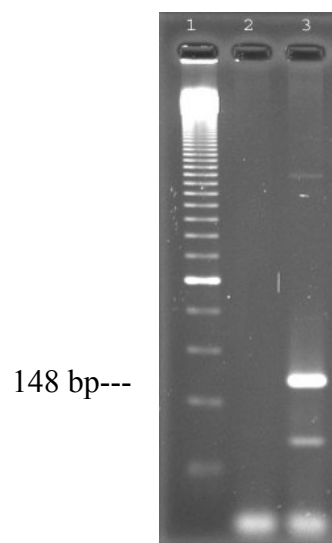


Abbildung 13: Gelelektrophorese mit den Primern MAL 1/2.

Kammer 1: 100 bp-Leiter. *Kammer 2:* Probe 33; *Kammer 3:* Probe 345.

4.4 Ergebnisse der Sequenzanalysen

Um die Identität des Produktes zu bestätigen und falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden ein Großteil der positiven PCR-Proben anschließend sequenziert. Besonderes Augenmerk wurde auf diejenigen Proben gelegt, die mit mehreren verschiedenen Primerpaaren positiv waren. Die gewonnen Sequenzen wurden anschließend in die BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool) -Datenbank für Sequenzvergleiche des National Center for Biotechnical Information der U.S. National Library of Medicine (www.ncbi.nlm.nih.gov) eingegeben. Die BLAST-Analyse ergab in vielen Fällen keine eindeutige Sequenzzuordnung. Bei vier Proben (33, 206, 345, 1429) kam es zu Übereinstimmungen mit der DNA einer der vier Plasmodiumarten. Die Ähnlichkeit der Sequenzen stellte sich jedoch, außer bei Probe 345, als gering heraus.

Die Probe 345, die bei den PCR-Durchläufen schon dadurch auffiel, dass sie mit mehreren verschiedenen Primerpaaren positive Amplifikationen aufwies, zeigte hohe Übereinstimmungen mit den Zielsequenzen der vier humanpathogenen Malariaerreger. Lediglich in einem kurzen Abschnitt unterschieden sich wenige Basenpaare. Dieser befinden sich in einem Bereich, in dem auch die vier Plasmodiumarten untereinander stark variieren. Eine vollständige Übereinstimmung mit dem Genom eines einzigen Plasmodiumerregers war nicht eindeutig zu finden, denn in diesem variablen Abschnitt zeigte die Probe einerseits Übereinstimmungen mit *P. falciparum* und *malariae*, und andererseits mit *P. ovale* und *vivax*. Die Wiederholung der Extraktion der Probe 345 beweist die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses. Damit ist ein eindeutiger Nachweis einer Malariainfektion bei einem der Skelette aus Rain am Lech gegeben, auch wenn eine definitive Zuordnung des Ergebnisses zu einem Erregertyp nicht möglich war. Neben Problemen in der Überlagerung der Sequenzen mit nicht-plasmodialer DNA wäre auch eine Mehrfachinfektion des betroffenen Individuums zu diskutieren, ebenso wie Änderungen (Mutationen) im plasmodialen Genom möglich, wenn auch nicht sehr wahrscheinlich sind.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Sequenz der Probe 345 wird der der 18S rRNA von *Plasmodium falciparum*, *malariae*, *ovale* und *vivax* gegenübergestellt.

Tabelle 11: Auflistung der für die 18S rRNA Sequenzen kodierenden DNA Regionen der vier für den Menschen pathologischen Plasmodiumarten, die durch die PCR mit den Primer MAL 7/8a, b amplifiziert werden. Angegeben sind auch die Primer sowie zum Vergleich die erhaltene Sequenz der Probe 345. Die sich von *P. falciparum* unterscheidenden Basen sind fett gedruckt.

P. falciparum	TAAATT	ACCCAATTCT	AAAGAAGAGA	GGTAGTGACA
P. vivax	TAAATT	ACCCAATTCT	AAAGAAGAGA	GGTAGTGACA
P. malariae	TAAATT	ACCCAATTCT	AAAGAAGAGA	GGTAGTGACA
P. ovale	TAAATT	ACCCAATTCT	AAAGAAGAGA	GGTAGTGACA
Probe 345	TAAATT	ACCCAATTCT	AAAGAAGAGA	GGTAGTGACA
Primer MAL7	TAAATT	ACCCAATTCT	AAADAAGAGA	G
<hr/>				
P. falciparum	AGAAATAACA	ATGCAAGGCC	AATTTTGGT	TTTGTAATTG
P. vivax	AGAAATAACA	ATACAAGGCC	AA . . TCTGGC	TTTGTAATTG
P. malariae	AGAAATAACA	ATGCAAGGCC	AAATTTGGT	TTTGTAATTG
P. ovale	AGAAATAACA	ATACAAGGCC	ATTCATGGT	TTTGTAATTG
Probe 345	AGAAATAACA	ATGCAAGGCC	TTGTTGCGCT	TTTGTAATTG
<hr/>				
P. falciparum	GAATGATAGG	AATTTACAAG	CTTCCTAGAG	TAACAATTGG
P. vivax	GAATGAT GGG	AATTTACAAG	CTTCCCAA .	ACT CAATTGG
P. malariae	GAATGAT GGG	AATTTACAAG	CTTCCCAGAG	AGG CAATTGG
P. ovale	GAATGAT GGG	AATTTACAAG	CTTCCCAA .	ATT CAATTGG
Probe 345	GAATGATAGG	AATTTAAATG	CTTAACAGAG	TAACAATTGG
<hr/>				
P. falciparum	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	A
P. vivax	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	A
P. malariae	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	A
P. ovale	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	A
Probe 345	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	A
Primer MAL8a		CACGGTCG	TCGGCGCCAT	T
Primer MAL8b	CCCGTTCAG	ACCACGGTC		

Die übrigen untersuchten Proben zeigten keine Gleichartigkeit mit den Nukleotidsequenzen der vier für den Menschen pathologischen Plasmodiumarten. Man erhielt bei der Ein-

gabe in die BLAST-Datenbank eine gewisse Ähnlichkeit mit Sequenzen verschiedener humaner Gene, Pilzarten und Mikroorganismen, darunter Candida, unkultivierte Erdpilze, Amöben und Nematoden. Auffällig war, dass bei einem Großteil der Sequenzen starke Überlagerungen der Basen zu finden waren, die die Auswertung der Daten erschwerten. Bei 8 der 25 untersuchten Proben waren die Sequenzen aufgrund dieser Tatsache nicht verwertbar.

In Abbildung 14 zeigt einen Ausschnitt der Sequenzierung der Probe 345.

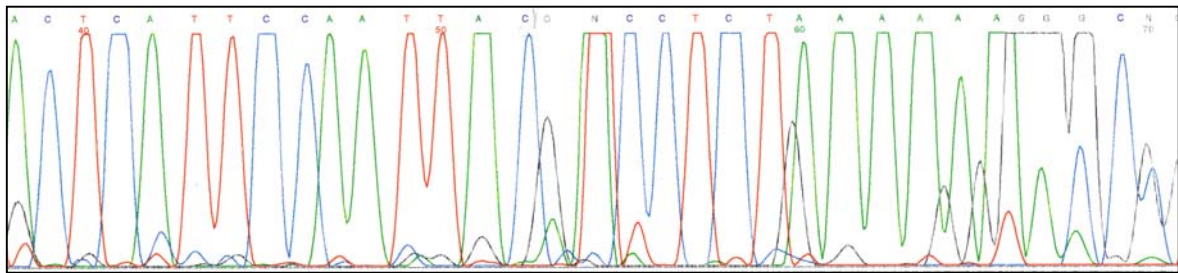


Abbildung 14: Ausschnitt des Ergebnisses der Sequenzanalyse der Probe 345 mit den Primern MAL 7/8 (ABI-PRISM™ 310 Genetic Analyzer der Firma Perkin Elmer).

5 Diskussion

5.1 Problematik der morphologischen Einteilung der Knochen

Cribra orbitalia und Hyperostosen können bei einer Vielzahl von Erkrankungen auftreten. CAPASSO [1998] und STEINBOCK [1976] erklären die Entstehung der Cribra orbitalia und Hyperostosen durch eine Hypertrophie des Knochenmarks, die dazu dient, mehr rote Blutkörperchen zu produzieren. Die Veränderungen werden deshalb als unspezifisches Zeichen einer chronischen anämischen Erkrankung angesehen. Dementsprechend kann jede Erkrankung, die zu einer Anämie, mit Hypoxämie und nachfolgender Knochenmarkstimulation und -hyperplasie führt, eine Cribra orbitalia sowie Hyperostosen hervorrufen. Die Cribra orbitalia scheint die Erstmanifestation zu sein. Wahrscheinlich findet die Knochenmarkshyperplasie in vielen Teilen des Skeletts gleichzeitig statt, aber nur das Orbitadach enthüllt den Prozess, beziehungsweise enthüllt den Prozess zuerst, da die dünne Tabula externa dort leicht durch die darunterliegende Hypertrophie und Hyperplasie arrodirt wird [STEINBOCK 1976]. Erst später bilden sich Hyperostosen des Schädeldaches oder auch der Langknochen aus.

Die Hauptursachen einer Cribra orbitalia sind einerseits angeborene Erkrankungen, die zu einer chronischen Anämie führen, wie Thalassämie, Hämoglobinopathien, hereditäre Sphärozytose oder Sichelzellanämie, andererseits erworbene Erkrankungen mit einer chronischen Anämie, zu denen Infektionen mit intestinalen Parasiten, Tuberkulose, Lepra Mangelernährung, Rachitis und unter anderem Malaria zählen [CAPASSO 1998; BENNICKE 1985; EL-NAJJAR et al. 1975; HENGGEN 1971; STEINBOCK 1976; TAYLOR 1985]. Unter all diesen Ätiologien wird vor allem die Eisenmangelanämie als häufige Ursache diskutiert, wobei in neueren Untersuchungen ein rein ernährungsbedingter Eisenmangel unwahrscheinlich erscheint [STUART-MACADAM 1992]. Vielmehr sind Anämien, die in Folge chronischer Erkrankungen z.B. Infektionen, [HENGGEN 1971; WAPLER & SCHULZ 1997] oder bei Parasitenbefall [REINHARD 1988] auftreten, als mögliche Auslöser angenommen worden. HENGGEN [1971] fand in seiner Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Verteilung der Cribrahäufigkeit und dem geographischen Breitengrad. Es zeigte sich, dass die Häufigkeit mit Annäherung zu Äquator stetig zunahm. Das ist ein Hinweis darauf, dass einer der Auslöser einer Cribra vor allem in den Tropen und Subtropen gefunden werden kann. In den Tropen und Subtropen sind Eisenmangelanämien sehr

häufig. Als hauptsächliche Ursache werden parasitäre Erkrankungen gesehen. Neben Wurmerkrankungen kann auch die Malaria zu einer hypochromen Anämie und damit einer Cribra orbitalia führen. Mit dem Wissen, dass es in der Zeit, aus der das Material dieser Untersuchungen stammt, in Deutschland Malaria gab, kann die Cribra orbitalia als guter Hinweis auf diese Erkrankung gesehen werden. Gerade im Hinblick darauf, dass eine Malariainfektion sonst keine makroskopisch erkennbaren Spuren am Skelett hinterlässt, ist eine Auswahl nach den Veränderungen Cribra und Hyperostose eine gute Möglichkeit um anhand der Knochenmorphologie eine Vorauswahl zu treffen.

Letzten Endes handelt es sich bei der spongiösen Hyperostose jedoch um ein Symptom, dessen vielfältige Ursachen differentialdiagnostisch nur schwer zu unterscheiden sind. Die Gründe dafür liegen in der begrenzten Möglichkeit des Knochens, auf Erkrankungen oder Mangelernährung zu reagieren. Die meist sehr komplexen Zusammenhänge der einzelnen beteiligten Faktoren lassen sich daher nicht immer direkt aus der morphologischen Ausprägung ablesen. Weiterführende histologische [SCHULTZ 1986, 1993] und biochemische Untersuchungen [VON ENDT & ORTNER 1982; GRUPE 1995; SCHUTKOWSKI & GRUPE 1997] werden empfohlen, um sich dem Problem der Differenzierung der vielfältigen Ursachen anzunähern, konnten jedoch keine definitive ätiologische Zuordnung bieten. Um der Frage einer Malariainfektion nachzugehen wurden die so ausgewählten Knochen mittels PCR und Sequenzierung weiter untersucht.

5.2 Cribrahäufigkeiten

In der Skelettserie aus Rain am Lech war es möglich das Merkmal Cribra orbitalia an der Mehrheit der Schädel zu beurteilen. Darunter fiel auch ein großer Prozentsatz an geschlechts- und altersbestimmten Individuen, so dass eine alters- und geschlechtsspezifische Verteilung erstellt werden konnte.

Der Cribraanteil von 31,4% im Gesamtkollektiv korreliert gut mit den Ergebnissen aus anderen Studien. Untersuchungen an Skeletten aus Südwest Amerika, durchgeführt von EL-NAJJAR [1975], ergaben mit 34,4 % zum Beispiel einen sehr ähnlichen Wert.

Der Grund für diese doch eher hohen Prozentzahlen liegt, wie in Abschnitt 5.1 geschildert, an den vielfältigen Ursachen für diese Veränderungen. Die Tatsache, dass jede Form der Anämie, sowie zahlreiche andere Erkrankungen und Zustände- oft mit hoher Inzidenz und Prävalenz- diese Skelettauffälligkeiten hervorrufen können, erklärt den großen Anteil dieser Pathologien im Gesamtkollektiv. Die Beobachtung, dass die Cribrahäufigkeit bei den Kindern 52,6% oder mehr beträgt, wurde auch in anderen Studien gemacht. Die Werte

lagen hier sogar bei bis zu 64,4% veränderten Orbitae im Kindesalter [MOLLER-CHRISTENSEN & SANDISON 1963; NATHAN & HAAS 1966]. Für das häufige Vorkommen bei den Kinderskeletten sind verschiedene Faktoren von Bedeutung. Geht man von der Annahme einer Eisenmangelanämie als Ursache aus, so lässt sich die hohe Prävalenz plausibel durch den erhöhten Eisenbedarf während des Wachstums erklären. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass der Knochen im Kindesalter noch dünn und unvollständig mineralisiert ist. Eine Knochenmarkshyperplasie könnte deshalb schneller zu einer Cribra orbitalia führen [EL-NAJJAR 1975]. Auch das häufigere Auftreten von Cribra bei Frauen, die während der Geschlechtsreife, aufgrund des menstruellen Blutverlustes sowie während einer Schwangerschaft, einen erhöhten Eisenbedarf haben, stützt die Hypothese einer ursächlichen Eisenmangelanämie. HENGGEN [1971] beschreibt, dass die Häufigkeit von Cribra orbitalia bei Annäherung an den Äquator zunimmt. Dies korreliert gut mit der weltweiten Verteilung der Eisenmangelanämie [WHO 1968]. Ursächlich für die Eisenmangelanämie ist, wie schon erwähnt, selten allein ein alimentärer Mangel. Wahrscheinlicher ist ein Zusammentreffen verschiedener Faktoren. Eine latente ernährungsbedingte Eisenmangelanämie kann zum Beispiel durch eine Infektion mit Würmern oder Parasiten, wie Malaria, manifest werden. Gerade solche Infektionen treten in den Tropen und Subtropen oft auf und werden deshalb dort als häufigste Ursache dieser gesehen [HENGGEN 1971].

Vergleicht man die Cribrahäufigkeit in den verschiedenen Altersgruppen, so findet man eine Abnahme dieser mit zunehmendem Alter. Das kann einerseits z.B. im Sinne eines Selektionsvorteils gewertet werden oder andererseits auch gegen einen chronischen, beziehungsweise länger andauernden, Krankheitsverlauf sprechen, bei dem eine Häufigkeitszunahme im Alter zu erwarten wäre, so dass in diesem Fall tendenziell eher von akuten Ereignissen, wie Infektionen als Ursache auszugehen ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass einige der Läsionen bei den Erwachsenen zum Teil geheilte Veränderungen aus der Kindheit sein können. [EL-NAJJAR 1975].

Wie schon HENGGEN 1971 an einer Skelettserie festgestellt hat, ist auch bei unseren Untersuchungen, bei der Einteilung der Cribrafälle nach Ausprägungsgrad, aufgefallen, dass die leichteste Ausprägung (Grad I) am häufigsten (69,5%) und die schwerste (Grad III) am seltensten (5,6%) vorkommt. Es ist somit eine Abnahme der Häufigkeit mit Zunahme der Ausprägung zu verzeichnen. Betrachtet man das Verhältnis von „männlich“ zu „weiblich“ bei den verschiedenen Ausprägungsgraden, so findet man ein Überwiegen der männlichen Individuen, bei Grad I, bei Grad II hingegen der weiblichen. Obwohl sich hiermit nicht

unmittelbar eine stärkere Belastung der weiblichen Individuen postulieren lässt, scheint sich zumindest die tendenzielle Häufung, insbesondere der schweren Fälle, anzudeuten. Zumal Frauen im geschlechtsfähigen Alter, also über einen langen Zeitraum hinweg, durch Menstruationen und Schwangerschaften einen höheren Eisenbedarf haben, kann es auch über diesen Zeitraum verstärkt zu einem Eisenmangel kommen. Der lange Verlauf macht den Übergang von Grad I zu II oder auch III möglich. Zu dieser Summation der Veränderung kann es vor allem auch kommen, da eine Rückbildung der Veränderungen nur teilweise geschieht [BRITTON 1970].

Abschließend ist zu sagen, dass die Ergebnisse der Häufigkeitsverteilung der *Cribra orbitalia* in dieser Skelettreihe, auch in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und Ausprägungsgrad, gut mit den Ergebnissen anderer Studien [ZINK 1999; CARLI-THIELE 1996; EL-NAJJAR et al. 1975] vereinbar sind.

5.3 Problem des Nachweises von ancient DNA

Mit der Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion 1985 [SAIKI et al. 1985; MULLIS & FALOONA 1987], die es ermöglicht, bereits sehr kleine Mengen DNA aus einem definierten Abschnitt um mehrere Größenordnungen *in vitro* zu vermehren [LINZ & DEGENHARDT 1990], wurde auch die Untersuchung von alter oder ancient DNA möglich. Als ancient DNA wird diejenige DNA bezeichnet, die einem toten Organismus oder Teilen von ihm entstammt, oder extrakorporal vorliegende DNA eines noch lebenden Organismus. Dies beinhaltet somit jegliche DNA, die einen autolytischen oder diagenetischen Prozess mit der Folge ihrer Degradierung durchlaufen hat [HUMMEL et al. 1995]. Das Zusammentreffen geeigneter Umstände führt dazu, dass nach dem Tod gelegentlich einzelne Gewebe von Organismen und damit auch ihr genetischer Bauplan in Form von degradierter, alter DNA erhalten bleiben. Besonders langfristig überdauernde Gewebe, wie Skelettelemente und Zähne, also wasserarme und harte Gewebe sind widerstandsfähig gegen die biogene, physikalische und chemische Dekomposition.

5.3.1 Biogene, physikalische und chemische Dekomposition

Im Verlauf der biogenen Dekomposition [BERG 1975; BÄR et al. 1988; HERRMANN et al. 1990] findet zunächst eine Degradation der im Organismus vorhandenen DNA durch Enzymaktivität statt. Im Anschluss daran besiedeln Mikroorganismen das Gewebe. Bei der Analyse von ancient DNA ist daher an mögliche Störungen durch den Eintrag von Fremd-DNA zu denken. Im Laufe der Liegezeit werden zusätzlich physikalische und chemische

Dekompositionsfaktoren [HOFREITER et al. 2001; ENGLINGTON & LOGAN 1991; GOLENBERG 1991] wirksam. Hier sind es vor allem pH-Wert und Bodenfeuchte, aber auch radioaktive Strahlung, die weiter schädigenden Einfluss auf die Struktur der DNA haben und zu Änderungen der ursprünglichen Basensequenz führen können. Beim chemischen Abbau kommt es überwiegend zu zwei verschiedenen Arten von DNA-Schädigung:

1. Hydrolytischer Schaden, der zur Depurinierung, Depyrimidierung und zur Desaminierung von Basen führt.
2. Oxidative Veränderungen, verursacht entweder durch die direkte Interaktion von ionisierenden Strahlen mit der DNA, oder vermittelt über freie Radikale, die aus Wassermolekülen durch ionisierende Strahlen entstehen.

Beide Wege führen wiederum zu modifizierten Basen [HÖSS et al. 1996]. Diese veränderten Basen blockieren die Strangverlängerung durch die DNA-Polymerase und machen somit eine enzymatische Amplifikation von DNA Sequenzen unmöglich. Untersucht man ancient DNA, so fällt auf, dass nur eine geringe Anzahl von Kopien der stark beschädigten ancient DNA-Moleküle vorhanden ist. Die Gründe dafür sind, wie oben erwähnt, der kontinuierliche Angriff der DNA durch destruktive Prozesse. Es wird geschätzt, dass allein durch Depurinierung eine menschliche Zelle zirka 2000-10000 Läsionen ihres Genoms pro Tag durchmacht [HANDT et al. 1994]. Dank der kontinuierlichen DNA-Reparaturmechanismen sind Organismen in der Lage solchen Angriffen auf ihr genetisches Material zu widerstehen. Nach dem Tod endet die DNA-Reparatur, wobei viele der destruktiven Prozesse bestehen bleiben. Die DNA bleibt zum Beispiel durch ihre Hydrophilität selbst in trockenem Klima hydriert und hydrolytische Schäden setzen sich fort. Auch wenn bestimmte Bedingungen die Möglichkeit des Überlebens erhöhen, zeigen doch alle Untersuchungen von ancient DNA, dass die Moleküle bis auf eine Größe von einigen hundert Basenpaaren reduziert sind und dass sie stark durch oxidative Veränderungen beeinträchtigt sind [PÄÄBO 1989].

HÖSS et al. [1996] zeigten in ihrer Arbeit, dass als physikalischer Faktor die Umgebungstemperatur eine große Rolle spielt. Proben, die einen geringen Schädigungsgrad aufwiesen und sich gut amplifizieren ließen, stammten aus arktischen oder subarktischen Regionen, aus Permafrost Ablagerungen in Sibirien und Alaska. Im Gegensatz dazu war die DNA der Proben aus Ägypten, Europa, Süd Afrika und warmen Regionen Amerikas stark beschädigt und brachte keine amplifizierbaren DNA-Sequenzen hervor. Für die Langzeit-Konservierung von DNA scheint daher eine kalte Umgebung von kritischer Wichtigkeit zu sein. Dies hängt damit zusammen, dass eine Abnahme der Temperatur um 20°C zu einer

10- bis 25-fachen Verminderung der Rate der chemischen Reaktionen, wie zum Beispiel des Zerfalls von Nukleotidbasen führt. Gefrieren vermindert die Zerfallsrate noch weiter. Folglich, wenn man den Zeitraum von mehreren Tausend Jahren betrachtet, spielt eine niedrige Temperatur eine große Rolle bei der Verlangsamung der postmortalen Degradierung von Nukleinsäuren in archäologischen Resten. Auch MAROTA et al. [2002] untersuchten in einer Studie die Abhängigkeit des DNA-Abbaus von der Temperatur. Basierend auf den hohen Durchschnittstemperaturen in Ägypten wurde eine Obergrenze für die DNA-Erhaltbarkeit von zirka 700-800 Jahren berechnet. Die Autoren legen deshalb nahe, dass aDNA-Analysen der menschlichen Überreste altägyptischer Individuen nicht sinnvoll sind und dass jegliche amplifizierte DNA als Kontamination durch neuere DNA gewertet werden sollte. PÄÄBO und WILSON ermittelten 1991 bei einer Temperatur von 15°C und einem pH-Wert von 7.0 eine geschätzte DNA-Halbwertszeit von 125 Jahren. Dies passt gut zu den neueren Daten über DNA Stabilität, die eine schnelle postmortale Längenabnahme der DNA-Fragmente auf 700-500 bp innerhalb von ungefähr 30 Jahren nach dem Tod zeigen [BACHMEIER et al. 2001], was auf eine rasch postmortale DNA-Fragmentation hinweist. Allerdings zeigte diese wie auch andere Studien deutlich, dass kleinere Fragmente für eine längere Periode gefunden werden können [LASSEN et al. 1994]. MAROTA et al. [2002] berechneten bei einer jährlichen Durchschnittstemperatur in Ägypten von 35°C die Halbwertszeit für DNA von 20,8 Jahren. Dabei wurden jedoch gewisse Umstände außer Acht gelassen. Gerade im Fall Ägypten ist zu beachten, dass das Mikroklima in den ägyptischen Grabstätten bis zu 10-20°C unterhalb der Außentemperatur liegen kann. Des weiteren ist das Material je nach Begräbnisort sehr trocken gelagert, ein weiterer wichtiger Faktor für die DNA-Erhaltbarkeit. Wichtig ist gerade bei den ägyptischen Proben auch die Mumifikation, die durch eine schnelle Dehydrierung des Körpers sowie Erhöhung des pH-Wertes durch das für die Mumifikation verwendete Natron den Dekompositionsprozess der Knochen und Weichteile deutlich inhibiert. Es gibt eindeutige Studien, die aDNA in Proben aus dem Jahr 3500-2800 BC zweifelsfrei nachweisen [NERLICH et al. 1997; ZINK et al. 2000, 2001, 2002]. Diese Studien widerlegen die Behauptung von MAROTA et al. [2002] und machen deutlich, dass eine Kombination verschiedenen Einflussgrößen die Abbaugeschwindigkeit von aDNA bestimmt.

5.3.2 Kontamination

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Analyse von ancient DNA erschwert ist das Problem der Kontamination. Es kann auf zwei Wegen zu einer Kontamination durch DNA kommen [HANDT et al. 1996]. Einerseits durch das Vorhandensein von rezenter DNA in den Rea-

genzien, die für die Verarbeitung und Untersuchung des Materials verwendet werden und somit alle Amplifikationen betreffen. Andererseits Kontamination einzelner Extraktionen oder Amplifikationen, entstanden zum Beispiel bei dem Umgang mit dem archäologischen Material vor der Probenentnahme oder durch Aerosole im Labor, die humane DNA oder Amplifikationsprodukte enthalten.

In dieser Arbeit wurden pro fünf untersuchten Proben zwei bis drei Kontrollen ohne DNA-Extrakt (Leerkontrollen) amplifiziert, um eine Kontaminationsrate zu ermitteln. Von insgesamt 151 mitgeführten Leerkontrollen und 302 Proben zeigten acht eine Kontamination.

In jedem der Fälle war mindestens eine Kontrollprobe frei von PCR-Produkten. Die Kontaminationen in den Leerprodukten stellten somit kein übergreifendes Ereignis dar, so dass von einer vereinzelt auftretenden Kontamination der Reaktionsgefäße, wie sie unter anderem von SCHMIDT et al. [1995] beschrieben wurden, ausgegangen werden kann. Allerdings lassen sich die Kontaminationsraten der Leerkontrollen nicht direkt auf das Kontaminationsrisiko bei der Amplifizierung von Proben-DNA übertragen, da im Gegensatz zum Leeransatz hier ein Konkurrenzsituation vorliegt. So ist es denkbar, dass die Proben-DNA quantitativ überwiegt und nicht von den Produkten der kontaminierten DNA überlagert wird. Daher liegt das Kontaminationsrisiko für Ansätze mit Proben-DNA eher unter den Raten der Leerkontrollen.

5.3.3 Inhibition

Da das Probenmaterial meist nicht von sterilen Plätzen, sondern aus der natürlichen Umgebung wie zum Beispiel der Erde auf dem Friedhof stammt, können ko-inhibierende Substanzen vorkommen, welche bei der PCR-Analyse das Enzym Taq-Polymerase komplett hemmen und dadurch zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die Reaktion kann durch wesentliche Anteile von Fremd-DNA (z.B. von Mikroorganismen) oder durch Inhibitoren, wie Huminsäuren, Gerbsäuren oder Fulvinsäuren, den Abbauprodukten von Pflanzen, gestört werden [HUMMEL et al. 1995]. Von SCHOLZ et al. [1998] wurde außerdem gezeigt, dass Kollagen I, welches vom Knochen selbst stammt, ein potentieller Inhibitor sein kann. Zeichen einer Inhibition sind das Fehlen jeglicher Primerdimere und das Fehlen von unspezifischen Amplifikationsprodukten. Bei visueller Kontrolle waren die meisten Extrakte in unseren Untersuchungen farblos. Bei einigen Proben zeigte sich jedoch eine schwache Braunfärbung, welche sich auf das Vorhandensein von inhibitorischen Substanzen zurückführen lässt [COOPER 1992]. Nach elektrophoretischer Auftrennung rufen diese Substanzen unter dem 254 nm UV-Licht eine blau-grüne Fluoreszenz hervor [TUROSS 1994]. Trotz des Verdachtes von inhibitorischen Substanzen in einigen Extrakten, wurde eine

blau-grüne Fluoreszenz in den Agarosegelen nicht nachgewiesen. Infolgedessen konnte im Allgemeinen von einer guten Qualität der Extrakte ausgegangen werden. Bei einigen Proben (z.B. 376 und 1400) scheinen jedoch Inhibitoren eine Rolle gespielt zu haben, da weder spezifische Produkte noch unspezifische Amplifikationsprodukte extrahierbar waren.

5.3.4 Lagerungsbedingungen der Knochen aus Rain am Lech

Bei dem Material, das für diese Untersuchungen verwendet wurde, handelt es sich um Knochen aus dem 15. –18. Jahrhundert. Die untersuchte DNA stammt von toten Organismen und ist damit ancient DNA. Knochen hat den Vorteil, dass es als langfristig überdauerndes, hydrophobes und hartes Gewebe sehr widerstandsfähig gegenüber biogener, physikalischer und chemischer Dekomposition ist. Für den Erhalt der DNA sind aber, wie oben beschrieben, zusätzlich die Lagerungsbedingungen besonders wichtig. In der Stadt Rain, aus der die Skelette stammen, handelt es sich um den speziellen Fall, dass die Toten zuerst auf dem Friedhof beerdigt, später aber, als man diesen aus Platzgründen räumen musste, die Skelette in ein Gebeinhaus ausgelagert wurden (siehe 2.1.2). Durch die Umlagerung der Knochen kann von einer positiven Auswirkung auf die Konservierung der DNA ausgegangen werden. Die Lagerung der Knochen in dem Karner bedingte einen guten Luftaustausch und damit ein trockenes Klima. Die Temperatur dort ist konstant niedrig und der pH-Wert im neutralen Bereich. Zusätzlich bestand ein Schutz vor UV-Strahlen. Durch die Tatsache, dass sich die Gebeine zuletzt außerhalb des Erdbodens befanden, wurde die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung und damit auch Inhibition der PCR durch Huminsäuren etc. verringert. Die Lagerungsbedingungen waren damit sehr gut, so dass eine ausreichende Menge konservierter DNA in den Knochen enthalten war.

Trotzdem ist die Gefahr unspezifische Sequenzen zu erhalten gegeben und der alleinige Nachweis eines einzigen positiven PCR-Produktes nicht aussagekräftig genug. Aus diesem Grund wurden an die positiven PCR-Amplifikationen, zur Verifikation der Ergebnisse, Sequenzanalysen angeschlossen.

5.4 Amplifikation von humaner DNA

Um die Präsenz von amplifizierbarer DNA nachzuweisen wurden alle Proben zuerst mittels PCR auf β -Aktin-Sequenzen, mit einer Basenlänge von 202 bp, getestet.

Aktin ist ein häufig vorhandenes und hoch konserviertes Protein, das in allen eukaryoten Zellen gefunden wird. Insgesamt sind bei Säugetieren sechs verschiedene Isoformen bekannt. Diese werden unterteilt in muskelspezifische und nicht-muskelspezifische oder zy-

toplasmatische Aktine. Das β -Aktin ist eines der häufigsten zellulären Proteine in Säugerzellen. Es bildet die Hauptkomponente der mikrofilamentären Strukturen in den Zellen und ist damit, als Teil des Zytoskelettes, für die Zellmotilität, Mitose und Muskelkontraktion wichtig [NAKAJIMA-IIJIMA et al. 1985]. Im humanen Genom gibt es mindestens 20 verschiedene Genabschnitte für β -Aktin. Analysen haben gezeigt, dass die meisten davon weiterentwickelte Pseudogene sind und auf mindestens vier verschiedenen Chromosomen, einschließlich dem X-Chromosom, verteilt sind [NG et al. 1985a]. β -Aktin ist wegen seines ubiquitären Vorkommens und seiner Länge von lediglich 202 bp für die Untersuchung von ancient DNA und dem Nachweis ihrer Amplifizierbarkeit besonders geeignet [GHOSSEIN et al. 1994].

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass die Knochen aus dem Karner außerordentlich gut erhalten sind. Die Proben enthalten, obwohl schon hunderte von Jahren alt, in der Mehrzahl der Fälle amplifizierbare humane DNA. Wie in Tabellen 9 und 10 dargestellt, war in 75,0% β -Aktin nachweisbar. Vorversuche aus unserem Labor bestätigen diesen Wert. ZINK et al. [2001] erzielten bei der Untersuchung von 41 Skelettproben aus Altägypten auf β -Aktin mit 27 positiven Ergebnissen, entsprechend 63,4%, einen ähnlich hohen Prozentsatz. Die Resultate bestätigen, dass die Knochen prinzipiell amplifizierbare DNA enthalten. Damit war die Voraussetzung für ein Fortführen der Untersuchungen erfüllt.

5.5 PCR- und Sequenzierungs-Ergebnisse von plasmodialer DNA

Um Malaria in den archäologischen Knochenüberresten nachzuweisen wurden publizierte Gensequenzen von Plasmodien-DNA [SNOUNOU et al. 1993 a, b; TAYLOR et al. 1997] verwendet. 20 Knochenproben von unterschiedlichen Individuen mit Cribra orbitalia oder Hyperostosen wurden mittels sechs verschiedener Primerpaare untersucht und positive Amplifikationen anschließend zur Bestätigung des Ergebnisses sequenziert. Insgesamt wurden 25 Proben von den 20 Individuen analysiert. Eine dieser Proben ergab PCR-Produkte aus zwei unabhängigen Extraktionen, welche beim Sequenzieren hohe Übereinstimmungen mit den 18S rRNA Gensequenzen der vier für den Menschen pathologischen Plasmodiumarten zeigte.

Bei den Untersuchungen ist auffällig, dass bei einem hohen Anteil der PCR-Amplifikationen Produkte der erwarteten Größe erzielt wurden, jedoch nach dem Sequenzieren nur eine Probe als positiv für Malaria bestätigt werden konnte. Der Anteil an positi-

ven Amplifikationen unterschied sich zwar je nach Primerpaar zwischen 0-80%, bildet man aber einen Durchschnittswert, so ergibt sich ein immer noch hoher Prozentsatz von 33% positiven PCRs. Im Gegensatz dazu steht, dass von 25 durchgeführten Sequenzierungen bei einer Probe, und damit bei 4%, Malaria identifiziert werden konnte. Für diese Ergebnisse kommen unterschiedliche Gründe in Frage:

Wie immer bei Forschungsarbeit an archäologischen Biomolekülen ist der Erhaltungszustand der Knochen entscheidend. Verschiedene Studien an ancient DNA haben gezeigt, dass die Erfolgsrate der PCR-Amplifikation, speziell von menschlicher DNA, sehr stark in Abhängigkeit von dem Konservierungszustand variiert [VERNESI et al. 1999]. Wie unter 5.3 beschrieben ist, müssen deshalb bei der Untersuchung von ancient DNA besondere Umstände bedacht werden. Die DNA durchläuft durch ihr hohes Alter spezifische Modifikationen, so dass es unter anderem zur Dekomposition kommt. In der Regel ist die Länge von ancient DNA-Molekülen deshalb auf einige hundert Basenpaare reduziert. Die durch die verschiedenen, hier verwendeten Primer, amplifizierten Fragmente befinden sich im Bereich von 135-205 Basenpaaren (Tabelle 6). DNA-Sequenzen dieser Länge sind in historischen Proben im Allgemeinen noch zu finden.

Von den sechs verwendeten Primerpaaren sind nur die Primer MAL 7/8 [TAYLOR et al. 1997] speziell für den Nachweis von ancient DNA entwickelt worden. Alle anderen Primer wurden für die rezente klinische Diagnostik einer Malaria bei dem Verdacht auf eine aktuell bestehende Infektion entworfen und werden vor allem für die Durchführung einer PCR aus frisch gewonnenem Patientenblut verwendet. Da Kontaminationen mit anderen Organismen in solchen Fällen selten sind, wurden die Primer nicht darauf überprüft, ob sie neben der plasmodialen DNA auch Sequenzen anderer Mikroorganismen, wie z.B. Pilze, amplifizieren. Dies legen jedoch die hier beschriebenen PCR-Ergebnisse nahe. Mit den Primern MAL 7/8 [TAYLOR et al. 1997] wurden mit 80% die meisten positiven Ergebnisse erzielt. Auch der eindeutige Malarianachweis der Probe 345 stammt aus den Untersuchungen mit dieser Primern. Die anderen Primer hingegen lieferten nur positive Resultate zwischen 0-55%.

Eine weitere Ursache für negative PCR-Ergebnisse könnte sein, dass die in den Knochen verbleibende DNA unterhalb der Nachweisgrenze von 20 fg DNA lag [TAYLOR et al. 1997]. Im Prinzip kann jeder Teil des menschlichen Körpers mit einer Blutversorgung plasmodiale DNA enthalten. Diejenigen Knochen, die Knochenmark enthalten sind das beste Ziel, wenn keine Weichteile verfügbar sind. Dennoch muss damit gerechnet werden, dass nur ein sehr geringer Teil von DNA in den Proben verbleibt. In diesem Kontext muss

auch bedacht werden, dass viele Malariainfektionen asymptomatisch, mit einer sehr niedrigen Parasitämie, verlaufen. Wenn es zum Tode kommt, ist dieser selten allein durch eine Malariainfektion verursacht, sondern eher durch die Kombination mehrerer synergistisch wirkender Erkrankungen bzw. von Malaria-induzierten Komplikationen. Solche Zustände waren innerhalb historischer Populationen vermutlich sehr häufig [SALLARES 2000]. Es ist anzunehmen, dass dies in früherer Zeit deutlich häufiger als heute der Fall war. Vor allem bei Patienten, die vererbte Resistenzen (z.B. Sichelzellanämie) oder alternativ eine erworbene Immunität nach wiederholten Infektionen im Kindesalter unter holoendemischen Bedingungen aufgebaut haben, kann dies der Fall sein. Deshalb ist es sogar bei Infektionen heutzutage möglich, dass nur sehr niedrige Konzentrationen von Malaria DNA vorhanden sind. Folglich kann sich zukünftig in der Praxis herausstellen, dass viele der Malariafälle in der Vergangenheit, selbst mit hochentwickelten biomolekularen Methoden kaum zu entdecken sind.

Der genaue Sequenzvergleich ergibt, außer bei Probe 345, deutliche Unterschiede mit der Zielsequenz.

Bei den PCR-Durchläufen ließ der hohe Anteil an positiven Amplifikationen mit den Primern MAL 7/8 bereits vermuten, dass neben plasmodialer DNA auch unspezifische Reaktionen abgelaufen waren und sich die Sequenz folglich eher von einem unbekanntem Organismus ableitet.

Die detaillierte Analyse der BLAST Ergebnisse bestätigt diese Vermutung:

Bei der Eingabe in die Datenbank erkennt man, dass die PCR-Produkte Sequenzen ergaben, die außer bei der Probe 345 nur eine geringe Ähnlichkeit mit den Zielsequenzen zeigten, hingegen jedoch eine gewisse Übereinstimmung mit Sequenzen verschiedenster Pilze, Mikroorganismen sowie humaner DNA aufwiesen. Ursächlich für die häufige Übereinstimmung mit Pilzsequenzen können die Lagerungsbedingungen im Gebeinhaus gewesen sein. Die Renovierung der Kapelle wurde nötig, da gerade in den letzten Jahren vor Entnahme der Gebeine, die Wände und Mauern der Kapelle feucht geworden waren, womit optimale Bedingungen für das Wachstum von Pilzen herrschten. Dass die BLAST-Analyse unter anderem auch humane Sequenzen ergab liegt mit daran, dass die Datenbank einen sehr hohen Anteil humaner Sequenzen enthält. Die Wahrscheinlichkeit zumindest eine gewisse Übereinstimmung zu finden ist deshalb groß.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit ähnlichen Studien, so sieht man, dass TAYLOR et al. [1997] ebenso wie SALARES et al. [2000] auf sehr ähnliche Probleme stießen.

TAYLOR und Koautoren [1997] konnten erfolgreich Malaria DNA aus einer Rippe amplifizieren. Die untersuchte Knochenprobe stammte von einem Individuum, das 1937 an Anämie, vermutlich ausgelöst durch Malaria, gestorben ist. Die Identität des Pathogens wurde mittels Sequenzierung des PCR-Produktes bestätigt. Es ergab 98% Sequenzübereinstimmung mit dem 18S rRNA Gene von *P. falciparum*. Weitere Versuche an einer zweiten Rippe eines 1936 gestorbenen Individuums, sowie an einer mittelalterlichen Skelettprobe aus Spanien und einer Mumie aus Ägypten, ergaben keine positiven Ergebnisse. Obwohl mehrere Individuen, von denen das Untersuchungsmaterial stammt, eine klinisch nachgewiesene Malariainfektion durchgemacht haben beziehungsweise an ihr verstorben sein sollen, konnte nur bei einer Probe zweifelsfrei Malaria nachgewiesen werden.

SALLARES et al. [2000] hatten die Möglichkeit, Knochen aus einer archäologischen Ausgrabungsstätte in Italien zu untersuchen. Die 40 gefundenen Kinderskelette stammen aus dem fünften Jahrhundert AD und sind nach den Analysen von SOREN et al. [1995, 1999] an einer Malariaepidemie gestorben. Die fünf ältesten dieser Skelette wurden mit den Primern MAL 7/8 nach TAYLOR et al. [1997] untersucht. Zwei der fünf untersuchten Skelette produzierten Banden im Agarosegel für das plasmodiale 18S rRNA Gene. Eine dieser beiden Proben ergab bei zweimaliger Extraktion reproduzierbare PCR Produkte, welche sich bei Sequenzieren als 98% identisch mit der *P. falciparum* 18S rRNA Gensequenz, herausstellten. Wie bei unseren Untersuchungen lieferte keine der anderen Proben PCR-Produkte, die mit den bekannten Malariasequenzen übereinstimmte, sondern eine Vielzahl von Sequenzen verschiedenster Pilze, Bakterien und anderer Organismen.

Einige interessante Schlussfolgerungen können aus diesen Resultaten gezogen werden.

Primer, die entwickelt wurden, um ein spezifisches Ziel im Malariagenom zu amplifizieren, können tatsächlich DNA einer große Anzahl von lebenden Organismen amplifizieren, vor allem wenn sie auf hoch konservierten Sequenzen basieren und eine große Zahl von Zyklen, wie in einer hemi-nested PCR, verwendet wird. Macht man einen Sequenzabgleich der Primer, so sieht man, dass die Rückwärtsprimer MAL 8a, b von TAYLOR et al. [1997] in den meisten eukaryoten Organismen sehr hoch konserviert sind und deshalb die Fähigkeit besitzen, lineare Amplifikationen von DNA sehr vieler Organismen neben Plasmodium zu initiieren. Am anderen Ende des PCR Produktes, ist der Vorwärtsprimer einzigartig für Plasmodium. Nichts desto trotz scheint es im Gesamteffekt ein Primerpaar zu sein, das zu Amplifikationen einer großen Vielfalt von nicht-Malaria spezifischen Sequenzen führen kann [SALLARES et al. 2000].

Vor ähnliche Probleme wurden auch ROLLO und MAROTA [1999] bei ihren Untersuchungen einer Mumie aus dem 16. Jahrhundert AD auf *Treponema pallidum* gestellt. Sie erhielten PCR Produkte, die die richtige Größe zu haben schienen, aber direktes Sequenzieren ergab eine Sequenz mit geringer Ähnlichkeit zu *T. pallidum* und anschließendes Klonieren produzierte individuelle Sequenzen verwandt mit einer großen Anzahl an Bakteriengattungen. Auch die Arbeit von ROLLO und MAROTA [1999] deutet darauf hin, dass man zahlreiche Spezies von Bakterien und Pilzen in altertümlichen menschlichen Überresten finden wird, wenn diese den Primern alternative Annealing-Möglichkeiten bieten.

Unerwünschte Amplifikation von verschiedenen Bakterien, Pilzen oder anderen nicht-Ziel Sequenzen scheinen ein typisches Problem mit Primern zu sein, die entwickelt worden sind, um ribosomale DNA zu amplifizieren. Ursächlich dafür kann die langsame Entwicklung und die hohe Konservierung der ribosomalen DNA sein. Deshalb scheint ribosomale DNA keine gute Wahl für PCR Systeme zu sein, die beabsichtigen Sequenzen spezifischer Mikroorganismen wie Plasmodium oder Treponemen, in der Erforschung paläopathologischer Erkrankungen, zu amplifizieren.

Ein weiteres Beispiel für dieses Problem ist die kürzliche Demonstration, dass ein Paar 18S rRNA Primer, die verwendet wurden, um Plasmodium Spezies in infizierten Reptilien nachzuweisen, genau so gut die DNA der Insektenvektoren und der Wirbeltier-Wirte amplifizieren kann [PERKINS & MARTIN 1999].

Die Schlussfolgerung dieser Untersuchungen ist, dass noch viel Arbeit geleistet werden muss, um eine passende Methoden zur Identifikation von Biomoleküle von Malariaparasiten in altertümlichen menschlichen Knochenresten zu entwickeln. Nur dann kann das komplette Potential der biomolekularen Archäologie in Bezug auf Malaria ausgeschöpft und noch offenen Fragen diesbezüglich beantwortet werden.

Dennoch ist der erfolgreiche Nachweis von Malaria gelungen.

Die Probe 345 zeigte bereits in der PCR positive Ergebnisse mit jedem der malarianachweisenden Primer, außer mit MAL 11/12. Das anschließende Sequenzieren und der Vergleich dieser Sequenz mit der Zielsequenz, ergab geringe Unterschiede in der Basenabfolge. Dabei fällt auf, dass sich die unterschiedlichen Basen in einem Bereich befinden, in dem auch die vier Plasmodiumarten untereinander stark variieren. Es kann spekuliert werden, dass dies ein besonders variabler Bereich ist, der im Laufe der Jahrhunderte durch Mutation gewissen Veränderungen unterworfen war. In einer zweiten Extraktion der Probe 345 wurde die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses bewiesen. Damit ist eindeutig eine Malariainfektion bei einem der Skelette aus Rain am Lech nachgewiesen.

Eine genaue Spezieszuordnung war nicht möglich. Durch die Auswahl der verschiedenen Primer, die jeweils einen oder mehrere der vier unterschiedlichen humanpathogenen Malariaerreger nachweisen, sollte ein erster Hinweis auf die Spezies gegeben werden. Da jede Probe mit jedem der sechs Primer untersucht wurde, würde schon anhand dieser Ergebnisse eine genauere Eingrenzung der Art möglich sein. Doch wie Tabelle 11 und 12 zeigen, ließ die Verteilung der positiven PCR-Ergebnisse auf die verschiedenen Primerpaare keine eindeutige Spezieszuordnung zu. Die Probe 233 z.B. ergab eine positive Amplifikation mit dem Primerpaar MAL 1/2 jedoch nicht mit MAL 3/4, obwohl beide *P. falciparum* nachweisen. Ein weiteres Beispiel ist Probe 219. Diese zeigte mit MAL 7/8 ein positives Ergebnis, als Hinweis auf eine Infektion mit einem der vier Erreger. Mit den anderen Primer allerdings konnte keine weitere positive Amplifikation nachgewiesen werden. Ein zusätzliches Problem ist, dass die genaue Sequenz der damals existierenden Malariaerreger nicht genau bekannt ist. Es ist anzunehmen, dass diese im Laufe der Jahrhunderte gewissen Veränderungen unterworfen war.

In der Zukunft wird es deshalb wahrscheinlich notwendig sein, alternative Ziele in anderen Teilen des Genoms zu finden, die spezifischer als ribosomale DNA sind. Experimente werden zur Zeit mit Primern für Gene der Zelloberflächenproteine gemacht. Diese sind viel variabler, entwickeln sich schneller als ribosomale DNA, haben eine größere Anzahl von Kopien in Plasmodien als ribosomale DNA und sind unverwechselbarer, aufgrund ihrer angenommenen Funktion des Ausweichens und Interagierens mit dem menschlichen Immunsystem. Es gibt viele andere Teile des Plasmodium Genoms, die geeignete PCR Systeme liefern könnten, und die Nummer von möglichen Zielen wird sich mit der Weiterentwicklung des Malaria Genom Sequencing Project schnell erhöhen.

Eine weitere Möglichkeit, die Vielzahl an Sequenzen, vor allem auch überlagerte Sequenzen genauer zu analysieren ist das Klonieren. Gerade wenn das PCR-Produkt aus einem Material generiert wurde, das von mehr als einem Individuum oder aus einem DNA-Gemisch stammt, wie es bei archäologischem Material oft der Fall ist, kann eine Klonierungsschritt vor oder nach dem Sequenzieren helfen, die vielen verschiedenen Sequenzen zu identifizieren [HUMMEL 1995]. Bei unseren Ergebnissen kam es mehrfach zu überlagerten Sequenzen. Dabei ist es möglich, dass die gesuchte Sequenz sich zwar darunter befindet, aber zum Beispiel durch Pilzsequenzen überlagert und nicht zu erkennen ist. Kloniert man, so hat man die Möglichkeit diese Sequenz unter den anderen zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit war das Klonieren zeitlich sowie aufgrund der mangelnden technischen Ausstattung des Labors leider nicht möglich.

Als alternative Methode sollte auch bedacht werden, dass es möglich ist, Malaria indirekt zu erforschen, indem man menschliche Genmutationen, wie den Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, betrachtet. Die Häufigkeit dieser Mutationen ist in vielen Populationen in der Vergangenheit, als Resultat der beträchtlichen Kraft der natürlichen Selektion durch Malaria, stark angestiegen. Der Nachweis solcher Mutationen in archäologischen Skeletten würde natürlich nicht beweisen, dass dieses besondere Individuum jemals mit Malaria infiziert war, kann aber ein Hinweis darauf sein, dass Vorfahren Kontakt mit endemischen Malariainfektionen hatten. Diese Alternative sollte vor allem auch deshalb in Betracht gezogen werden, da es immer leichter sein wird, menschliche DNA aus menschlichen Knochen zu extrahieren als exogene DNA, wie die von Malariaparasiten.

Zu Beginn wurde bei der Suche nach paläomikrobiologischen Infektionen besonderes Augenmerk auf das Aufdecken von Pathogenen gelegt, die typische morphologische Veränderungen an Knochen und Weichteilen hervorrufen. Mittlerweile ist durch die technische Entwicklung speziell adaptierter Extraktions- und Amplifikationsverfahren der erfolgreiche Nachweis von unterschiedlichen Pathogenen in bis zu mehrere tausend Jahren altem skeletalem und mummifiziertem Material möglich geworden. Die meisten molekularen Untersuchungen wurden am Mycobacterium-tuberculosis-Komplex gemacht, der aufgrund der schützenden Zellwandeigenschaften der Mycobacterien für die Analysen besonders geeignet war. Die Studien an historischen Tuberkuloseinfektionen waren bald nicht mehr nur auf die Diagnose einzelner Infektionserkrankungen begrenzt, sondern erbrachten interessante Daten über das Auftreten und die Frequenz von Tuberkulose in früheren Populationen. Mit der Einführung der Spoglotyping Technik, die auf der Variation der DR (direkt repeat) Region bei den Mycobacterium-tuberculosis-Komplex Mitgliedern basiert, wurde die Unterscheidung zwischen den Mitglieder des Mycobacterium-tuberculosis-Komplex und damit die Untersuchung der Evolutionsaspekte von mykobakteriellen Infektionen möglich. Mit diesen Auswertungen entstanden Theorien zur Herkunft und Übertragung der Erkrankung, welche einen wichtigen Beitrag zur modernen mikrobiologischen Forschungsarbeit darstellen [ZINK et al. 2002a].

Es existieren viele historische und archäologische Beweise von anderen Infektionserkrankungen, wie Lepra, Pest, Malaria usw., die schon in historischen Proben durch erfolgreiche Amplifikation des entsprechenden Pathogens aufgedeckt wurden. Dennoch fehlen bis jetzt ausgedehnte Studien, um mehr Information über die Häufigkeit, Übertragung und wahrscheinliche Evolution dieser Pathogene zu erhalten. In Anbetracht des klinischen Verlaufes dieser Infektionen und der Bedeutung für die Bevölkerung, ist dies besonders bei Malaria

wichtig. Die andauernde Forschung in diesem relativ neuen wissenschaftlichen Feld hat das Potential zu einem besseren Verständnis von Wirt-Pathogen Interaktion, Übertragung und Verbreitung der Infektionserkrankung in historischen und modernen Zeiten beizutragen.

6 Zusammenfassung

Malaria ist, mit zirka einer Millionen Todesopfern jährlich, eine der wichtigsten Infektionskrankheiten weltweit. Ihre Verbreitung begrenzt sich heutzutage, bis auf seltene Ausnahmen, auf ein endemisches Auftreten in den Tropen. Klinische Beschreibungen weisen jedoch auf die Ausbreitung der Erkrankung bis in die nördlichen Gebiete Europas einschließlich Deutschlands im 15. –19. Jahrhundert hin.

In der vorliegenden Arbeit sollen bis heute fehlende, molekularbiologische Nachweise von humanen Malariainfektionen für den Raum Süddeutschland geliefert werden. Die Skelettserie aus Rain am Lech stellt dabei mit insgesamt 2547 teilweise erhaltenen Skeletten aus dem 15. –18. Jahrhundert ein ideales Untersuchungskollektiv dar. Durch die Lage der Stadt im Donaumoos, zwischen Donau und Lech, verfügte Rain als früheres Sumpfgebiet über optimale Lebensbedingungen für Plasmodien.

Für die paläomikrobiologischen Untersuchungen wurden 20 Knochen ausgewählt, die pathologische Veränderungen einer „Cribra orbitalia“ und „Hyperostosen“ aufwiesen. Diese gelten als Zeichen für eine Anämie und können damit hinweisend auf Malariainfektionen sein. Aus dem gewonnenen Knochenmehl wurde die DNA extrahiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation von humaner DNA mittels β -Aktin mit der Polymerase-Kettenreaktion. Der Nachweis dieses hoch konservierten, in allen eukaryonten Zellen häufig vorkommenden Genes, zeigte den guten Erhaltungszustand der DNA in den Knochen an. Plasmodiale DNA wurde im nächsten Schritt mittels sechs verschiedener Primer, unter Verwendung des für die kleine ribosomale Untereinheit kodierenden Genes, amplifiziert. Um die positiven Ergebnisse dieser Tests zu verifizieren wurden anschließend 25 ausgewählte Proben sequenziert.

Der Cribraanteil am Gesamtkollektiv wurde mit 31,4% ermittelt. Dieser hohe Prozentsatz lässt sich auf die vielfältigen Ursachen für die Knochenveränderung zurückführen. Die alters- und geschlechtsspezifische Verteilung zeigte übereinstimmend mit anderen Studien ein vermehrtes Auftreten im Kindesalter sowie bei weiblichen Individuen, möglicherweise durch den erhöhten Eisenbedarf im Kindes- und gebärfähigem Alter bedingt.

Bei den molekularbiologischen Untersuchungen fiel eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der PCR und der Sequenzierung auf. Neben dem großen Anteil positiver Amplifikationen ergab das anschließende Sequenzieren für eine Probe hohe Übereinstimmungen mit den Genomen der vier humanpathologischen Malariaerreger. Die Sequenzanalyse der PCR-Produkte zeigte, außer bei der oben erwähnten Probe, nur eine geringe Ähnlichkeit

mit den Zielsequenzen. Gewisse Übereinstimmung wurden jedoch mit den DNA-Sequenzen verschiedenster Pilze, Mikroorganismen sowie humaner DNA gefunden.

Folgende Aspekte können diese Ergebnisse erklären: Die untersuchte ancient DNA, die aus dem 15. –18. Jahrhundert stammt, ist durch Dekomposition unterschiedlichen biogenen, physikalischen und chemischen Reaktionen ausgesetzt, so dass es zur Modifikation von Basen und zu Strangbrüchen kommt. Aufgrund der geringen Anzahl der erhaltenen Moleküle, sowie der kurzen Fragmentlänge ist diese besonders sensibel gegenüber Kontaminationen. Durch verschiedene Stoffe, wie Fremd-DNA, z.B. von Mikroorganismen oder durch Abbauprodukte von Pflanzen, können die Amplifikationen zusätzlich inhibiert werden. Wichtig ist weiterhin, dass nur eines der sechs verwendeten Primerpaare speziell für die Analyse von ancient DNA, alle anderen Primer für den Nachweis von akut bestehenden Malariainfektion entwickelt wurden.

Dennoch ist der erfolgreiche Nachweis von Malaria in einer Probe gelungen. Eine eindeutige Spezieszuordnung war nicht möglich. Die Basen, die sich von der Zielsequenz unterscheiden, befinden sich in einem Bereich, in dem auch die vier Plasmodiumarten untereinander stark variieren. Es kann spekuliert werden, dass dieser besonders variable Bereich im Laufe der Jahrhunderte durch Mutation Veränderungen unterworfen war, oder aber eine Mischinfektion bei dem Individuum vorlag.

In der Zukunft steht es aus eine zuverlässigere Methoden zu entwickeln um die Biomoleküle von Malariaparasiten in historischen menschlichen Knochenüberresten zweifelsfrei aufzudecken oder andere Teile des Genoms zu finden, die spezifischer als ribosomale DNA sind.

7 Literaturverzeichnis

ANDERSON, T. JC., SU, X.-Z., BOCKARIE, M., LAGOG, M., DAY, K.P. (1999): Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* 1999: 113-125.

ANGEL, J. L. (1966): Porotic Hyperostosis, Anemias, Malaras, and Marshes in the Prehistoric Eastern Mediterranean. *Science* 153: 760-763.

AUFDERHEIDE, A. C. & RODRÍGUEZ-MARTÍN, C. (1998): *The Cambridge Encyclopedia of human Paleopathology*. Cambridge University Press. 1998.

BABIKER, H. A., ABDEL-MUHSIN, A., RANFORD-CARTWRIGHT, L. C., SATTI, G., WALLIKER, D. (1998): Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 582-590.

BACHMEIER, B., KAISER, C., NERLICH, A. G., PENNING, R., EISENMENGER, W., PESCHEL, O. (2001): Preliminary molecular study of time-dependent changes in DNA-stability in soil-buried skeletal material. In: Brinkmann B., editor. *19th International Congress International Society for Forensic Genetics*, Münster, Germany. p 107 [abstract].

BÄR, W., KRATZER, A., MÄCHLER, M., SCHMID, W. (1988): Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int.* 39: 59-70.

BENNIKE, P. (1985): *Palaeopathology of Danish Skeletons. A Comparative Study of Demography, Disease and Injury*. Akademisk Forlag, Kopenhagen.

BERENBAUM, M. R. (1997): *Blutsauger, Staatsgründer, Seidenfabrikanten*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997.

BERG, S. (1975): Leichenzersetzung und Leichenzerstörung. In: Müller B. (ed): *Gerichtliche Medizin*, Bd. I. Springer, Berlin Heidelberg.

BRITTON, H. A., CANBY, J. P., MOHLER, C.M. (1960): Iron deficiency anemia producing evidence of marrow hyperplasia in calvarium. *Pediatrics* 25: 621-628.

BOOM, R, SOL, C. J. A., SALIMANS, M. M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E., VAN DER NOORDAA, J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495-503.

BURGER, J., HUMMEL, S., HERRMANN, B., HENKE, W. (1999): DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20: 1722-1728.

CAPASSO, C. (1998): Evidence of Malaria on ancient bones. *International Journal of Anthropology* 13 (Nr 3-4): 172-175.

CARLI-THIELE, P.(1996): *Spuren von Mangelkrankungen an steinzeitlichen Kinderskeletten*. In: Schultz, M. (Hrsg.): Fortschritte in der Paläopathologie und Osteoarchäologie, Band 1. Verlag Erich Goltze, Göttingen.

CONE, R. W. & FAIRFAX, M. R (1993): Protocol for ultraviolet irradiation of surfaces to reduce PCR contamination. *PCR Meth. Applic.* 3: 15-17.

COOPER, A. (1992): Removal of colourings, inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contaminations from ancient DNA samples. *Ancient DNA-Newsletter* 1:31-32.

DORN, L. (1974): *Rainer Bürger im Alltag 1545-1654* (Nach den Ratsprotokollen der Stadt Rain). Selbstverlag der Stadt Rain.

DORN, L. (1985): *Historisches aus Rain*. Selbstverlag der Stadt Rain.

EGLINGTON, G. & LOGAN, G. A. (1991): Molecular preservation. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* 333: 315-328.

EL-NAJJAR, M. L., LOZOFF, B., RYAN, D. J. (1975): The Paleoepidemiology of porotic hyperostosis in the american southwest: Radiological and ecological considerations. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* Vol.125, Nr. 4:918-924.

EL-NAJJAR, M. L. & ROBERTSON, A.L. (1976): Spongy Bones in Prehistoric America. *Science* 193: 141-143.

EL-NAJJAR, M. L., RYAN, D. J., TURNER II, C. G., LOZOFF, B. (1976): The Etiology of Porotic Hyperostosis Among the Prehistoric and Historic Anasazi Indians of Southwestern United States. *Am. J. Phys. Anthrop.* 44: 477-488.

VON ENDT, D. W. & ORTNER, D. J. (1982): Amino Acid Analysis of Bone from a Possible Case of Prehistoric Iron Deficiency Anemia from the American Southwest. *Am. J. Phys. Anthrop.* 59: 377-385.

EVISON, M. P., SMILLIE, D. M., CHAMBERLAIN, A. T. (1997): Extraction of single-copy nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories. *Journal of Forensic Sciences* 42: 1032-1038.

FEREMBACH, D., SCHWIDETZKY, I., STLOUKAL, M (1979): Empfehlungen für die Alter- und Geschlechtsdiagnose am Skelett. *Homo* 30: 1-32.

FLEMING, A. F. (1994): Agriculture-related anaemias. *Br. J. Biomed. Sci.* 51: 345-357.

GHOSSEIN, R. A., ROSS, D. G., SALOMON, R. N., RABSON, A. R. (1994): A search for mycobacterial DNA in sarcoidosis using the polymerase chain reaktion. *American Journal of Physical Anthropology* 65:381-386.

GOLENBERG, E. M. (1991): Amplification and analysis of Miocene plant fossil DNA. *Phil Trans R Soc Lond B* 333: 419-427.

GOMAN, M., MONS, B., SCAIFE, J. (1991): The complete sequence of a Plasmodium malariae SSUrRNA gene and its comparison to other plasmodial SSUrRNA genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 281-288.

GRUPE, G. (1995): Zur Ätiologie der Cribra orbitalia: Auswirkungen auf das Aminosäureprofil im Knochenkollagen und den Eisengehalt des Knochenminerals. *Z. Morph. Anthrol.* 81: 125-137.

HAAS, C.J., ZINK, A., MOLNÁR, E., MARCSIK, A., DUTOUR, O., NERLICH, A. G., PÁLFI, G. (2000): Molecular evidence for tuberculosis in Hungarian skeletal samples. *Am. J. Phys. Anthropol.* 113 (3):293-304.

HACKETT, L. W. (1937): Malaria in Europe: An Ecological Study. *Oxford University Press*, Oxford.

HANDT, O., HÖSS, M., KRINGS, M., PÄÄBO, S. (1994): Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 50: 524-529, Birkhäuser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland.

HANDT, O., KRINGS, M., WARD, R. H., PÄÄBO, S. (1996): The retrieval of ancient human DNA sequences. *American Journal of Human Genetics* 59: 368-376.

HENGEN, O. P. (1971): Cribra orbitalia: Pathogenesis and Probable Etiology. *Homo* 22: 57-76.

HERRMANN, B., GRUPE, G., HUMMEL, S., PIEPENBRINK, H., SCHUTKOWSKI, H. (1990): *Prähistorische Anthropologie*. Springer Berlin Heidelberg 1990.

HOFTREITER, M., SERRE, D., POINAR, H. N., KUCH, M., PÄÄBO, S. (2001): Ancient DNA. *Macmillan Magazines Ltd* Vol. 2, 354-359.

HÖSS, M., JARUGA, P., ZASTAWNY, T. H., DIZADAROGLU, M., PÄÄBO, S. (1996): DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissue. *Nucleic Acids Research* Vol. 24., No. 7: 1304-1307.

HUMMEL, S. (1992): *Nachweis spezifischer Y-chromosomaler DNA-Sequenzen aus menschlichem bodengelagerten Skelettmaterial unter Anwendung der Polymerase Chain Reaction*. Ph. Thesis, Göttingen 1992.

HUMMEL, S. & HERRMANN, B. (1993): General aspects of sample preparation
In: Herrmann, B. und Hummel, S. (eds.) *Ancient DNA*. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, and forensic specimens. Springer-Verlag, New York, 205-210.

HUMMEL, S. & HERMANN, B. (1995): aDNA analysis in Paleopathology: Mini review and prospects. *Paleopath. Newsletter* 91: 6-9.

HUMMEL, S., NORDSIEK, G., RAMECKERS, J., LASSEN, C., ZIERDT, H., BARON, H., HERRMANN, B. (1995). aDNA – Ein neuer Zugang zu alten Fragen. *Z. Morph. Anthrop.* 81: 41-65.

INNIS, M. A., MYAMBO, K. B., GELFAND, D. H., BROW, M. A. (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA.

JELINEK, T. & MÜHLBERGER, N. (2001): *Arbeitsgemeinschaft Malaria*. Importierte Malaria in Deutschland. www.antiinfectives-intelligence.de/peg/veranstaltungen/jahrestagung_18/forum/ag_malaria

KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERT, J., ZINKERNAGEL, R. M. (1998): *Medizinische Mikrobiologie*. 9., überarbeitete und neugestaltete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 1997.

KELLY, W. & PÄÄBO, S. (1993): DNA Sequences from old Tissue Remains. *Methods in Enzymology* Vol. 224: 406-419.

KENT, S. (1986): The influence of sedentism and aggregation on porotic hyperostosis and anaemia. A case study. *Man* 21: 605-636.

KITCHIN, P. A., SZOTYORI, Z., FROMHOLC, C., ALMOND, N. (1990): Avoidance of false positives. *Nature* 334: 201.

KOST, T. A., THEODORAKIS, N., HUGHES, S. H. (1983): The nucleotide sequence of the chick cytoplasmatic β -actin gene. *Nucleic Acids Research* Vol 11, N. 23: 8287-8301.

KWOK, S. (1989): Procedures to minimize PCR-product carryover. *Amplifications* 2: 4.

KWOK, S. & HIGUCHI, R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339 :237-238.

LANGSLEY, G., HYDE, J. E., GOMAN, M., SCAIFE, J. G. (1983): Cloning and characterization of the rRNA genes from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucl. Acids Res.* 11: 8703-8717.

LASSEN, C., HUMMEL, S., HERRMANN, B. (1994): Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. *Int. J. Leg. Med.* 107: 152-155.

LINZ, U. & DEGENHARDT, H. (1990): Die Polymerase Kettenreakton. Ein Überblick. *Naturwissenschaften* 77: 515-530.

LÖFFELMEIER, A. (1995): Die Physikatsberichte für das Landgericht Rain für die Jahre 1857-1861. in: *Oberbayerisches Archiv* 119: 97-146

LONGO, M. C., BERNINGER, M. S., HARTLEY, J. L. (1990): Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaktions. *Gene* 93: 125-128.

MAROTA, I., BASILE, C., UBALDI, M., ROLLO, F.(2002): DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. *Am. J. Phys. Anthropol.* 117 (4): 310-318.

MARTY, A. M. & ANDERSON, E. M. (1995): Malaria. In: *Tropical Pathology*. Hrsg: Prof. Dr. Dres. h. c. Wilhelm Doerr, Heidelberg, Prof. Dr. Gerhard Seifert, Hamburg. Volume 8, 2 nd Edition. Springer-Verlag: 557-595.

MCCUTCHAN, T. F., DE LA CRUZ, V. F., LAL, A. A., GUNDERSON, J. H., SOGIN, M. L. (1988): Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28: 63-68.

MØLLER-CHRISTENSEN, V. & SANDISON, A. T. (1963): *Usura orbitae* (cribra orbitalia) in the collection of the University of Glasgow. *Path. Microbiol.* 26: 175-183.

MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. (1987): Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.

NAKAJIMA-IIJIMA, S., HAMADA, H., REDDY, P., KAKUNAGA, T. (1985): Molecular structure of the human cytoplasmatic β -Aktin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci* 82: 6133-6137.

NATHAN, H. & HAAS, N. (1966): Cribra orbitalia, a bone condition of the orbit of unknown nature. *Israel J. Med. Sci.* 2: 171-191.

NERLICH, A. G., HAAS, C. J., ZINK, A., SZEIMIES, U., HAGEDORN, H. G. (1997): Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet* 350: 1404.

NEWTON, C.R., GRAHAM, A. (1994): *PCR*, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

NG, S.-Y., GUNNING, P., EDDY, R., PONTE, P., LEAVITT, J., KEDES, L., SHOWS, T. (1985): Chromosome 7 assignment of the human β -actin functional gene (ACTB) and the chromosomal dispersion of pseudogenes. *Cytogenetics and cell genetics* Vol. 39: 712.

NG, S.-Y., GUNNING, P., EDDY, R., PONTE, P., LEAVITT, J., SHOWS, T., KEDES, L. (1985): Evolution of the Functional Human β -Actin Gene and Its Multi-Pseudogene Family: Conservation of Noncoding Regions and Chromosomal Dispersion of Pseudogenes. *Molecular and Cellular Biology* Vol 5, No. 10: 2720-2732.

NIEDERHAUSER, C, HÖFELEIN, C, WEGMÜLLER, B, LÜTHY, J, CANDARIAN, U. (1994): Reliability of PCR decontamination systems. *PCR Meth. Appl.* 4: 117-123.

NIENHAUS, C, & GEHRMANN, P (1991): PCR: Kontaminationen und deren Vermeidung. *BioTechniques* 2: 48-50.

ORREGO, C. (1990): Organizing a laboratory for PCR work. In: Innis MA, Gelfand DH, Snisky JJ, und Whiote TJ. (eds.): *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 447-454.

PÄÄBO, S. (1989): Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1939-1943.

PÄÄBO, S., WILSON, A. C. (1991): Miocene DNA sequences: a dream com true? *Curr. Biol.* 1: 45-46.

PERKINS, S.L. & MARTIN, J.M. (1999): Conserved polymerase chain reaction primers fail in diagnosis of parasitic infections. *J. Parasitol.* 85: 982-984.

POSER, C. M. & BRUYN, G. W. (1999): *An illustrated history of malaria*. Parthenon Publ. Group New York, 1999.

ROLLO, F. & MAROTA, I. (1999): How microbial ancient DNA, found in association with human remains, can be interpreted. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B*, 354: 111-119.

ROPER, C., ELHASSAN, I. M., HVIID, L., GIHA, H., RICHARDSON, W., BABIKER, H., SATTI, G. M. H., THEANDER, T. G., ARNOT, D. E. (1996): Detection of very low level Plasmodium falciparum infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 325-331.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

SAIKI, R. K., GELFANS, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

- SALLARES, R. & GOMZI, S. (2001); Biomolecular Archaeology of Malaria. *Ancient Biomolecules*, Vol 3: 195-213.
- SANGER, F. (1981): Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214: 1205-1210.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9436-9440.
- SCHMITD, T., HUMMEL, S., HERRMANN, B. (1995): Evidence of contamination in PCR-laboratory disposables. *Naturwissenschaften* 82: 423-431
- SCHOLZ, M., GIDDING, I., PUSCH, C.M. (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.
- SCHULTZ, M. (1986): Die mikroskopische Untersuchung prähistorischer Skelttfunde. Bericht aus der Arbeit des Amtes für Museen und Archäologie des Kantons Baselland, Heft 006.
- SCHULTZ, M. (1988): Paläopathologische Diagnostik: In: Knußmann R. (Hrsg.): *Anthropologie. Handbuch der vergleichenden Biologie des Menschen*. Band I/1: Methoden. Fischer Verlag, Stuttgart, 480-496.
- SCHULTZ, M. (1993): Initial Stages of Systemic Bone Diseases. In: Grupe, G. & Garland, A. N. (Hrsg.): *Histology of Ancient Human Bone*. Springer Verlag, Berlin, 185-203.
- SCHUTKOWSKI, H. & GRUPE, G. (1997): Zusammenhänge zwischen Cribra orbitalia, archäometrischen Befunden am Skelett und Habitatbedingungen. *Anthrop. Anz.* 55: 155-166.
- SNOUNOU, G. (1996): Detection and identification of the four malaria parasite species infection humans by PCR amplification. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 50: Spe-*

cies Diagnostics Protokoll: PCR and Other Nucleic Acids Methods. (J.P. Clapp, Ed.), 263-291, Humana Press, Totowa, NJ.

SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., JARRA, W., THAITHONG, S., BROWN, K. N. (1993a): Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology* 58: 283-292.

SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., PING ZHU, X., JARRA, W., PINHEIRO, L., DO ROSARIO, V. E., THAITHONG, S., BROWN, K. N. (1993b): High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61: 315-320.

SNOUNOU, G., BROWN, K. N., DO ROSARIO, V. E. (1994): Detection of malaria parasites by PCR: a reply. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 363.

SNOUNOU, G. & BECK, H-P. (1998): The unse of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol. Today* 14: 462-467.

SOREN, D. & SOREN, N. (1994): Excavation of a Late Roman Villa and Late Roman Infant Cemetary near Lugnano in Teverina, Italy. Bretschneider, Rome.

SOREN, D., FENTON, T., BIRKBY, W. (1995): The late Roman infant cemetery near Lugnano in Teverina, Italy: some implications. *J. Paleopathol.* 7: 13-42.

STEINBOCK, R. T. (1976): Hematologic disorders-The Anemias. In: *Paleopathological Diagnosis and Interpretation: Bone diseases in ancient human populations.* CC Thomas, Springfield, Illinois, USA. VII: 213-252.

STUART-MACADAM, P. (1989): Porotic Hyperostosis: Relationship between Orbital and Vault Lesions. *Am. J. Phys. Anthropol.* 80: 187-193.

STUART-MACADAM, P. (1992): Anemia in Past Human Populations. In: Stuart-Macadam P., Kent S. (Hrsg.): *Diet, Demography and Disease. Changing Perspectives on Anemia*. De Gruyter, New York: 151-170

TAYLOR, M. G. (1985): The Paleopathology of a Southern Sinagua Population from Oak Creek Pueblo, Arizona. In: Merbs C.F., Miller R.J. (Hrsg.): *Health and Disease in Prehistoric Southwest*. Arizona State University Anthropological Research Papers No. 34 Tempe, Arizona State University.

TAYLOR, M. G., RUTLAND, P., MOLLESON, T. (1997): A sensitive polymerase chain reaction method for the detection of Plasmodium species DNA in ancient human remains. *Ancient Biomolecules* Vol. 1: 193-203.

TUROSS, N. (1994): The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 50: 530-535.

VANDEKERCKHOVE, J. & WEBER, K. (1978a): Actin amino acid sequences: Comparisons of actins from calf thymus, bovine brain, and SV-40-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin. *Eur. J. Biochem.* 90: 451.

VANDEKERCKHOVE, J. & WEBER, K. (1978b): Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1106.

VERNESI, C., CARAMELLI, D., CARBONELLI SALA, S., UBALDI, M., ROLLO, F., CHIARELLI, B. (1999): Application of DNA sex tests to bone specimens from three Etruscan (VII-III century BC) archaeological sites. *Ancient Biomol.* 2: 295-305.

WAPLER, U. & SCHULTZ, M. (1997): Une méthode de recherche histologique appliquée au matériel osseux archéologique; L'exemple des Cribra orbitalia. *Bull. Mém. Soc. D'Anthropologie Paris, n. s., t. 8*: 421-431.

WATERS, A. P. & MCCUTCHAN, T. F. (1989a): Partial sequence of the asexually expressed SU rRNA gene of Plasmodium vivax. *Nucleic Acids Res.* 17: 2135.

WATERS, A. P. & MCCUTCHAN, T. F. (1989b): Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet i*: 1343-1346.

WELCKER, H. (1888): Cribra orbitalia, ein ethnologisch-diagnostisches Merkmal mehrerer Menschenrassen. *Arch. Anthropol.* 17: 1-18.

WILSON, S. M. (1994): Detection of malaria parasites by PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 363.

WORLD HEALTH ORGANISATION (1968): Nutritional anemias: Report of a WHO scientific group *WHO Technical Report Series* 405.

WORLD HEALTH ORGANISATION (1974): Report of a WHO Interregional Conference. Malaria Control in countries where time-limited eradication is impractical at present. *WHO Technical Report Series* 573: 7-14.

WORLD HEALTH ORGANISATION (2003): Africa Malaria Report.
www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr33/en/.

ZINK, A. (1999): *Kindersterblichkeit im frühen Mittelalter* - Morphologische und paläopathologische Ergebnisse an der Skeletserie von Altenerding, Ldkr. Erding, Bayern. In: Schultz, M. (Hrsg.): Beiträge zur Paläopathologie, Band 4. Cuvillier Verlag, Göttingen.

ZINK, A., REISCHEL, U., WOLF, H., NERLICH, A. G. (2000): Molecular evidence for bacteremia by gastrointestinal pathogenic bacteria in an infant mummy from ancient Egypt. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124: 1614-1618.

ZINK, A., HAAS, C. J., REISCHL, U., SZEIMIES, U.; NERLICH, A. G. (2001): Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J. Med. Microbiol.* Vol. 50: 355-366.

ZINK, A., REISCHEL, U., WOLF, H., NERLICH, A.G. (2002): Molecular analysis of ancient microbial infections. *FEMS Microbiology Letters* 213: 141-147.

ZINK, A., SOLA, C., REISCHEL, U., GRABNER, W., RASTOGI, N., WOLF, H.,
NERLICH, A.G. (2003): Characterisation of Mycobacterium tuberculosis DNAs from
Egyptian mummies by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 41: 359-367.

Lebenslauf – Kerstin Herberth

Persönliche Daten

Name: Kerstin Herberth
Geburtsdatum: 19.02.1976
Geburtsort: München

Schulbildung

1982 - 1985 Grundschule, Egling a. d. Paar
1985 - 1987 L'Anse Creuse Public School, Michigan, USA
1987 - 1992 Viscardigymnasium, Fürstenfeldbruck
1992 Deerfieldbeach High School, Florida, USA
1992 - 1995 Viscardigymnasium, Fürstenfeldbruck
1995 Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

1995-1996 Chirurgie, Kreiskrankenhaus Fürstenfeldbruck

Studium

1996 - 2003 Humanmedizin, LMU München
08/1998 Physikum
08/1999 Erstes Staatsexamen
04/2002 Zweites Staatsexamen
05/2003 Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr

04 - 08/2002 Städtisches Krankenhaus München-Harlaching, Innere Medizin
08 - 11/2002 Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Pädiatrie
11 - 03/2002 Tulane University Hospital, New Orleans, Chirurgie

AIP

seit 11/2003 Kinderradiologie, Kinderklinik der Stadt Köln