

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

**Morphologische und molekularbiologische Geschlechtsbestimmung von
Individuen mit Knochenfrakturen einer Skelettserie des 15. – 18. Jahrhunderts
aus Süddeutschland (Rain am Lech)**

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

vorgelegt von
Cordula Mauerer
aus
München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Nerlich
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. R. Putz Prof. Dr. W. G. Locher
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. A. Zink
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	02.02.2006

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	5
I.1 Allgemeines	5
I.2 Fragestellung	7
II. Material.....	8
II.1 Fundort.....	8
II.1.1 Historischer Abriss von Rain am Lech um 1250-1800.....	8
II.1.2 Das heutige Rain am Lech	9
II.2 Fundmaterial	10
II.3 Auswahl des Probenmaterials.....	12
II.4 Verwendete Geräte	13
II.5 Chemikalien	14
II.6 PCR-Reagenzien und Enzyme	15
II.7 Hilfsmittel und Einwegmaterialien	15
II.8 Puffer und Lösungen.....	16
III. Methoden.....	18
III.1 Morphologische Geschlechtsbestimmung.....	18
III.1.1 Schädel	19
III.1.2 Becken	22
III.2 Makroskopische Einteilung der Traumata	23
III.2.1 Prämortale oder postmortale Entstehung.....	23
III.2.2 Schädelverletzungen	24
III.2.2.1 Hiebverletzung.....	25
III.2.2.2 Impressionsfraktur	25
III.2.2.3 Lochfraktur	25
III.2.3 Traumatische Veränderungen des postkraniellen Skelettes.....	25
III.2.3.1 Parietfraktur	26
III.2.3.2 Colles-Fraktur	26
III.2.3.3 Hiebverletzung.....	26
III.3 Molekularbiologische Geschlechtsbestimmung	27
III.3.1 Allgemeines zu aDNA und Polymerase-Kettenreaktion.....	27
III.3.2 Prävention einer Kontamination	27
III.3.3 Probenaufbereitung	29
III.3.4 DNA-Extraktion.....	29
III.3.5 DNA-Amplifikation	30
III.3.5.1 Amplifikation von β -Aktin	31

III.3.5.2 Amplifikation von SR-Y	32
III.3.5.3 Amplifikation von Amelogenin	33
III.3.6 Nachweis der Amplikons	34
III.3.6.1 Agarosegel-Elektrophorese.....	34
III.3.6.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	35
IV. Ergebnisse	37
IV.1 Morphologische Untersuchungen	37
IV.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung der Population aus Rain	37
IV.1.2 Traumaraten	38
IV.1.2.1 Calvaria	38
IV.1.2.2 Differenzierung der Schädelverletzungen.....	40
IV.1.2.3 Postkraniales Skelett	44
IV.2 Molekularbiologische Untersuchungen	46
IV.2.1 Ergebnisse des Nachweises von β -Aktin	47
IV.2.2 Molekulargenetische Geschlechtsdiagnose	48
IV.2.2.1 Postkraniales Skelett	49
IV.2.2.2 Schädel	52
V. Diskussion.....	53
V.1 Alters- und Geschlechtsverteilung der Population aus Rain am Lech	53
V.2 Häufigkeiten und Ursachen der Schädelfrakturen	54
V.3 Frakturhäufigkeiten und –ursachen des postkranialen Skelettes.....	59
V.4 Komplizierende Umstände beim Nachweis von ancient DNA.....	61
V.4.1 Lagerungsbedingungen der Skelettelemente aus Rain am Lech.....	62
V.4.2 Biogene, chemische und physikalische Dekomposition.....	62
V.4.3 Kontamination	64
V.4.4 Hemmung	65
V.5 Diskussion der Amplifikationsergebnisse.....	66
V.5.1 β -Aktin.....	66
V.5.2 SR-Y und Amelogenin.....	67
V.5.3 Molekulargenetische Ergebnisse in Bezug auf postkraniale Traumata bei Männern und Frauen.....	69
VI. Zusammenfassung.....	72
VII. Literatur.....	74
VIII. Danksagung	84
IX. Lebenslauf.....	85

I. Einleitung

I.1 Allgemeines

MORTUI VIVOS DOCENT – Die Toten lehren die Lebenden.

Die Paläopathologie ist ein Zweig der medizinischen Wissenschaft, der im Speziellen menschliche Überreste aus archäologischen Fundorten untersucht, um daraus Aussagen über das Vorkommen oder Spuren von Krankheiten bei Individuen zu treffen. Ein weiteres Ziel ist, den Einfluss eines speziellen Umfeldes und die Lebensbedingungen der Population und des Individuums zu verstehen, um daraus Gesetzmäßigkeiten für heute lebende Menschen zu schaffen, die in ähnlichem Umfeld aufwachsen (Živanović 1982).

Sie verwendet dabei zwei verschiedene Ansätze: Die Medizin und die Anthropologie. Beide sind innerhalb der Paläopathologie stark miteinander verwoben, unterscheiden sich jedoch in ihren Untersuchungsvorgehen und ihrem Fachjargon. So kann man heute davon ausgehen, dass die Auslöser für degenerative Knochen- und Gelenkveränderungen bei paläolithischen Jägern praktisch identisch waren mit denen des Büroarbeiters des 21. Jahrhunderts. Was sich veränderte während der Geschichte der menschlichen Population sind die globale Häufigkeit von Krankheiten und die unterschiedlichen geographischen Krankheitsmuster (Roberts und Manchester 1997). Traumatische Skelettschäden sind so alt wie der Ursprung der Knochen selbst. Sie entstehen meist als Ergebnis gewaltvoller Begegnungen mit Gefahren der Umwelt oder inter- und intraspezifischen Konflikten.

Traumatische Verletzungen, besonders Frakturen, werden nicht selten bei Ausgrabungen von menschlichen Überresten gefunden. Dabei liegt das Interesse nicht nur in der Individualdiagnose, die normalerweise einfach zu erhalten ist, sondern vor allem in der kulturellen Bedeutung, die Einblicke in Leben und Leiden einer Population erlaubt (Steinbock 1976). Die Erfassung der Häufigkeit und Art von Knochenverletzungen unter Berücksichtigung von Individualalter und Geschlecht ermöglicht eine Einordnung der Verletzungsmuster und –ursachen nach regionalen, soziokulturellen und biologischen Gesichtspunkten (Kunter 1981) und trägt somit wesentlich zur Rekonstruktion der gesamten Lebenssituation früherer Bevölkerungen bei.

In jüngster Zeit macht sich die Paläopathologie neben makroskopischen und mikroskopischen Analysen mehr und mehr auch molekularbiologische Untersuchungstechniken zu eigen, um Fragestellungen verschiedenster Art zu klären. Der Grundstein für heutige molekulargenetische Untersuchungen an ancient DNA wurde in den 80er Jahren durch verschiedene Forscher (u.a. Saiki et al. 1985, Higuchi et al. 1984, Johnson et al. 1985, Pääbo 1984, Jeffreys et al. 1985) gelegt. Ein wesentliches Ereignis für die Forschung an ancient DNA war die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche besser als andere molekulare Techniken die Amplifikation von DNA durch hochsensitive und einfache Untersuchungen ermöglicht. Am Ende der Dekade repräsentierte der Bericht einer erfolgreichen Amplifikation von DNA aus archäologischen Knochen durch Hagelberg et al. (1989) einen wirklichen Durchbruch. Durch verschiedene Bemühungen, diese Methode an unterschiedlichen Materialien anzuwenden, konnte der Punkt erreicht werden, an dem die Forschung an ancient und degradierter DNA heute steht: Sie ist eine zuverlässige Untersuchungsstrategie, die vielen wissenschaftlichen Gebieten und Interessen dient.

Vor allem die forensischen Wissenschaften bedienen sich der PCR zur Typisierung menschlicher und tierischer DNA (z.B. Forster und Eberspacher 1999, Schneider et al. 1999, Lederer et al. 2001), u.a. zur Identifikation von Opfern bei Massenkatastrophen, wie Flugzeugabstürzen (z.B. Whitaker et al. 1995, Goodwin et al. 1999), der Feuerkatastrophe der Kapruner Seilbahn oder nach dem Anschlag auf das New Yorker World Trade Center. Verschollene Soldaten (z.B. Ginther et al. 1992) oder Opfer von Verbrechen (z.B. Corach et al. 1995) wurden noch Jahre nach ihrem Tod durch die Methode der ancient DNA-Technologie identifiziert. Aus unterschiedlichsten Gründen wurden auch private Affären amerikanischer Präsidenten, wie Bill Clinton (Woodward 1999) oder Abraham Lincoln (Micozzi 1991) Ziel solcher Untersuchungen. Ancient DNA wurde außerdem zur Identifikation von historischen Personen wie Kaspar Hauser (Weichhold et al. 1998) und Jesse James (Stone et al. 2001) analysiert.

Auch für die Erhaltungsbiologie, Verwandtschaftsanalysen, Forschung an Infektionskrankheiten und ihren Entstehungsgeschichten ist die Analyse von ancient und degradierter DNA dienlich.

I.2 Fragestellung

Da „unser Wissen über Krankheiten und Verletzungen in prähistorischer Zeit aufgrund des relativ geringen Umfanges des prähistorischen Knochenmaterials keineswegs umfassend“ ist (Kunter 1981), scheint das für diese Arbeit vorliegende Skelettmaterial umso „viel versprechender“ zu sein. Hierbei handelt es sich nämlich nicht um vereinzelte Funde, sondern um den Inhalt eines kompletten Gebeinhauses. In diesem „Karner“ aus der Stadt Rain am Lech sind die menschlichen Überreste von mindestens 2547 Individuen des 15.-18. Jahrhunderts enthalten, deren Untersuchung repräsentative Aussagen zu Art und Häufigkeit von Knochenläsionen, auch im Hinblick auf die zahlreichen kriegerischen Auseinandersetzungen der damaligen Zeit, erhoffen lässt.

Besonderes Augenmerk der Studie soll vor allem auf der quantitativen und qualitativen Erfassung von traumatischen Knochenveränderungen des Schädels und der postkraniellen Skelettelemente liegen. Dabei wurde eine morphologische Geschlechts- und Altersbestimmung anhand der Schädelknochen vorgenommen, um eine differenziertere Analyse der Häufigkeiten innerhalb der einzelnen Alters- und Geschlechtsgruppen zu ermöglichen.

Da jedoch bisher keine zuverlässige Möglichkeit einer sicheren morphologischen Geschlechtsbestimmung bei Langknochen, Skelettelementen mit einem hohen Fragmentierungsgrad und Kinderskeletten besteht, ist es ein wesentliches, zusätzliches Anliegen dieser Arbeit, die Perspektiven der molekularbiologischen Geschlechtsdetermination aufzuzeigen. Hierfür wurde durch Extraktion und Amplifikation von ancient DNA (aDNA) eine molekulare Geschlechtsbestimmung bei einigen frakturierten Langknochen durchgeführt, um auch hier geschlechtsrelevante Aussagen machen zu können. Zusätzlich wurden einzelne Kinderschädel molekular untersucht. Die Richtigkeit der ancient DNA-Untersuchungen wurde durch molekulare Untersuchung von morphologisch geschlechtsdeterminierten Schädeln abgesichert. Des Weiteren wurde zum Methodenvergleich bei nicht-frakturierten Knochen molekulargenetisch das Geschlecht bestimmt.

II. Material

II.1 Fundort

II.1.1 Historischer Abriss von Rain am Lech um 1250-1800

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. Da Rain schon mit der Gründung als Grenz- und Festungsstadt konzipiert war, war der Platz für den Friedhof um die Stadtpfarrkirche begrenzt. Aus diesem Grund wurde 1471 die als Gebeinhaus dienende Allerheiligenkapelle erbaut. In regelmäßigen Abständen räumte man so den überfüllten Friedhof und lagerte die Gebeine in die Gruft der Kapelle aus. Die Knochen des Gebeinhauses stammen demnach frühestens aus dem 15. Jahrhundert.

Die Stadt Rain war häufig in Kriege verwickelt: 1446 in den Wittelsbacher Krieg, 1504 in den Landshuter Erbfolgekrieg, sowie Anfang des 17. Jahrhunderts mehrmals in den 30-jährigen Krieg (insbesondere im Rahmen der berühmten „Schlacht bei Rain“, in der der kaiserliche Feldherr Tilly tödlich verletzt wurde).

Aufgrund der vielen Kriegsoffer und der wachsenden Bevölkerungszahl entstand die Notwendigkeit eines weiteren Friedhofs. Zusätzlich zum Friedhof innerhalb der Stadtmauern wurde um 1600 die St. Rochuskirche mit dem zugehörigem Rochusfriedhof außerhalb der Stadt erbaut. Es ist somit anzunehmen, dass der innerstädtische Friedhof nur einen Teil der verstorbenen Bevölkerung aufgenommen hat. Auch zu Beginn des 18. Jahrhunderts machten die Kriege vor der Stadt Rain keinen Halt. So kämpften die Bewohner 1702-1704 im Spanischen und 1742-1745 im Österreichischen Erbfolgekrieg. Doch nicht nur Kriege sondern auch Epidemien forderten ihre Opfer. Dreimal (1348-1351, 1634, 1649) wurde die Stadt von Pest-Epidemien heimgesucht.

Im Rahmen der Säkularisation wurde 1803 eine landesherrliche Verordnung erlassen, wonach auf dem Friedhof um die Pfarrkirche keine Beerdigungen mehr stattfinden durften. Da die Allerheiligenkapelle damit ihre Funktion als Gebeinhaus verlor, müssen die darin gelagerten Gebeine aus dem 15.-18. Jahrhundert stammen (Dorn 1985).

II.1.2 Das heutige Rain am Lech

Rain am Lech ist eine 7711 Hektar große Stadt im Landkreis Donauwörth in Schwaben (Abb. 1). Sie liegt im Donaumoos zwischen Lech und Donau und zählt ca. 8400 Einwohner (www.rain.de).

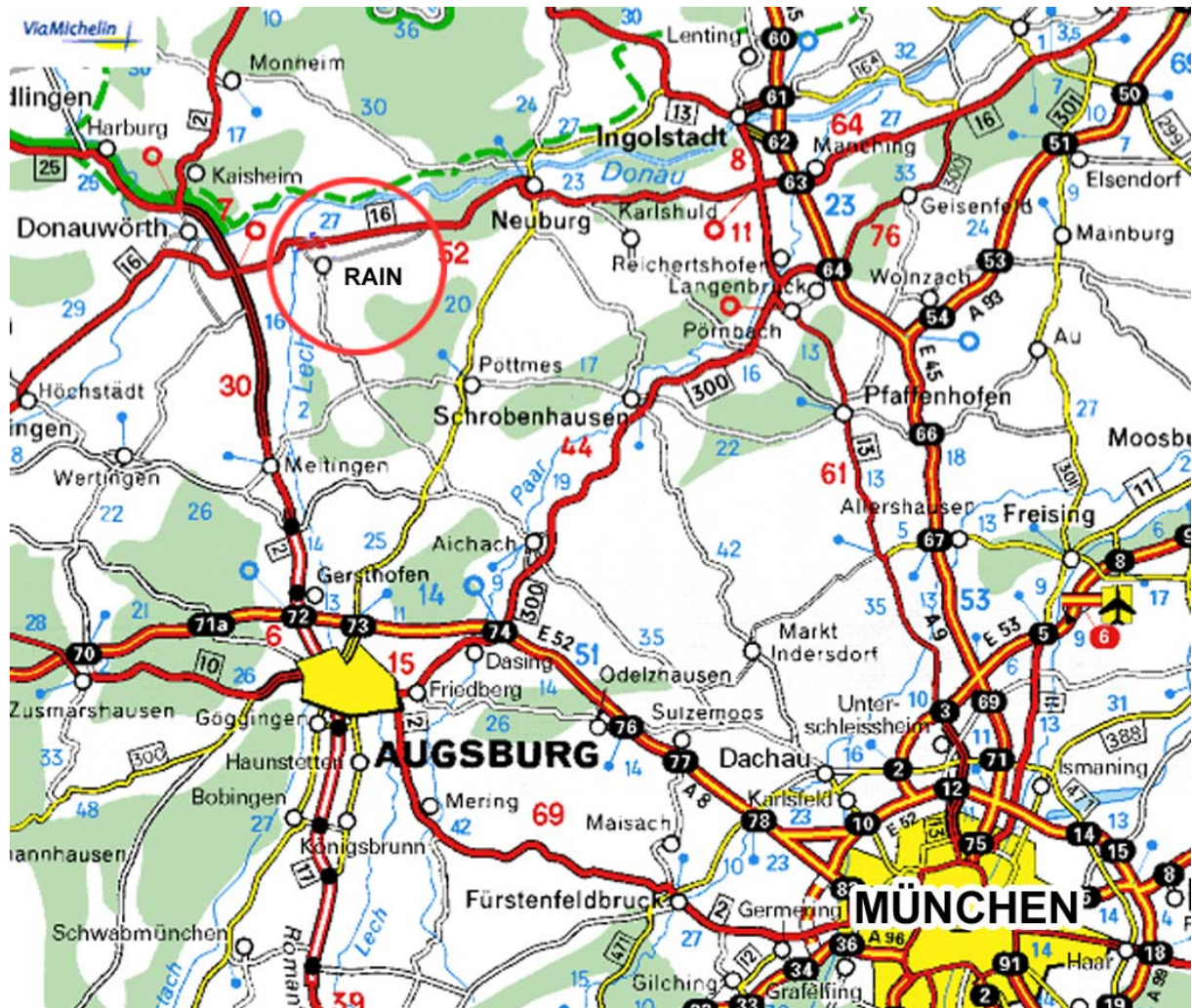


Abb. 1: Geographische Lage der Stadt Rain am Lech (Bayern-Karte, viamichelin.de, Maßstab 1:600000)

Die zu untersuchenden Knochen stammen aus dem „Karnen“ (Gebeinhaus) der Allerheiligenkapelle, welche sich neben der Pfarrkirche in der Stadtmittte befindet. Die Kapelle steht seit 1829 im Besitz der Stadt Rain und hat seit der Fertigstellung des Heimatmuseums 1988 keine Funktion mehr. Im Rahmen von Sanierungsarbeiten bestand die Möglichkeit, an den darin gelagerten Knochen zu forschen.

II.2 Fundmaterial

Bei der Räumung des Karners wurden insgesamt 15285 Gebeine erfasst (Tabelle 1, Abb. 2). Da die Gräber bei der Auslagerung aus dem Friedhof in die Allerheiligenkapelle aufgelöst und die Knochen ungeordnet eingeräumt wurden, war eine individuelle Zuordnung nicht mehr möglich.

Tabelle 1: Gesamtheit der einzelnen Knochen aus dem Karner in Rain am Lech



Schädel	2547
Femur rechts	2491
Femur links	2180
Tibiae rechts	1780
Tibiae links	1780
Humeri rechts	1426
Humeri links	1426
Os coxae rechts	769
Os coxae links	780

Abb. 2: Knochenberg – Fund bei Öffnung des Karners

Da 2547 Schädel gefunden wurden, kann man von einer ebenso hohen Mindestzahl an Individuen ausgehen. Die Anzahl der Verstorbenen wird laut Sterberegister von Rain am Lech für den Zeitraum von 1696-1800 mit 2282 angegeben. Rechnet man ausgehend von dieser Summe an Todesfällen entsprechend der geschätzten Einwohnerzahlen im Zeitraum von 1400-1800 hoch, so kann man für diesen Zeitraum in grober Annäherung mit rund 5100 Verstorbenen rechnen. Somit werden mit dieser Untersuchung 2547 von geschätzten 5100 Bestatteten erfasst. Das entspricht etwa der Hälfte aller geschätzten Todesfälle von 1400 – 1800.

Die entnommenen Gebeine wurden im Vorfeld sortiert und katalogisiert, makroskopische Auffälligkeiten notiert. Die am häufigsten gefundenen Schädelveränderungen (Abb. 3) waren mit 37% die unspezifischen Hyperostosen, gefolgt von den Osteomen mit 25%. Traumatische Veränderungen konnten in 10% der Fälle diagnostiziert werden.

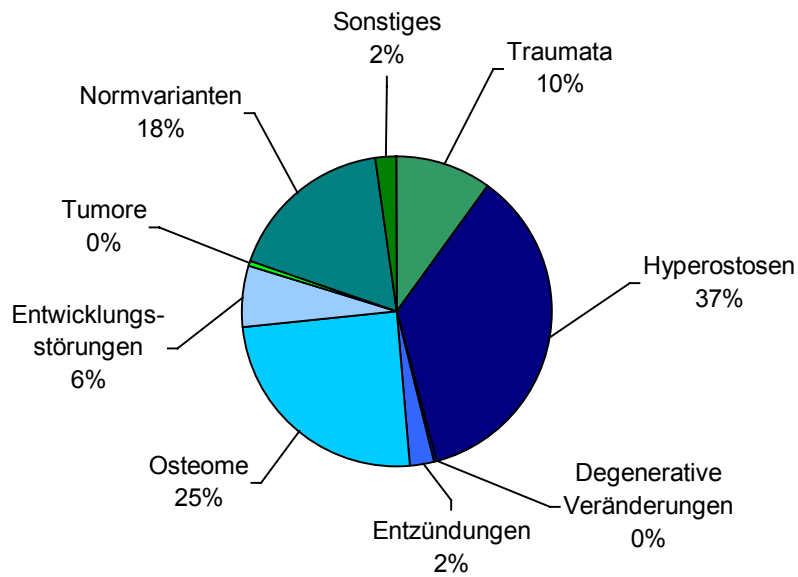


Abb. 3: Auffälligkeiten der Calvaria

Bei den Langknochen (Abb. 4) waren die degenerativen Gelenkveränderungen mit 29% führend. Hyperostotische Veränderungen konnten bei 24% und traumatische Veränderungen bei 11% der postkraniellen Skelettelemente beobachtet werden.

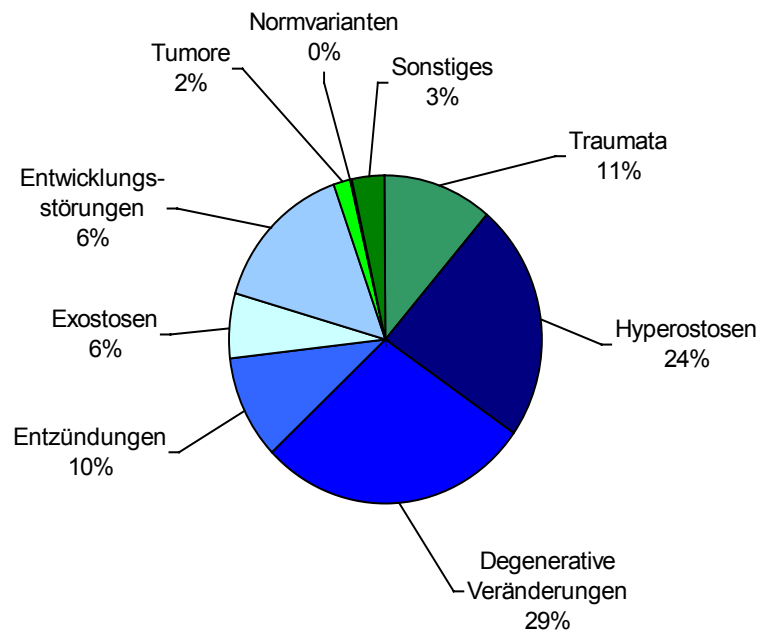


Abb. 4: Auffälligkeiten der postkraniellen Skelette

Das Team der Arbeitsgruppe „Paläopathologie“ der LMU München führte unter der Leitung von Dr. Albert Zink eine ektokranielle Altersbestimmung anhand der Schädel in Anlehnung an Ferembach et al. (1979) durch und stellte die Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung. Immature Individuen wurden anhand des Zahnstatus in die Altersstufen Neonatus (0-6 Monate), Infans I (0,5-6 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 (Tabelle 2). Bei 80 adulten Individuen war keine Altersbestimmung möglich.

Tabelle 2: Altersmäßige Zusammensetzung der Population aus Rain

Altersstufe	N	%
Neonatus	2	0,1
Infans I	202	7,9
Infans II	288	11,3
Infans I oder II	6	0,24
Juvenil	146	5,7
21-30 Jahre	820	32,2
31-40 Jahre	522	20,5
41-50 Jahre	268	10,5
51-60 Jahre	132	5,2
älter 60 Jahre	81	3,2
erwachsen, Alter unbestimmt	80	3,1

II.3 Auswahl des Probenmaterials

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 mit eingeschlossen, da die morphologische Geschlechtsbestimmung im Kindesalter mit einer großen Unsicherheit behaftet ist (Zink 1999).

Für den molekularbiologischen Teil dieser Arbeit wurden 20 von den insgesamt 53 traumatisch veränderten Langknochen für die molekularbiologische Diagnostik ausgewählt.

Die Auswahl erfolgte zufällig aus den Knochen mit gutem Erhaltungszustand, welche eine offensichtliche Kallusreaktion und eine Achsenfehlstellung aufwiesen. Zehn nichttraumatisierte Langknochen wurden zum Methodenvergleich untersucht.

Sieben Schädel, bei denen eindeutig das Geschlecht mittels morphologischer Methoden festgelegt werden konnte, wurden zum Nachweis der Richtigkeit der Methode molekulargenetisch analysiert. Drei Kinderschädel, welche morphologisch nicht geschlechtsdiagnostiziert werden können, wurden zur Darstellung der Perspektiven von derartigen Untersuchungen mit in die Analysen eingeschlossen. Die Auswahl erfolgte auch bei den kindlichen Calvaria zufällig aus den Schädeln mit gutem Erhaltungszustand und aufgrund der Aufwendigkeit der Methode nur in begrenzter Zahl.

II.4 Verwendete Geräte

Autoklaven, Heraeus

Brutschrank, Heraeus

Computer, Compaq Deskpro

Dentalbohrmaschine, MN Dental Instruments, München

DNA Thermal Cycler Typ Primus, MWG AG Biotech

Elektrophoresekammer Elektrophoresis Unit (13 x 13 cm), Pharmacia Biotech

Elektrophoresekammer Typ Mupid 21 (10 x 15 cm), Cosmo Bio Co., LTD.

Gefrierschrank Typ economic super, Bosch

Kühlschrank Typ glass line, Liebherr

Kugelschwingmühle Typ MM2, mit Zirkonium-Mahlbechern, Retsch

Magnetrührer Typ MR 2002, Heidolph

Mikrowelle Typ MWE 700, Bauknecht

Präzisionswaage Typ Navigator™, Ohaus®

Rotator, Agitateur rotatif, Marke unbekannt

Vortexer Typ MS 2, IKA-Labortechnik

Schüttler Typ KS 250 basic, IKA-Labortechnik

Stromversorgung Typ EPS 600 Electrophoresis Power Supply, Pharmacia Biotech

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

Thermomixer Typ compact, Eppendorf

UV-Lampe, 254nm, Marke unbekannt

Videodokumentationssystem für Gelelektrophorese, ImageMaster[®] VDS,
Pharmacia Biotech
Werkbank, steril, Typ Herasafe, Heraeus Instruments
Zentrifuge Typ 2-4, Sigma
Zentrifuge Typ 1.OR, Heraeus Universalzentrifuge, Laborteam Schultheiss
Zentrifuge Typ 5417R, Eppendorf

II.5 Chemikalien

Aceton, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
Agarose, Seakem[®] LE agarose, Biozym
Aqua ad iniectabilia, B. Braun, Melsungen AG
Aqua bidest, H. Kerndl GmbH, Weißenfeld
Bromphenol-Blau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Diatomeen-Erde, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
50 bp DNA-Leiter, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
100 bp DNA-Leiter, Promega Corporation, Wisconsin (USA)
DNA Silver Staining Kit, Pharmacia Biotech
DNA ZAP, Solution 1 und 2, Ambion, Inc., Texas (USA)
EDTA (Ethylendinitrotetraacetat Dinatrium-Dihydrat), Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen
Eisessig, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
Ethanol absolut, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
Ethidiumbromid
Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Guanidinium-Thiocyanat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HCl, Merck Eurolab GmbH, Ismaning
4% Natriumhypochloridlösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SSCP Anode Buffer B (pH 7,4), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SSCP Cathode Buffer B (pH 7,4), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SSCP Rehydration Buffer B (pH 7,4), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris (Tri[hydroxymethyl]aminoethan), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris-Cl, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

II.6 PCR-Reagenzien und Enzyme

Ampli Taq Gold[™] DNA-Polymerase (5 U/ μ l), Applied Biosystems, Weiterstadt

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

MgCl₂-Solution (25 mM), Applied Biosystems, Weiterstadt

10 x PCR Gold Puffer, GeneAmp[®], Applied Biosystems, Weiterstadt

Primer Act 1/2 (50 pmol), Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm

Primer Amel 1/2 (50 pmol), Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm

Primer SR-Y 1/2 (50 pmol), Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm

Proteinase K, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

II.7 Hilfsmittel und Einwegmaterialien

Aluminiumfolie S, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

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

Dental-Diamant-Trennscheibe, MN Dental Instruments, München

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

GeneGel Special Electrode Wicks

GeneGel SSCP gels, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Kleenex[®] Tücher, Kimberley-Clark

Microcon[™] 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 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), Eppendorf

Pipettenspitzen (2,5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), Biozym, Oldendorf

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

Reaktionsgefäße (0,6 ml), Biozym, Oldendorf

Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Safeskin[®], California

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

II.8 Puffer und Lösungen

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

Färbelösung (5x):

Silbernitrat	1% w/v
Benzolsulfonsäure	0,35% w/v

Fixierlösung (5x):

Benzolsulfonsäure	3% w/v
Ethanol	24% v/v

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

Natriumcarbonat-Lösung (5x):

Natriumcarbonat	12,5% w/v
-----------------	-----------

10 x PCR Gold Puffer:

Tris/HCl, pH 8,05	150 mM
KCl	500 mM

Stopping & Preserving solution (5x):

Essigsäure	5% v/v
Natriumacetat	25% w/v
Glycerol	50% v/v

TAE-Puffer:

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

III. Methoden

III.1 Morphologische Geschlechtsbestimmung

Mit der Bestimmung des Geschlechts erhält man neben der Diagnose des Skeletalters eine weitere wesentliche biologische Information über ein Individuum. Sie gründet auf einer Begutachtung der geschlechtsspezifischen Unterschiede am Skelett bezüglich der Größe und Form.

Bislang wurden für viele Skelettelemente und für Populationen unterschiedlicher ethnischer Herkunft die Möglichkeiten der morphologischen Geschlechtsdiagnose erarbeitet (Ascádi und Nemeskéri 1970, Ubelaker 1974, Sjøvold 1988, Hoyme and İşcan 1989). Schädel, Becken und Langknochen wurden am häufigsten und effektivsten für geschlechtsbestimmende Untersuchungen herangezogen. Dabei gibt es neben charakteristischen männlichen und weiblichen Merkmalsausprägungen eine Vielzahl von Variationen von robust weiblich bis grazil männlich (Ascádi und Nemeskéri 1970). Neben der Variabilität innerhalb der Geschlechter sind auch zwischen räumlich und/oder zeitlich getrennten Bevölkerungsgruppen Unterschiede zu erkennen (Herrmann et al. 1990). Dafür werden die unterschiedlichen Lebensbedingungen, körperliche Arbeit und funktionelle Abnutzung der Knochen verantwortlich gemacht.

In vorliegender Arbeit wurde auf die Geschlechtsdiagnose nicht-erwachsener Individuen verzichtet. Einerseits ist die morphologische Geschlechtsbestimmung im Kindesalter mit einer großen Unsicherheit behaftet (Zink 1999), andererseits sind Knochen eines nicht-adulten Skeletts im Allgemeinen schlechter erhalten und damit vielfach nur unzulänglich zu beurteilen.

Als Maß für die Gesamtzahl der Individuen gilt die Anzahl der Schädel. Zur Geschlechtsbestimmung der adulten Individuen aus Rain am Lech wurde ausschließlich der Schädel herangezogen, da nur so gewährleistet war, dass ein Individuum nicht zweimal beurteilt wurde.

III.1.1 Schädel

Zu Beginn der Analysen musste sich ein Überblick über die Variabilität der geschlechtstypischen Merkmale innerhalb der zu untersuchenden Serie verschafft werden. Als Untersuchungsgrundlage dienten die allgemein anerkannten Empfehlungen nach Ferembach et al. 1979. Dann wurde jeder einzelne Schädel in seiner Gesamtheit betrachtet.

In den Abbildungen 5 und 6 ist deutlich zu erkennen, dass der typisch männliche Schädel gegenüber dem typisch weiblichen größer und schwerer ist. Er besitzt aufgrund kräftiger markierter Muskelansätze deutlich ausgeprägtere Einzelmerkmale und ist daher reliefreicher (Saller 1964).



Abb. 5 und 6: Ein weiblicher (jeweils links) und ein männlicher (jeweils rechts) Schädel aus der Skelettserie aus Rain am Lech

Die Merkmale werden nach ihrer Bedeutung als Indikatoren für das Geschlecht in drei Kategorien eingeteilt:

Glabella (Stirnglatze), Processus mastoideus (Warzenfortsatz hinter dem Ohr), Processus zygomaticus (Jochfortsatz) und das Relief des Planum nuchale (Hinterhauptsfläche) bilden die Kategorie mit der höchsten Bedeutung für die Geschlechtsbestimmung. Eine prominente, deutlich gegen die Nasenwurzel abgehobene Glabella, sowie ein starkes Relief des Planum nuchale sprechen für das Vorliegen eines männlichen Schädels. Gleichermäßen wird ein kräftiger, hoher Processus zygomaticus und ein voluminöser Processus mastoideus gedeutet.

Die zweite Kategorie bilden Arcus superciliaris (knöcherner Augenbrauenwulst), Tubera frontalia und parietalia (Stirn- und Scheitelhöcker), Protuberantia occipitalis externa (Hinterhauptsstachel) und Os zygomaticum (Jochbein).

Stark hervorgetretene Arcus superciliares, fehlende bzw. schwach ausgebildete Tubera frontalia und parietalia, eine starke Protuberantia occipitalis externa und ein kräftiges Os zygomaticum gaben den Hinweis auf ein männliches Individuum.

Die letzte und am wenigsten aussagekräftige Gruppe bilden das Os frontale (Stirnbein), der Margo supraorbitalis (Kante der oberen Augenhöhle) und die Orbita (Augenhöhle). Dabei sprechen für einen männlichen Calvarium eine fliehende Stirn, ein abgerundeter, kräftiger Margo supraorbitalis und eine eher rechteckige Orbita. Tabelle 3 zeigt die Einzelmerkmale, ihre Gewichtungen und Klassifikationen.

Tabelle 3: Merkmale zur Geschlechtsbestimmung am Schädel (abgeändert aus Sjøvold 1988 nach Ascádi und Nemeskéri 1970 und Ferembach et al. 1979)

	Gewicht	Hyperfeminin -2	Feminin -1	Indifferent 0	Maskulin +1	Hypermaskulin +2
Glabella	3	sehr schwach	leicht betont	mittel	betont	sehr stark
Processus mastoideus	3	sehr klein	klein	mittel	groß	sehr groß
Muskelansätze am Planum nuchale	3	fehlend	schwach	mittel	stark	sehr stark
Processus zygomaticus	3	niedrig, dünn	mäßig	mittel	hoch, kräftig	sehr hoch, kräftig
Arcus superciliaris	2	sehr schwach	leicht betont	mittel	betont	sehr stark
Tuber frontalia und parietalia	2	betont	mäßig betont	mittel	schwach	fehlend
Protuberantia occipitalis externa	2	sehr schwach	schwach	mittel	stark	sehr stark
Os zygomaticum	2	sehr niedrig, glatt	niedrig, glatt	mittelhoch, unregelmäßige Oberfläche	hoch, unregelmäßige Oberfläche	sehr hoch, unregelmäßige Oberfläche
Crista supra-mastoidea	2	sehr schwach	schwach	mittel	stark	sehr stark
Margo supraorbitalis	1	sehr scharf	scharf	mittel	leicht abgerundet	stark abgerundet
Form der Orbitae	1	rund	rund	mittel	leicht „fernseh-schirmähnlich“	„fernsehschirm-ähnlich“
Neigung des Os frontale	1	vertikal	fast vertikal	wenig geneigt	leicht fliehend	stark fliehend

Die Merkmale zur Geschlechtsbestimmung sind allerdings nicht immer eindeutig männlich bzw. eindeutig weiblich. Vielmehr teilt man sie von hyperfeminin über indifferent bis hypermaskulin ein. Bei der Auswertung sind der Grad der Sexualisation sowie die Anzahl der benutzten Merkmale zu beachten. Die Geschlechtsbestimmung ist umso eindeutiger, je mehr Merkmale in dieselbe Richtung deuten.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft einige der oben beschriebenen Merkmale in ihren verschiedenen Ausprägungen. Die Werte -2 bis +2 bedeuten hyperfeminin (-2), feminin (-1), indifferent (0), maskulin (+1) und hypermaskulin (+2).

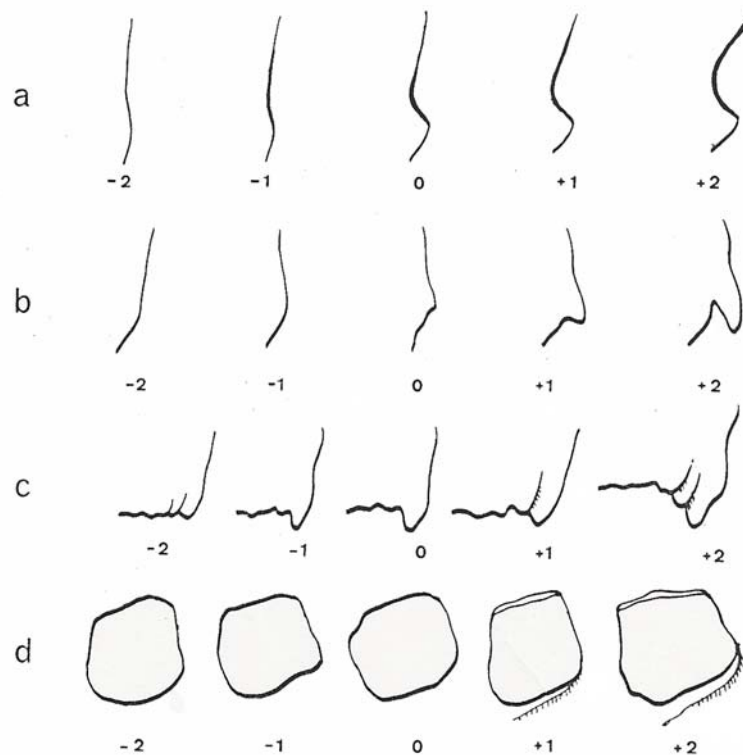


Abb. 7: Merkmale zur Geschlechtsbestimmung am Schädel (abgeändert aus Sjøvold 1988 nach Ascádi und Nemeskéri 1970). a) Glabellaentwicklung und Tiefe der Nasenwurzel; b) Entwicklung der Protuberantia occipitalis externa; c) Entwicklung des Processus mastoideus; d) Umriss der Orbita

III.1.2 Becken

Da das Becken der Frau als Geburtskanal dient, hat es andere Proportionen als das des Mannes. Es ist in der Regel breiter und niedriger. Die morphologische Methode nach Ascádi und Nemeskéri (1970) basiert auf der unterschiedlichen Bedeutung der Beckenmerkmale für die Geschlechtsdiagnose.

Bei vorliegender Arbeit wurde eine wichtige Methode der Geschlechtsbestimmung am Becken durch den sogenannten Arc composé („zusammengesetzter Bogen“, Abb. 8) verwendet.

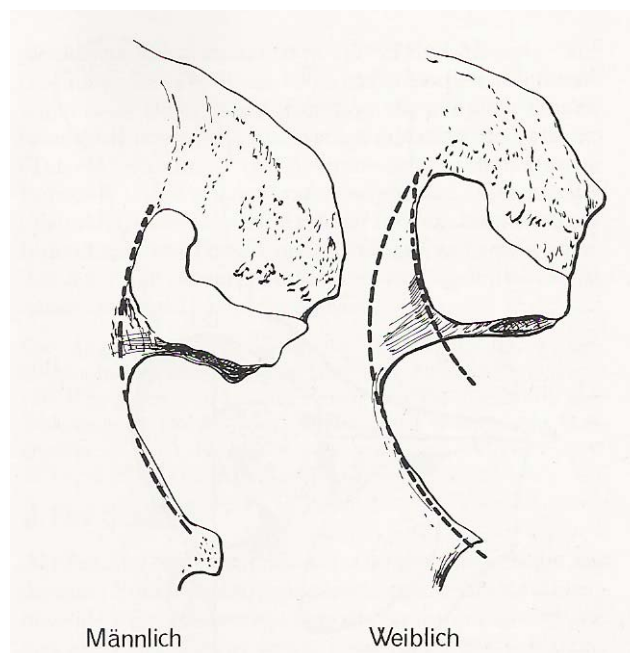


Abb. 8: Arc composé (aus Sjøvold 1988)

Beim männlichen Geschlecht bildet die kraniale Kante der Facies auricularis zusammen mit der kranialen und ventralen Kante der Incisura ischiadica major annähernd einen einfachen Bogen. Das Becken der Frau hat diese natürliche Verbindung nicht, so dass sich diese aus zwei Bögen zusammensetzt.

III.2 Makroskopische Einteilung der Traumata

Knochenbrüche lassen sich am Skelettmaterial relativ gut diagnostizieren. Ihre Entstehungsursachen können erschlossen werden. Diese Diagnose wird vereinfacht durch das Auftreten charakteristischer Gewebeschädigungen, welche die verschiedenen Gewaltarten hervorrufen. Von den zahlreichen Verletzungsursachen haben im Zusammenhang mit historischen Materialien nur mechanische und thermische Einwirkungen praktische Bedeutung. Thermisch bedingte Verletzungen werden insgesamt jedoch sehr selten nachgewiesen und spielen auch bei den Gebeinen aus der Allerheiligenkapelle in Rain am Lech keine Rolle. Als traumatische Ursachen, die an historischen Knochen diagnostiziert werden können, haben akute mechanische Einwirkungen die größte Bedeutung. Man unterscheidet scharfe Gewalt durch Klingen von Schwert oder Messer, aber auch Pfeilen, halbscharfe Gewalt durch scharfe Kanten von Axt oder Säge, sowie Speer und Tierbiss und stumpfe Gewalt durch Flächen von Stein und Keule bzw. durch Sturz (Herrmann et al. 1990).

III.2.1 Prämortale oder postmortale Entstehung

Traumatische Veränderungen des menschlichen Skeletts können prä- oder postmortal entstehen. Man kann nur dann mit Sicherheit von prämortaler Entstehung sprechen, wenn ein Individuum zu Lebzeiten eine Knochenfraktur erfährt, diese nicht unmittelbar den Tod nach sich zieht und sich eine vitale Reaktion des betroffenen Gewebes, wie Kallusbildung, Nekrose und/oder entzündliche Knochenreaktionen zeigt. Die Kallusbildung tritt nach mehreren Tagen bis Wochen ein und persistiert für Monate (Bull et al. 1987).

Somit sind prämortale Traumen, welche sich kurz vor dem Tode eines Individuums ereigneten und/oder direkt zum Tode führten und somit noch keine vitale Reaktion nach sich zogen, nur schwer von postmortal entstandenen Artefakten zu differenzieren. Artefaktbildung ist unter anderem durch Ausgrabung, Bergung und Präparation des Knochenmaterials möglich.

Ein Kriterium der zeitlichen Einordnung einer Verletzung ist die Färbung der Fraktur- oder Schnittfläche. Hat der Verletzungsbereich dieselbe Färbung wie die übrigen Knochenoberflächen, so ist von einer intravitalen Verletzung auszugehen.

Bei Artefakten hingegen sind die Bruchflächen deutlich heller als die restlichen Knochenoberflächen (Herrmann et al. 1990).

Es ist demnach sinnvoll, „fragliche Traumata“ ohne nachweisbare Knochenreaktion (Abb. 9) von „sicheren Traumata“ mit nachweisbarer Knochenreaktion (Abb. 13 und Abb. 14, S.41) zu unterscheiden, damit die nahe dem Todeszeitpunkt entstandenen Traumata nicht unbeachtet bleiben.



Abb. 9: Fragliches Trauma mit fehlender Knochenreaktion der Schädelkalotte

II.2.2 Schädelverletzungen

Der überwiegende Anteil von Knochenläsionen des prähistorischen Menschen lässt sich auf direkte Gewalteinwirkung zurückführen. Meist waren diese Läsionen Folge kämpferischer Auseinandersetzungen (Kunter 1981). Zur Abgrenzung einer Verletzung aufgrund eines Sturzes von einer Fraktur aufgrund direkter Gewalteinwirkung verwendet man die Hutkrempe regel. Bei Frakturen im Bereich der Hutkrempe oder unterhalb kann man eine Sturzverletzung annehmen. Liegt sie darüber, wie bei fast allen Schädeln aus Rain am Lech, wird eine Schlagverletzung angenommen. Die sogenannten Kampf- oder Waffenverletzungen werden in Anlehnung an Brothwell (1981) in drei verschiedene Klassen eingeteilt.

III.2.2.1 Hiebverletzung

Waffen mit scharfen Klingen wie Schwerter, Beile und Äxte hinterlassen Hiebverletzungen (Abb. 13, S. 41). Diese zeichnen sich durch eng umschriebene, scharfe Ränder und Riefen aus, welche parallel zur Einwirkungsrichtung verlaufen.

III.2.2.2 Impressionsfraktur

Impressionsfrakturen (Abb. 14, S. 41) entstehen durch die Einwirkung stumpfer Gewalt. Als Tatwaffe kommen z.B. Steine oder Keulen in Frage. Diese hinterlassen meist eine starke Deformierung des Schädels mit zwei Hauptmerkmalen: Die Verlagerung von Knochenteilen unter das Niveau der übrigen Schädelkalotte und eine in der Regel größere Schädigung der Tabula interna als der Tabula externa.

III.2.2.3 Lochfraktur

Wenn ein relativ kleinflächiger Gegenstand auf die Knochenoberfläche einwirkt, so kann daraus eine Durchlöcherung des Knochens resultieren. Typische Waffen, die diese Art von Fraktur verursachen können, sind Lanzen, Speere, Pfeile, Kugeln und Kiesel einer Steinschleuder. Dabei ist das „Einschussloch“ typischerweise durch einen engen äußeren Durchmesser und eine trichterförmige Erweiterung des inneren Durchmessers gekennzeichnet.

III.2.3 Traumatische Veränderungen des postkraniellen Skelettes

Brüche des postkraniellen Skeletts können jeden Knochen betreffen und mannigfaltige Ursachen haben. Nicht nur zwischenmenschliche, aggressive Handlungen führen zu Frakturen, auch Unfälle des täglichen Lebens, wie z.B. Stürze, spielen eine Rolle. Jedoch können bei Analysen prähistorischer Materials häufig nur die robusten, weniger fragilen Knochen geborgen und untersucht werden.

Kunter (1981) berichtet von besonders häufigem Vorkommen von Brüchen der unteren Extremitäten in frühgeschichtlichen und mittelalterlichen Friedhöfen. Dabei soll bei einer Fraktur der Tibia und/oder der Fibula ein Sturz mit Verdrehen des Fußes die Ursache sein.

Weitere Frakturen, die Rückschlüsse auf deren Ursachen zulassen, betreffen die Ulna und den Radius.

III.2.3.1 Parietfraktur

Unter der Parietfraktur versteht man die isolierte oder kombinierte Querfraktur der Ulna. Sie beruht auf einer Abwehrhaltung, bei der der Unterarm schützend vor das Gesicht oder vor den Kopf gehalten wird.

III.2.3.2 Colles-Fraktur

Der Sturz auf den ausgestreckten Arm führt typischerweise zu einer dislozierten Fraktur des distalen Radius. Die Colles-Fraktur ist demnach nicht direkt den sogenannten Aggressionsverletzungen zuzuordnen, sondern Folge eines Sturzes, welcher sich auch im Rahmen eines Unfalls des täglichen Lebens ereignen kann.

III.2.3.3 Hiebverletzung

Nicht nur der Schädel, sondern auch alle Knochen des postkraniellen Skeletts können Hiebverletzungen aufweisen. Betroffen sind häufig Knochen des Unterarms und die Schlüsselbeine. Ursächlich hierfür sind Waffen mit scharfen Klingen wie Schwerter, Beile und Äxte.

III.3 Molekularbiologische Geschlechtsbestimmung

III.3.1 Allgemeines zu aDNA und Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (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 erlaubt eine Vervielfältigung gezielter DNA-Abschnitte. Dazu wird ein Reaktionsgemisch, das die zu untersuchende DNA enthält, zyklisch wiederkehrend verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. In jedem Zyklus kommt es zunächst zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA, nachfolgend zur Anlagerung von Startermolekülen („annealing“), sogenannten Primern, die den gesuchten Abschnitt einrahmen. Abschließend initiiert ein thermostabiles Enzym den Wiederaufbau eines Doppelstrangs an den jeweiligen einzelsträngigen Matrizen („extension“). So verdoppelt sich idealerweise der gesuchte DNA-Abschnitt in jedem Zyklus (Newton and Graham 1994).

Bereits aus sehr kleinen Mengen DNA, sogar im Spuren- bzw. Mikrospurenbereich, lassen sich definierte Abschnitte um mehrere Größenordnungen vermehren (Ruano et al. 1989, Jeffreys et al. 1988, Linz und Degenhardt 1990). Eben diese Eigenschaft macht die PCR so wertvoll für die Analyse von aDNA. „aDNA bezeichnet diejenige DNA, die einem toten Organismus oder Teilen von ihm entstammt oder extrakorporal vorliegende DNA eines noch lebenden Organismus, und damit jegliche DNA, die einen autolytischen oder diagenetischen Prozess mit der Folge ihrer Degradierung durchlaufen hat.“ (Herrmann und Hummel 1994)

III.3.2 Prävention einer Kontamination

Selbst kleinste Spuren von DNA können durch die molekularbiologische Technik der DNA-Extraktion und Amplifikation untersucht werden. Diese Sensibilität erweist sich vor allem bei der Bearbeitung von anthropologischen Funden als günstig, da eine Analyse von alter DNA eine Arbeit im Mikrospurenbereich bedeutet. Aufgrund dieser Sensibilität ist die Reaktion jedoch sehr anfällig für Kontaminationen mit moderner DNA oder mit PCR-Produkten. So ist jede Verunreinigung mit auch noch so geringen Mengen (auch Einzelkopien) an Fremd-DNA ein Problem und daher zu vermeiden oder zumindest zu minimieren.

Es müssen spezifische Maßnahmen getroffen werden, die über das übliche Maß bei der Arbeit mit der PCR an rezenter DNA hinausgehen (Nienhaus und Gehrman 1991, Schmidt et al. 1995, Niederhauser et al. 1994).

Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Verfahren angewandt. „Carry-over Kontaminationen“ ereignen sich, wenn Amplifikationsprodukte in einen der Analyseschritte vor der eigentlichen PCR eingeschleppt werden. Zur Vermeidung dieser Art der Kontamination wurde auf eine strikte räumliche Trennung der Labors, der Gerätschaften, Pipetten, Einwegmaterialien und Arbeitskleidung in Prä- und Post-PCR-Bereiche geachtet (z.B. Niederhauser et al. 1994, Kwok und Higuchi 1989). Dadurch wurde verhindert, dass PCR-Produkte vorangegangener Amplifikationen, beispielsweise über Pipetten (Aerosolbildung), in neue Ansätze oder in die Proben selbst gerieten (Nienhaus und Gehrman 1991). Positivkontrollen wurden grundsätzlich nicht durchgeführt, um die Anzahl der PCR-Produkte und die dadurch gegebene Gefahr des „carry-over Effekts“ (Kwok 1989) nicht zu vergrößern.

Da menschliche DNA analysiert wurde, musste besonders die Gefahr der Verunreinigung mit exogener DNA berücksichtigt werden (Kitchin et al. 1990). So wurden zu jedem Arbeitsschritt Einmalhandschuhe getragen und häufig gewechselt. Darüber hinaus wurden sämtliche Arbeitsflächen und Pipetten vor Arbeitsbeginn im Laborbereich über Stunden mit UV-Licht (254nm) bestrahlt, um an den Oberflächen anhaftende rezente DNA mittels Dimerisierung benachbarter Pyrimidinbanden zu inaktivieren (Buoncristiani et al. 1990, Cone und Fairfax 1993, Sarkar und Sommer 1990).

Um der Verschleppung von DNA unter den Proben (Kreuzkontamination) entgegenzuwirken, wurden alle Arbeitsflächen und Geräte, mit denen die Proben in Berührung kamen, gründlich mit DNA ZAP (Solution 1 und 2) gereinigt. Des Weiteren wurden nur sterile, aliquotierte Reagenzien sowie Pipettenspitzen mit Filtern benutzt. Alle mehrfach verwendeten Geräte, wie z.B. Glasgefäße, wurden zur zuverlässigen Beseitigung anhaftender Probenspuren, autoklaviert. Um eventuelle Verunreinigungen zu erkennen, wurden geeignete Kontrollen durchgeführt.

Diese beinhalteten zwei Extraktionskontrollen (Parallelextraktionen, in denen kein Gewebe eingesetzt wird), sowie eine PCR-Kontrolle (PCR-Ansatz ohne Extrakt). War nur eine dieser Kontrollen fraglich bzw. eindeutig positiv, wurde der ganze Ansatz verworfen und mit frischen Reagenzien neu angesetzt.

III.3.3 Probenaufbereitung

Da die Knochen nicht unter Verwendung von Mundschutz und Einmalhandschuhen aus dem Karner entnommen wurden, konnte eine initiale Verunreinigung mit moderner DNA nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden die Außenflächen der Proben zuerst mit einer 0,5% Natriumhypochloritlösung gereinigt und anschließend mit einer Fräse ca. 1-2 mm abgeschliffen und dabei das Knochenmehl abgesaugt (Hummel et al. 1995). Die Herauspräparation eines ca. 2 x 1 cm großen Stückes aus jeder Knochenprobe erfolgte mit einer Dentalbohrmaschine mit Diamant-Trennscheibe. Sowohl das Abfräsen wie auch das Heraussägen erfolgten auf einer sterilen Werkbank.

Bei der Wahl der Knochenprobe wurde darauf geachtet, dass der Bereich möglichst frei von Rissen oder sonstigen Beschädigungen war und eine möglichst dicke Compacta aufwies. Die Proben wurden nun mit der Diamantsäge gedrittelt, damit sie in die Mahlgefäße der Mühle passten. Die Pulverisierung der Knochenstücke erfolgte bei 25 Hz in einer Kugelschwingmühle. Dieses Vermahlen der Probe dient einer Vergrößerung der Probenoberfläche und damit der Erleichterung der nachfolgenden Dekalzifizierung und DNA-Extraktion. Das Knochenpulver wurde kurzfristig bei Raumtemperatur aufbewahrt.

III.3.4 DNA-Extraktion

Die Durchführung der DNA-Extraktion erfolgte in Anlehnung an Haas et al. 2000. Ca. 1 g des Knochenmehls wurden mit 2,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) in ein 14-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und 72 h bei Raumtemperatur in einem Rotator inkubiert (Evison et al. 1997). Nach 24 und 48 h wurden jeweils nochmal 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt. Während dieser Inkubationszeit führte die Reaktion des Chelatbildners EDTA mit den Ca^{2+} -Ionen aus dem Hydroxylapatit des Knochens unter Bildung eines Calcium-EDTA-Komplexes zur Dekalzifizierung des Homogenisats.

Die Zentrifugation der Proben für 15 min bei 4000 rpm bewirkte, dass sich die aDNA nun im wässrigen Überstand der Probe befand.

Ca. 0,5 ml dieses Überstands wurden nun mit 1 ml Guanidinisocyanat-Lösung und 50 µl Diatomeen-Erde gemischt (Boom et al. 1990). Nach einer Inkubation im Rotator für weitere zwei Stunden folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Im Anschluss daran wurde das Pellet zweimal mit 1,5 ml Ethanol (70%) und einmal mit 1,5 ml Aceton gewaschen. Hierfür gibt man Ethanol bzw. Aceton zu dem Pellet, mischt mit dem Vortexer, zentrifugiert kurz, zieht zum Schluss den Überstand ab und verwirft diesen. Anschließend wurde das Pellet bei 56 °C über 10 min in einem Brutschrank getrocknet und danach die aDNA mit 120 µl sterilem Wasser wieder gelöst. Dafür bewegte sich das Gemisch 15 min bei 56 °C und 800 rpm im Thermomixer und wurde alle 5 min in einem Vortexer (IKA-Schüttler MS 2) gemischt. Im Anschluss daran wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase aus dem letzten Arbeitsschritt wurde nun in Zentrifugationsfiltern (Microcon-30 Filter) aufkonzentriert. Dazu gab man 80 µl des Überstands mit 300 µl sterilem Wasser auf den Filter und zentrifugierte für 15 min bei 11000 rpm. Während dieses Vorgangs bindet die DNA an den Filter. Nach Wenden des Microcon-30 Filters und 5 minütiger Zentrifugation bei 11000 rpm gewinnt man schließlich den aufkonzentrierten und gewaschenen DNA-Extrakt. Dieser wurde abschließend mit 20 µl sterilem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

III.3.5 DNA-Amplifikation

Alle Komponenten für die DNA-Amplifikation wurden zu einem Mastermix pipettiert und auf 0,2 ml-Röhrchen verteilt, zuletzt wurde das DNA-Extrakt hinzugefügt. Dieser Mastermix setzte sich aus folgenden Einzelbestandteilen zusammen:

- dH₂O
- 10 x PCR-Puffer
- MgCl₂ (25 mM)
- dNTP-Mix (20 mM)
- Primer (Sense, 50 pmol)
- Primer (Antisense, 50 pmol)
- Taq-Polymerase (5 U/µl)
- DNA-Template (variable Konzentration)

Die Volumenangaben folgen in den Punkten III.3.5.1 und III.3.5.2 (Tabelle 4 und 5).

Es wurden nur solche Primer verwendet, die eine DNA-Zielsequenz von nicht mehr als 202 Basenpaaren Länge umspannen, denn erfahrungsgemäß sind in aDNA-Extrakten keine intakten DNA-Zielsequenzen von weit mehr als 200 Basenpaaren Länge zu erwarten (Hummel 2003).

III.3.5.1 Amplifikation von β -Aktin

Um die Anwesenheit von amplifizierbarer DNA zu überprüfen, wurden alle Proben zuerst für die β -Aktin-Gensequenz getestet. Diese Zielsequenz ist ein 202 Basenpaare langes Segment des menschlichen β -Aktin-Gens.

Primersequenzen (Ghossein et al. 1994):

Act1: 5' -CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G- 3'

Act2: 5' -GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC- 3'

Die Konzentrationen und Volumenansätze sind Tabelle 4 zu entnehmen.

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

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

Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 20 μ l. Der Mastermix wurde auf zehn Proben, vier Extraktionskontrollen und eine PCR-Kontrolle verteilt.

Die Reaktion erfolgte in einem DNA-Thermocycler der Firma MWG Biotech. Nach einer einmaligen, initialen Denaturierung der DNA für 10 min bei 95 °C wurden 45 Zyklen wie folgt durchgeführt:

Denaturierung	1 min bei 94 °C
Annealing	1 min bei 60 °C
Extension	1 min bei 72 °C

Im Anschluss daran folgten weitere 8 min bei 72 °C, um begonnene, unvollständig synthetisierte Stränge zu komplettieren. Danach wurden die Proben automatisch auf 4 °C heruntergekühlt. Die längerfristige Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei -20 °C.

III.3.5.2 Amplifikation von SR-Y

SR-Y ist ein geschlechtsdeterminierendes Gen, welches nur der Mann besitzt. Während bei männlichen Individuen eine 93 bp lange Bande im Agarosegel erscheint, lassen weibliche Individuen kein Fragment im Gel erkennen.

Primersequenzen (Santos et al. 1998):

SR-Y 1: 5' -ATA AGT ATC GAC CTC GTC GGA A- 3'
 SR-Y 2: 5' -GCA CTT CGC TGC AGA GTA CCG A- 3'

In Tabelle 5 sind die Konzentrationen und Volumenansätze für die Amplifizierung von SR-Y und Amelogenin (III.3.5.3) angegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für SR-Y und Amelogenin.

Ingredienz	Ausgangs-Konzentration	Ziel-Konzentration	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 1	50 pM	1 pM	6,0 µl	0,4 µl
Primer 2	50 pM	1 pM	6,0 µl	0,4 µl
dH ₂ O			220,5 µl	14,7 µl
DNA	variabel			0,5 µl

Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 20 µl. Die Verteilung der Mastermixes erfolgte wiederum auf zehn Proben, vier Extraktionskontrollen und eine PCR-Kontrolle.

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma MWG Biotech durchgeführt. Die initiale Denaturierung erfolgte über 10 min bei 95 °C, anschließend liefen 45 Zyklen wie folgt ab:

Denaturierung	3 min bei 94 °C
Annealing	3 min bei 58 °C
Extension	3 min bei 72 °C

Es folgten weitere 8 min bei 72 °C. Danach wurden die Proben automatisch auf 4 °C heruntergekühlt. Die längerfristige Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei –20 °C.

III.3.5.3 Amplifikation von Amelogenin

Das Primerpaar Amel 1/2 amplifiziert einen Teil des Introns 1 des Amelogeningens, welches auf den menschlichen Geschlechtschromosomen lokalisiert ist und für ein Protein des Zahnschmelzes kodiert. Es handelt sich hierbei um ein single-copy-Gen. Während die Sequenz auf dem Y-Chromosom 112 Basenpaare umfasst, liegt die Sequenz auf dem X-Chromosom mit einer 6-bp-Deletion als 106 Basenpaare langer Abschnitt vor (Nakahori et al. 1991, Bailey et al. 1992, Mannucci et al. 1994). Die Amplifikation mit dem Primerpaar Amel 1/2 führt zu einem einzigen Amplifikationsprodukt für Frauen (106 bp) und zu zwei Produkten für Männer (106 und 112 bp).

Primersequenzen (Mannucci et al. 1994):

Amel 1: 5' -CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG- 3'
Amel 2: 5' -ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG- 3'

Der PCR-Ansatz war identisch mit dem für SR-Y (III.3.5.2, Tabelle 5).

Die Reaktion fand wiederum in einem Thermocycler der Firma MWG Biotech statt. Nach der initialen Denaturierung über 10 min bei 95 °C wurden 45 Zyklen wie folgt durchgeführt:

Denaturierung	3 min bei 94 °C
Annealing	3 min bei 60 °C
Extension	3 min bei 72 °C

Es folgten weitere 8 min bei 72 °C. Danach wurden die Proben automatisch auf 4 °C heruntergekühlt. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei –20 °C.

III.3.6 Nachweis der Amplikons

Zur Überprüfung des Amplifikationserfolgs der PCR kamen sowohl die Agarosegel-Elektrophorese als auch die Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Anwendung.

III.3.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuren liegen im alkalischen und schwach sauren pH als Polyanionen vor. Legt man ein elektrisches Feld an, werden sie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Aufgrund des konstanten Ladung-Massen-Verhältnisses ist dabei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zum Molekulargewicht. Nach Färbung des Gels mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, können die DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Es wurde eine Agarosekonzentration von 4% gewählt. Hierfür wurde 1 g Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in 250 ml 20 x TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde die Agarose in eine Gelkammer (10 x 5 cm) gegossen, welche vorher mit einem 17-zähligen Kamm bestückt wurde. Nachdem ca. 15 Minuten später das Gel erkaltet war, wurde es aus der Gießvorrichtung entnommen und der Kamm entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde vor dem horizontalen Einsetzen des Agarosegels mit ca. 1000 ml 1 x TAE-Puffer gefüllt. Jeweils 10 µl der PCR-Produkte wurden mit 2 µl einfachem Ladepuffer versetzt.

Um die Größe der amplifizierten Fragmente ermitteln zu können, wurden die erste und letzte Kammer jeden Gels mit 2 µl einer 50 bzw. 100 bp Standardleiter und 2 µl Ladepuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 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 werden. Das Gel wurde anschließend in einem Videodokumentationssystem für Gelelektrophorese fotografiert und per Computer festgehalten.

III.3.6.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Durch die Verwendung sogenannter PAGE-Elektrophoresen können im Gegensatz zur Agarosegel-Elektrophorese PCR-Produkte mit Längenunterschieden von nur 4-6 bp detektiert werden. Daher eignet sich die PAGE-Elektrophorese in besonderem Maße für die Darstellung der PCR-Produkte der Primerpaare Amel 1/2.

In vorliegender Arbeit wurden deshalb die Amplifikate von Amelogenin, sofern sie mit der Agarosegelelektrophorese nachweisbar waren, auch mit der PAGE-Elektrophorese untersucht. Dazu wurden fertige Polyacrylamidgele sowie Fertiglösungen der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg (GeneGel SSCP Starter Kit) verwendet. Das Gel wurde zuerst für 60 min bei 80 rpm in einem Schüttler (KS 250 basic) mit 20 ml Rehydrationspuffer (SSCP Rehydration Buffer B) aufgeweicht. Nach dem Trocknen der Oberfläche wurde es in die Horizontalelektrophoresekammer (Elektrophoresis Unit, Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die Elektrodenstreifen (GeneGel Special Electrode Wicks) wurden mit 2 ml Anode Buffer B (pH 7,4) bzw. 2 ml Cathode Buffer B (pH 7,4) benetzt. Zuletzt wurden die Kammern mit je 3 µl der PCR-Produkte und 3 µl dH₂O gefüllt. Zum Größenvergleich dienten 6 µl einer 50 Basenpaarleiter (Amersham Pharmacia Biotech). Die Laufzeit betrug insgesamt 130 min und setzte sich, wie in Tabelle 6 ersichtlich, zusammen.

Tabelle 6: Laufbedingungen der PAGE-Elektrophorese

	Temperatur	Spannung	Stromstärke	Zeit
Phase 1	12°C	180 V	22 mA	40 min
Phase 2	12°C	390 V	26 mA	90 min

Die Färbung der Gels erfolgte mittels einer Silberfärbung (DNA Silver Staining Kit, Pharmacia Biotech) nach folgendem, von der Firma Pharmacia Biotech vorgeschlagenem Protokoll (Tabelle 7):

Tabelle 7: Protokoll zur Silberfärbung

Arbeitsschritte	Fertiglösungen	weitere Komponenten	Zeit
1. Fixierung	25 ml Fixierlösung	100 ml 24% Ethanol	30 min
2. Färbung	25 ml Färbelösung	100 ml dH ₂ O	30 min
3. Waschen		125 ml dH ₂ O	4 min
4. Entwicklung	25 ml Natriumcarbonat-Lösung	100 ml dH ₂ O 125 µl Natriumthiosulfat (37% w/v in H ₂ O) 125 µl Formaldehyd (2% w/v in H ₂ O)	6 min
5. Konservierung	25 ml Stopping & Preserving solution	100 ml dH ₂ O	30 min
6. Waschen		125 ml dH ₂ O	10 min

IV. Ergebnisse

IV.1 Morphologische Untersuchungen

IV.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung der Population aus Rain

Eine Untersuchung des Alters wurde bei 2547 Schädeln vorgenommen (Tabelle 8), wovon 498 der Altersstufe Neonatus, Infans I oder Infans II zugeordnet wurden. Da beim kindlichen Skelett die Geschlechtsbestimmung aufgrund noch nicht ausgeprägter Geschlechtsmerkmale des Schädels deutliche Unsicherheiten aufweist (Zink 1999), wurde hierauf verzichtet.

Von den verbleibenden 2049 Schädeln, die nach dem Geschlecht untersucht wurden, sind 1179 männlich, 852 weiblich und 18 können keinem Geschlecht zugeordnet werden (Tabelle 8). Das Alter von 80 Schädeln kann aufgrund des schlechten Erhaltungszustands lediglich auf erwachsen (älter als juvenil) festgelegt werden.

Tabelle 8: Alters- und Geschlechtsverteilung der Population aus Rain

Altersstufe	männlich	weiblich	unbestimmt	gesamt
Neonatus			2	2
Infans I			202	202
Infans II			288	288
Infans I oder II			6	6
Juvenil	65	70	11	146
21-30 Jahre	391	426	3	820
31-40 Jahre	321	201	0	522
41-50 Jahre	188	80	0	268
51-60 Jahre	101	31	0	132
älter 60 Jahre	58	23	0	81
erwachsen, Alter unbestimmt	55	21	4	80
Summe	1179	852	516	2547

Die Sterblichkeit der Population ab 13 Jahre (Abb. 10) ist bei den Frauen bis 30 Jahre höher als bei den Männern und sinkt dann ab dem 31. Lebensjahr deutlich unter die Werte der Männer ab.

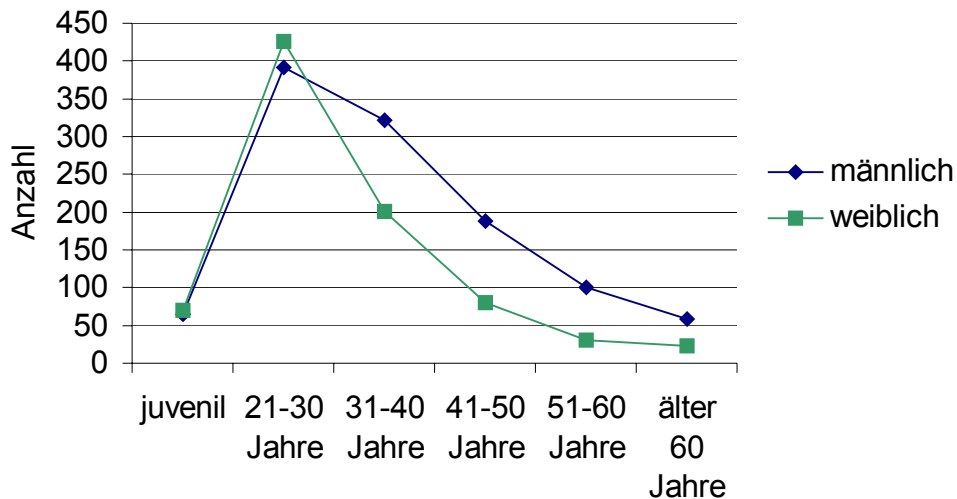


Abb. 10: Männliche und weibliche Individuen ab 13 Jahre (juvenil)

Die morphologischen Befunde zur Geschlechtsbestimmung an den Beckenknochen ergeben ein ähnliches Verhältnis von männlich zu weiblich (1,19:1) wie an den Schädeln (1,38:1) und bestätigen somit die Ergebnisse zur angenommenen Geschlechtsverteilung.

IV.1.2 Traumaraten

Die Verletzungen der Schädel und der postkraniellen Skelettteile der Population aus Rain am Lech wurden sowohl quantitativ als auch qualitativ erfasst.

IV.1.2.1 Calvaria

Von den insgesamt 2049 Schädeln der Altersklassen juvenil und älter weisen 152 Schädel (7,4%) traumatische Läsionen auf (Tabelle 9).

Tabelle 9: Sicher und fraglich traumatisch veränderte Calvaria

	männlich	weiblich	gesamt
Sichere Traumata	86	24	110
Fragliche Traumata	25	17	42
Gesamt	111	41	152

110 der 152 traumatisch veränderten Calvaria weisen ein makroskopisch sicher nachweisbares Trauma mit vitaler Gewebereaktion (Abb. 13 und Abb. 14, S.41) und 42 ein fragliches Trauma ohne Gewebereaktion (Abb. 9, S. 24) auf. Es zeigen somit 7,3% bzw. 9,4% aller 1179 männlichen und 2,8% bzw. 4,8% aller 852 weiblichen Individuen traumatische Veränderungen der Schädel. Die niedrige Prozentzahl gibt jeweils den Anteil der sicheren Traumata wieder, die hohe schließt den Anteil der fraglichen Traumata und damit auch mögliche Artefakte mit ein. Um die Fehlerquelle der möglichen Artefakte und damit einen zu hohen Anteil an falsch positiven Ergebnissen auszuschließen, wird im Weiteren der Arbeit nur auf die sicheren traumatischen Veränderungen eingegangen. Das Verhältnis von Männern zu Frauen mit Schädelverletzungen beläuft sich auf 78,2% zu 22,8%.

Die meisten Schädelverletzungen der Männer (31 Frakturen) weisen die 31- bis 40-Jährigen auf, die wenigsten (n=2) betreffen die Juvenilen (Tabelle 10), wobei die Traumarate mit zunehmendem Alter von 3,1% (juvenil) auf 12,2% (41-50 Jahre) steigt und auch in den zwei höchsten Altersstufen relativ groß bleibt (Abb. 11).

Tabelle 10: Traumatisch veränderte Calvaria in den verschiedenen Altersklassen

Altersstufe	Männer	Frauen
Juvenil	2	3
21-30 Jahre	19	9
31-40 Jahre	31	7
41-50 Jahre	23	4
51-60 Jahre	7	0
Älter als 60 Jahre	4	1

Bei den Frauen hingegen findet man traumatisch veränderte Schädel am häufigsten in der Altersklasse 21-30 Jahre (9 Individuen). Die Altersstufe 51-60 Jahre ist mit keinem und die älter als 60-Jährigen sind mit einem verletzten Individuum am geringsten vertreten (Tabelle 10). Die altersbezogene Traumarate ist der der Männer ähnlich (Abb. 11). Sie steigt vom 21. bis zum 50. Lebensjahr kontinuierlich an (von 2,1% auf 5,0%), jedoch deutlich schwächer als bei den männlichen Individuen. Die Juvenilen zeigen eine überraschend hohe Rate mit 4,3%.

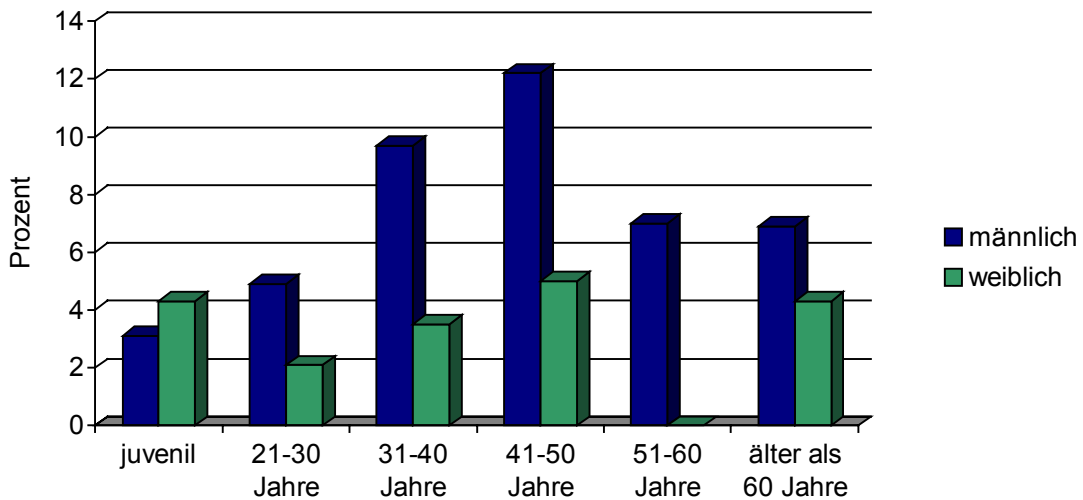


Abb. 11: Prozentuale Verteilung der Schädelverletzungen in den verschiedenen Altersklassen

IV.1.2.2 Differenzierung der Schädelverletzungen

Bei der Differenzierung der verschiedenen traumatischen Veränderungen am Schädel in Hiebverletzungen, Impressionsfrakturen und Lochdefekte zeigt sich, dass von den 86 betroffenen Männern (Abb. 12) 46 eine Hiebverletzung aufweisen (Beispiel Individuum 1616, Abb. 13).

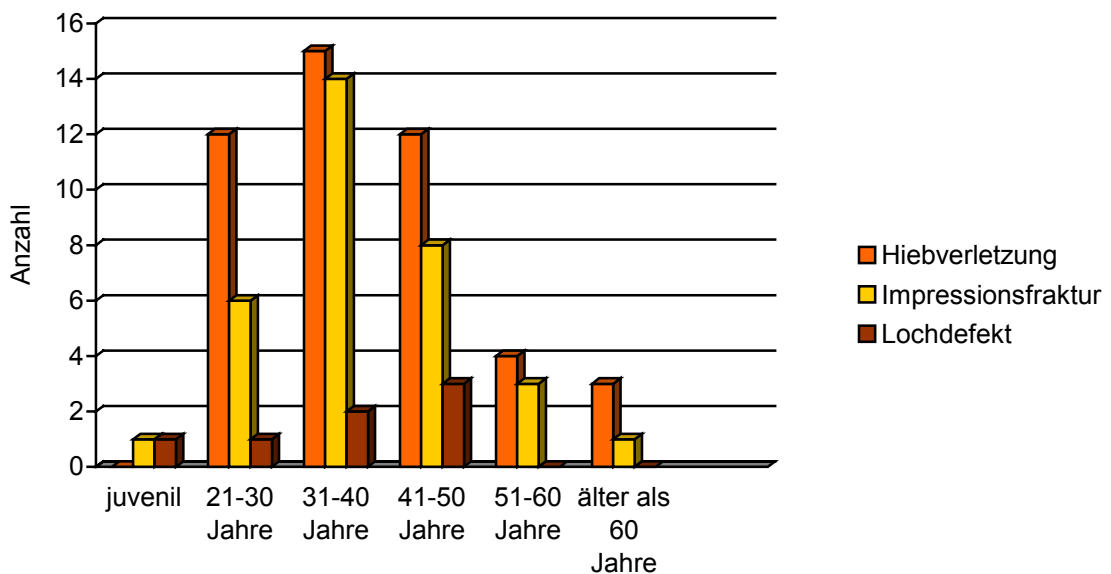


Abb. 12: Anzahl der Hieb-, Impressions- und Lochverletzungen der männlichen Individuen

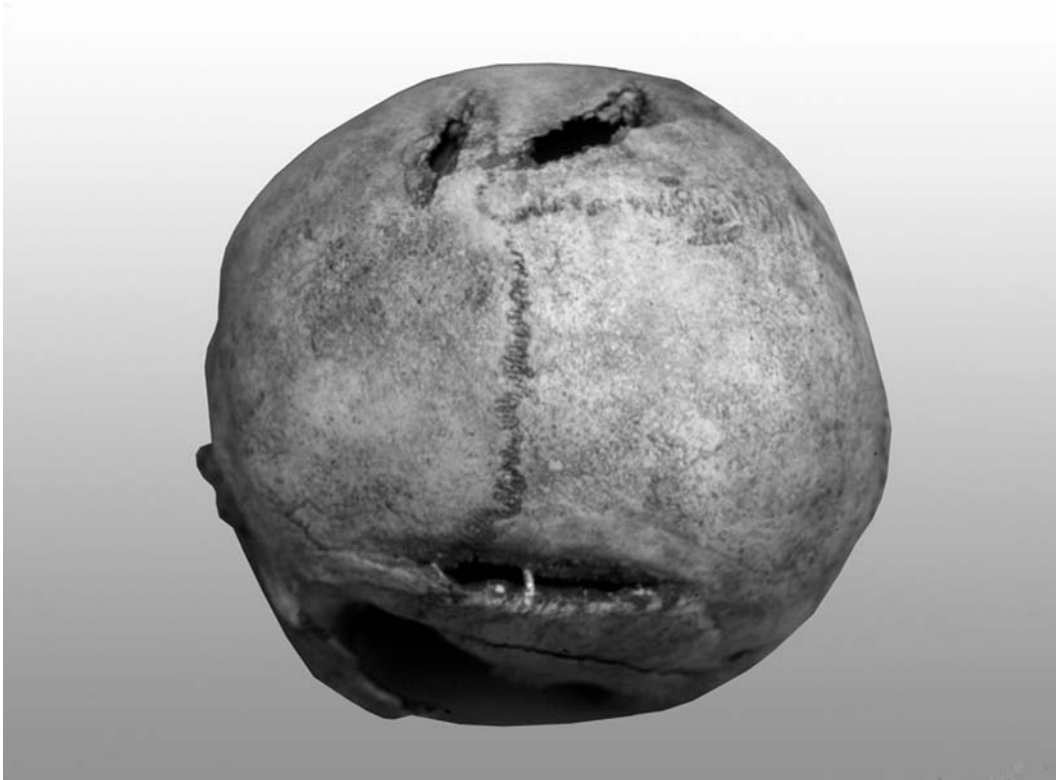


Abb. 13: Männliches Individuum mit mehreren verheilten Hiebverletzungen

Bei 33 der männlichen Individuen konnte eine Impressionsfraktur (Beispiel Individuum 1400, Abb. 14) und bei sieben ein Lochdefekt diagnostiziert werden.



Abb. 14: Männliches Individuum mit großer überlebter Impressionsfraktur

Die Verletzungen der 24 Frauen teilen sich auf in neun Hieb-, 13 Impressionsverletzungen und zwei Lochdefekte (Abb. 15).

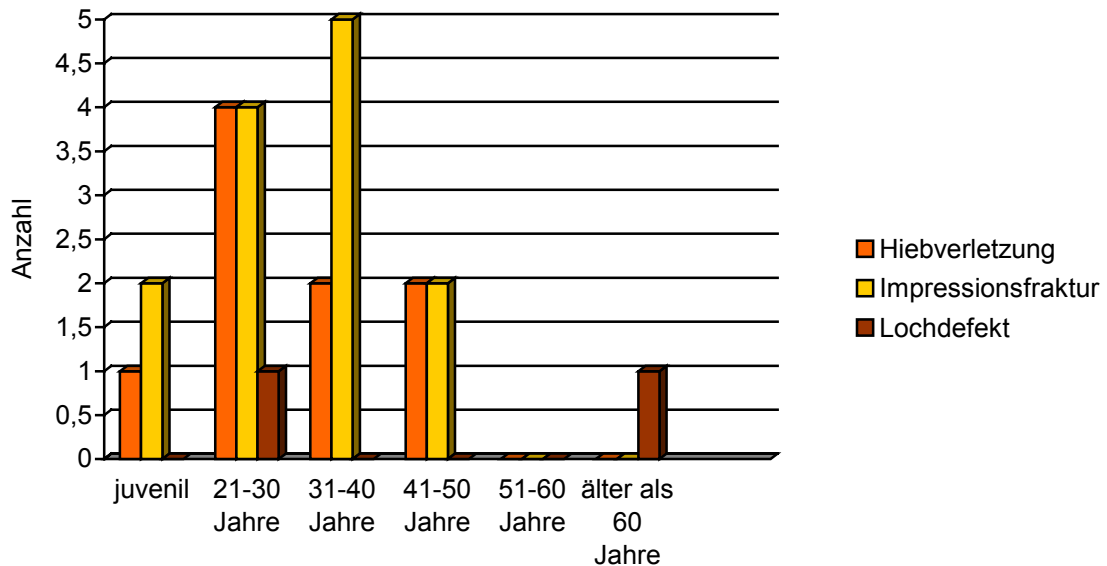


Abb. 15: Anzahl der Hieb-, Impressions- und Lochverletzungen der weiblichen Individuen

Vergleicht man nun die geschlechtsspezifischen Anteile der verschiedenen Frakturarten (Tabelle 11), so fällt auf, dass über die Hälfte der Männer Hiebverletzungen aufweisen. Im Gegensatz hierzu sind bei den Frauen die Impressionsfrakturen von größerer Bedeutung. Lochdefekte sind bei beiden Geschlechtern mit ca. 8% gleich verteilt und spielen eine eher untergeordnete Rolle.

Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der einzelnen Frakturarten

	Männer	Frauen
Hiebverletzung	53,5%	37,5%
Impressionsfraktur	38,4%	54,2%
Lochdefekt	8,1%	8,3%

Nicht nur allgemein ist die Hiebverletzung die vorherrschende Schädelverletzung der Männer, sondern auch innerhalb jeder einzelnen Altersklasse ab 21 Jahren ist sie die häufigste traumatische Veränderung (Abb. 16). Die Juvenilen weisen jedoch keine derartige Verletzung auf.

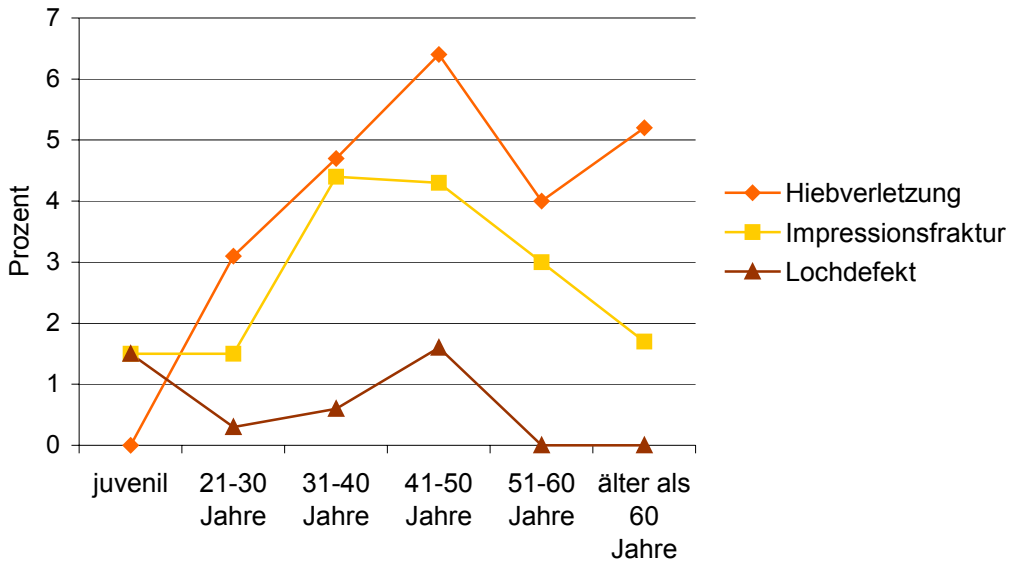


Abb. 16: Prozentuale Verteilung der Hieb-, Impressions- und Lochverletzungen bei den Männern

Bei jeder der weiblichen Altersklassen juvenil, 21-30 Jahre, 31-40 Jahre und 41-50 Jahre ist die Rate der Impressionsfrakturen größer oder gleich der der Hiebverletzungen. Die 51- bis 60-Jährigen sind an den Verletzungen nicht beteiligt. Auffallend ist die hohe Lochdefektrate der älter als 60-Jährigen (Abb. 17).

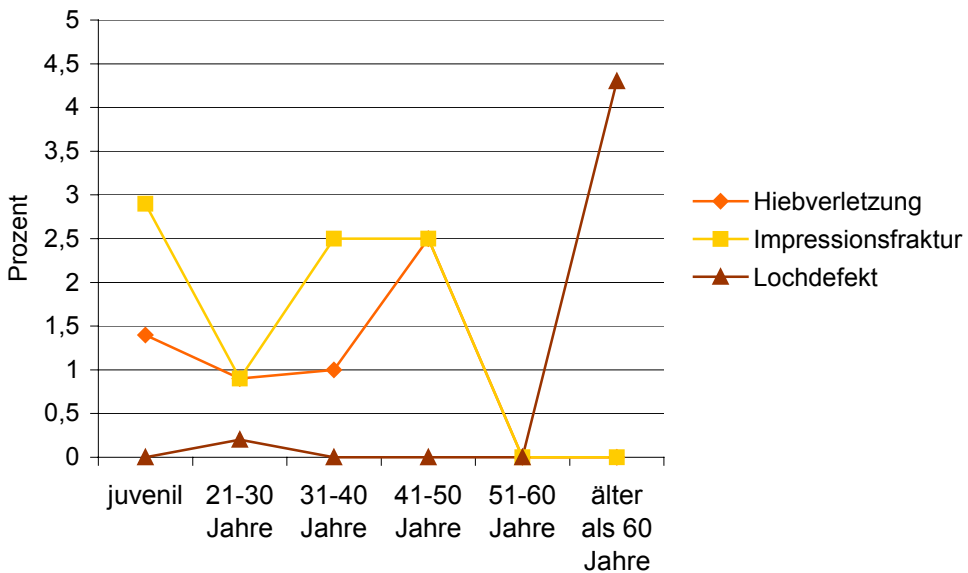


Abb. 17: Prozentuale Verteilung der Hieb-, Impressions- und Lochverletzungen bei den Frauen

IV.1.2.3 Postkraniales Skelett

Da die morphognostische Geschlechtsdiagnose anhand einzelner Langknochen mit makroskopischen Möglichkeiten sehr vage, bzw. nur am Femur näherungsweise möglich ist (Hermann et al. 1990), wird in dieser Arbeit auf eine rein morphologische Diagnostik verzichtet und eine molekularbiologische Geschlechtsdiagnose vorgenommen (siehe IV.2.2.1.). Insgesamt sind 53 Langknochen traumatisch verändert (Beispiel Abb. 18).



Abb. 18: Individuum 200; Tibiafraktur mit Kallusbildung

Sechs der 53 Langknochen weisen eine Hiebverletzung auf. So sind die Hiebverletzungen lediglich mit 11,3% an allen traumatischen Verletzungen der Langknochen beteiligt und betreffen je zwei rechte und linke Tibiae, einen rechten Radius und einen rechten Humerus. Von den übrigen 47 postkranialen Skelettelementen (Abb. 19) sind mit 57,4% vor allem die unteren Extremitäten betroffen. Hierbei findet man sowohl bei den zehn Tibiae, den 14 Femura, als auch bei den drei Fibulae vor allem diaphysäre Frakturen.

Die Frakturen der oberen Extremitäten verteilen sich auf fünf Ulnae mit diaphysär gelegenen Frakturen, sieben Radii mit vorherrschend distalen Frakturen und fünf, vor allem diaphysär mittig gelegenen Humerusfrakturen.

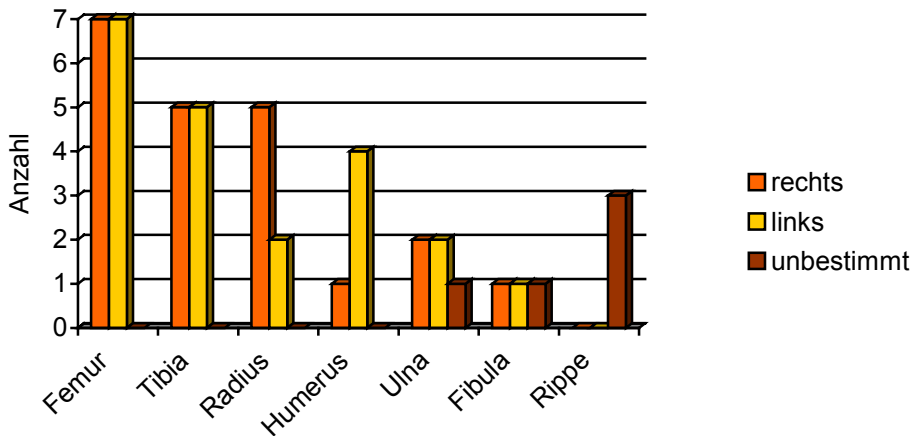


Abb. 19: Anzahl der Frakturen am postkraniellen Skelett (ohne Hiebverletzungen)

Eine repräsentative Gesamtanzahl ist von Femura (4671), Tibiae (5560) und Humeri (2852) vorhanden, so dass statistische Aussagen nur bei diesen Skelettelementen möglich sind (Abb. 20). Die Frakturen des Femur, der Tibia und des linken Humerus treten mit je ca. 0,3% gleich häufig auf. Unterrepräsentiert ist die traumatische Veränderung des rechten Humerus (0,07%).

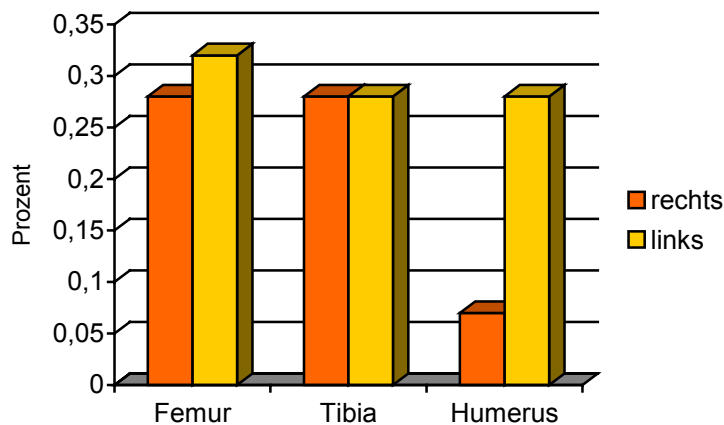


Abb. 20: Prozentuale Frakturrate (ohne Hiebverletzungen)

IV.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden 20 frakturierte Langknochen, welche einen guten Erhaltungszustand aufwiesen und Hinweise auf ein exogenes Trauma im Sinne einer Kallusreaktion und einer Achsenfehlstellung zeigten und zehn unversehrte Langknochen zum Methodenvergleich ausgewählt.

Die Untersuchung von sieben Schädeln, bei denen eindeutig das Geschlecht mittels morphologischer Methoden festgelegt werden konnte, dient dem Nachweis der Richtigkeit der molekularbiologischen Methode.

Drei Kinderschädel, die morphologisch nicht geschlechtsdiagnostiziert werden können, wurden zur Darstellung der Perspektiven von derartigen Untersuchungen mit in die Analysen eingeschlossen. Da es eines hohen finanziellen und zeitlichen Aufwands bedarf, konnten diese interessanten und viel versprechenden Analysen jedoch nur in begrenztem Umfang durchgeführt werden. In toto beinhaltete die molekularbiologische Untersuchung 40 verschiedene Knochen.

Zur Beurteilung der Amplifikationsergebnisse für β -Aktin, Amelogenin und SR-Y (Tabellen 12, 14 und 15) wurden diese in vier Kategorien eingeteilt:

- + positiv
- negativ
- ? nicht eindeutig negativ
- +? nicht eindeutig positiv

Da in der Agarosegel-Elektrophorese bei der Analyse für Amelogenin lediglich eine Bande sichtbar wird und so keine Geschlechtsdiagnose getroffen werden kann, wurden alle Proben, die für Amelogenin positiv waren, nochmals mittels eines High-Resolution-Gels (mit Silberfärbung) zur genaueren Auftrennung der Banden untersucht. Auf diese Weise kann das Geschlecht bei positivem Ergebnis eindeutig diagnostiziert werden.

Die Ergebnisse der Amplifikation von Amelogenin und die Darstellung mittels PAGE-Elektrophorese wurden in fünf Kategorien eingeteilt:

DB	Doppelbande (106 und 112 bp, männliches Individuum)
EB ₁₀₆	Einzelbande (106 bp, weibliches Individuum)
EB ₁₁₂	Einzelbande (112 bp, männliches Individuum)
DB/EB	nach Wiederholung kein eindeutiges Ergebnis
-	kein Ergebnis

IV.2.1 Ergebnisse des Nachweises von β -Aktin

Um die Präsenz von amplifizierbarer DNA zu testen, wurde bei allen 40 Proben mittels PCR die Sequenz β -Aktin mit einer Länge von 202 bp getestet (Beispiele Abb. 21).

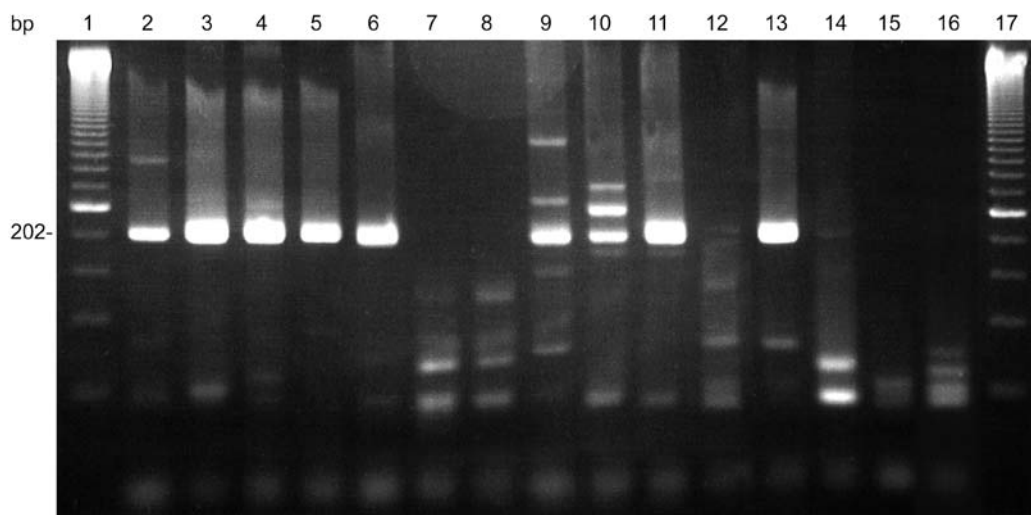


Abb. 21: Amplifikation des β -Aktin-Gens. Spalte 1 und 17: 50 bp Standardleiter; Spalte 2-6, 9-11 und 13: positiver Nachweis des Amplifikationsprodukts; Spalte 12: Probe ohne Nachweis des β -Aktin-Gens; Spalte 7,8,14-16: Negativkontrollen

Nach maximal dreimaliger Wiederholung konnte in 28 Fällen (70%) ancient DNA amplifiziert werden (Tabellen 12, 14 und 15). Probe Nummer 332 zeigt ein nicht eindeutig positives Ergebnis.

IV.2.2 Molekulargenetische Geschlechtsdiagnose

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen einige Ergebnisse für Amplifikationsreaktionen, die mit den Primerpaaren SR-Y und Amel 1/2 durchgeführt wurden.

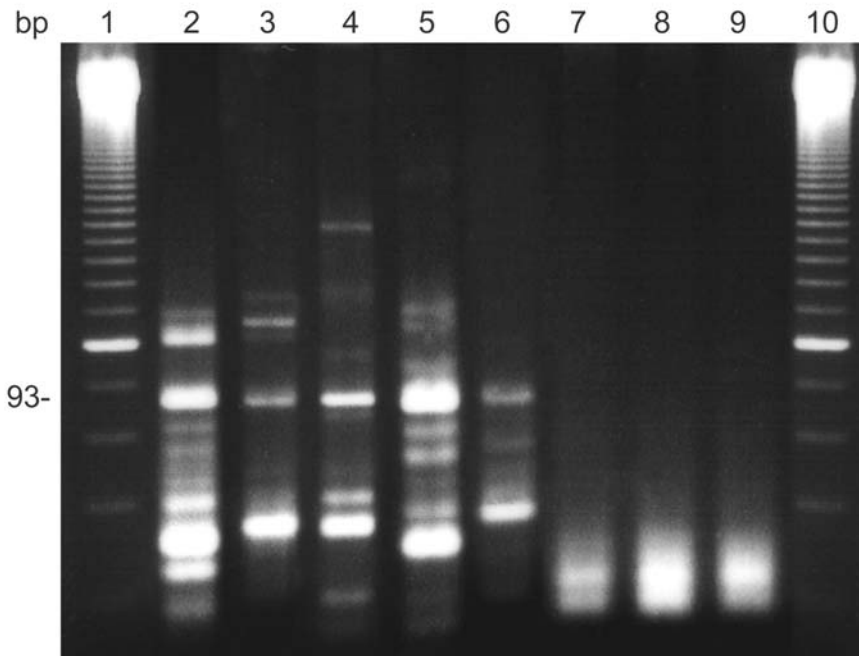


Abb. 22: Amplifikation des SR-Y Gens bei Knochenproben aus Rain am Lech: Spalte 1 und 10: 50-bp Standardleiter; Spalte 2-6: Amplifikationsprodukte; Spalte 7-9: Negativkontrollen

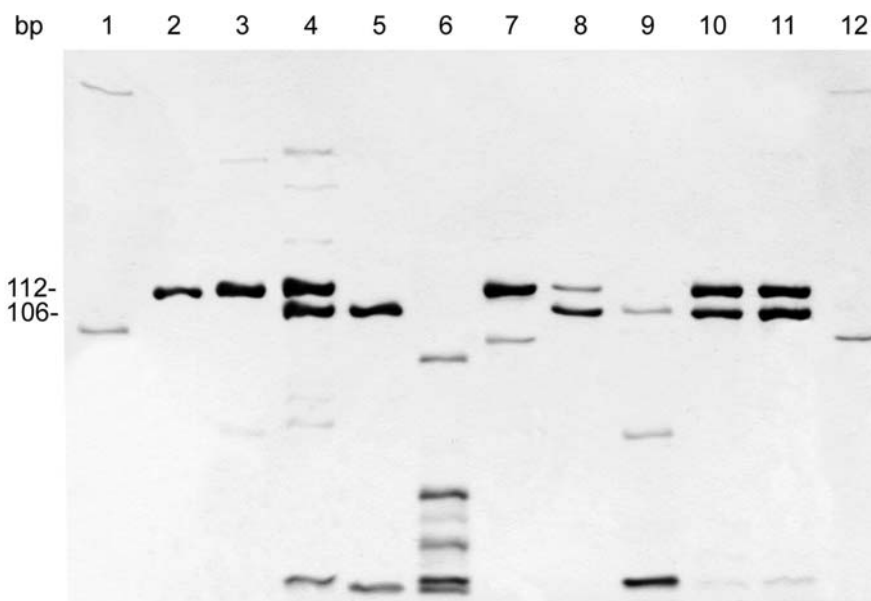


Abb. 23: Amplifikation des Amelogeningens und Darstellung mittels PAGE-Elektrophorese: Spalte 1 und 12: 100-bp Standardleiter; Spalte 2-11: Amplifikationsprodukte ausgewählter Individuen aus Rain am Lech

IV.2.2.1 Postkraniales Skelett

Die molekulare Analyse zur Geschlechtsbestimmung bei 20 frakturierten Langknochen mittels Amplifikation von β -Aktin, SR-Y und Amelogenin (Tabelle 12) verlief in 50% der Fälle erfolgreich. Von zehn Proben mit identifizierter Geschlechtszugehörigkeit ist eine Probe einem weiblichen Individuum und neun Proben männlichen Individuen zuzuordnen. Mit 90% überwiegt somit das männliche Geschlecht deutlich. Eine Probe (Nummer 12) zeigt im Agarosegel ein eindeutig positives Ergebnis für Amelogenin, welches jedoch mit Hilfe des PAGE-Gels nicht genauer differenziert werden kann. Probe Nummer 200 ergab nach Wiederholung des High-Resolution-Gels voneinander abweichende Ergebnisse.

Tabelle 12: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen 20 frakturierter Langknochen

Nummer	β -Aktin	SR-Y	Amelogenin	Amelogenin (PAGE-Gel)	molekular bestimmtes Geschlecht
11	+	-	+	EB ₁₀₆	weiblich
12	+	-	+	-	nicht möglich
30	+	+	+?	DB	männlich
48	+	+	+	DB	männlich
88	+	+	+	DB	männlich
165	-	-	-		nicht möglich
196	+	-	-		nicht möglich
200	+	+?	+	DB/EB	nicht eindeutig
247	+	-	-		nicht möglich
248	-	-	-		nicht möglich
258	-	+	-		männlich
259	-	-	-		nicht möglich
270	-	-	-		nicht möglich
277	+	-	+	EB ₁₁₂	männlich
304	-	-	-		nicht möglich

Fortsetzung Tabelle 12

Nummer	β -Aktin	SR-Y	Amelogenin	Amelogenin (PAGE-Gel)	molekular bestimmtes Geschlecht
313	+	-	-		nicht möglich
330	+	+	+	DB	männlich
363	-	+	-		männlich
371	-	+	-		männlich
387	+	+	+	DB	männlich

Die molekularbiologische Geschlechtsbestimmung der Langknochen war überwiegend bei den großen, weniger fragilen Knochen (Tabelle 13) möglich.

Tabelle 13: Molekularbiologische Geschlechtsbestimmung frakturierter Langknochen und deren Traumalokalisation

Nummer	Frakturlokalisierung	molekular bestimmtes Geschlecht (Ergebnisse aus Tabelle 12)
11	Tibia, distal, links	weiblich
30	Femur, mittig diaphysär, rechts	männlich
48	Tibia, distal, links	männlich
88	Humerus, proximal, links	männlich
258	Tibia, mittig diaphysär, links	männlich
277	Femur, mittig diaphysär, rechts	männlich
330	Radius, distal, links	männlich
363	Femur, distal, links	männlich
371	Femur, Schenkelhals, rechts	männlich
387	Femur, mittig diaphysär, rechts	männlich

Parallel dazu wurden zehn weitere Langknochen (Tabelle 14) zum Methodenvergleich molekularbiologisch untersucht. Hierbei konnte bei sechs von zehn Proben (60%) das Geschlecht eindeutig als männlich bestimmt werden. Probe Nummer 33 zeigt unterschiedliche Resultate. Zum einen ein positives Ergebnis für SR-Y, welches für ein männliches Individuum sprechen würde, und zum anderen nur eine Bande (106 bp) in der Auftrennung mittels des High-Resolution-Gels. Dies würde für sich alleine gesehen für ein weibliches Individuum sprechen, schließt jedoch prinzipiell ein männliches Individuum bei „Drop-out“ eines Allels in der ancient DNA nicht aus.

Tabelle 14: Molekularbiologische Ergebnisse 10 nicht-frakturierter Langknochen

Nummer	β-Aktin	SR-Y	Amelogenin	Amelogenin (PAGE-Gel)	molekular bestimmtes Geschlecht
33	+	+	+	EB106	nicht eindeutig
190	+	+	+	EB112	männlich
206	+	-	+	DB	männlich
219	+	-	+	-	nicht möglich
233	+	+	+	DB	männlich
332	+?	-	-		nicht möglich
345	+	+	-		männlich
358	+	+	-		männlich
376	-	-	-		nicht möglich
414	+	+	+	DB	männlich

IV.2.2.2 Schädel

Zur Überprüfung der Richtigkeit der molekularen Geschlechtsbestimmung wurde diese bei morphologisch sicher bestimmten Schädeln angewendet. Zu diesem Zwecke wurden sieben Schädel nach der morphologischen Geschlechtsdiagnose molekularbiologisch untersucht (Tabelle 15). Dabei konnte in vier Fällen (66,7%) die makroskopische Diagnose eindeutig bestätigt werden und in keiner Analyse widersprach das molekulargenetisch bestimmte dem morphologischen Geschlecht. Das makroskopisch weibliche Individuum Nummer 1325 kann mit dem Primer Amelogenin nicht als solches detektiert werden. Auch bei den Schädeln Nummer 1400 und 1429, zwei morphologisch männliche Individuen, kann keine molekulare Geschlechtsdiagnose gestellt werden.

Die Analyse der drei Kinderschädel (Nummer 500, 1054 und 1056, Tabelle 15) ergab eindeutig zwei männliche und ein weibliches Individuum.

Tabelle 15: Molekularbiologische und morphologische Ergebnisse ausgewählter erwachsener und kindlicher Schädel im Vergleich

Nummer	β-Aktin	SR-Y	Amelogenin	Amelogenin (PAGE-Gel)	molekular bestimmtes Geschlecht	morpholog. bestimmtes Geschlecht
126	+	+	+	DB	männlich	männlich
181	+	+	+	EB ₁₁₂	männlich	männlich
506	+	+	+?	EB ₁₁₂	männlich	männlich
1325	+	+?	-		nicht eindeutig	weiblich
1400	-	-	+?	-	nicht möglich	männlich
1429	+	-	+?	-	nicht möglich	männlich
2062	+	+	-		männlich	männlich
500	-	+	-		männlich	? (Kind)
1054	+	-	+	EB ₁₀₆	weiblich	? (Kind)
1056	+	+	-		männlich	? (Kind)

V. Diskussion

V.1 Alters- und Geschlechtsverteilung der Population aus Rain am Lech

Die wichtigste Grundlage für die Rekonstruktion einer historischen Population stellt die Alters- und Geschlechtsbestimmung dar. Sie lässt Rückschlüsse hinsichtlich der Zusammensetzung der Bevölkerung zu und bietet den Ausgangspunkt zur Beurteilung weiterführender Fragestellungen.

Von der in Tabelle 8 dargestellten Population aus Rain am Lech sind 19,6% im Alter bis 12 Jahren (Neonatus, Infans I und Infans II) verstorben. Dies spiegelt jedoch nicht die zu jener Zeit übliche hohe Rate der Kindersterblichkeit wieder, die etwa im Bereich der Zahlen des angehenden Mittelalters liegen müsste und mit 45-60% angegeben wird (Zink 1999).

Mehr als die Hälfte der Population verstarb im Alter von 21-40 Jahren, wobei die meisten (820 Individuen) der 2547 Todesfälle auf die Altersklasse der 21- bis 30-Jährigen fällt. Das sind 32,2% der Gesamtbevölkerung. Die Lebenserwartung im 18. Jahrhundert errechnete Grimm (1973) etwas höher, für Männer auf 33,2 und für Frauen auf 35,7 Jahre.

Da die Untersuchung aber Knochen der Population von Rain am Lech ab dem 15. Jahrhundert mit einbezieht, muss man für diese früher gelebten Individuen von einem niedrigeren Sterbealter ausgehen, bedingt durch Verletzungen, geringere Hygiene, mangelnde ärztliche Versorgung und insbesondere durch Infektionskrankheiten wie Pest, Lepra (Dorn 1985) und Tuberkulose (Zink, bisher unveröffentlicht). Dass mehr Frauen als Männer in der Alterklasse 21-30 Jahre starben, erklärt sich durch das Risiko der Schwangerschaften und Geburten mit der zusätzlichen Gefahr des Todes durch Kindbettfieber oder andere schwangerschaftsbezogene Erkrankungen. In allen Altersklassen über 30 Jahren liegt die Sterblichkeit der Männer hingegen deutlich über der der Frauen. Es ist anzunehmen, dass hierfür vorwiegend Konflikte und kriegerische Auseinandersetzungen ursächlich sind.

Nur wenige Individuen wurden älter als 40 Jahre, so dass sich die Zahl der Verstorbenen in den höheren Altersklassen minimiert und lediglich 3,2% der Gesamtbevölkerung mehr als 60 Lebensjahre erreichten.

V.2 Häufigkeiten und Ursachen der Schädelfrakturen

Unfälle bei der Jagd oder bei Verrichtungen des täglichen Lebens, zufallsbedingten Fall und Sturz hat es zu allen Zeiten gegeben. Ebenso wenig fehlten kämpferische Auseinandersetzungen zwischen Menschen. Diese Formen der Gewalteinwirkungen auf das menschliche Skelett als Stützorgan des Körpers haben nicht selten zu Knochenverletzungen und Frakturen geführt (Kunter 1981).

Durch die zwar unselektive, aber in hoher Zahl erfolgte Umlagerung der Gebeine aus dem Friedhof um die Stadtpfarrkirche in den Karner der Allerheiligenkapelle von Rain am Lech ergibt sich die Möglichkeit, einen Großteil der damals beerdigten Menschen von 1400-1800 zu untersuchen. Die hohe Anzahl der Individuen (2547) macht repräsentative Aussagen über das Vorkommen von Frakturen auf Populationsebene möglich. Eine überschlägige Abschätzung der Bevölkerungszahlen für den genannten Zeitraum belegt, dass rund 50% der gesamten Bevölkerung im heutigen Material des Karners enthalten sind. Die fehlende Population ist entweder auf einem anderen Friedhof beigesetzt worden (z.B. bei der St. Rochuskirche) oder ist auf Grund unzureichender Erhaltung nicht im Fundmaterial des Karners enthalten.

Der gesamte prozentuale Anteil der traumatisierten Schädel aus Rain am Lech beträgt 7,4% der untersuchten Population. Damit wäre jeder 14. Bürger (juvenil und älter) von einem Schädeltrauma im Laufe seines Lebens betroffen gewesen. Schließt man die fraglichen Frakturen von der Untersuchung aus, da ein hoher Artefaktanteil u.a. aufgrund unfachmännischer Umlagerung der Skelette möglich ist, so hätte immer noch jeder 19. Bürger ein Schädeltrauma erlitten. Als Ursache hierfür sind keine zufälligen Stürze anzunehmen. Viel wahrscheinlicher scheinen kriegerische Auseinandersetzungen die Quelle der Verletzungen zu sein, wobei bei der Untersuchung nur Verletzungen mit Knochenreaktionen nachweisbar sind und andere, wie Weichteilverletzungen oder knöcherne Verletzungen mit direkter Todesfolge, die sicherlich auch in erheblicher Zahl vorhanden gewesen sein dürften, nicht mehr belegbar sind. Von erheblicher Bedeutung bei dieser Interpretation ist dabei die sogenannte „Hutkrempe-Regel“, die besagt, dass Verletzungen des Schädels in der Ebene der Hutkrempe oder darunter eher unfall-/sturzbedingt seien. Verletzungen des Schädels an anderer Stelle jedoch für eine Einwirkung von dritter Hand sprächen.

Historische Daten (Dorn 1985) belegen die widrigen Schicksale der Stadt Rain am Lech zu Lebzeiten der gefundenen Gebeine. So war die Stadt in den Wittelsbacher Krieg, den Landhuter Erfolgskrieg, mehrmals in den 30-jährigen Krieg, den Spanischen Krieg und den Österreichischen Erbfolgekrieg involviert.

1632 bedrohte Gustav Adolf von Schweden im 30-jährigen Krieg das Kurfürstentum Bayern „(...) und drang stürmend auf die baierischen Avantgarden ein. Tilly selbst, und unter ihm General Altinger befehligten diese Garden, und stürzten sich heldenmüthig mit denselben dem andringenden Feinde entgegen. Allein Graf Tilly ward am rechten Schenkel, und Altinger am Kopfe verwundet, und beide mußten aus dem Schlachtfelde getragen werden.“ (Weber 1819)

Der Kopf ist ein beliebtes Ziel gewalttätiger Übergriffe. Schädelverletzungen sind unter anderem das Ergebnis eines „Mann-gegen-Mann-Kampfs“, wobei sich die Krieger direkt gegenüberstehen.

Da es schon immer die Männer waren, die ein Volk kämpferisch verteidigten, waren sie im Gegensatz zu den Frauen generell einem größeren Verletzungsrisiko ausgesetzt. Roberts und Manchester (1997) gehen davon aus, dass vor allem Schädelverletzungen um ein Vielfaches häufiger bei Männern auftreten als bei Frauen.

Im vorliegenden Material beläuft sich das Verhältnis von Männern zu Frauen mit Schädelverletzungen auf 78,2 zu 22,8 und zeigt damit ebenfalls einen deutlichen Männerüberschuss. Vergleicht man jedoch diese Daten mit einer Studie von Grimm (1974), die die geschlechtsspezifische Aufteilung von knöchernen Verletzungen vom Paleolithikum bis zum späten Mittelalter beschreibt, so fällt auf, dass der Frauenanteil von 22,8% eher mit den neolithischen als mit den spät-mittelalterlichen Werten zu vergleichen ist. Für das Späte Mittelalter gibt Grimm aufgrund der ausgeprägten geschlechtsspezifischen Arbeitsteilung einen Frauenanteil von nur 10% an. Somit war der Anteil der betroffenen Frauen aus Rain am Lech doppelt so hoch wie zu erwarten gewesen wäre.

Es ist auffällig, dass Frauen von Rain am Lech derart häufig Schädelverletzungen erlitten haben. Ein Grund könnte sein, dass das weibliche Geschlecht in die kriegerischen Handlungen miteinbezogen oder zumindest Opfer bei Übergriffen wurde. Selbstverständlich kann häusliche Gewalt als eine weitere Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Schließt man nun die verschiedenen Altersklassen in die Diskussion mit ein, gilt zu berücksichtigen, dass eine Schädelfraktur nicht direkt den Tod des Individuums nach sich gezogen hat, da nur die sicheren Schädelfrakturen mit vitalen Reaktionen in die vorliegenden Ergebnisse einfließen. D.h. ein Individuum, das mit 31-40 Jahren gestorben ist, erhielt die Fraktur irgendwann im Laufe seines Lebens und nicht zwangsläufig zwischen 31 und 40 Jahren. Somit hatte man mit zunehmendem Alter eine längere Exposition gegenüber Verletzungsgefahren (Grimm 1973).

Dies zeigt auch die Frakturrate der Männer aus Rain am Lech die von 3,1% (juvenil) auf 12,2% (41-50 Jahre) ansteigt und auch in den Altersstufen darüber vergleichsweise hohe Werte (7%) aufweist.

Die Frakturraten steigen nicht kontinuierlich bis zu den Individuen älter als 60 Jahre an, denn bei älteren Individuen ist es wahrscheinlicher, dass sie an einem natürlichen Tod versterben, als noch aktiv in einen Krieg mit Verletzungsfolge verwickelt zu werden.

Bei den Frauen aus Rain am Lech steigt der Anteil der Frakturen ebenfalls mit dem Alter an, von 2,1% (21 Jahre) auf 5% (50 Jahre), allerdings in geringerem Maße als bei den Männern. Dies entspricht den Erwartungen, wenn man davon ausgeht, dass Frauen normalerweise nicht aktiv in kriegerische Auseinandersetzungen einbezogen werden und damit den Verletzungsgefahren nur indirekt ausgesetzt sind. In der Altersklasse über 51 Jahre gibt es nur einen Fall einer verletzten Frau. Die hohe Frakturrate der Juvenilen von 4,3% könnte ein Hinweis auf eine auf diese Altersgruppe gezielte Gewalt sein. Die noch folgende Betrachtung der Verletzungsart versucht, eine genauere Erklärung für diese Beobachtungen zu liefern.

Mit der Idee, dass die Art der Verletzung genauere Rückschlüsse auf die einwirkende Gewalt zulässt, wurden die Schädel auf Hiebverletzungen, Impressionsfrakturen und Lochdefekte untersucht.

Die männlichen Schädel zeigen hauptsächlich Hiebverletzungen (53,5%) auf. Da Hiebverletzungen bei Verletzungen mit Klingen von Schwertern, Beilen oder Äxten zustande kommen, bestätigt dies die Vermutung auf kriegerische Auseinandersetzungen. Auch historische Daten belegen den Einsatz dieser Art von Waffen. Weber (1819, S.68f) beschreibt einen Angriff der Bayern gegen die Schweden im 30-jährigen Krieg: „(...) warfen sich stürmend in die Stadt; hieben die erschrockenen Feinde in Stücke; badeten sich in dem Blute der eiskalten Nordmänner, und trieben die fliehenden Reste, welche ihr Schwert nicht erreichen konnte, über die Lechbrücke bis nach Donauwörth.“ Des weiteren erwähnt Weber die Bewohner aus Rain am Lech, „die unter dem Schwerte des Feindes fielen“ (Weber 1819, S.72f). Die untersuchten Männer aus Rain am Lech sind demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit in direkten Kämpfen verletzt worden.

Nach unseren Untersuchungen wurden auch Frauen Opfer scharfer Gewalt (37,5% Hiebverletzungen). Ob sie diese Frakturen jedoch beim Ausüben des Kriegsdiensts erlitten, bleibt mehr als fraglich. Historische Daten geben darüber keinen Aufschluss. Vielmehr ist anzunehmen, dass sie Opfer der zahlreich stattgefundenen Raubzüge wurden, „(...) als etwa tausend Mann mit Fackeln in den Händen, (...) die Stadt überströmten; die Häuser und Scheunen (...) und alle Winkel in ihnen durchsuchten, und sie mit ihrer heißhungrigen Raubgierde ausleerten.“ (Weber 1819, S.87)

Dass den Frauen hierbei weniger mit scharfer Gewalt als mit stumpfen Waffen begegnet wurde, liegt vielleicht in der natürlichen Hemmung der Gewaltanwendung mit typischen Kampfwaffen jener Zeit, so v.a. dem Schwert, dem Beil oder der Axt gegen Frauen. Andererseits zeigt die hohe Impressionsfrakturenrate von 54,2%, dass der eigentliche Grund dieser Raub- und Verwüstungszüge nicht das Töten, sondern das Ausbeuten der Häuser war. „Da war nicht ein Haus in Rain, und nicht eine einzige Hütte, welche (...) nicht geweckt, gequält, bestohlen, oder wohl gar ausgeplündert wurde.“ (Weber 1819, S. 90). Hierbei trafen vermutlich die feindlichen Plünderer auf einheimische Frauen, die ihnen im Wege standen und mittels ungeplanter, ungerichteter Gewalt mit meist stumpfen Waffen bekämpft wurden.

Die hohe Verletzungsrate bei den weiblichen Juvenilen (1,4% Hiebverletzungen und 2,9% Impressionsfrakturen), gerade im Vergleich zu den 0% betroffenen männlichen Jugendlichen könnte ein Hinweis darauf sein, dass weibliche Juvenile Opfer gezielter Übergriffe waren.

Ein Grund dafür, dass nur ein weibliches Individuum über 51 Jahren eine Fraktur aufweist, könnte dafür sprechen, dass diese Altersgruppe in deutlich geringerem Maße in die Misshandlungen einbezogen waren. Denkbar ist auch, dass Frauen dieser Altersklasse häufiger unmittelbar an einer Verletzung gestorben sind und damit nicht für diese Statistik erfasst wurden.

Lochdefekte, die dritte der untersuchten Frakturarten, entstehen, wenn ein relativ kleinflächiger Gegenstand auf die Knochenoberfläche einwirkt. Typische, diesen Defekt verursachende Waffen sind Lanzen, Speere, Pfeile, Kugeln und Kiesel einer Steinschleuder. Von Weber (1819) werden Gewehre (z.B. „heftige Kugelregen aus Feuerngewehren“ (S.67)) erwähnt, mit denen die Population aus Rain am Lech konfrontiert wurde.

Trotzdem spielen die Lochdefekte eine untergeordnete Rolle (Männer: 8,1%; Frauen: 8,3%). Ein Grund hierfür könnte sein, dass klassische Lochverletzungen nur oberhalb einer Mindestgeschwindigkeit des einwirkenden Gegenstandes entstehen. Diese Geschwindigkeit wurde von frühneuzeitlichen und historischen Handfeuerwaffen meist nicht erreicht, so dass stattdessen eher unspezifische Trümmerbrüche nachweisbar sind (Herrmann et al. 1990).

Lediglich die Altersklasse „älter als 60 Jahre“ der weiblichen Individuen erreichte mit 4,3% einen verhältnismäßig hohen Wert an Lochdefekten. Jedoch lässt dieser Wert aufgrund einer schmalen Materialbasis mit nur einem betroffenen Individuum keine Rückschlüsse auf die gesamte Population zu.

V.3 Frakturhäufigkeiten und –ursachen des postkraniellen Skelettes

Verletzungen haben an der untersuchten Population aus Rain am Lech am Postcranium weniger Spuren hinterlassen als an den Schädeln. Dies gilt insbesondere für Verletzungen mit kriegerischem Hintergrund. Von den 53 traumatisch veränderten Langknochen weisen lediglich sechs eine typische Hiebverletzung auf. Von den restlichen 47 Frakturen können nur über Femura, Tibiae und Humeri relative Aussagen getroffen werden, da von diesen eine repräsentative Gesamtzahl vorhanden ist. Von anderen Knochen des postkraniellen Skelettes konnten nur wenige Fundstücke geborgen werden. Als Ursache könnte man sich eine schnellere Dekomposition oder Zerstörung bei unsachgemäßer Skelettbergung vorstellen, da Ulnae, Radii, Fibulae und Costae dünner und damit fragiler sind. Frakturen der Femura, Tibiae und Humeri waren mit je ca. 0,3% relativ gleich verteilt. Nur der rechte Humerus ist mit 0,07% unterrepräsentiert. Die untere Extremität ist mit 57,4% mehr von Frakturen betroffen als die obere.

„In frühgeschichtlichen und mittelalterlichen Friedhöfen Europas findet man besonders häufig Brüche der unteren Extremitäten (...)“ berichtet Kunter (1981, S. 232). Dabei soll bei Frakturen der Tibia und/oder der Fibula ein Sturz mit Verdrehen des Fußes die Ursache sein. Die diaphysäre Tibia- und/oder Fibulafraktur kann auch ein direktes Trauma, wie bei einem Schlag mit einem stumpfen Gegenstand als Ursache haben (Berchtold 2001).

Živanović (1982) berichtet von nicht seltenem Vorkommen von Humerusfrakturen in mittelalterlichen Militärfriedhöfen. Genaue Daten werden nicht angegeben, aber auch wenn es sich in Rain am Lech nicht um einen Militärfriedhof handelt, kann von „häufig“ oder „nicht selten“ bei einer Frakturrate von 0,3%, bzw. 0,07% nicht die Rede sein. Damit liegen die geringen postkraniellen Frakturaten sowohl der unteren als auch der oberen Extremitäten der Population aus Rain am Lech unter den Erwartungen.

Bei Untersuchung der Frakturarten der oberen Extremität wurden Parier- und Colles-Frakturen unterschieden. Die fünf diaphysär mittig gelegenen Ulnafrakturen (zwei rechts, zwei links, ein Knochen keiner Seite zuordenbar) können Parierfrakturen sein.

Diese Frakturart entsteht, wenn man den Unterarm schützend vor äußerer Gewalteinwirkung (z.B. durch Stockschläge) über das Gesicht oder über den Kopf hält. Sie können demnach Hinweis auf gewalttätige Konfrontationen sein und sollten zur Stützung dieser These eher bei männlichen Individuen als bei weiblichen nachzuweisen sein.

In dem vorliegenden Material tritt diese Frakturart rechts genauso häufig auf wie links. Wären die Frakturen ausschließlich Folge eines Kampfs, so würde man eine Häufung der Fälle links erwarten, denn die häufigeren Rechtshänder hielten die Kampfwanne in der rechten Hand und verteidigte sich im Falle eines direkten Angriffes mit links.

Da kriegerische Handlungen literarisch (Weber 1819) dokumentiert sind und nach der Untersuchung der Schädel in dieser Arbeit auch nicht von der Hand zu weisen sind, verwundert es, dass derart wenig „Aggressionsfrakturen“ an den oberen Extremitäten auftreten.

Eindeutigen Hinweis auf aggressive Handlungen geben beim postkranialen Skelett nur die Hiebverletzungen. Dass die unteren Extremitäten häufiger betroffen sind als die oberen spricht für Kämpfe zwischen berittenem Mann und einem unberittenen Feind, denn nur dann bieten hauptsächlich die Beine eine Angriffsfläche und werden in Mitleidenschaft gezogen (Janssens 1970).

Eine typische Folgeerscheinung des Vornüberfallens auf die ausgestreckte Hand, ist die Colles-Fraktur. Bei ihr ist der Radius ca. zwei bis drei Zentimeter oberhalb des Handwurzelgelenkes gebrochen. Fünf der sieben untersuchten Radii weisen diese Art der Fraktur auf, wobei ohne signifikanten Unterschied mehr rechte als linke betroffen sind. Ein direkter Hinweis auf kriegerische Handlungen ist hierbei nicht zu erkennen.

So geben lediglich sechs Hieb- und eventuell fünf Parierfrakturen Hinweise auf die Kriege in Rain am Lech. Verglichen mit den „Aggressionsfrakturen“ des Schädels ist das eine verschwindend geringe Zahl. Natürlich ist der Schädel zum Zwecke des Tötens ein beliebteres Ziel als die Extremitäten, aber die wenigen Verletzungen des postkranialen Skelettes lassen rückschließen, dass die Soldaten ihren Körper in

diesen Kriegen vermutlich gut durch Rüstung, Kettenhemden oder ähnliches zu schützen wussten.

So interessant diese Perspektiven auch sind, sei aufgrund der schmalen Materialbasis vor allem der fragilen Skelettelemente des postkraniellen Skeletts noch größte Vorsicht bei Aussagen geboten, die die ganze Bevölkerung betreffen.

V.4 Komplizierende Umstände beim Nachweis von ancient DNA

Mit der Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al. 1985, Mullis and Faloona 1987) wurde die Vervielfältigung von definierten Bereichen des menschlichen Genoms möglich und gestattete den Nachweis selbst einzelner DNA-Moleküle (Saiki et al. 1988). Dadurch können DNA-Untersuchungen auch im Spuren- und Mikrospurenbereich durchgeführt werden (Ruano et al. 1989, Jeffreys et al. 1988).

Durch die Entdeckung teilweise erhaltener Nucleinsäuren in alten biologischen Überresten (Higuchi et al. 1984, Pääbo 1984) konnte man schließlich auch paläopathologische Funde mit Hilfe der PCR analysieren.

Bei der Analyse prähistorischen Materials ist mit schlechtem Erhaltungszustand von DNA zu rechnen. Daher ist die Möglichkeit des Nachweises selbst einzelner DNA-Moleküle bei molekulargenetischer Untersuchung von fragmentiertem Material und Material im Spurenbereich basale Voraussetzung. Des Weiteren kann aufgrund der enzymatisch gesteuerten Vervielfältigung von Quellenmaterial, das für die Analyse benötigte Material drastisch reduziert werden. Selbst fragmentierte Skelettelemente, an denen Untersuchungen nach morphologischen Kriterien nicht mehr möglich sind, werden durch die PCR-gestützte Analyse von ancient DNA analysierbar. Durch die Sensibilität der PCR können prähistorische Materialien untersucht werden, aus denen lediglich geringe Mengen bereits zum Teil degradiertes DNA extrahierbar sind (Reynolds und Sensabaugh 1991).

Dabei spielt die Degradierung der zu untersuchenden DNA, die zwangsläufig bei (prä)historischem Material in Folge von Dekompositionseignissen auftritt (Hofreiter et al. 2001), mit abnehmender Größe der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte eine immer geringere Rolle.

Da erfahrungsgemäß in aDNA-Extrakten keine intakten DNA-Zielsequenzen von mehr als 200-300 Basenpaaren Länge zu erwarten sind (Hummel 2003), wurden nur solche Primerpaare verwendet, die eine Zielsequenz von nicht mehr als 202 Basenpaaren umspannen.

V.4.1 Lagerungsbedingungen der Skelettelemente aus Rain am Lech

Bei dem Material aus Rain am Lech handelt es sich ausschließlich um Knochen. Das hat den Vorteil, dass es langfristig überdauerndes, hydrophobes und hartes Gewebe und somit widerstandsfähig gegenüber biogener, physikalischer und chemischer Dekomposition ist. Auch die Lagerungsbedingungen der Knochen waren äußerst günstig für die molekulargenetische Untersuchung. Da die Skelettelemente nach Ausgrabung aus einem Friedhof in einen Karner umgelagert wurden, kann man von einer positiven Auswirkung auf die Konservierung der DNA ausgehen. Die Lagerung in dem Karner bedingte einen guten Luftaustausch und damit ein trockenes Klima. Die Temperatur war konstant niedrig und der pH-Wert war im normalen Bereich.

Auch die Wahrscheinlichkeit der Verunreinigung mit Huminsäuren und damit die Inhibition ist durch die Lagerung außerhalb des Erdbodens geringer. Somit waren die äußeren Bedingungen für den Erhalt der ancient DNA gut.

V.4.2 Biogene, chemische und physikalische Dekomposition

DNA-Degradierung ist vermutlich der häufigste Grund für das Versagen der PCR. Die Dekomposition des knöchernen Materials wird prinzipiell in drei verschiedenen Faktoren wirksam: Biogene, chemische und physikalische Faktoren (Herrmann et al. 1990). Als biologische (biogene) Faktoren werden neben dem sofort nach dem Tod des Individuums einsetzenden, autolytischen Abbau von DNA (Bär et al. 1988) auch Mikroorganismen, wie Bakterien oder Pilze, zur postmortalen Dekomposition der Makro- und Mikrostruktur des bodengelagerten Knochens wirksam. Sie invadieren in die Hartgewebe, indem sie physiologischen Hohlräumen folgen oder aktiv in den Knochen eindringen.

Im Verlauf der Liegezeit werden zusätzlich physikalische und chemische Dekompositionsfaktoren wirksam. So tragen liegezeit- und liegemilieubedingte Faktoren wie pH-Wert, Feuchtigkeit und kurzweilige Strahlung zu biochemischen Veränderungen der DNA bei (Eglington und Logan 1991, Lindahl 1993, Burger et al. 1997).

Beim chemischen Abbau kommt es überwiegend zu zwei verschiedenen Arten von DNA-Schädigung und damit zu modifizierten Basen (Höss et al. 1996). Zum einen erfolgt eine hydrolytische Schädigung, welche zu Depurinisierung, Depyrimidierung und Desaminierung führt, zum anderen finden oxidative Veränderungen statt, welche entweder durch die direkte Interaktion von ionisierenden Strahlen mit der DNA oder vermittelt über freie Radikale, die aus Wassermolekülen entstehen, verursacht werden.

Diese veränderten Basen blockieren die Strangverlängerung durch die DNA-Polymerase und machen somit eine enzymatische Amplifikation von DNA-Sequenzen unmöglich. Höss et al. (1996) zeigten in ihrer Arbeit auch, dass die Umgebungstemperatur als physikalischer Faktor eine große Rolle spielt: Proben, die einen geringen Schädigungsgrad aufwiesen und sich gut amplifizieren ließen, stammten aus arktischen und subarktischen Regionen. Im Gegensatz dazu war die DNA der Proben aus Ägypten, Europa, Südafrika und warmen Regionen Amerikas stark beschädigt und brachte keine amplifizierbaren DNA-Sequenzen hervor.

Für die Langzeitkonservierung von DNA scheint daher eine kalte Umgebung von kritischer Wichtigkeit zu sein, da eine Abnahme der Temperatur um 20 °C zu einer 10- bis 25-fachen Verminderung von chemischen Reaktionen führt. Gefrieren reduziert die Verfallsrate noch weiter.

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 und die Halbwertszeit für DNA von 20,8 Jahren berechnet. Die Autoren gehen daher davon aus, dass aDNA-Analysen der menschlichen Überreste altägyptischer Individuen generell nicht sinnvoll sind und jegliche amplifizierte DNA als Kontamination durch neuere DNA gewertet werden muss. Dabei wurden gewisse Umstände jedoch außer Acht gelassen. Es ist zu beachten, dass das Mikroklima in den ägyptischen Grabstätten bis zu 10-20 °C unterhalb der Außentemperatur liegen kann. Außerdem ist das Material je nach Begräbnisort sehr trocken gelagert. Nicht zu vernachlässigen ist bei den ägyptischen Proben der Prozess der Mumifikation, welcher durch eine schnelle Dehydrierung des Körpers sowie Erhöhung des pH-Wertes durch das hierfür verwendete Natron den Dekompositionsprozess der Knochen und Weichteile deutlich inhibiert (Zink und Nerlich 2003).

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 geht konform mit den neueren Daten von Bachmeier et al. (2001), die eine schnelle, postmortale Längenabnahme der DNA-Fragmente auf 500-700 bp innerhalb von ungefähr 30 Jahren nach dem Tod zeigen. Allerdings verdeutlicht diese wie auch andere Studien, dass kleinere Fragmente für eine längere Periode gefunden werden können (z.B. Lassen et al. 1994). Weitere Studien (Nerlich et al. 1997, Zink et al. 2000, Zink et al. 2001, Zink et al. 2002) konnten zweifelsfrei aDNA in Proben aus dem Jahr 3500-2800 BC nachweisen.

Da die Degradierung der DNA alle möglichen Abschnitte des Genoms betreffen kann, erklärt sich, weshalb bei einigen Proben (z.B. Nr. 196, 206, 219, 258, 277, 313, 363, 371) nur eines oder zwei der drei zur Analyse verwendeten Primerpaare zu einem erfolgreichen Amplifikat geführt haben.

V.4.3 Kontamination

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Analyse von ancient DNA erschwert, ist das Problem der Kontamination. Zwei wesentliche Wege führen dazu (Handt et al. 1996): Das Vorhandensein von zeitgenössischer DNA in den Reagenzien, die für die Verarbeitung und Untersuchung des Materials verwendet werden und somit alle Amplifikationen betreffen. Sowie die Kontamination einzelner Extraktionen oder Amplifikationen, welche bei dem Umgang mit dem archäologischen Material vor der Probenentnahme oder durch Aerosole im Labor entstehen.

Pro fünf untersuchte Proben wurden zwei oder drei Kontrollen ohne DNA-Extrakt (Leerkontrollen) amplifiziert, um eine eventuelle Kontaminationsrate zu ermitteln. Von insgesamt 85 mitgeführten Leerkontrollen und 170 Proben zeigten drei eine Kontamination. Hierbei handelte es sich um Amplifikationsergebnisse, die qualitativ einem Ergebnis eines Ansatzes mit target DNA entsprechen. Die Kontaminationsrate, ermittelt über den Anteil der kontaminierten Leerkontrollen an der Gesamtheit der Leerkontrollen, liegt bei 0% für β -Aktin, 0% für SR-Y und 10% für Amelogenin.

In jedem der Fälle war mindestens eine Kontrollprobe frei von PCR-Produkten. Die Kontaminationen in den Leerproben 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 wird, ausgegangen werden kann. Eine eventuell vorhandene Kontamination durch DNA von Personen, die mit den Proben und Probenansätzen im Labor in Berührung gekommen sind, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die PCR-Produkte keinen Rückschluss auf individualspezifische Allelprofile zulassen.

Die Kontaminationsraten der Leerkontrollen lassen sich allerdings nicht direkt auf das Kontaminationsrisiko bei der Amplifizierung von Proben-DNA übertragen, da im Gegensatz zum Leeransatz hier eine 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.

V.4.4 Hemmung

Idealerweise würde sich bei der PCR-gestützten Amplifikation von aDNA bei jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppeln. Aus verschiedenen Gründen kann damit jedoch nicht gerechnet werden. Die Reaktion kann durch wesentliche Anteile von Fremd-DNA (z.B. von Mikroorganismen) oder durch Inhibitoren, wie Huminsäuren, Gerbsäuren oder Fulvinsäuren, welche Abbauprodukte von Pflanzen sind, gestört werden (Hummel et al. 1995) und so zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Von Scholz et al. (1998) wurde außerdem gezeigt, dass Kollagen I, welches vom Knochen selbst stammen kann, 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 farblos. Jedoch zeigte sich bei einigen Proben eine schwache Braunfärbung des Extrakts, 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 Verdachts 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 (Nr. 165, 248, 259, 270, 304, 376 und 1400) scheinen jedoch Inhibitoren eine Rolle gespielt zu haben, da kein einziges spezifisches Produkt und auch keine unspezifischen Amplifikationsprodukte extrahierbar waren.

V.5 Diskussion der Amplifikationsergebnisse

V.5.1 β -Aktin

Wie unter Punkt V.4. ausführlich beschrieben, führen mehrere unterschiedliche Faktoren dazu, dass es eine Variabilität hinsichtlich der Amplifizierbarkeit von ancient DNA gibt. So fördern unter anderem mikrobieller Befall und Feuchtigkeit die DNA-Degradierung und PCR-inhibierende Substanzen, wie Huminsäuren, behindern den Amplifikationserfolg.

Aus diesem Grunde wurden alle Proben zum Nachweis von amplifizierbarer ancient DNA zuerst mittels PCR auf die β -Aktin-Sequenz getestet. Diese DNA-Zielsequenz ist ein 202 Basenpaar langes Segment des menschlichen β -Aktin-Gens. Aktin ist ein häufig vorkommendes und hochkonserviertes Protein, welches in allen eukaryonten Zellen exprimiert wird. Insgesamt sind sechs Isoformen bekannt, die in muskel- und nicht-muskelspezifisch unterteilt werden. Das β -Aktin ist ein ubiquitäres, zytoskelettales Protein, welches in verschiedenen Zell- und Gewebetypen exprimiert wird (Nakajima-Iijima et al. 1985). Im humanen Genom gibt es mindestens 20 verschiedene Gen-Sequenzen für β -Aktin. Analysen zeigen, dass die meisten davon weiterentwickelte Pseudogene sind und auf mindestens vier verschiedenen Chromosomen, einschließlich dem X-Chromosom, verteilt sind (Ng et al. 1985). β -Aktin ist aufgrund 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 zeigen, dass die Skelettelemente aus dem Karner in Rain am Lech außerordentlich gut erhalten sind. Die Proben enthalten nach einer Liegezeit von bis zu 500 Jahren zu einem großen Anteil amplifizierbare humane DNA. Wie den Tabellen 12, 14 und 15 zu entnehmen ist, war in 70% aller untersuchten Fälle β -Aktin nachweisbar. Andere Untersuchungen, beispielsweise altägyptischer Mumien, die artifiziell konserviert werden, legen mit 63,4% ähnliche Ergebnisse vor (Zink et. al 2001).

V.5.2 SR-Y und Amelogenin

Die Ergebnisse aus Abbildung 12 zeigen, dass Amplifikationen der Y-spezifischen 93 bp langen DNA-Sequenz aus dem Knochenmaterial der Population aus Rain am Lech mit diesem Primerpaar grundsätzlich durchführbar waren. Mit der Agarosegel-Elektrophorese zeigt sich bei männlichen Individuen ein 93 bp langes PCR-Produkt. Bei weiblichen Individuen lässt sich kein Fragment im Gel erkennen. Auch in der Leerprobe ist kein PCR-Produkt feststellbar.

Daraus folgt, dass das Nichtvorhandensein von Amplifikationsprodukten in den Proben sowohl auf das Fehlen der entsprechenden Y-chromosomalen Sequenzen (bei weiblichen Individuen) als auch auf das Fehlen amplifizierbarer DNA in ausreichenden Fragmentlängen zurückgeführt werden kann. Somit müssen die Fälle, die kein PCR-Signal aufweisen, mit einem weiteren Primerpaar untersucht werden. Aus diesem Grund wurde die Geschlechtsdetermination der Individuen aus Rain am Lech nicht allein auf der Grundlage der Amplifikationsergebnisse mit dem Primerpaar SR-Y durchgeführt, sondern ein weiterer geschlechtsspezifischer Genort (Amelogenin) untersucht.

Die Abbildung 23 (High-Resolution-Gel) zeigt exemplarisch die elektrophoretische Auftrennung von Amplifikationsergebnissen der längenpolymorphen Amelogenin-Sequenz historischer Proben. Je nach Geschlecht des untersuchten Individuums können unterschiedliche Produkte im Gel detektiert werden: Bei weiblichen Individuen, die zwei X-Chromosome aufweisen, erscheint homozygot eine 106 bp lange Bande im Gel (vgl. Spalte 5 und 9, Abb. 23). Bei männlichen Individuen, die ein X- und ein Y-Chromosom aufweisen, lässt sich hemizygot ein 106 bp langes und ein 112 bp langes Fragment im Gel nachweisen (vgl. Spalte 4, 8, 10 und 11, Abb. 23).

Somit bietet die Amplifikation von X- und Y-spezifischen Allelen im Gegensatz zu Amplifikationen mit dem Primerpaar SR-Y den Vorteil einer internen Positiv-Kontrolle (Akane et al. 1991), da sowohl für weibliche als auch für männliche Individuen ein positiver Nachweis möglich ist.

In Abbildung 23 ist ein Phänomen dargestellt, welches häufig bei der Amplifikation von single copy Genen auftritt. Hierbei handelt es sich um den Ausfall eines Allels. So wurde bei den Proben der Spalten 2, 3 und 7 nur die obere 112 bp lange Bande amplifiziert. Die Gründe für Amplifikationsausfälle eines Allels können die nur sehr geringe Anzahl von aDNA-Zielsequenzen oder die starke Degradierung der aDNA sein (Rogan und Salvo 1990, Lindahl 1993). Jedoch ist eine eindeutige Geschlechtsbestimmung (männlich) möglich, wenn nur das 112 bp lange Allel amplifiziert wird.

Obwohl der Ausfall des kürzeren Allels grundsätzlich weniger wahrscheinlich ist (Burger et al. 1997), muss dieser Fall dennoch in die Betrachtungen einbezogen werden.

Wird nur das 106 bp lange Allel amplifiziert und somit ein weibliches Individuum angenommen, muss der Ausfall des 112 bp langen Fragments einberechnet werden, sonst würde ein männliches Individuum als weiblich determiniert werden.

Eine Publikation (Santos et al. 1998) zeigt, dass eine Deletion auf dem Y-Chromosom zu dem Fehlen der 112 bp langen Bande führen kann. Auch nach Wiederholung der Amplifikationsreaktion bestünde keine Möglichkeit, dieses falsche Ergebnis zu korrigieren, da die Ursache nicht degradierte DNA oder eine zu geringe Konzentration an aDNA-Zielsequenzen ist. Allerdings wird die Frequenz dieser Deletion in der rezenten Weltbevölkerung mit 0,6% angegeben und wurde bisher lediglich bei Individuen aus Sri Lanka detektiert, wo sie mit einer Häufigkeit von 8% auftrat.

Bei der Amplifikation der geschlechtsbestimmenden Primerpaare Amelogenin und SR-Y traten, wie auch bei anderen Primerpaaren möglich, sogenannte Primer-Polymer-Bildungen durch Primer-Reaktionen auf.

Hierbei handelt es sich nicht um die Amplifikation der X- oder Y-Chromosom-spezifischen Sequenzen, sondern um PCR-Produkte, die durch eine unspezifische Zusammenlagerung von Primern gebildet werden. Diese kann man exemplarisch in den Leerkontrollen der Abbildung 22 (Spalten 7-9) sehen.

Anhand der Abbildungen 21, 22 und 23 wird deutlich, dass in den Extrakten DNA unterschiedlichen Degradierungsgrades vorhanden ist. Neben deutlich detektierbaren Gehalten an stark fragmentierter, überwiegend niedermolekularer DNA weisen die Knochenextrakte auch hochmolekulare Anteile auf.

Da die Anwesenheit von Mikroorganismen in bodengelagerten (alten) Knochen positiv mit Anteilen hochmolekularer DNA im Gelbild korreliert (Hagelberg et al. 1991), kann davon ausgegangen werden, dass auch bei den Extrakten der Knochenproben aus Rain am Lech Anteile hochmolekularer DNA in der Regel von Mikroorganismen stammen.

V.5.3 Molekulargenetische Ergebnisse in Bezug auf postkraniale Traumata bei Männern und Frauen

Die molekularbiologische Geschlechtsbestimmung 20 frakturierter Langknochen mittels Amplifikation von β -Aktin, SR-Y und Amelogenin war in 50% der Fälle erfolgreich. Von zehn Proben, bei denen das Geschlecht detektierbar war, ist eine Probe einem weiblichen Individuum und neun Proben männlichen Individuen zuzuordnen (Tabelle 13). Mit 90% überwiegt somit, wie auch schon bei der Analyse der Schädeltraumata gezeigt werden konnte, das männliche Geschlecht deutlich.

Dabei fällt auf, dass die molekularbiologische Untersuchung vorwiegend bei den größeren Langknochen, wie Femura (in 62,5% der Fälle) und Tibiae (50%) zu einem positiven Ergebnis geführt haben. Dies ist durch die in V.4.2. diskutierte biogene, chemische und physikalische Dekomposition vor allem der dünneren und damit fragileren Knochen, wie Ulnae, Radii, Fibulae und Costae erklärbar.

In der Kontrollgruppe mit zehn nicht-frakturierten Knochen konnte bei 60% eindeutig eine Zuordnung zu einem Geschlecht erfolgen. Alle postkranialen Skelettelemente waren von männlichen Individuen. Bei sehr ähnlichen Ergebnissen in der untersuchten Gruppe und der Kontrollgruppe, kann man davon ausgehen, dass Frakturen im Allgemeinen die Aussagekraft der molekularbiologischen Geschlechtsbestimmung nicht negativ beeinflussen.

Die klassische Parietfraktur, die entsteht, wenn man den Unterarm schützend vor äußerer Gewalteinwirkung (z.B. durch Stockschläge) über das Gesicht oder über den Kopf hält, ist ein Hinweis auf gewalttätige Übergriffe. Da bei Betrachtung der Schädelverletzungen vor allem männliche Individuen „Aggressionstraumata“ aufwiesen, würde man nun erwarten, dass die Parietfrakturen ebenfalls überwiegend männlichen Individuen zuzuordnen sind. In vorliegender Arbeit konnte diese These nicht gestützt werden, da bei keiner molekularbiologischen Analyse der Ulnae eine Geschlechtsdiagnose gestellt werden konnte.

Eine Fraktur, die ebenso Rückschlüsse auf ihre Ursache zulässt, ist die Colles-Fraktur. Der Radius ist hierbei ca. zwei bis drei Zentimeter oberhalb des Handwurzelgelenkes gebrochen. Sie entsteht bei dem Vornüberfallen auf die gestreckte Hand. Diese Art der Fraktur konnte bei fünf Individuen festgestellt werden. Eine molekulare Geschlechtsdiagnose gelang bei einem linken Radius mit einer Colles-Fraktur. Dieser konnte einem männlichen Individuum zugeordnet werden.

Ein weiterer Langknochen, ein linker Humerus mit einer alten proximalen Fraktur, konnte als einem Mann zugehörig analysiert werden. Diese Art der Fraktur tritt häufig bei älteren Menschen auf, welche entweder indirekt beim Sturz auf die ausgestreckte Hand oder den Ellenbogen bzw. direkt beim Sturz auf das Schultergelenk fallen.

Diaphysäre Tibiafrakturen können als Ursache sowohl indirekt einwirkende Kräfte, wie bei einem Sturz mit Verdrehen des Fußes, als auch das direkte Trauma haben. In vorliegendem Skelettmaterial war eine diaphysäre, linke Tibiafraktur einem männlichen Individuum zuzuordnen. Ob diese Fraktur nun Folge direkter Gewalt war, kann nicht mehr nachvollzogen werden.

Der einzige frakturierte Langknochen, der in der Untersuchung einem weiblichen Individuum gehörte, wies eine distale, linke Tibiafraktur auf, wie sie bei einer axialen Stauchung entsteht. Bei einem weiteren männlichen Individuum konnte diese Art von Fraktur ebenfalls nachgewiesen werden.

Am erfolgreichsten war die molekularbiologische Geschlechtsuntersuchung bei den Femura. Drei diaphysär rechte, eine distal linke und eine rechte Schenkelhalsfraktur konnten Männern zugeteilt werden. Wie auch bei den Tibiafrakturen lässt sich bei den Femurfrakturen der genaue Unfallmechanismus nicht rekonstruieren.

Aufgrund der schmalen Materialbasis vor allem der fragilen Skelettelemente des postkraniellen Skeletts können lediglich bei einzelnen Individuen mit molekularer Geschlechtsdiagnose Aussagen über deren Traumata getroffen werden. Eine allgemeingültige Darstellung auf Populationsebene über die Verteilung der frakturierten Langknochen und deren Geschlechtszuteilung der Skelettreihe aus Rain am Lech kann jedoch nicht angeboten werden.

VI. Zusammenfassung

Die Paläopathologie hat zum Ziel, Krankheits- und Lebensumstände früherer Bevölkerungen zu rekonstruieren und Informationen über das Auftreten, Ausbreitung und Entwicklung von Krankheiten in historischen Zeiten bis in die heutige Zeit hinein zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden Frakturhäufigkeiten an einer Skelettserie des 15.-18. Jahrhunderts von Rain am Lech in Süddeutschland untersucht. Dabei wurden verschiedene Gewalteinwirkungen auf Schädel und Langknochen erfasst und in Hinblick auf die zahlreichen, kriegerischen Auseinandersetzungen der damaligen Zeit diskutiert. Die morphologischen Alters- und Geschlechtsbestimmung der Schädel ermöglichte dabei eine differenziertere Analyse der Häufigkeiten innerhalb der einzelnen Alters- und Geschlechtsgruppen. Des Weiteren wurde durch Extraktion und Amplifikation von ancient DNA (aDNA) eine molekulare Geschlechtsbestimmung bei einigen frakturierten Langknochen durchgeführt, um auch hier geschlechtsrelevante Aussagen machen zu können. Zusätzlich wurden einzelne Kinderschädel molekular untersucht, da morphologische Methoden hier kaum verlässliche Aussagen liefern. Durch die vergleichende molekulare Analyse morphologisch sicher geschlechtsdeterminierter Schädel von erwachsenen Individuen sollte überprüft werden, inwieweit aDNA-Untersuchungen geeignet sind, zuverlässige Aussagen über die Geschlechtsbestimmung zu liefern.

Im Gebeinhaus von Rain am Lech konnten Skelettelemente von mindestens 2547 Individuen erfasst werden, die in etwa die Hälfte aller geschätzten Todesfälle von 1400 - 1800 repräsentieren. 152 von 2049 (7,4%) der erwachsenen Schädel waren traumatisch verändert und wiesen Hieb-, Impressions- und Lochdefekte auf. Die meisten Schädelfrakturen, insbesondere Hiebfrakturen, waren bei Männern der Altersklasse 31-40 Jahre nachzuweisen. Dies ist sicher im Zusammenhang zu sehen mit den zahlreichen kriegerischen Auseinandersetzungen, in die Rain am Lech während dieses Zeitraums verwickelt war. Besonders bemerkenswert aber ist, dass 22,8% der Schädelfrakturen bei weiblichen Individuen, darunter auch Jugendliche, nachgewiesen werden konnten. Eine bislang noch nie beschriebene Häufigkeit. Der Nachweis von überwiegend Impressionsfrakturen spricht allerdings dagegen, dass die Rainer Frauen aktiv ins Kampfgeschehen eingegriffen haben, eher dafür, dass sie Opfer von Raubzügen und Plünderungen wurden.

Frakturen des postkraniellen Skeletts wurden vergleichsweise selten diagnostiziert. Von den 53 traumatisch veränderten Langknochen geben lediglich sechs Hieb- und eventuell fünf Parietfrakturen Hinweise auf kriegerische Auseinandersetzungen.

Für den molekularbiologischen Teil dieser Arbeit wurde bei 20 frakturierten, zehn nicht frakturierten, drei Kinderschädeln und sieben morphologisch geschlechtsdeterminierten Schädeln aDNA untersucht. Zuerst wurde der Extraktionserfolg durch die Amplifikation des humanen β -Aktin-Gens untersucht. Das multi-copy-Gen konnte dabei in 70% der Proben erfolgreich nachgewiesen werden.

Die molekulare Geschlechtsbestimmung wurde anschließend durch Amplifikation des Amelogenin- und SR-Y-Gens durchgeführt. Das SR-Y-Gen liegt auf dem Y-Chromosom und kann somit lediglich bei männlichen Individuen amplifiziert werden. Das Amelogenin-Gen hingegen führt zu zwei unterschiedlich großen Amplifikaten auf den beiden Geschlechtschromosomen. Durch Auftrennung der verschiedenen Amplifikate in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese lassen sich diese Unterschiede erfassen.

Auf diese Weise konnte bei 50% der frakturierten Knochen das Geschlecht molekular bestimmt werden und es zeigte sich, wie auch bei den Schädel, ein Überwiegen des männlichen Geschlechts. Dabei kann jedoch bei zu schmaler Materialbasis keine allgemeingültige Aussage in Bezug auf das Geschlecht und die Verteilung postkranialer Frakturen, sowie deren Ursachen bei der Skelettserie aus Rain am Lech getroffen werden. Die parallele Untersuchung nicht-frakturierter postkranialer Skelettelemente führte in 60% der Fälle zu einem positiven Ergebnis.

Die molekularbiologische Analyse der morphologisch geschlechtsdeterminierten Schädel zeigte, dass die Methode in 66,7% der Fälle erfolgreich war und in 100% der Fälle mit der morphognostischen Methode übereinstimmte. Bei allen untersuchten Kinderschädeln ließ sich das Geschlecht molekular bestimmen.

Die hohe Zuverlässigkeit der molekularen Geschlechtsbestimmung und die gezeigte Anwendbarkeit auf Kinderskelette eröffnet für zukünftige paläopathologische Studien die Möglichkeit, gerade auch Krankheitshäufigkeiten von Kindern und einzelne Knochenfunde einer differenzierten geschlechtsbezogenen Analyse zu unterziehen.

VII. Literatur

AKANE, A., SHINO, H., MATSUBARA, K., NAKHORI, Y., SEKI, S., NAGAFUCHI, S., YAMADA, M., NAKAGOME, Y. (1991): Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic. Sci. Int.* 49: 81-88

ASCÁDI, G., NEMESKÉRI, J. (1970): History of human life span and mortality. Akademiai Kiado, Budapest.

BACHMEIER, B., KAISER, C., NEHRLICH, 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.* 38 (5): 1176-1182

BAILEY, D.M.D., AFFARA, N.A., FERGUSON-SMITH, M.A. (1992): The X-Y homologous gene Amelogenin maps to the short arms of both the X and Y chromosomes and is highly conserved in Primates. *Genomics* 14: 203-205

BERCHTOLD, R. (2001): Chirurgie. Urban & Fischer, München, Jena.

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. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503

BROTHWELL, D.R. (1981): Digging up bones. London: British Museum (Natural History)

BULL, H.-G., GANZER, U., GRÜNTZIG, J., SCHIRMER, M. (1987): Der Schädelbruch. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.

BUONCRISTIANI, M., VON BEROLDINGEN, C. SENSABAUGH, G.F. (1990): Effects of UV damage on DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: Polesky, H.F., Mayr, W.R. (eds.): Advances in Haemogenetics 3. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 151-153

BURGER, J., HUMMEL, S., HERRMANN, B. (1997): Nachweis von DNA-Einzelkopiesequenzen aus prähistorischen Zähnen. Liegemilieu als Faktor für den Erhalt von DNA. Anthropol. Anz. 55: 193-198

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

CORACH, D., SALA, A., PENACINO, G., IANNUCCI, N., BERNARDI, P., DORETTI, M., FONDEBRIDER, L., GINARTE, A., INCHAURREGUI, A., SOMIGLIANA, C., TURNER, S., HAGELBERG, E. (1997): Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: The search for "missing" persons killed during the last dictatorship in Argentina. Electrophoresis 18: 1608-1612

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. (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

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. J. Forensic Sci. 42: 1032-1038

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

FORSTER, R., EBERSPACHER, B. (1999): Evidence of DNA from epithelial cells of the hand of the suspect found on the tool of the crime. *Arch Kriminol* 203: 45-53

GHOSSEIN, R.A., ROSS, D.G., SALOMON, R.N., RABSON, A.R. (1994): A search for mycobacterial DNA in sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 101: 733-737

GINTHER, C., ISSEL-TARVER, L., KING, M.C. (1992): Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet* 2: 135-138

GOODWIN, W., LINACRE, A., VANZIS, P. (1999): The use of mitochondrial DNA and short tandem repeat typing in the identification of air crash victims. *Electrophoresis* 20: 1707-1711

GRIMM, H. (1973): Neue Ergebnisse über Geschlechtsunterschiede in der Häufigkeit von Knochenverletzungen in urgeschichtlichem und historischem Geschlechtmaterial. *Biom. Z.* Bd.15, Heft 6: 431-438

GRIMM, H. (1974): Verletzungsspuren an männlichen und weiblichen Menschenresten und ihre Beziehung zum gegenwärtigen Sexualdimorphismus des Skeletts. *Anthropologiai Közlemények* 18: 65-68

HAAS, C., ZINK, A., MOLNÁR, E., SZEIMIES, U., REISCHL, U., MARCSIK, A., ARDAGNA, Y., DUTOUR, O., PÁLFI, G., NERLICH, A. (2000): Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. *Am. J. Phys. Anthropol.* 113: 293-304

HAGELBERG, E., SYKES, B., HEDGES, R. (1989): Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342: 485-485

HAGELBERG, E., GRAY, I.C., JEFFREYS, A.J. (1991): Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427-429

HANDT, O., KRINGS, M., WARD, R.H., PÄÄBO, S. (1996): The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 368-376

HERRMANN, B., HUMMEL, S. (1994): Introduction. In: Herrmann, B., Hummel, S. (eds.): *Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens.* Springer-Verlag, New York: 1-12

HERRMANN, B., GRUPE, G., HUMMEL, S., PIEPENBRINK, H., SCHUTKOWSKI, H. (1990): *Prähistorische Anthropologie, Leitfaden der Feld- und Labormethoden.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

HIGUCHI, R., BOWMAN, B., FREIBERGER, M., RYDER, O.A. und WILSON, A.C. (1984): DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284

HÖSS, M., JARUGA, P., ZASTAWNY, T., DIZDAOGLU, M., PÄÄBO, S. (1996): DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 24 (7): 1304-1307

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

HOYME, L.E., İŞCAN, M.Y. (1989): Determination of sex and race: Accuracy and assumptions. In: İşcan, M.Y., Kennedy, K. (eds.): *Reconstruction of life from the skeleton.* Alan R. Liss, Inc., New York: 53-93

HUMMEL, S. (2003): *Ancient DNA Typing. Methods, Strategies and Applications.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

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

JANSSENS, P.A. (1970): *Paleopathology*. London

JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. (1985): Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature* 316: 76-79

JEFFREYS, A.J., WILSON, V., NEUMANN, R., KEYTE, J. (1988): Amplification of human minisatellites by polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 10953-10971

JOHNSON, P.H., OLSON, C.B., GOODMAN, M. (1985): Isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from tissue of the woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*. *Comp. Biochem. Physiol.* 81: 1045-1051

KITCHIN, P.A., SZOTYORI, Z., FROMHOLC, C., ALMOND, N. (1990): Avoidance of false positives. *Nature* 344: 201

KUNTER, M. (1981): Frakturen und Verletzungen der vor- und frühgeschichtlichen Menschen. *Archäologie und Naturwissenschaften* 2: 221-246

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

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

LEDERER, T., BETZ, P., SEIDL, S. (2001): DNA analysis of fingernail debris using different multiplex systems: a case report. *Int J Legal Med* 114: 263-266

LINDAHL, T. (1993): Instability and decay of primary structure of DNA: Nature 362: 709-715

LINZ, U., DEGENHARDT; H. (1990): Die Polymerase Kettenreaktion. Ein Überblick. Naturwissenschaften 77: 515-530

MANNUCCI, A., SULLIVAN, K.M., IVANOV, P.L., GILL, P. (1994): Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. Am J Leg Med 106: 190-193

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

MICOZZI, M.S. (1991): When the patient is Abraham Lincoln. Caduceus 7: 34-42

MULLIS, K. B., FALOONA, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 155: 335-350

NAKAHORI, Y., TAKENAKA, O., NAKAGOME, Y. (1991): A human X-Y homologous region encodes "Amelogenin". Genomics 9: 264-269

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

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

NG, S., 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 5 (10): 2720-2732

NIEDERHAUSER, C., HÖFELEIN, C., WEGMÜLLER, B., LÜTHY, J., CANDRIAN, 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

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

PÄÄBO, S. (1984): Über den Nachweis von DNA in altägyptischen Mumien. Das Altertum 30: 213-218

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

REYNOLDS, R., SENSABAUGH, G. (1991): Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction. Anal. Chem. 3: 2-15

ROBERTS, C., MANCHESTER, K. (1997): The Archeology of disease, 2nd Edition. Cornell University Press, Ithaca, New York.

ROGAN, P.K., SALVO, J.S. (1990): Study of Nucleic Acids Isolated From Ancient Remains. Yearbook Phys. Anthropol. 33: 195-214

RUANO, G., FENTON, W., KIDD, K.K. (1989): Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster" PCR. Nucleic Acids Res. 17 (13): 5407

SALLER, K. (1964): Leitfaden der Anthropologie, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

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

SAIKI, R.K., GELFARD, 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 a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

SANTOS, F.R., PANDYA, A., TYLER-SMITH, C. (1998): Reliability of DNA-based sex tests. *Nature genetics* 18: 103

SARKAR, G., SOMMER, S. (1990): Shedding light on PCR contamination. *Nature* 343: 27

SCHMIDT, T., HUMMEL, S., HERRMANN, B. (1995): Evidence of contamination in PCR-laboratory disposables. *Naturwissenschaften* 82: 423-431

SCHNEIDER, P.M., SEO, Y., RITTNER, C. (1999): Forensic mt DNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *Int J Legal Med* 112: 315-316

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

SJØVOLD, T. (1988): Geschlechtsdiagnose am Skelett. In: Knußmann, R. (Hrsg.): *Wesen und Methoden der Anthropologie*, 4.Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 444-480

STEINBOCK, R.T. (1976): *Paleopathological Diagnosis and Interpretation – Bone diseases in ancient human populations*. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A.

STONE, A.C., STARRS, J.E., STONEKING, M. (2001): Mitochondrial DNA analyses of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 46: 173-176

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

UBELAKER, D.H. (1974): Reconstruction of demographic profiles from ossuary skeletal samples. Smithsonian Contr. Anthropol. 18, Smithsonian Inst. Pr., Washington D.C.

WEBER, J. B. (1819): Versuch einer Geschichte von der königl. baierischen Stadt Rain und biographische Notizen vom Doctor und Professor Joseph Weber samt dem vollständigen Verzeichnisse seiner gedruckten Schriften. Webersche Buchhandlung, Landshut.

WEICHHOLD, G.M., BARK, J.E., KORTE, W., EISENMENGER, W., SULLIVAN, K.M. (1998): DNA analysis in the case of Kaspar Hauser. Int J Legal Med 111: 287-291

WHITAKER, J.P., CLAYTON, T.M., URQUHART, A.J., MILLICAN, E.S., DOWNES, T.J., KIMPTON, C.P., GILL;P. (1995): Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. BioTechniques 18: 670-677

WOODWARD, B. (1999): Shadow: Five presidents and the legacy of Watergate. Simon and Schuster, New York.

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., NERLICH, A. (2003): Molecular analyses of the “Pharaohs“- Feasibility of molecular studies in ancient Egyptian material. Am. J. Phys. Anthropol. 121: 109-111

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

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

ŽIVANOVIĆ, S. (1982): *Ancient Diseases – The elements of palaeopathology.* Methuen & Co. Ltd. London.

VIII. Danksagung

Mein Dank gilt meiner Mutter, meinen Geschwistern und Freunden, die mir jederzeit das Verständnis und die Freiräume gegeben haben, die notwendig waren, um diese Arbeit zu erstellen.

Herrn Prof. Dr. med. A. Nerlich danke ich für die Überlassung des Themas und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Dr. rer. nat. A. Zink danke ich für die stets erreichbare und freundschaftliche Betreuung.

Den MTAs des Pathologischen Instituts danke ich für die freundliche Unterstützung bei technischen und logistischen Problemen.

IX. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Cordula Viola Mauerer
Geburtsdatum: 27.05.1977
Geburtsort: München

Ausbildung:

1983 - 1987 Grundschule, München
1987 - 1996 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München
1996 - 2003 Studium der Humanmedizin an der
 Ludwig-Maximilians-Universität München
2002 - 2003 Praktisches Jahr
 1. Tertial: Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus,
 München-Harlaching
 2. Tertial: Neurologie, Klinikum Großhadern, München
 3. Tertial: Chirurgie, Tulane University Hospital,
 New Orleans
10/2003 Bestehen der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

2003 - 2004 Ärztin im Praktikum an der Neurologischen Klinik,
 Klinikum Großhadern, München
10/2004 Approbation als Ärztin
seit 10/2004 Assistenzärztin an der Neurologischen Klinik,
 Klinikum Großhadern, München