

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Eisenmenger

**Untersuchungen zur Degradation von DNA in Knochen
und deren Anwendbarkeit für die
Liegezeitbestimmung von Skelettfunden**

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

vorgelegt von
Christina Kaiser
aus München
2005

Mit Genehmigung durch die Medizinische Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Penning

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Rupp

PD Dr. R. Huss

Prof. Dr. Ch. Habrich

Mitbetreuung durch promovierte Mitarbeiter: Dr. O. Peschel

Dr. B. Bachmeier

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		Seite	iii
1. Einleitung			1
1.1	Überblick		1
1.2	Todeszeitbestimmung		2
1.2.1	Einflussfaktoren		2
1.2.2	Frühe Leichenerscheinungen		3
1.2.3	Späte Leichenerscheinungen		6
1.2.4	Sonderformen von Leichenerscheinungen		8
1.3	Liegezeitbestimmung von Skelettfunden		9
1.3.1	Einflussfaktoren		10
1.3.2	Historischer Überblick		13
1.4	Einsatz von DNA-Techniken		15
1.5	Degradation der DNA		16
1.6	Fragestellung und Zielsetzung dieser Doktorarbeit		17
2. Material und Methoden			19
2.1	Geräte		19
2.2	Material		20
2.2.1	Verwendetes Untersuchungsmaterial		20
2.2.2	Probenentnahme und –präparation		22
2.3	DNA-Extraktion aus Knochen		22
2.3.1	Methode 1		22
2.3.2	Methode 2		23
2.3.3	Methode 3		24
2.4	Phenolextraktion und Ethanol-fällung der DNA		25
2.5	Quantitative DNA-Bestimmung		25
2.6	Elektrophoretische Verfahren		26
2.6.1	Agarosegel-Elektrophorese		26
2.6.1.1	Herstellung der Gele		26
2.6.1.2	Vorbereitung der Proben und Elektrophorese		26
2.6.2	Polyacrylamidgel (PAA) -Elektrophorese		27
2.6.2.1	Herstellung der Gele		27

2.6.2.2	Vorbereitung der Proben und Elektrophorese	28
2.6.2.3	Silberfärbung	28
2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
2.8	Reamplifikation	32
3.	Ergebnisse	35
3.1	Optimierung der PCR-Bedingungen	35
3.2	Quantitative DNA-Bestimmung	37
3.3	Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden	38
3.3.1	Quantitative DNA-Bestimmung	38
3.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
3.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	41
3.4.1	Extraktionsmethode 1	41
3.4.2	Extraktionsmethoden 2 + 3	44
4.	Diskussion	48
4.1	Zielsetzung und allgemeine Problematik	48
4.2	Methodische Vorarbeiten und Vorversuche	49
4.2.1	Analytik von aDNA und Vermeidung von Kontamination durch rezente DNA	49
4.2.2	Untersuchungen zu verschiedenen DNA-Extraktionsverfahren aus Knochen	50
4.2.3	Optimierung der PCR-Bedingungen	52
4.3	Quantitative DNA-Bestimmung	54
4.4	Untersuchungen zur forensischen Relevanz von aDNA-Analysen für die Bestimmung des Liegealters	56
4.4.1	Quantitative aDNA-Messungen	56
4.4.2	Untersuchung der Fragmentlängen zu unterschiedlichen Liegezeiten	57
5.	Zusammenfassung	63
	Literaturverzeichnis	I
	Danksagung	IX
	Lebenslauf	X

Abkürzungsverzeichnis der Tabellen und Abbildungen

S	Standard
I	Innen
M	Mitte
A	Außen
P	Positiv-Kontrolle
N	Negativ-Kontrolle
E1	Extraktionsmethode 1
E2	Extraktionsmethode 2
E3	Extraktionsmethode 3

1. Einleitung

1.1 Überblick

„Der Tod ist kein Abschnitt des Daseins, sondern nur ein Zwischenereignis, ein Übergang aus einer Form des endlichen Wesens in eine andere.“

W. v. Humboldt, Briefe an eine Freundin, 4. Juni 1882

Die Weichteile des menschlichen Körpers sind nach Eintritt des Todes einer zumeist raschen Autolyse und Fäulnis unterworfen, sodass – mit Ausnahme von natürlicher oder künstlicher Mumifikation – oft „nur“ die Knochen über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben. Obwohl auch diese in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen vollständig zersetzt werden können, gibt es vielfach auch sehr gut erhaltenes Knochenmaterial, das Aussagen über die entsprechenden Individuen selbst nach Zeiträumen von mehreren tausend Jahren erlaubt. Mit dem Problem des Gewebeerhaltes ist jedoch nicht nur der humanistische Philosoph konfrontiert, dessen Zielsetzung oft abstrakt erscheint, sondern besonders auch Anthropologen und Rechtsmediziner mit ihrem wesentlich konkreteren Ziel, bei Skelettfunden die Fragen nach Geschlecht, Lebensalter, Größe, Liegezeit und Todesursache zu beantworten.

Die Zielsetzung dieser Doktorarbeit ist es, zu überprüfen, inwieweit die Fortentwicklung molekularer Nachweisverfahren der letzten Jahre neue Möglichkeiten zur Liegezeitbestimmung von Knochenfunden aufzeigt. Dabei wurde im Besonderen der Frage nachgegangen, ob es einen Zusammenhang zwischen der DNA-Degradation im Knochen und dem Zeitraum vom Todeseintritt bis zur Auffindung der Leiche (=Liegezeit) gibt.

Für Rechtsmediziner (wie generell für Ärzte) ist die Bestimmung der Liegezeit von Skelettfunden und damit der Todeszeit eine Aufgabe von weittragender rechtlicher Bedeutung. Da z.B. die Verfolgbarkeit einer Straftat, ausgenommen Völkermord und Mord, abhängig von der Schwere der Strafandrohung nach 3, 5, 10, 20 oder 30 Jahren verjährt (§ 78 StGB), sind möglichst genaue Angaben des Sachverständigen zum

Todeszeitpunkt von größter Bedeutung. Zu denken ist außerdem an die Zeitbestimmung bei zivilrechtlichen Fragen der Erbfolge bei Unfällen oder Selbstmorden von Ehepaaren bzw. Eltern und Kindern sowie an versicherungsrechtliche Konsequenzen bestimmter Todesfälle im Hinblick auf ihre Zeitabhängigkeit (Wartezeit bei Suiziden u.ä.).

1.2 Todeszeitbestimmung

Unter Todeszeitbestimmung versteht man die Feststellung des Todeszeitpunkts mit Hilfe der Temperaturmethode sowie der Beurteilung von Leichenerscheinungen. Nachdem sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit „Leichen“ befasst, die entweder an der Erdoberfläche gelegen sind oder in der Erde vergraben waren, soll nicht auf Sonderfälle wie Wasser- und Moorleichen eingegangen werden. Diese weisen zu viele Besonderheiten und Ausnahmerecheinungen auf, als dass sie in dieser Arbeit mit berücksichtigt werden könnten.

1.2.1 Einflussfaktoren

An dieser Stelle soll zunächst auf die wichtige Bedeutung der Umgebungstemperatur eingegangen werden. Sie beeinflusst sowohl das zeitliche Auftreten der frühen als auch der späten Leichenerscheinungen in ganz erheblichem Maße. Generell gilt: je höher die Temperatur ist, desto schneller treten die Veränderungen in Erscheinung. Leichenerscheinungen, die in der Hitze des Sommers bereits 3 bis 4 Stunden postmortal auftreten können, zeigen sich im Winter, bei Eis und Schnee, womöglich erst nach 8 bis 12 Tagen. Aber auch andere Faktoren, wie die Todesart (z.B. Sepsis), der Liegeort, ungewöhnliche Bekleidung/Bedeckung und die Konstitution der Leiche (isolierende subkutane Fettschicht) spielen für ihr zeitliches Erscheinen eine große Rolle.

„Der Arzt aber muss diese Einflüsse und Verschiedenheiten genau berücksichtigen, um in dieser Hinsicht sein Gutachten abzugeben, doch darf er es nie anders als in Form des Zweifels aussprechen.“

Mit diesem Zitat hat Devergie bereits im Jahre 1841 auf die Schwierigkeiten der Todeszeitbestimmung an Hand von Leichenerscheinungen hingewiesen. Man kann zwar auf Grund gewisser Gesetzmäßigkeiten unter Berücksichtigung der äußeren Umstände ein zeitliches Fenster, in den seltensten Fällen jedoch einen genauen Zeitpunkt des Todes angeben. Schematisierte Tabellen und Grafiken leisten hier gute Dienste, die praktischen Erfahrungen eines Rechtsmediziners können aber auch sie niemals ersetzen, sondern höchstens ergänzen.

1.2.2 Frühe Leichenerscheinungen

Trifft der Arzt kurze Zeit, d.h. innerhalb der ersten Stunden nach Eintritt des Todes am Ort des Geschehens ein, so bieten sich ihm für die Bestimmung der Todeszeit vielfältige Möglichkeiten, wie z.B. die Messung der Körpertemperatur sowie die Beurteilung der Totenstarre (=Rigor mortis) und der Totenflecken (=Livores). Grundsätzlich muss allerdings gesagt werden, dass verlässliche Angaben mit Hilfe dieser drei Kriterien auch nur im frühen postmortalen Intervall zu erwarten sind.

Das Ausmaß des Temperaturabfalls kann je nach äußeren Gegebenheiten erheblich variieren, da es durch eine Vielzahl von biologischen und physikalischen Faktoren beeinflusst wird. Die wohl wichtigsten dieser Faktoren sind die Umgebungstemperatur, der Liegeort (im Raum, im Freien oder im Wasser) sowie Bekleidung und Ernährungszustand der Leiche. Ein grober Anhalt für den Temperaturrückgang ist das Absinken der Mastdarms-temperatur um 1°C pro Stunde bei normaler Umgebungstemperatur (18-20°C). Für etwas genauere Todeszeitbestimmungen mittels Temperaturmethode, unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren, existieren geeichte Kurven oder Nomogramme. In der Rechtsmedizin hat sich hier v.a. die Methode von Henßge und Madea durchgesetzt (Henßge, Madea, 1988; Schwerd, 1992; Penning, 1997). Eine neue, ebenfalls temperaturgestützte Methode zur Todeszeitbestimmung wurde kürzlich von Mall entwickelt (Mall, 2000).

Eine weitere Leichenerscheinung sind die Totenflecken als eines der sicheren Todeszeichen. Sie entstehen durch die Stase und das daraus resultierende passive Absinken des Blutes in tiefer gelegene, abhängige Körperregionen. Daher hängt die Verteilung der Totenflecken selbstverständlich von der Lagerung (cave: Umlagerung) der Leiche, ihre Intensität u.a. von der „Blutfülle“ des Körpers (Anämie, Blutverlust) und von der Todesart ab. Die Entwicklung der Totenflecken beginnt temperaturabhängig frühestens 20-30 Minuten nach dem Tode, in aller Regel in der Nackenregion. Nachdem sich die Kapillaren der Kutis nicht gleichmäßig mit Blut füllen, entstehen zunächst Flecken, die erst nach einiger Zeit konfluieren. Innerhalb der ersten 6 Stunden besteht eine vollständige, bis zu 12 Stunden postmortal eine partielle Umlagerungsfähigkeit der Totenflecken. Ebenso bis zu 12 Stunden postmortal sind sie durch leichten Druck vollständig wegdrückbar, wohingegen sie 12-36 Stunden nach Eintritt des Todes nur noch durch kräftigen Druck mit einem harten Gegenstand zum Verschwinden gebracht werden können. Ab dem dritten Tag gelingt auch dies nicht mehr, da das Blut in den Kapillaren eingedickt (Hämokonzentration) bzw. weil Blutfarbstoff nach autolysebedingter Brüchigkeit der Gefäßwände ins Gewebe eingedrungen ist (Hämolyse).

Dort, wo der Kapillardruck besonders hoch ist, d.h. im Bereich starker Stauung und Hypostase (z.B. im Gesicht bei postmortal starker Kopftieflage), können zusätzlich Stauungstotenflecken (=Vibices) auftreten. Hierbei handelt es sich um bis zu linsen- große, dunkelblaue Blutaustritte aus Kapillarrupturen (Schwerd, 1992; Penning, 1997).

Ein zweites sicheres Todeszeichen stellt die Totenstarre dar. Die Totenstarre wird biochemisch durch ein Absinken des ATP-Spiegels (Zerfall $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP}$) erklärt. Da postmortal keine Resynthese des ATP als Bedingung für die Trennung von Aktin und Myosin erfolgen kann („Weichmacherfunktion“), bleibt die Totenstarre bis zu ihrer durch Autolyse und Fäulnis bedingten Lösung erhalten. Gemäß der Nysten'schen Regel (Nysten, 1811) beginnt sie an der Kaumuskulatur und schreitet nach unten fort, um sich später in der gleichen Reihenfolge wieder zu lösen. Die Totenstarre entsteht frühestens 2 Stunden postmortal, in kalter Umgebung auch deutlich später. Vollständig ausgeprägt ist sie nach 6-12 Stunden. Danach beginnt sie sich wieder spontan zu lösen, wobei dieser Vorgang erst nach 2 bis 3 Tagen abgeschlossen ist.

Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die Todeszeitbestimmung ist die Brechung der Totenstarre. Erfolgt diese in den ersten 6-10 Stunden, so kommt es zu ihrem Wiedereintritt durch Erstarren der bis dahin noch nicht befallenen Muskelfibrillen. Dabei gilt: je früher der Lösungsversuch unternommen wird, desto stärker ist die zweite Ausprägung der Totenstarre (Henßge, Madea, 1988; Schwerd, 1992; Penning, 1997).

Ebenfalls zur Bestimmung der Todeszeit im frühen postmortalen Intervall können die supravitalen Reaktionen herangezogen werden. Dabei muss zwischen klinischem Tod, Hirntod (=Individualtod) und biologischem Tod unterschieden werden. Mit dem Eintritt des klinischen Todes (Stillstand von Kreislauf und Atmung) und schließlich des Hirntodes (endgültiger Ausfall der gesamten Hirnfunktion) sind zwar die zentralen Regulationsmechanismen ausgeschaltet, die Zellen sterben aber infolge des O₂-Mangels erst allmählich ab. Während dieser Zeit bis zum Absterben der letzten vitalen Zellen (biologischer Tod), einer Zeit, die auch als intermediäres Leben bezeichnet wird, ist die Auslösung der sogenannten supravitalen Reaktionen möglich. Hierzu zählen z.B. die Pupillenreaktion beim Einträufeln von Sympatho- bzw. Parasympathomimetika in den Bindehautsack (bis zu 4 Stunden p.m.), die elektrische Erregbarkeit der Muskulatur (im Bereich der Augenlider bis zu 8 Stunden p.m., im Bereich des Mundes bis zu 6 Stunden p.m., im Bereich der Hand bis zu 5 ½ Stunden p.m.), die idiomuskuläre Wulstbildung (bis zu 8 Stunden p.m.), der Nachweis beweglicher Samenfäden in den Samenblasen (bis zu 82 Stunden p.m.) und noch einige mehr. Auf diese soll allerdings nicht näher eingegangen werden, nachdem deren praktische Bedeutung für die Todeszeitbestimmung eher gering ist (Dietz, Dürwald, 1976; Schwerd, 1992; Penning, 1997).

Aber all die genannten Möglichkeiten zur Bestimmung der Todeszeit sind auf das frühe postmortale Intervall begrenzt. Was ist also, wenn der Zeitraum zwischen Eintritt des Todes und Auffindung der Leiche Wochen oder gar Monate beträgt?

In manchen Fällen bieten sich dem Kriminalisten weitere Lebensumstände des Toten, die Rückschlüsse auf einen auch länger zurückliegenden Todeszeitpunkt zulassen: Nichtentleerung des Briefkastens von einem bestimmten Zeitpunkt an (Tageszeitung!),

letzter Kalendertag bei Abreißkalendern, Beschaffenheit von herumstehenden Flüssigkeiten oder Mahlzeiten etc. (Schwerd, 1992).

Ist auch diese Art der „Todeszeitbestimmung“ nicht möglich, so muss schließlich auf die Beurteilung der sogenannten späten Leichenerscheinungen zurückgegriffen werden.

1.2.3 Späte Leichenerscheinungen

Biochemische Prozesse führen nach dem Tod relativ rasch zu tiefgreifenden Veränderungen von Zell- und Gewebsstrukturen. Da sie anfangs durch körpereigene Enzyme bewirkt werden, fasst man sie unter dem Sammelbegriff Autolyse zusammen. Dieses Stadium der lytischen Veränderungen geht schließlich fließend in bakteriell bedingte Destruktionen über. Die früher als wichtig erachtete Trennung zwischen Fäulnis (durch anaerobe Bakterien) und Verwesung (durch aerobe Bakterien) hat man inzwischen wieder verlassen, nachdem sie erstens nicht immer nachvollziehbar und zweitens ohne praktische Bedeutung ist. Im Folgenden wird deshalb in diesem Zusammenhang nur noch von Fäulniserscheinungen die Rede sein.

Ebenfalls zu berücksichtigen sind ungewöhnliche Leichenveränderungen wie Tierfraß, Fettwachsbildung und Mumifizierung.

Als Autolyse bezeichnet man Zersetzungserscheinungen durch körpereigene Enzyme. Besonders betroffen sind hier die beiden Organe Pankreas und Magen. Die Autolyse des Magens (Gastromalacia acida) kann dabei ein solches Ausmaß annehmen, dass große Teile der Magenwand, in seltenen Fällen sogar das benachbarte Zwerchfell, aufgelöst werden. Im Pankreas und zum Teil auch im Nebennierenmark werden relativ frühzeitig, d.h. bereits wenige Stunden postmortal, autolytisch bedingte Erweichungen beobachtet (Schwerd, 1992; Penning, 1997).

Die Leichenfäulnis, also die Zersetzung durch Bakterien, ist das letzte und wohl eindeutigste der sogenannten sicheren Todeszeichen. Ihr Auftreten ist jedoch noch stärker temperaturabhängig als das von Leichenstarre und Totenflecken, sodass sich

eine Abschätzung des Todeszeitpunkts aus Fäulnisveränderungen nicht nach starren Regeln richten kann und somit dem erfahrenen Rechtsmediziner vorbehalten sein sollte. Ausgesprochene Fäulniserscheinungen treten selbst unter "günstigen" Bedingungen gewöhnlich nicht vor 2 Tagen postmortal auf, doch können sie in Ausnahmefällen, z.B. bei sehr hoher Umgebungstemperatur (Sauna) oder bei vorausgegangener Sepsis auch schon nach wenigen Stunden beobachtet werden. Gefrorene Leichen hingegen können über Jahre hinweg äußerlich weitgehend unverändert bleiben.

Hinzu kommt eine weitere Abhängigkeit der Fäulniszeiten von unterschiedlichen Keimbesiedelungen bzw. von einer Antibiotika-Therapie vor dem Tode (Wagner, 1960).

Selbstverständlich spielt auch das die Leiche umgebende Medium eine große Rolle. Gemäß der Casper'schen Regel (Casper, 1858) treten vergleichbare Fäulniserscheinungen bei ähnlicher Temperatur an der Luft nach etwa 1 Woche, im Wasser nach 2 und im Erdgrab nach 8 Wochen (bzw. dem jeweils Vielfachen davon) auf (Schwerd, 1992; Penning, 1997).

Zu einem geringen Prozentsatz dringen die Fäulnisbakterien (z.B. *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus*, *Clostridium*) durch die Haut oder über die Atemwege in den menschlichen Körper ein, doch überwiegend entstammen sie der physiologischen (Darm-)Flora.

Beginnende Fäulnis führt zunächst zu einer Grünverfärbung der Haut durch den Abbau von Hämoglobin zu Sulfhämoglobin (=Verdoglobin_s) unter dem Einfluss fäulnisbedingter Freisetzung von H₂S bei der Zerstörung von Eiweiß. Nachdem sie zuerst dort entsteht, wo Darmbakterien am schnellsten die Haut erreichen können, tritt sie als erstes im rechten Unterbauch auf, nachdem hier das Zökum infolge starker Gasblähung der Bauchwand besonders eng anliegt. Die Ausbreitung der Fäulnisbakterien erfolgt hauptsächlich über den Blutweg. Hämolyse und Hämoglobinzersetzung innerhalb der Gefäße führen schließlich zum sogenannten Durchschlagen der Venennetze mit schmutzig-rötlicher oder grünlicher Verfärbung. Der Austritt des Blutfarbstoffs aus den Venen wird hierbei offensichtlich durch den sich aufbauenden Druck der Fäulnisgase unterstützt. Diese Fäulnisgase sind ein Gemisch aus CH₄, H₂S, NH₃, N₂, H₂ und CO₂ und bewirken eine Auftreibung des gesamten Leichnams bis hin zu dessen völliger Entstellung. Die Haut weist mit Gas und Flüssigkeit gefüllte Blasen

auf, die Haare lassen sich leicht ausziehen, nicht selten tritt rötliche Fäulnisflüssigkeit (DD: Blut) aus Mund und Nase aus. Im Körperinneren entwickeln sich sogenannte Schaumorgane mit starker Gasblasendurchsetzung. Intrakraniell führen die Fäulnisvorgänge zu einer schmierigen Erweichung des Gehirns bis hin zu dessen regelrechter Verflüssigung (Schwerd, 1992; Penning, 1997).

Durch Tierfraß entstandene Verletzungen an Leichen können zu einer erheblichen Erschwernis der Todes- bzw. Liegezeitbestimmung führen. Ein im Freien liegender Leichnam kann von Ameisen, Aaskäfern, Nagetieren, Wild- und Raubtieren (z.B. Fuchs) oder Vögeln unter Umständen innerhalb weniger Tage skelettiert werden. Aber auch Haustiere wie Katzen und Hunde beginnen, wenn sie z.B. mit dem Verstorbenen in einer Wohnung eingesperrt sind, nach kurzer Zeit mit dem Ablecken und Abnagen der Weichteile insbesondere um die freiliegenden Körperöffnungen herum. Typischerweise entstehen dabei unregelmäßige Wundränder und ein gleichmäßiger reaktionsloser Wundgrund ohne Einblutungen.

Auf der anderen Seite lässt das Vorhandensein von Fliegenmaden (Metamorphose: Ei → Made → Puppe → Fliege) Rückschlüsse auf den Zeitpunkt des Todes zu. Die Ablage von Fliegeneiern kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt postmortal, in Ausnahmefällen auch schon prä mortal erfolgen. Erste winzige Maden schlüpfen in der Regel nach frühestens 10 Stunden, allerdings ist dieser Vorgang stark temperaturabhängig und findet überhaupt erst ab einer Temperatur von über 4 bis 7 °C statt. Das Wachstum der Maden wird meist als sehr grobe Faustregel mit 1 mm pro Tag angegeben. Ihre Verpuppung in braune feste Kapseln erfolgt nach 1 bis 2 Wochen und nach weiteren 1 bis 2 Wochen schlüpft die nächste Madengeneration (Dietz, Dürwald, 1976; Schwerd, 1992; Penning, 1997).

1.2.4 Sonderformen von Leichenerscheinungen

Unter speziellen Umweltbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) können besondere Formen von Leichenerscheinungen auftreten:

Weichteile von Leichen, die sich in feuchtem Milieu befinden (z.B. im Wasser, in nassem Lehmboden, aber auch in einer feuchten Gruft) werden unter Umständen in Fettwachs (=Adipocire=Leichenlipid) umgewandelt. Dabei entstehen aus körpereigenem Fett v.a. Palmitin- und Stearinsäure sowie deren Kalzium- und Magnesiumsalze. Dies führt nach und nach zu einer Verhärtung von Haut und Weichteilen, welche auf diese Weise über viele Jahre hinweg erhalten bleiben können (Konservierung). In der ersten Zeit postmortal, d.h. innerhalb einiger Wochen, sind aus dem Grad der Fettwachsbildung noch Rückschlüsse auf die Liegezeit möglich. Die vollständige Umwandlung der Leiche dauert schließlich mehrere Jahre und bleibt dann stabil und lange „haltbar“.

Bei trockener Wärme und Luftzug kommt es hingegen zur vollkommenen Austrocknung und zur lederartigen Verhärtung betroffener Hautpartien. Dieser als Mumifizierung bezeichnete Vorgang tritt bei sehr hohen Temperaturen (z.B. in der Wüste) nach etwa 2 Wochen, in unseren Breitengraden nach frühestens 1 bis 2 Monaten auf. Im Endstadium kann die Mumifizierung ebenso wie die Fettwachsbildung zur gleichbleibenden Konservierung eines Leichnams über Jahrhunderte führen (Schwerd, 1992; Penning, 1997).

1.3 Liegezeitbestimmung von Skelettfunden

Wie oben bereits erwähnt, sind die Angaben zur Todes- bzw. Liegezeit an Hand von späten Leichenerscheinungen trotz Berücksichtigung aller erfassbaren Einflussfaktoren eher vage und ziemlich ungenau. Bei stark fortgeschrittener Fäulnis, d.h. bei vollständiger Skelettierung einer Leiche, entfallen auch diese Parameter, sodass als Grundlage zur Todeszeitbestimmung im Wesentlichen nur noch die Knochen zur Verfügung stehen.

1.3.1 Einflussfaktoren

Die Liegezeitbestimmung von Knochenfunden ist in hohem Maße von den Lagerungsbedingungen (Temperatur, umgebendes Medium, Feuchtigkeit etc.) sowie von weiteren äußeren Gegebenheiten (z.B. Tierfraß) abhängig. Bei Wärme und Tierfraß kann die Skelettierung einer Leiche an der Erdoberfläche nach wenigen Wochen abgeschlossen sein, wohingegen das vollständige Verschwinden von Weichteilen im Erdgrab, abhängig von der Art des Bodens, mindestens 3 bis 4 Jahre, manchmal sogar Jahrzehnte in Anspruch nimmt.

Aber auch die Dekomposition der Knochen selbst variiert ganz erheblich mit den unterschiedlichen Umweltbedingungen. Biologische Vorgänge vollziehen sich in der Regel nur in einem bestimmten Temperaturbereich, der meist einen unteren und einen oberen Schwellenwert sowie ein dazwischen liegendes Optimum aufweist. Die Optimaltemperatur für viele Bodenorganismen liegt in einem Bereich von 25 bis 30°C (Franz, 1960). Bei höheren Temperaturen erlischt das Leben und an die Stelle der Lebensprozesse treten rein chemische Reaktionen, die wiederum nach der RGT-Regel von J.H. van't Hoff mit steigender Temperatur eine Beschleunigung erfahren. In gefrorenen Böden hingegen sind Fäulnisvorgänge so gut wie aufgehoben. Als grobe Faustregel gilt deshalb, dass die Dekomposition der Knochen mit der herrschenden Temperatur im Boden (Grabtiefe 1,70m) annähernd parallel verläuft (Hunger, Leopold, 1978).

Die Bodenfeuchtigkeit ist einerseits von der Niederschlagsmenge, andererseits von der Wasserdurchlässigkeit bzw. Speicherkapazität des Bodens abhängig. Sowohl zu viel als auch zu wenig Feuchtigkeit wirkt sich ungünstig auf die Zersetzung organischer Substanzen aus. So können beispielsweise wasserundurchlässige Lehm- oder Tonböden sowie die konstante Anwesenheit von Grundwasser durch die Begünstigung der Fettwachsbildung eine normale postmortale Dekomposition verhindern und somit den Knochen und Gewebe über lange Zeit konservieren.

Die Zusammensetzung des Bodens, insbesondere sein pH-Wert, sein Gehalt an austauschbarem Calcium und Phosphor sowie seine Redoxeigenschaften spielen bezüglich der Dekomposition von Knochen ebenfalls eine große Rolle.

Bei sehr sauren Böden (niedriger pH-Wert) kommt es z.B. auf Grund von Humin- und Gerbsäuren zur Unterbindung bakterieller Zersetzungsvorgänge und damit zu einer gewissen Konservierung von Haut und Organen (Moorleichen), aber auch zur Zerstörung der Knochen durch Herauslösen des Calciumphosphates (Gabriel, 1930).

Generell konservieren alle karbonatreichen, basischen bis neutralen Böden im morphologischen Sinne gut (Berg, 1964). Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass es in humiden Böden nicht selten zur sogenannten Sekundärmineralisation, d.h. zur Stoffeinwanderung aus dem Boden in den Knochen bei Schwinden der kollagenen Grundsubstanz kommt. Dies kann unter Umständen zu groben Fehlschätzungen des Liegealters führen, da alte Knochen in Folge ihrer dadurch gewonnenen Härte und Schwere rezentes Material vortäuschen können. Klarheit bringt hier eine mikroskopische Untersuchung von entkalkten Gefrierschnitten.

Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Feuchtigkeit, Temperatur und andere Faktoren, wie z.B. Bodenorganismen (Bakterien, Pilze) bestimmen schließlich die Redoxeigenschaften eines Bodens, welche wiederum maßgebend für Art und Charakter der biologischen und chemischen Prozesse sind. So stehen bei einer guten Sauerstoffversorgung und einem hohen pH-Wert eines Bodens Oxidationsvorgänge im Vordergrund, während es bei Abwesenheit von Sauerstoff überwiegend zu Reduktionsvorgängen (→ Fäulnis) kommt (Hunger, Leopold, 1978).

Im Bewusstsein um diese große Bandbreite an Einflussfaktoren wurden in der Vergangenheit zahlreiche Versuche unternommen, allgemein gültige objektive Richtlinien und Methoden für die Bestimmung der Liegezeit von Knochenfunden zu entwickeln. Dabei sind einerseits morphologische (makroskopische und mikroskopische), andererseits chemische oder physikalische Ansätze mit ganz unterschiedlicher praktischer Bedeutung und Anwendbarkeit entstanden. In der Rechtsmedizin haben sich diesbezüglich vorwiegend die morphologischen Methoden durchgesetzt.

Die wohl wichtigste und gebräuchlichste Möglichkeit zur Liegezeitschätzung ist das Vorhandensein bzw. das Fehlen von Fettwachs in den Markhöhlen der Röhrenknochen. Der postmortale Prozess der Fett-Transgression mit anschließender Fett-Durchtränkung der Compacta dauert etwa 10 Jahre. Eine komplett mit Fettwachs ausgefüllte Markhöhle spricht für eine Liegezeit von höchstens 30 Jahren, wohingegen makroskopisch sichtbare Fettwachsreste in den größeren Gefäßkanälen noch bis zu 50 Jahre, mikroskopische Fettwachsreste in den Havers'schen Kanälen sogar bis zu 100 Jahre feststellbar sind.

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Liegezeitbestimmung ist die einfache makroskopische Betrachtung des Knochens. Usuren der Knochenoberfläche sind mit gewisser Regelmäßigkeit nach 30 bis 40 Jahren zu beobachten, doch können sie auch schon nach 15 Jahren vorhanden sein bzw. nach hunderten von Jahren noch völlig fehlen. Sehr altes Material (>100 Jahre) ist in der Regel leicht und porös und mit den Fingern zu zerbrechen. Dies liegt daran, dass die progrediente Zersetzung des Bindegewebsgerüsts nach dem Tode mit Ab- und Umbauerscheinungen der mineralischen Knochensubstanz einhergeht. Organisches Material nimmt dabei im Laufe der Lagerungszeit sehr stark ab, während anorganisches Material zunimmt. Ausnahmen und dadurch bedingte Fehlschätzungen sind aber auch hier möglich, da diese Vorgänge stark von äußeren Faktoren, insbesondere von der Beschaffenheit des Bodens abhängig sind.

Ebenfalls zur makroskopischen Untersuchung eines Knochens gehört die Beurteilung und zeitliche Zuordnung von Weichteilrückständen, von eventuell noch vorhandenen Knorpeln und Sehnen sowie von Kleiderresten (Müller, 1975; Hunger, Leopold, 1978).

Auf die vielen weiteren Methoden zur Liegezeitbestimmung menschlicher Knochen soll an dieser Stelle nicht im Detail eingegangen werden, da sie sich in der Praxis nicht durchgesetzt haben. Einige von ihnen seien dennoch kurz erwähnt, allein um die immensen Anstrengungen, die auf diesem Forschungsgebiet unternommen wurden, zu veranschaulichen.

1.3.2 Historischer Überblick

- Bereits im Jahre 1829 hat Mende in seinem Handbuch der gerichtlichen Medizin auf die Problematik der Liegezeitbestimmung von Knochenfunden hingewiesen. Er selbst hat sich intensiv mit den am Knochen ablaufenden Dekompositionsvorgängen beschäftigt, wobei er sich im Wesentlichen auf die makromorphologischen Untersuchungsmethoden beschränkt hat. Dazu zählten z.B. die Beurteilung der Beschaffenheit der Knochen im Hinblick auf ihren Feuchtigkeits- und Fettgehalt oder das Vorhandensein von Mark in den Markhöhlen sowie von Knorpel und Weichteilen.
- Gute 50 Jahre später wurden die von Mende aufgestellten Erfahrungssätze von Toldt wieder aufgenommen und im Wesentlichen bestätigt. Er bemerkte jedoch ausdrücklich, dass die Begutachtung bei Liegezeitbestimmungen „*meist nur aus der Analogie mit den Erfahrungen aus der Praxis gestützt werden können*“ (Toldt, 1882), eine Erkenntnis, die auch heute, trotz gewaltigem medizinisch-technischem Fortschritt, immer noch gültig ist.

Weitere Methoden und Autoren zur Liegezeitbestimmung menschlicher Knochen im Überblick sind u.a.:

- Messung des spezifischen Gewichtes von nicht spongiösen Knochen (Weibel, 1912),
- Eiweißpräzipitin-Reaktion nach Uhlenhuth (Nachweis von Proteinen) (Beumer, 1914),
- Fluortest (Oakley, 1949),
- Prüfung der UV-Fluoreszenz; Messung des Stickstoffgehalts (Neckermann, 1950),
- Ninhydrin-Reaktion (Nachweis von Eiweißkörpern + Abbauprodukten) (Koslowsky, 1953).

- Berg und Specht waren im Jahre 1958 die ersten Autoren, die systematische Untersuchungen zur Liegezeitbestimmung von Skelettfunden, inklusive neuer Gesichtspunkte (s.u.), veröffentlicht haben. Sie begutachteten in einer zusammenhängenden Versuchsreihe insgesamt 102 zuverlässig datierte menschliche Knochen mit Hilfe von morphologischen, chemischen und physikalischen Methoden. Dabei betonten die Autoren besonders, dass Liegezeitbestimmungen an biologischem Material wegen der Milieuabhängigkeit stets als problematisch anzusehen seien. Entsprechend dieser Tatsache empfahlen sie in ihrer Arbeit, möglichst viele objektive Methoden anzuwenden und dabei v.a. die Prüfung des Bodens nicht zu vernachlässigen.
- Untersuchung der Ultraschallgeschwindigkeit; ^{14}C -Radiocarbonmethode (Berg, Specht, 1958),
- Messung des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) (Hunger et al., 1968),
- Nachweis von Aminosäuren (Knight, 1969),
- Färbung mit Sublimat-Bromphenolblau-Reagens (Nachweis von Albumin) (Rubeshansky, 1971),
- Untersuchung des Veraschungsrückstandes (Hunger et al., 1971),
- Nachweis von Mukopolysacchariden und Lipiden (Urban, 1974),
- Analyse eingelagerter radioaktiver Isotope, (Swift, 1998; Swift et al., 2001).

Bei genauerer Betrachtung dieser Arbeiten fällt auf, dass in der oben genannten Aufzählung ein Wissenschaftsbereich noch völlig fehlt, der in der heutigen modernen Medizin immer mehr an Bedeutung gewinnt: die Molekularbiologie mit ihren Möglichkeiten der DNA-Bestimmung.

1.4 Einsatz von DNA-Techniken

Die Erforschung der DNA gehört zu den zentralen Kapiteln der biochemischen Wissenschaften. Sie geht zurück auf die Veröffentlichung der grundlegenden Gesetze der Vererbung 1866 durch Gregor Mendel und führte nach der Identifizierung der DNA als Träger der Erbmerkmale durch Oswald Avery (1944) zur Strukturaufklärung der DNA durch James Watson und Francis Crick im Jahre 1953. Damit war die dynamische Entwicklung der modernen Molekularbiologie eingeleitet.

Gut 30 Jahre später fanden DNA-Techniken durch die Einführung des sogenannten DNA-Fingerprintings (Gill et al., 1985; Jeffreys et al., 1985) auch auf dem Gebiet der Rechtsmedizin Einzug. Heute sind sie unverzichtbare Mittel der Vaterschaftsbegutachtung oder Spurenuntersuchung. So ist inzwischen die zuverlässige Identifizierung von Personen an Hand geringster Mengen kernhaltigen Materials (Haarwurzel, Mikro-Blutspur, Speichel an Zigarettenkippen etc.) möglich.

Aber auch erb- bzw. versicherungsrechtliche oder historische Fragestellungen können mit Hilfe von DNA-Techniken beantwortet werden. So gelang beispielsweise Anslinger et al. im Jahre 2000 die sichere Identifizierung Martin Bormanns über mtDNA-Analysen seiner sterblichen Überreste.

Dieses Beispiel macht deutlich, dass auch Knochen als Untersuchungsmaterial für DNA-Analysen hervorragend geeignet sind. Mehr noch, nach Lassen et al. (1994) sollte bei schlecht erhaltenem Untersuchungsmaterial Knochen generell der Vorzug gegenüber Weichteilen (Degradation Leber > Milz, Niere, Schilddrüse > Blut > Gehirn, Muskel, Lymphknoten) gegeben werden. Extraktionen aus Knochen enthielten vergleichsweise mehr hochmolekulare DNA und weniger hemmende Verunreinigungen und führten somit eher zu erfolgreichen Amplifikationen (Bär et al., 1988; Hochmeister et al., 1991; Lassen et al., 1994). Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die kompakte, eher „strapazierfähige“ Knochenoberfläche einen gewissen Schutz vor bakterieller und enzymatischer Zerstörung bietet. Außerdem ist die DNA im Knochen an eine anorganische Komponente (Calciumhydroxyapatit) gebunden, was wiederum zu deren Stabilisierung beiträgt (Lindahl, 1993).

1.5 Degradation der DNA

Gleichwohl bleibt auch die DNA im Knochen nach dem Tode nicht stabil, sondern wird nach und nach degradiert, was schließlich zu einem sukzessiven Verschwinden großer Fragmente von 15 kb und mehr führt. Dieser Vorgang der Degradation ist sehr komplex und bis heute nicht vollständig geklärt. Der Abbau der DNA erfolgt einerseits über oxidative Prozesse, andererseits über Nukleasen, die zusammen mit anderen hydrolytischen Enzymen freigesetzt werden, wenn nach dem Tode zelluläre und subzelluläre Membranen autolysebedingt zu Grunde gehen. Nach ihrem Angriffspunkt am Ende bzw. innerhalb einer Nukleotidkette lassen sich Exo- bzw. Endonukleasen unterscheiden, die je nach Spezifität als Ribonukleasen (spalten RNA) und Desoxyribonukleasen (spalten DNA) bezeichnet werden (Perry et al., 1988; Bär et al., 1988).

Wie jeder autolytische Prozess ist zweifellos auch die Degradation der DNA stark von äußeren Faktoren abhängig. Beispielsweise führten bei den Versuchen von Perry et al. (1988) schon geringe Temperaturschwankungen von wenigen °C (Inkubation der Proben bei 19 bis 25°C) zu großen Unterschieden bei der Degradation der DNA über einen Zeitraum von Wochen bzw. Monaten. Ferner konnten sie aufzeigen, dass sich hohe Feuchtigkeit - wenn auch nicht in solchem Maße - ebenfalls beschleunigend auf die DNA-Degradation im Knochen auswirkt. Eine andere Studie (Rankin et al., 1996) führte zu dem Ergebnis, dass die mikrobiologische Aktivität und die Feuchtigkeit des Bodens einen größeren Einfluss haben als die Einwirkung von Strahlung oder Hitze. Prinzipiell stellen kalte und trockene Witterung sowie stabile Umweltbedingungen ohne große Schwankungen die wichtigsten Faktoren für den Erhalt von DNA dar (MacHugh et al., 2000).

Der Liegeort des Knochens ist somit von entscheidender Bedeutung. Gemäß einer 1991 durchgeführten Studie konnten Hochmeister et al. die größte Menge an DNA aus den Knochen gewinnen, die an der Oberfläche gelagert wurden, gefolgt von denen im Wasser und schließlich von denen, die in der Erde vergraben waren. Rankin et al. (1996) kamen diesbezüglich jedoch zu anderen Ergebnissen. Ihre Versuche belegten, dass das Ausmaß der DNA-Degradation folgende Reihenfolge aufweist: Wasser > Erde > Oberfläche.

Aus diesen widersprüchlichen Befunden kann man ableiten, dass vergleichende Aussagen über die Degradation bzw. über den Gehalt an DNA nur dann sinnvoll und zulässig sind, wenn bei den untersuchten Proben identische oder zumindest ähnliche Lagerungsbedingungen vorgelegen haben. Aber auch bei der Auswahl der Proben ist zu beachten, dass zusätzlich zu den äußeren Faktoren auch die Art des Knochens für den Erhaltungszustand der DNA eine Rolle spielt. So scheint z.B. im jeweiligen Vergleich eine Klavikula langsamer zu degradieren als eine Rippe und die Knochenmatrix wiederum langsamer als das Knochenmark (Perry et al., 1988). Lee et al. fanden im Jahre 1991(a) außerdem heraus, dass die DNA-Menge, die aus 100 mg eines spongiösen Knochens extrahiert werden konnte, regelmäßig 10 bis 20 mal so hoch war wie diejenige aus 100 mg eines kompakten Knochens. Dennoch beurteilten MacHugh et al. (2000) kompakte Knochen auf Grund ihrer geringeren Kontamination durch Bakterien und Pilze als geeigneter für DNA-Untersuchungen als spongiöse Knochen.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung dieser Doktorarbeit

Trotz der intensiven und in den letzten Jahren noch erheblich gestiegenen Verwendung von molekularbiologischen Techniken in der Rechtsmedizin gibt es bislang nur sehr wenige, zumeist punktuelle Studien und Untersuchungen zu molekularen Daten, die Rückschlüsse auf das Liegealter von Knochenfunden zulassen. Deshalb wurde die vorliegende Studie zum Thema „**Liegezeitbestimmung von Skelettfunden**“ konzipiert. Im Prinzip sind es zwei Fakten, die zur Entstehung des (molekularbiologischen) Lösungsansatzes für diese Fragestellung geführt haben:

1. Menschliche DNA kann über einen ausgesprochen langen Zeitraum relativ stabil bleiben.
2. Menschliche DNA degradiert im Laufe der Zeit.

zu 1.:

1985/86 konnte Pääbo einen Nachweis dafür erbringen, dass DNA zumindest unter bestimmten äußeren Bedingungen relativ lange Zeit „haltbar“ bleiben kann. Er war in der Lage, von einer alten ägyptischen Mumie ein 3400 bp großes DNA-Fragment zu amplifizieren. Ähnliches gelang auch Hagelberg et al. (1989), indem sie aus 300 bis 5000 Jahre alten menschlichen Knochen mitochondriale DNA-Sequenzen bis zu einer Länge von 600 bp amplifizieren konnten. Cattaneo et al. vertraten in ihrer 1997 erschienenen Arbeit ebenfalls die Auffassung, dass signifikante Mengen an DNA erstaunlich lange Zeit überleben können. Mittlerweile konnte die Arbeitsgruppe von Pääbo (Krings et al., 1997) zeigen, dass selbst Neandertaler-Knochen mit einem Liegealter von rund 50.000 Jahren eine erfolgreiche Amplifikation und Analyse von "ancient DNA" (aDNA) erlauben. Auf jeden Fall scheint also nach Jahren und Jahrzehnten in Einzelfällen noch ausreichend DNA für molekularbiologische Untersuchungen vorhanden zu sein. Schließlich berichteten auch Holland et al. (1993), dass trotz extremer Umweltbedingungen und trotz geringer Menge und schlechter Qualität der DNA zwei Gramm Knochen ausreichen, um erfolgreich DNA-Analysen durchzuführen.

zu 2.:

Können über die Degradation der DNA Aussagen über die Liegezeit von Knochenfunden - unter Berücksichtigung der jeweiligen Umweltbedingungen - gemacht werden? Wenn ja, innerhalb welcher Zeitspanne ist dies möglich?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

PCR:

- GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, USA)
- Primus Thermo Cycler (MWG, Ebersberg)

Agarose-Gel-Elektrophorese:

- Electrophoresis Power Supply – EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden)
- Elektrophoresekammer GNA 100 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden)

PAA-Gel-Elektrophorese:

- Electrophoresis Power Supply – EPS 600 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden)
- Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Elektrophoresekammer P9DS (OwI Separation Systems, Portsmouth, USA)

Zentrifugen:

- Zentrifuge 2-4 (Sigma, Osterode)
- Zentrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Centra CL3R (International Equipment Company, Massachusetts, USA)
- Mikroliterzentrifuge UEC-Force-I (UniEquip, Martinsried)

Waagen:

- Sartorius handy (Sartorius, Göttingen)
- Sartorius Scaltec SBC 33 (Scaltec, Heiligenstadt)

sonstige:

- Brutschrank (Heraeus, Hanau)
- Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)

- Schüttler (IKA, Staufen)
- Handsäge Micromot 220/E (Proxxon, Niersbach);
Diamant-Trennscheibe (Dental Instruments, München);
HM Fräse (Dental Instruments, München)
- Kugelschwingmühle MM 200 (Retsch, Haan)
- Minishaker MS2 (IKA, Wilmington, NC)
- RNA/DNA Calculator, GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden);
Thermal Printer DPU-414 (Seiko Instruments, Japan)
- Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden);
Thermal Imaging System FTI-500 (Fuji Film)

2.2 Material

2.2.1 Verwendetes Untersuchungsmaterial

Bei dem verwendeten Untersuchungsmaterial handelt es sich um menschliche lange Röhrenknochen. Diese stammen vorwiegend aus Umbettungen bzw. Exhumierungen von lokalen (Münchner) Friedhöfen mit bekannter Liegedauer von rund 1 bis 34 Jahren (siehe Tab.1).

Auf Grund der relativ engen geographischen Beziehung der Fundorte wurde unterstellt, dass die Liegebedingungen der Knochen bezüglich Witterungseinflüssen und Bodenart sehr ähnlich waren. Dafür spricht auch der bei allen Knochen liegezeitentsprechende Erhaltungszustand. Einzelne Kriterien wie Temperatur, Wassergehalt oder pH-Wert des Bodens wurden in der vorliegenden Arbeit auch deshalb nicht weiter berücksichtigt, da diese in rechtsmedizinischen Einzelfalluntersuchungen in der Regel Schwankungen unterliegen und somit nicht eindeutig rekonstruierbar sind. Zusätzlich zu dem rein bodengelagerten Material wurde zu Vergleichszwecken ein Knochenfund aus lange zurückliegender Zeit mit einem Liegealter von mehr als 100 Jahren untersucht (siehe ebenfalls Tab. 1). Dieser stammt aus dem Gebeinhaus von Rain/Lech, das die

menschlichen Überreste des örtlichen Friedhofs aus der Zeit zwischen 1400 und 1800 AD enthielt. Spätere Bestattungen waren auf Grund der historischen Sachlage ausgeschlossen, sodass das Fundmaterial ein Liegealter von mindestens 200 und höchstens 600 Jahren hat.

Proben-Nr.	Liegealter
#11 E1	1 Jahr
Exhum. E2	4 Jahre
#12 E1	8 Jahre
#12 E2	8 Jahre
#3 E2	8 ½ Jahre
#9 E1	15 Jahre
#9 E2	15 Jahre
#19 E2	18 Jahre
#10 E2	21 Jahre
#37 E2	23 Jahre
#8 E2	30 Jahre
#13 E1	34 Jahre
#13 E2	34 Jahre
R/L 27 E2	200-600 Jahre

Tab. 1: Proben-Nr. und Liegealter der untersuchten Knochen

2.2.2 Probenentnahme und –präparation

Aus den insgesamt elf menschlichen Oberschenkelknochen wurde mit einer Handsäge jeweils ein ca. 2 cm breites Stück herausgesägt. Um einen möglichst identischen, genau definierten Entnahmeort zu gewährleisten, wurde dieses dabei exakt aus der Mitte der Diaphyse entnommen. Nach gründlicher Oberflächenreinigung mit 0,5-prozentigem Natriumhypochlorit (Sigma-Aldrich, Steinheim) und Abfräsen der obersten Schicht mit einer Handfräse mit sterilen Säge- bzw. Fräsblättern wurden die Knochenquerschnitte unter Beibehaltung von strikt sterilen Bedingungen zirkulär in drei etwa gleich breite Bereiche zersägt: einen inneren, dem Knochenmark zugewandten (inneres Drittel), einen mittleren (mittleres Drittel) sowie einen äußeren Bereich, der Kontakt zur Umgebung aufwies (äußeres Drittel). Diese Knochenfragmente wurden anschließend in sterile, 50 ml fassende Schraubdeckel-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Nach der Zerkleinerung in der Kugelschwingmühle mit einer maximalen Frequenz von 30/sec wurden vom inneren, mittleren und äußeren Abschnitt getrennt jeweils vier Gramm Knochenmehl auf vier Gefäße (PS-Tubes, Greiner, Solingen) aufgeteilt.

2.3 DNA-Extraktion aus Knochen

Zur weiteren analytischen Aufarbeitung wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet, um die Effizienz der DNA-Präparation zu testen.

2.3.1 Methode 1 (Boom et al., 1990; Haas et al., 2000b)

Pro PS-Tube und Gramm Knochenmehl wurden 2 ml einer 0,5 M (pH 8.0) EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) sowie 25 µl (20 mg/ml) Proteinase K (Sigma-Aldrich, Steinheim) hinzugegeben, gut vermischt und für 72 Stunden im Überkopfschüttler inkubiert. Nach 24 und nach 48 Stunden erfolgte die weitere Zugabe von jeweils 25 µl Proteinase K. Anschließend wurden die PS-Tubes in der Sigma-Zentrifuge für 15 min. bei 4000 g zentrifugiert. Jeweils 1 ml der hierbei entstandenen

Aliquots wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und mit 1 ml frisch hergestellter 4 M GSCN-Lösung (4,72 g Guanidinium-Thiocyanat; Tris-Cl ad 10 ml; 440 µl 0,5 M EDTA; 0,13 g Triton X) sowie mit 50 µl Diatomeen-Erde (5 g Diatomeen-Erde; 20 ml H₂O; 171,2 µl HCl) vermischt. Dann folgte eine erneute Inkubation im Überkopfschüttler für 2 Stunden. Im Anschluss an eine 5-minütige Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge bei 13000 g wurde jedes Pellet zwei mal mit 1,5 ml 70 % Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Holland) und ein mal mit 1,5 ml Aceton (Merck, Darmstadt) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für mind. 10 min. bis zur vollständigen Austrocknung in den auf 56°C vorgeheizten Brutschrank gestellt. Für die nun folgende DNA-Elution wurden die Pellets in 120 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen) gelöst, mit dem Minishaker gründlich gemischt und 15 min. lang bei 56°C und 1000 rpm im Eppendorf-Thermomixer geschüttelt. Nach nochmaligem Vortexen wurden die Proben in der Eppendorf-Zentrifuge für weitere 10 min. bei 13000 g zentrifugiert. Vorsichtig wurden die Überstände abgenommen und gleiche Proben vereinigt. Das Volumen der vereinigten Überstände wurde mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und in Microcon30-Säulchen (Millipore, Eschborn) mittels Zentrifugation laut Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die so entstandene DNA-Lösung wurde mit Aqua ad iniectabilia auf ein Volumen von 20 µl gebracht und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3.2 Methode 2 (First-DNA Kit, GEN-IAL, Troisdorf)

Jeweils ein Gramm Knochenmehl der inneren, mittleren und äußeren Fraktion wurde in ein steriles 50 ml-Schraubdeckel-Röhrchen überführt und mit 40 ml 0.5 M (pH 7,5) EDTA-Lösung gemischt. Nach 24-stündiger Inkubation im Überkopfschüttler bei 4°C wurde für 10 min. bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde drei mal wiederholt. Anschließend folgte ein dreimaliges Waschen der Pellets mit jeweils 30 ml Wasser. Zu jedem der drei Proben wurden dann 1000 µl Lyse 1 (First-DNA Kit, GEN-IAL, Troisdorf), 100 µl Lyse 2 (GEN-IAL), 25 µl frisch angesetztes 0,8 M DTT (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 50 µl Enzym (GEN-IAL) hinzugegeben. Danach wurden die Proben im Eppendorf-Thermomixer bei 56°C für

mind. 24 Stunden bis zur vollständigen Auflösung des Knochenmehls geschüttelt. Nach Zugabe von 750 µl Lyse 3 (GEN-IAL) und kurzem Vortexen kamen die Proben für 5 min. in den Gefrierschrank (-20°). Dann wurde für 20 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und die entstandenen Aliquots vorsichtig in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese Aliquots wurden mit 0,8 Vol. Isopropanol gemischt und zur Pelletierung der DNA für weitere 15 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend musste das Pellet im Eppendorf-Thermocycler vollständig trocknen, um schließlich in 30 µl Wasser gelöst zu werden. Die Aufbewahrung der DNA-Lösungen bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank.

2.3.3 Methode 3 („Dialysemethode“)

Die nach Extraktionsmethode 2 gewonnenen DNA-Lösungen der jeweiligen Knochen wurden in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und gegen 1 x Dialysepuffer (1 M Tris, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA) dialysiert. Hierfür wurde jede DNA-Probe mit Wasser auf insgesamt 500 µl aufgefüllt, in die Mitte eines Schwimfilters (Millipore, Eschborn) pipettiert und über Nacht abgedeckt stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Aliquots vorsichtig vom Filter abgehoben und in neuen Eppendorf-Gefäßen mit 50 µl 4 M LiCl (Merck, Darmstadt) und 3 µl Glycogen (Peqlab, Erlangen) gemischt. Nach Zugabe von jeweils 1 ml 100 % Ethanol und gründlichem Vortexen wurde die in den Proben enthaltene DNA für 2 Stunden bei -20°C gefällt und anschließend in der Eppendorf-Zentrifuge für 60 min. bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die DNA-Pellets mit jeweils 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und vollständiger Entfernung des Alkohols wurden die Pellets im Thermomixer für ca. 10 min. bei 56°C getrocknet und dann bei gleicher Temperatur in 12 µl Wasser gelöst. Die entstandenen DNA-Lösungen wurden bei 4°C, nicht im eingefrorenen Zustand, aufbewahrt.

2.4 Phenolextraktion und Ethanol-fällung der DNA

Um eiweißhaltige Beimengungen und Verunreinigungen aus den DNA-Lösungen zu entfernen, die evtl. zu einer Hemmung der PCR führen können, erfolgte im Anschluss an die DNA-Extraktion eine Phenol-Chloroform-Fällung. Hierfür wurden die DNA-Lösungen mit Wasser auf insgesamt 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl Phenol-Chloroform (Roth, Karlsruhe) gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die obere Phase vorsichtig in ein neues 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA-haltige obere Phase wurde mit 500 µl Chloroform extrahiert (Roth, Karlsruhe). Die Fällung der DNA erfolgte mit 500 µl 100 % Ethanol und 40 µl Na-Acetat. Nach Zentrifugation wurde das entstandene Pellet mit 1000 µl 70 % Ethanol gewaschen, vollständig getrocknet und schließlich wieder in 30 µl Wasser gelöst.

2.5 Quantitative DNA-Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der DNA-Konzentrationen in den extrahierten Lösungen wurde der RNA/DNA-Calculator GeneQuant pro verwendet. Es wurde eine 1:7 Verdünnung der DNA mit Wasser hergestellt. Die photometrische Messung erfolgte in Küvetten mit 5 mm Schichtdicke bei 230 nm, 260 nm, 280 nm sowie 320 nm. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die DNA-Konzentration der Proben nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} = 2 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{spez. Konzentration}$$

Die Reinheit der Nukleinsäuren konnte aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ abgeschätzt werden. Dabei weist reine DNA einen Quotienten von ca. 1,8 auf, während eine Kontamination der DNA durch Proteine oder Phenol zu einer deutlichen Erniedrigung dieses Wertes führt.

Nukleinsäure	Spez. Konz. bei OD ₂₆₀ = 1	OD260/OD280
genomische DNA	50 µg/ml	1,8

Tab. 2: photometrische Daten von genomischer DNA

2.6 Elektrophoretische Verfahren

Die Bestimmung der Größe der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese in Gelen (105 mm x 75 mm x 7,5 mm) mit 2 % Agarose sowie durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gelen (150 mm x 140 mm x 1,5 mm) mit 14 % Acrylamid.

2.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

2.6.1.1 Herstellung der Gele

1,3 g Agarose (Biozym, Oldendorf) wurden in 60 ml 1x TBE-Puffer (Life Technologies, Paisley, Scotland) gelöst und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Nach Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) wurde das Gel in eine horizontale Gelkammer (Pharmacia Biotech, Freiburg) mit zwei 11-er Kämmen gegossen und für ca. 30 min. bis zum vollständigen Erstarren stehen gelassen.

2.6.1.2 Vorbereitung der Proben und Elektrophorese

Jeweils 5-10 µl der DNA-Proben wurden mit einem 3x-Probenpuffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Für die Größenbestimmung der DNA wurden 10 µl Standard (50-1000 bp DNA-Marker, BioWhitaker, USA) verwendet.

Die Gele wurden in die mit 1 x TBE-Puffer und 10 µl Ethidiumbromid befüllte Elektrophorese-Kammer gelegt. Nach dem Auftragen der vorbereiteten DNA-Proben und des

DNA-Standards erfolgte die Elektrophorese bei Raumtemperatur und folgenden Einstellungen: Spannung 120 V, Stromstärke 100 mA, Laufzeit 40 min.

Die Banden wurden mittels eines Durchlichtscanners im Image Master VDS sichtbar gemacht und dann abfotografiert und gespeichert.

2.6.2 Polyacrylamidgel (PAA) -Elektrophorese

2.6.2.1 Herstellung der Gele

Folgende Reagenzien wurden zur Herstellung der Polyacrylamidgele verwendet:

- Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 % (Appligene, Heidelberg)
- 5 x TBE-Puffer
- Glycerin (Roth, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (Merck, Darmstadt)
- TEMED (Serva, Heidelberg)

Das Gießen der Gele erfolgte in vertikalen Gelgießständen. Erst nach vollständiger Polymerisation des 14 % Trenngels wurde direkt auf dieses das 3 % Sammelgel gegossen und für ca. 20 min. stehen gelassen, bis es ebenfalls ausgehärtet war. Durch die Verwendung von Kämmen entstanden in jedem Gel 15 beschickbare Taschen.

14 % Trenngel mit 10 % Glycerin	
A/B 40 %	10,5 ml
5 x TBE	3 ml
H ₂ O	13,3 ml
Glycerin	3 ml
TEMED	0,02 ml
APS 10 %	0,2 ml
Gesamt	30 ml

Tab. 3: Herstellung der PAA-Trenngele

3 % Sammelgel ohne Glycerin	
A/B 40 %	0.37 ml
5 x TBE	0,49 ml
H ₂ O	4,01 ml
TEMED	0,004 ml
APS 10 %	0,03 ml
Gesamt	4,9 ml

Tab. 4: Herstellung der PAA-Sammelgele

2.6.2.2 Vorbereitung der Proben und Elektrophorese

Die DNA-Proben wurden mit 3x-Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Größenbestimmung der DNA erfolgte mit Hilfe eines DNA-Markers (BioWhitaker, USA), von dem pro Spur 500 ng aufgetragen wurden.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur in einer vertikalen Elektrophorese-Kammer, gefüllt mit 0,5 % TBE-Laufpuffer, durchgeführt. Die Spannung betrug konstante 550 V, die Stromstärke 100 mA und die Laufzeit ca. 40 min.

2.6.2.3 Silberfärbung

Die DNA-Banden wurden mit dem DNA Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nachgewiesen. Um ein sauberes, gleichmäßiges Ergebnis zu erzielen, wurde das Gel während des gesamten Färbeprozesses auf einem Schüttler gut durchgemischt.

Zuerst wurde die DNA in einer Lösung aus 25 ml *Fixing Solution* und 100 ml 24 % Ethanol fixiert. Dann folgte die Versilberung in 25 ml *Staining Solution* und 100 ml Wasser. Zur Beseitigung überschüssigen Silbers wurde das Gel anschließend für mind. 1 min. mit reichlich Aqua bidest. gewaschen. Als vierter Schritt folgte die Entwicklung

der DNA-Banden in einer Lösung aus 25 ml *Developing Solution*, 125 µl Natriumthiosulfat, 125 µl Formaldehyd und 100 ml Wasser. In der *Stopping & Preserving Solution* konnte das Gel schließlich für einige Zeit, z.B. bis zur Reamplifikation einzelner Banden, aufbewahrt werden.

Schritt	Lösung	Zeit [min]
1. Fixieren	25 ml <i>Fixing Solution</i> (Benzylsulfonsäure 3,0 Gew.%; Ethanol 24 Vol.%) 100 ml Ethanol (24 Vol.%)	30
2. Versilberung	25 ml <i>Staining Solution</i> (Silbernitrat 1,0 Gew.%; Benzylsulfonsäure 0,35 Gew.%) 100 ml Wasser	30
3. Waschen	Wasser	1
4. Entwicklung	25 ml <i>Developing Solution</i> (Natriumcarbonat 12,5 Gew.%) 125 µl Natriumthiosulfat (2,0 Gew.%) 125 µl Formaldehyd (37 Gew.%) 100 ml Wasser	12
5. Stoppen	25 ml <i>Stopping & Preserving Solution</i> (Essigsäure 5,0 Vol.%; Natriumacetat 25 Gew.%; Glycerol 50 Vol.%) 100 ml Wasser	>30

Tab. 5: Silberfärbung der PAA-Gele

Zum Abfotografieren und Speichern der Polyacrylamidgele wurde, ebenso wie bei den Agarosegelen, der Image Master VDS verwendet.

2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Unter Benutzung der bekannten genomischen DNA-Sequenzen (veröffentlicht in GenBank, National Center for Biotechnology Information – NCBI) wurden geeignete Primer aus dem β -Actin-Gen ausgewählt. Nachdem dieses Gen weder im Genom von Bakterien noch in dem von Pilzen existiert, konnte bereits durch die Wahl der Primer eine diesbezügliche Verfälschung der späteren PCR-Ergebnisse verhindert werden. Die vier Primerpaare wurden dabei so gewählt, dass die entsprechenden Amplikons unterschiedliche Längen aufwiesen: 150, 200, 507 und 763 bp (Basenpaare).

Während die Primer für das Amplifikationsprodukt von 150, 507 und 763 bp Größe an allen Proben angewandt wurden, wurden die Primer für das 200 bp Produkt nur an einzelnen Proben angewandt. Dies erfolgte, da die Amplifikat-Größen von 150 und 200 bp sehr ähnlich sind und somit die Anwendung der 200 bp-Amplifikation keine wesentliche Zusatzinformation (außer der Bestätigung der Amplifikation in Einzelfällen aus Kontrollzwecken) bringen kann.

Primerpaare	Sequenz	Lokalisation
1 β -actin-f2249	5' -TGC CAT CCT GCG TCT G- 3'	Exon 3
1 β -actin-r2381	5' -AAG TCC AGG GCG ACG TAG- 3'	Exon 3
2 Act-3	5' -GTG ATG GAC TCC GGT GAC- 3'	Exon 3
2 Act-4	5' -AGT CCA GGG CGA CGT AG- 3'	Exon 3
3 β -actin-f1657	5' -GTG GCC CGC TAC CTC T- 3'	Exon 2 / Intron 2
3 β -actin-r2146	5' -AGG CGT ACA GGG ATA GCA- 3'	Exon 3
4 β -actin-f1652	5' -GGT GAG TGG CCC GCT AC- 3'	Exon 2 / Intron 2
4 β -actin-r2397	5' -GGC CAT CTC TTG CTC GAA- 3'	Exon 3

Tab. 6: verwendete Primer

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Dieser Reaktionsansatz enthielt je 1 µl Primer (Interactiva, Thermo Hybaid, Ulm), 200 ng DNA-Vorlage, 0,3 µl dNTPs (DNA Polymerization Mix, Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden), 0,4 µl PANScrip Polymerase (PAN Biotech, Aidenbach) und 0,5 bzw. 0,6 µl MgCl₂ (PAN Biotech, Aidenbach) in 2,5 µl eines 10-fach Puffers (PAN Biotech, Aidenbach).

Die PCR-Bedingungen für die verschiedenen Primer wurden zunächst unter Verwendung rezenter DNA (aus Keratinozyten Zelllinie HaCaT) optimiert und schließlich auf die PCR mit aDNA (ancient DNA) übertragen. In der Regel wurden 40 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung des DNA-Doppelstranges fand stets bei 94°C statt und dauerte 30 sec.. Die Parameter für Hybridisierung und Synthese variierten, je nach Länge der amplifizierten DNA und nach Art des Primers:

Primerpaare	MgCl ₂ -Konz.	Hybridisierung	Synthese
1 (150 bp)	1 mM (0,5 µl)	62°C, 30 sec.	72°C, 30 sec.
2 (200 bp)	1,2 mM (0,6 µl)	60°C, 30 sec.	72°C, 30 sec.
3 (507 bp)	1,2 mM (0,6 µl)	60°C, 30 sec.	72°C, 60 sec.
4 (763 bp)	1,2 mM (0,6 µl)	62°C, 30 sec.	72°C, 60 sec.

Tab. 7: PCR-Bedingungen der verwendeten Primer

Negativ-Kontrollen wurden in gleicher Weise, jedoch ohne Zugabe von DNA-Template durchgeführt. Der Erfolg der Amplifikation wurde durch Auftragen von 5-10 µl des Gesamtansatzes auf Agarose- bzw. Polyacrylamidgelen überprüft.

2.8 Reamplifikation (siehe Abb. 1 - 4)

Bei nicht ganz eindeutigen Ergebnissen auf den Gelen wurde eine Reamplifikation der entsprechenden Banden durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Banden mit sterilen Skalpellklingen (Bayha, Tuttlingen) aus dem gut gewässerten Polyacrylamidgel herausgeschnitten und in 70 μ l 0,1 % Triton/Tris-Puffer gelegt. Dann wurden die Proben für 10 min. bei 96°C im Thermomixer geschüttelt. Jeweils 4 μ l der Lösungen wurden schließlich in die PCR, die nach denselben Bedingungen wie unter 2.7 beschrieben durchgeführt wurde, eingesetzt. Meist genügten jedoch 35 Zyklen für das Erzielen eindeutiger Ergebnisse.

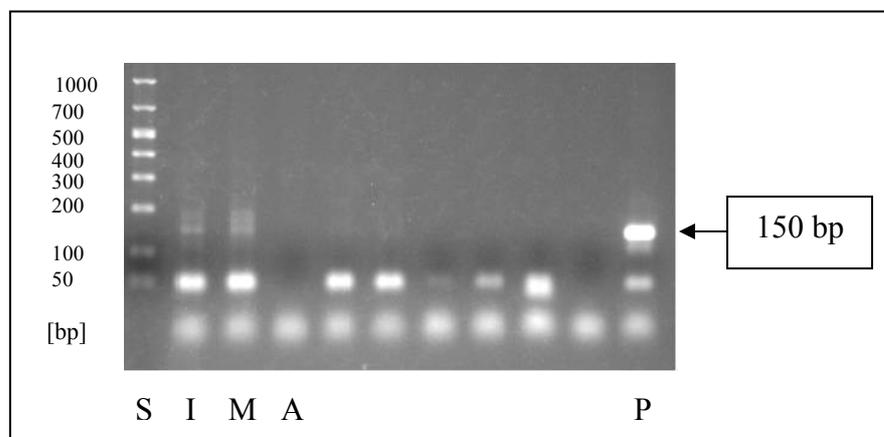


Abb. 1: Agarose-Gel von Knochen #13 E1

I (Innen) und M (Mitte) fraglich positiv



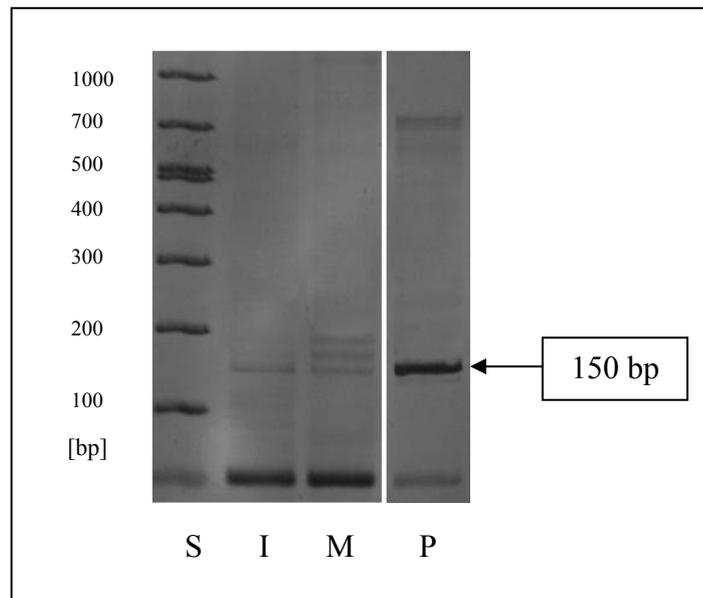


Abb. 2: PAA-Gel von Knochen #13 E1

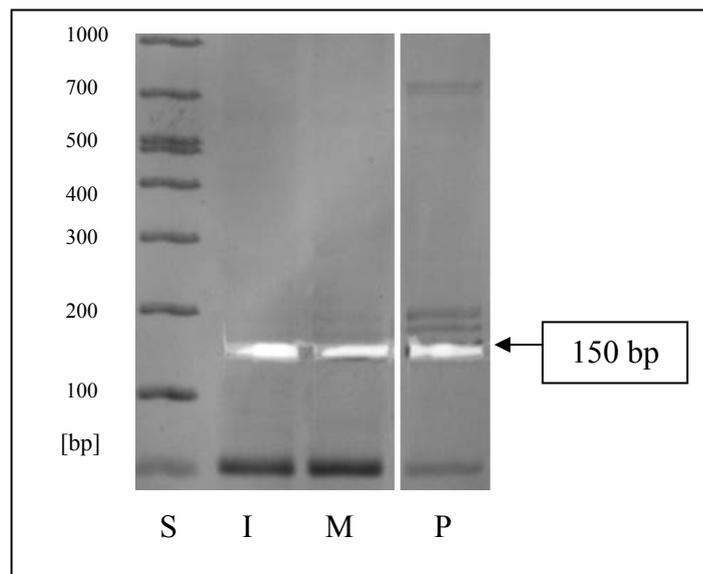


Abb. 3: PAA-Gel von Knochen #13 E1 mit ausgeschnittenen Banden

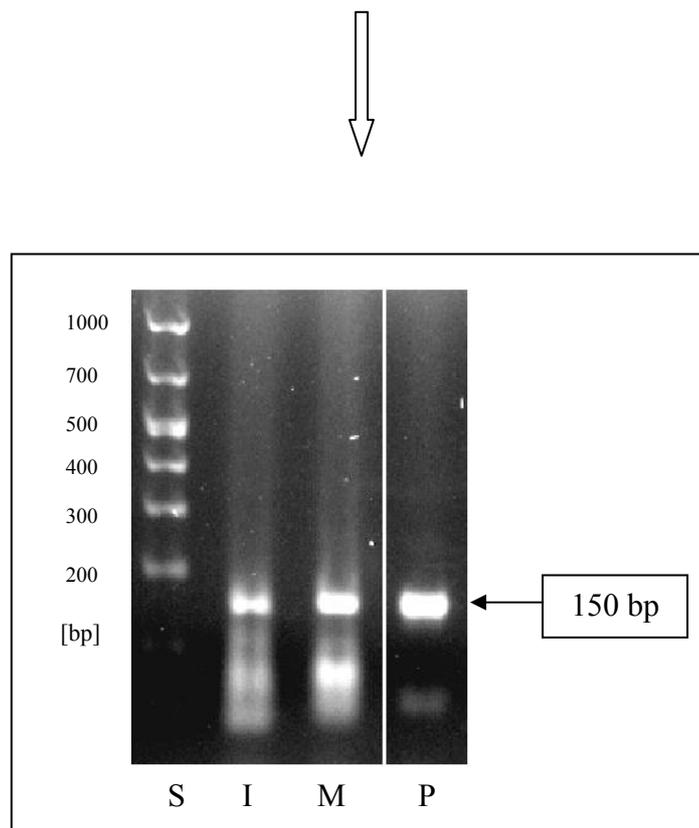


Abb. 4: Agarose-Gel von Knochen #13 E1 (Reamplifikation)
Bestätigung der positiven Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Bevor mit der Untersuchung der aDNA (ancient DNA) begonnen werden konnte, wurden zunächst die PCR-Bedingungen für die verschiedenen Primerpaare optimiert. Dies wurde ganz überwiegend an rezenter DNA (Keratinocyten Zelllinie HaCaT), vereinzelt auch an alter DNA (#12 E1) durchgeführt.

Um die geeignete Hybridisierungs-Temperatur zu ermitteln, wurde diese innerhalb der für die jeweiligen Primer angegebenen Temperaturspanne variiert. Es zeigte sich, dass bei den Primerpaaren 2 und 3 bei 60°C, bei den Primerpaaren 1 und 4 hingegen bei 62°C die besten und eindeutigsten Ergebnisse erzielt werden konnten. Beispielhaft sei dies an Hand von Primerpaar 4 demonstriert: Die PCR wurde mit 200 ng DNA-Vorlage (HaCaT bzw. #12 E1) und einer MgCl₂-Konzentration von 1,2 mM durchgeführt, die Hybridisierungs-Temperatur lag bei 62°C bzw. bei 60°C. Die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte war bei 62°C deutlich größer.

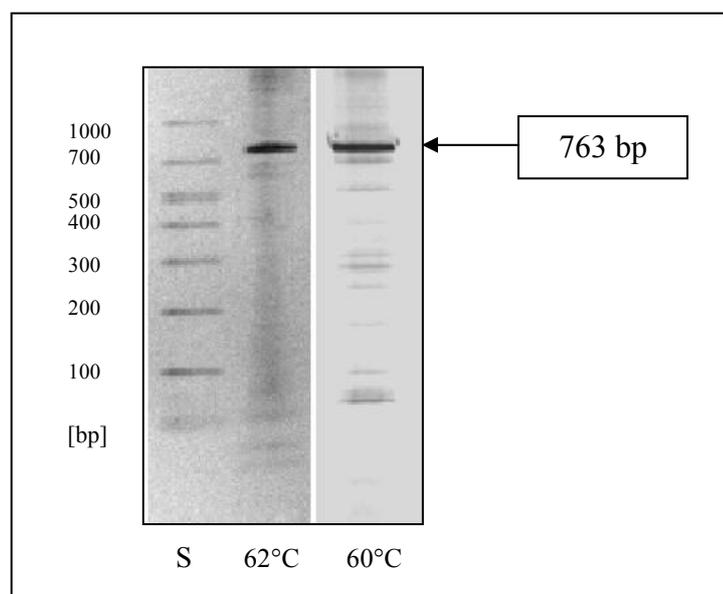


Abb. 5: PAA-Gel von rezenter DNA (HaCaT)
Hybridisierungs-Temperatur 62°C bzw. 60°C

In derselben Weise wurde bei der Bestimmung der optimalen MgCl₂-Konzentration verfahren, welche die Spezifität und Ausbeute der PCR ebenfalls erheblich beeinflussen kann. Die in Abb. 38 dargestellte PCR (Primerpaar 1) wurde mit 200 ng HaCaT-DNA bei einer Hybridisierungs-Temperatur von 62°C durchgeführt. Die MgCl₂-Konzentration variierte zwischen 1,4 und 1,0 mM. Dabei ist zu erkennen, dass eine optimale Bande bei einer Konzentration von 1,0 mM erscheint.

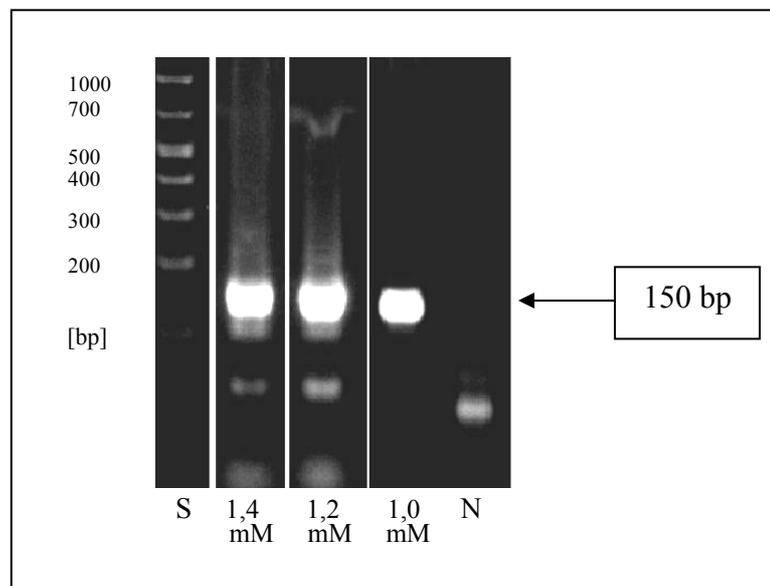


Abb.6: Agarose-Gel von rezenter DNA (HaCaT)
MgCl₂-Konzentration 1,4 mM, 1,2 mM bzw. 1,0 mM

Die Polymerisation erfolgte immer bei 72°C. Bei den Primerpaaren 1 und 2 genügten für diesen Schritt 30 sec., bei den Primerpaaren 3 und 4 wurde die Syntheszeit auf Grund der längeren Amplikons auf 60 sec. verlängert. Somit wurde sichergestellt, dass die Polymerase alle Stränge zu Ende synthetisieren konnte.

Den letzten zu optimierenden Parameter für die PCR stellt die eingesetzte DNA-Menge dar. Zu diesem Zweck wurde eine PCR mit konstanter MgCl₂-Konzentration (1,2 mM) und konstanter Hybridisierungs-Temperatur (60°C), aber unterschiedlichen DNA-Konzentrationen (50-250 ng HaCaT) durchgeführt. Hierbei erwies sich eine DNA-

Menge von 200 ng als optimal. Die Intensität der betreffenden Bande war am größten, ohne dass die Anzahl an unspezifischen Amplikons zugenommen hatte.

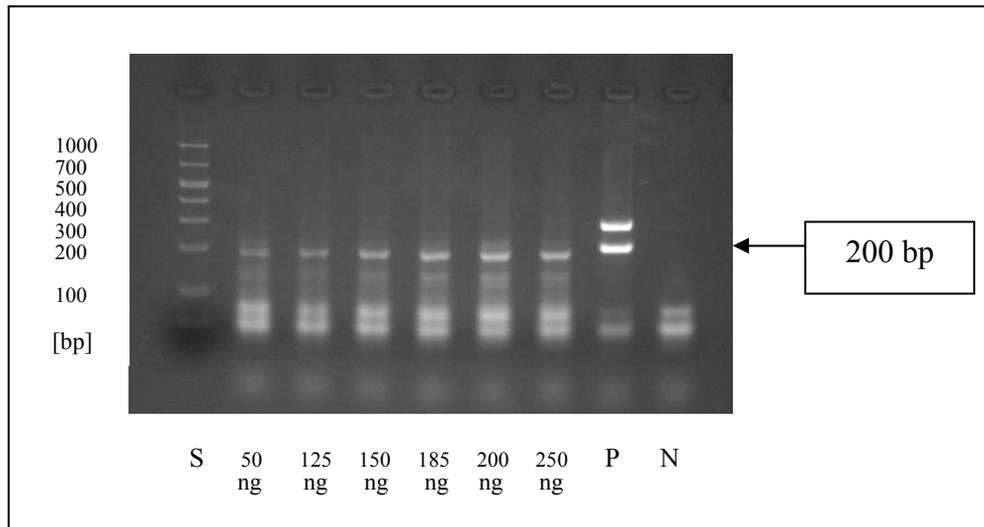


Abb.7: Agarose-Gel von rezenter DNA (HaCaT)

DNA-Menge (Template) zwischen 50 ng und 250 ng

3.2 Quantitative DNA-Bestimmung

Die photometrische Quantifizierung der DNA-Lösungen mit dem RNA/DNA-Calculator ergab, dass die äußeren Knochenabschnitte tendenziell die *höchsten*, die mittleren Abschnitte die **niedrigsten** Konzentrationen an DNA aufwiesen. Bei 8 von 14 Proben konnten im äußeren Knochensegment die größten Werte gemessen werden, wohingegen bei 9 dieser 14 Proben das mittlere Segment die geringste DNA-Menge enthielt. Auch lag die durchschnittlich gemessene DNA-Konzentration (Mittelwert) außen mit 180,4 ng/μl deutlich über der in der Mitte (121,6 ng/μl) und innen (142,3 ng/μl).

Liegezeit	Knochen	DNA Innen [ng/μl]	DNA Mitte [ng/μl]	DNA Außen [ng/μl]
1 Jahr	#11 E1	31,5	25,9	<i>51,8</i>
4 Jahre	Exhum. E2	56,0	43,4	<i>163,1</i>
8 Jahre	#12 E1	56,0	61,6	<i>86,1</i>
8 Jahre	#12 E2	68,6	<i>206,5</i>	162,4
8 ½ Jahre	#3 E2	338,8	120,4	309,4
15 Jahre	#9 E1	<i>71,4</i>	49,0	49,7
15 Jahre	#9 E2	224,7	<i>251,3</i>	123,2
18 Jahre	#19 E2	268,1	175,7	<i>512,4</i>
21 Jahre	#10 E2	139,9	86,8	<i>198,0</i>
23 Jahre	#37 E2	74,2	67,9	<i>205,6</i>
30 Jahre	#8 E2	209,3	<i>312,9</i>	140,0
34 Jahre	#13 E1	<i>100,8</i>	<i>100,8</i>	83,3
34 Jahre	#13 E2	271,6	157,5	<i>338,8</i>
200-600 Jahre	R/L 27 E2	81,2	42,7	<i>101,5</i>

Tab. 8: photometrisch bestimmte DNA-Mengen (ng/μl) aller untersuchter Knochen
 Fettdruck = niedrigster Wert, Kursivdruck = höchster Wert

3.3 Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden

3.3.1 Quantitative DNA-Bestimmung

Als sich nach der Optimierung der PCR-Bedingungen herausstellte, dass für jede PCR eine DNA-Menge von 200 ng benötigt wurde, war bald klar, dass die Extraktionsmethode 1 schnell an ihre Grenzen stoßen würde. Sie war zu uneffektiv und

viele der extrahierten Knochenproben waren auf Grund der zu geringen DNA-Konzentrationen für weitere Untersuchungen ungeeignet. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit Extraktionsmethode 2 verglichen, die sich als wesentlich effektiver erwies. Ein direkter Vergleich der beiden Methoden an Hand von 3 Fällen zeigt eine eindeutig bessere Ausbeute bei Methode 2 für alle gemessenen Werten (#12 I/M/A, #9 I/M/A, #13 I/M/A).

Extraktionsmethode	Knochen	DNA Innen [ng/μl]	DNA Mitte [ng/μl]	DNA Außen [ng/μl]
E1	#12	56,0	61,6	86,1
E2	#12	68,6	206,5	162,4
E1	#9	71,4	49,0	49,7
E2	#9	224,7	251,3	123,2
E1	#13	100,8	100,8	83,3
E2	#13	271,6	157,5	338,8

Tab. 9: photometrisch bestimmte DNA-Mengen (ng/μl) der nach Methode 1 und 2 extrahierten Knochen

3.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Ferner zeigte sich, dass bei den PCRs mit DNA aus Extraktionsmethode 2 unter Verwendung identischer DNA-Konzentrationen (200 ng) etwas bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als mit DNA aus Extraktionsmethode 1. So war beispielsweise mit Methode 2 im äußeren Drittel der Knochen #9 und #13 die Amplifikation des 150-bp-Fragments, im Knochen #13 zusätzlich die des 507-bp-Fragments möglich. Bei Methode 1 hingegen blieb der äußere Bereich der beiden Knochen immer negativ.

Extraktions- methode	Knochen	150 bp			507 bp			763 bp		
		I	M	A	I	M	A	I	M	A
E1	#12	+	+	+	-	+	-	-	+	-
E2	#12	+	+	+	+	+	-	+	-	-
E1	#9	-	+	-	-	+	-	-	-	-
E2	#9	-	+	+	-	+	-	-	-	-
E1	#13	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E2	#13	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Tab. 10: PCR-Ergebnisse der nach Methode 1 und 2 extrahierten Knochen

+ positiv, - negativ

Bei den beiden Knochen #37 und #8 waren die gesamten PCRs auch nach Extraktionsmethode 2 noch gehemmt. Deshalb erfolgte die Dialyse des betreffenden Materials durch Methode 3. Auf diese Weise konnte zumindest bei #37 das 150-bp-Fragment nachgewiesen werden.

Extraktions- methode	Knochen	150 bp			507 bp			763 bp		
		I	M	A	I	M	A	I	M	A
E2	#37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	#37 (dial.)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E2	#8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	#8 (dial.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 11: PCR-Ergebnisse der nach Methode 2 und 3 extrahierten Knochen

+ positiv, - negativ

3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.4.1 Extraktionsmethode 1

Insgesamt 4 der nach Methode 1 extrahierten Knochenproben enthielten ausreichend DNA für die weiteren Untersuchungen durch die verschiedenen PCRs. Hierbei zeigte sich, dass sich im mittleren Knochenabschnitt wesentlich häufiger spezifische Amplikons nachweisen ließen als im inneren und äußeren Drittel. Besonders deutlich ist dieses Ergebnis beim 8 Jahre alten Knochen (#12 E1) sowie beim 15 Jahre alten Knochen (#9 E1) zu sehen.

Außerdem zeichneten sich Unterschiede der erhaltenen PCR-Produkte in Abhängigkeit von der Liegezeit der Knochen ab. Während das 150-bp-Fragment des β -Actin-Gens in allen vier Proben nachgewiesen werden konnte, war eine spezifische Bande des 507-bp-Fragments nur bei den 1, 8 und 15 Jahre alten Knochen zu erkennen. Das 763 bp große Amplikon war schließlich nur noch bei den zwei jüngsten Knochen (#11 E1, #12 E1) positiv.

Liegezeit	Knochen	150 bp			507 bp			763 bp		
		I	M	A	I	M	A	I	M	A
1 Jahr	#11 E1.	+	+	+	-	-	+	-	-	+
8 Jahre	#12 E1	+	+	+	-	+	-	-	+	-
15 Jahre	#9 E1	-	+	-	-	+	-	-	-	-
34 Jahre	#13 E1	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 12: PCR-Ergebnisse (Extraktionsmethode 1)

+ positiv, - negativ

Knochen #11 E1 (1 Jahr):

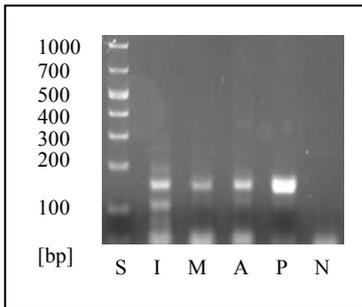


Abb. 8: 150 bp

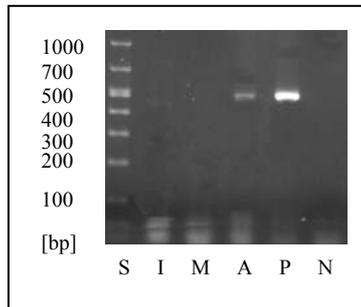


Abb. 9: 507 bp

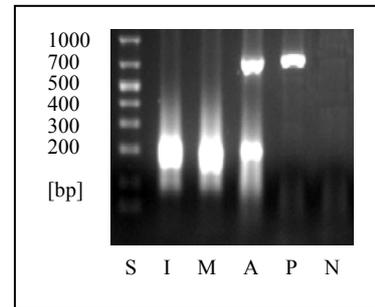


Abb. 10: 763 bp

Knochen #12 E1 (8 Jahre):

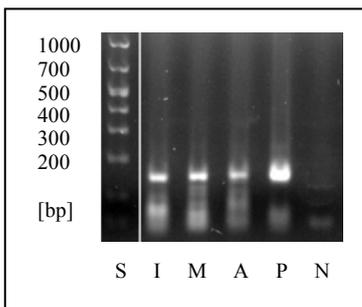


Abb. 11: 150 bp

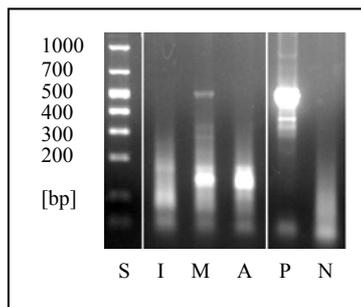


Abb. 12: 507 bp

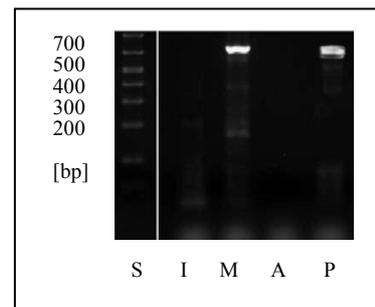


Abb. 13: 763 bp

Knochen #12 E1 (8 Jahre):

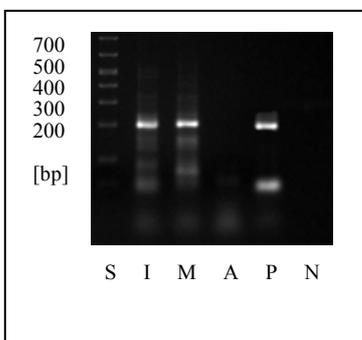


Abb. 14: 200 bp

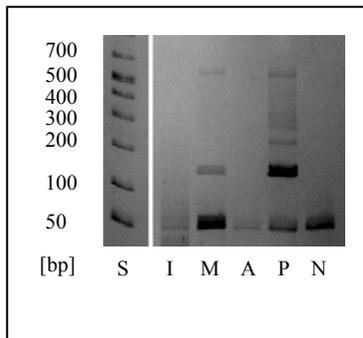
Knochen #9 E1 (15 Jahre):

Abb. 15: 150 bp

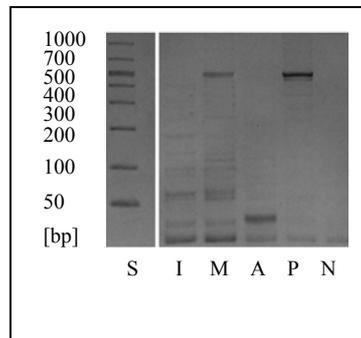


Abb. 16: 507 bp

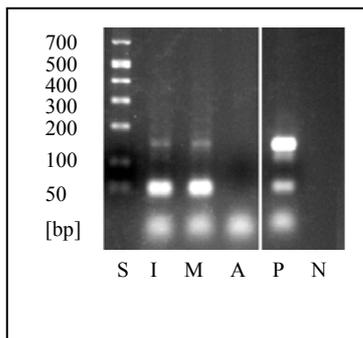
Knochen #13 E1 (34 Jahre):

Abb. 17: 150 bp

3.4.2 Extraktionsmethoden 2 + 3

Die mit Extraktionsmethode 1 erzielten Ergebnisse konnten mit den Extraktionsmethoden 2 bzw. 3 ebenfalls bestätigt werden. Auch hier waren die spezifischen PCR-Produkte überwiegend im mittleren Knochenabschnitt zu finden. Am deutlichsten ist dieses Ergebnis bei der Amplifikation des 150-bp-Fragments zu erkennen.

Ferner konnte auch hier die Abhängigkeit der amplifizierbaren DNA-Produkte von der Liegezeit des jeweiligen Knochens belegt werden. Das 150-bp-Fragment war mit Ausnahme des 30- sowie 200-600-jährigen Knochens in allen Proben nachweisbar, wohingegen das 507er Fragment nur mehr bis zu einer Liegezeit von 15 Jahren amplifiziert werden konnte. Eine Ausnahme bildete in diesem Fall Knochen #13 E2, dessen äußerer Bereich im Agarosegel bei 507 bp eine positive Bande aufwies. Mit dem Primerpaar 4 (763 bp) waren lediglich bei den beiden jüngsten Knochen (Exhum. E2, #12 E2) spezifische PCR-Produkte nachweisbar.

Liegezeit	Knochen	150 bp			507 bp			763 bp		
		I	M	A	I	M	A	I	M	A
4 Jahre	Exhum. E2	+	+	+	+	+	+	-	+	+
8 Jahre	#12 E2	+	+	+	+	+	-	+	-	-
8 ½ Jahre	#3 E2	+	+	+	+	-	+	-	-	-
15 Jahre	#9 E2	-	+	+	-	+	-	-	-	-
18 Jahre	#19 E2	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21 Jahre	#10 E2	-	+	-	-	-	-	-	-	-
23 Jahre	#37 E3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
30 Jahre	#8 E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34 Jahre	#13 E2	+	+	+	-	-	+	-	-	-
200-600 Jahre	R/L 27 E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 13: PCR-Ergebnisse (Extraktionsmethoden 2 und 3)

+ positiv, - negativ

Knochen Exhum. E2 (4 Jahre):

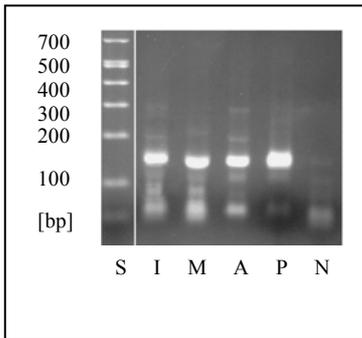


Abb. 18: 150 bp

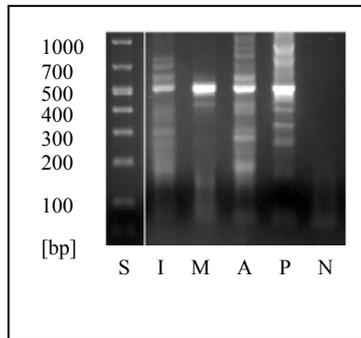


Abb. 19: 507 bp

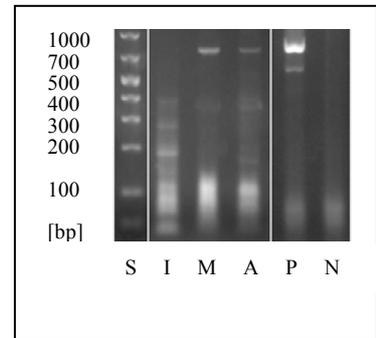


Abb. 20: 763 bp

Knochen #12 E2 (8 Jahre):

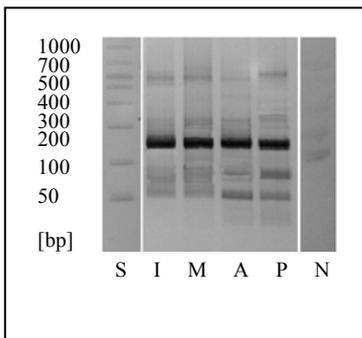


Abb. 21: 150 bp

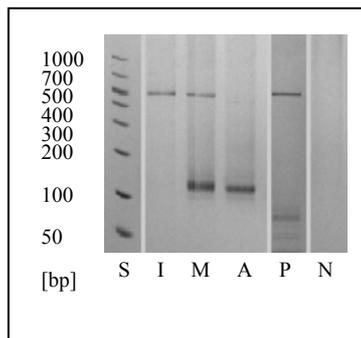


Abb. 22: 507 bp

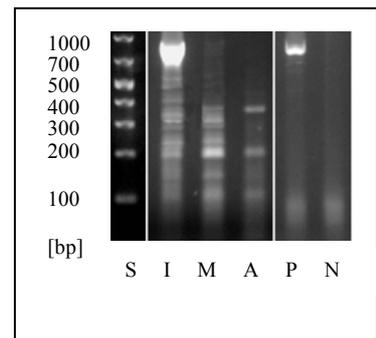


Abb. 23: 763 bp

Knochen #3 E2 (8 ½ Jahre):

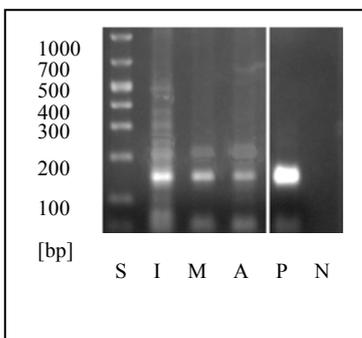


Abb. 24: 150 bp

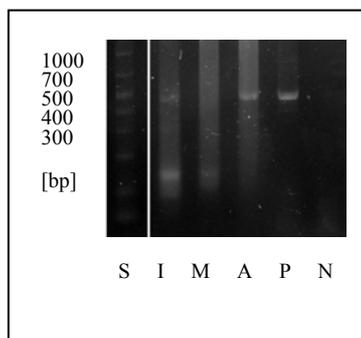


Abb. 25: 507 bp

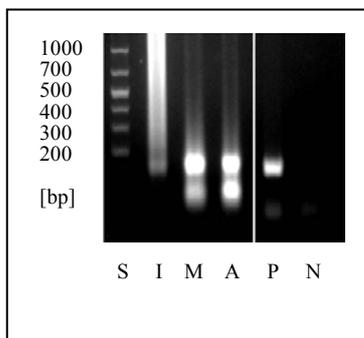
Knochen #9 E2 (15 Jahre):

Abb. 26: 150 bp

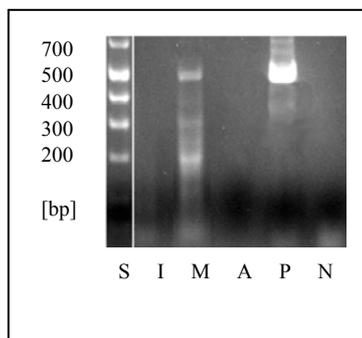


Abb. 27: 507 bp

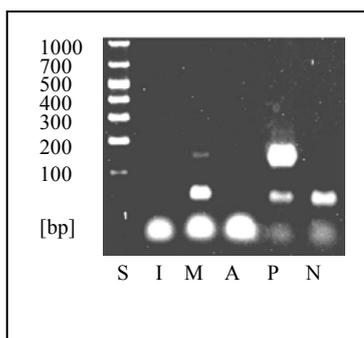
Knochen #19 E2 (18 Jahre):

Abb. 28: 150 bp

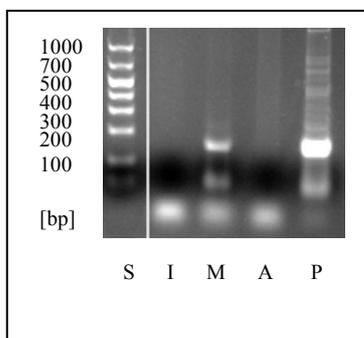
Knochen #10 E2 (21 Jahre):

Abb. 29: 150 bp

Knochen #37 E3 (23 Jahre):

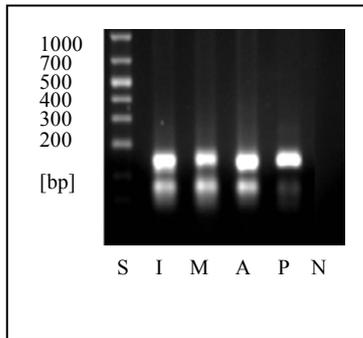


Abb. 30: 150 bp

Knochen #13 E2 (34 Jahre):

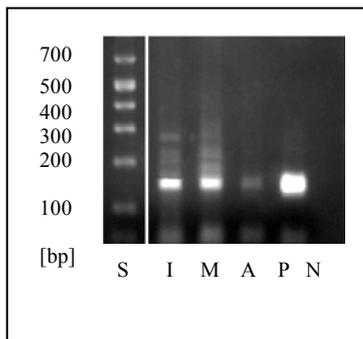


Abb. 31: 150 bp

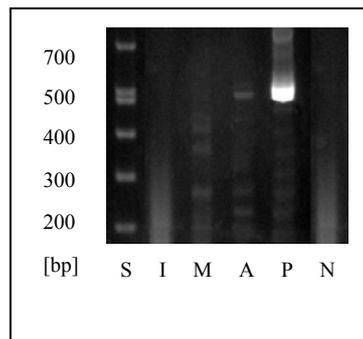


Abb. 32: 507 bp

4. Diskussion

4.1 Zielsetzung und allgemeine Problematik

Die Zielsetzung dieser Doktorarbeit besteht darin, mit Hilfe von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden einen neuen Lösungsansatz zur Problematik der Liegezeitbestimmung von Knochenfunden zu entwickeln. Die dabei zugrundeliegende Idee ist die, dass humane DNA im Knochenmaterial nach dem Tode nicht stabil erhalten bleibt, sondern durch autolytische Prozesse und Dekomposition nach und nach degradiert wird, wobei die Fragmentierung der DNA einem kompletten Verlust vorangeht. Diese Annahme erscheint nicht unbegründet, da frühere Untersuchungen ein „Überleben“ von ancient DNA bis zu rund 50.000 Jahren Alter angeben (Hofreiter et al., 2001) – so wurde beispielsweise erfolgreich authentische aDNA von Neandertalern analysiert (Krings et al., 1997). Diese Untersuchungen hatten zudem zeigen können, dass aDNA-Fragmente bis zu einer geschätzten Größe von 200 kb selbst in Biomaterial von mehreren tausend Jahren Alter noch vorhanden sind (Haack, 1998). Daten über den Abbau von hochmolekularer DNA im Rahmen von Dekompositionsvorgängen sind demgegenüber noch sehr spärlich. Demzufolge ist es also vorstellbar, über die Möglichkeit der Amplifikation verschieden langer, genau definierter DNA-Fragmente Aussagen über das postmortale Liegealter eines Knochens treffen zu können. Dem wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von vier verschiedenen Primerpaaren aus dem β -Actin-Gen mittels Polymerase-Ketten-Reaktionen nachgegangen. Die dabei ausgewählten Amplikons wiesen Längen von 150 bp, 200 bp, 507 bp sowie 763 bp auf, decken also einen Bereich von DNA-Fragmenten ab, wie er auf Grund der erwähnten Berichte innerhalb eines Zeitraumes von wenigen Jahren post mortem im Zuge der DNA-Degradation einem fassbaren Abbau unterlegen sein kann.

4.2 Methodische Vorarbeiten und Vorversuche

4.2.1 Analytik von aDNA und Vermeidung von Kontamination durch rezente DNA

Bevor die oben genannte Fragestellung untersucht werden konnte, mussten zunächst grundlegende Überlegungen sowie methodische Vorversuche zur Adaptierung der notwendigen Methodik durchgeführt werden.

Die zumindest teilweise degradierte aDNA stellt eine grundlegende Problematik in der Analytik dar: in Folge jahrelanger Einwirkung von Umwelteinflüssen ist die DNA meist fragmentiert und nur schwer für molekularbiologische Untersuchungen brauchbar. Zudem ist ihre Konzentration oft so gering, dass relativ große Mengen an „Rohmaterial“ und eine sehr effiziente Extraktionsmethode nötig sind, um später überhaupt genug Ausgangsmaterial für die PCR zur Verfügung zu haben.

Ein weiteres großes Problem bei der Analyse von aDNA ist die Kontamination durch rezente DNA, welche durch die im Labor arbeitenden Personen in die Ansätze eingebracht werden kann. Die rezente DNA ist besser erhalten und kann deshalb im Rahmen der PCR-Amplifikation leichter vervielfältigt werden und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen. Deshalb sind bei allen Arbeitsschritten entsprechende Sicherheitsmassnahmen (zusammengefasst unter dem Begriff des „sterilen Arbeitens“) zu beachten. Dies beginnt bei der Gewinnung des Ausgangsmaterials (z.B. Exhumierung von Knochen) und geht über die Extraktion der DNA bis hin zur Durchführung der PCR. Notwendig ist zudem der konsequente Einsatz von Leerproben bei der Extraktion ebenso wie von Negativkontrollen bei der PCR. Diesen grundlegenden Voraussetzungen wurde in dieser Arbeit Rechnung getragen, da die gesamte Aufarbeitung des Materials unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde. Die Gefahr der „Verschleppung“ durch die rezente Kontroll-DNA (aus der Keratinozyten Zelllinie HaCaT) wurde durch eine räumliche Trennung in der Aufarbeitung rezenter von ancient DNA minimiert. An Hand der Ergebnisse ist es zudem auf Grund der starken Fragmentierung sehr plausibel, dass tatsächlich nur die aDNA erfasst wurde.

Die Untersuchung von Knochen als Quelle für die DNA erfordert zusätzlich zur Kontaminations-Vermeidung eine gründliche Reinigung bzw. Entfernung der Oberfläche. MacHugh et al. (2000) schlugen zu diesem Zweck z.B. den Einsatz von Sandpapier oder Sandstrahler vor, gefolgt von einer kurzwelligigen UV-Bestrahlung. Die letztgenannte Technik wurde generell in der Vergangenheit von zahlreichen Autoren angewandt, unter anderem auch schon 1988 von Perry et al.. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein etwas einfacher durchzuführendes, aber nicht minder effektives Verfahren angewandt, bei dem zunächst die Oberfläche des Knochens mit 0,5-prozentigem Natriumhypochlorit gereinigt und anschließend die oberste Schicht abgefräst wurde (Haas et al., 2000b). Im Anschluss daran erfolgte die Zerkleinerung zu Knochenmehl unter sterilen Bedingungen (d.h. Tragen von Handschuhen, Mundschutz und Schutzkleidung; Verwendung von autoklavierten Geräten und Materialien; strikte räumliche Trennung der einzelnen Arbeitsschritte).

4.2.2 Untersuchungen zu verschiedenen DNA-Extraktionsverfahren aus Knochen

Von entscheidender Bedeutung bei der Untersuchung von ancient DNA ist, ein möglichst effizientes Extraktionsverfahren anzuwenden, ist doch die Menge an DNA auf Grund der Degradation sehr gering. Für die Extraktion der DNA stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, wobei sich bis heute besonders die Phenol/Chloroform-Methode (Hagelberg, Clegg, 1991), die Silikat-Methode (Boom et al., 1990; Höss, Pääbo, 1993) sowie eine Kombination aus beiden (Richards et al., 1995) in den bisherigen Untersuchungen zu aDNA durchgesetzt haben. Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere Verfahren, deren Zahl zudem ständig zunimmt. Bisherige vergleichende Artikel zeigen auch zwischen diesen Extraktionsmethoden unterschiedliche Extraktionseffizienz. So wiesen beispielsweise Cattaneo et al. 1997 an bis zu 43 Jahre alten Knochen- und Blutproben nach, dass die von ihnen getestete „glass-milk-Methode“ effizienter ist als die „Natriumacetat-Methode“, die ihrerseits wiederum besser funktioniert als die „magnetic-beads-Methode“.

Zudem wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von kommerziellen Extraktions-Kits angeboten. Das Prinzip der Extraktion ist jedoch bei allen ähnlich. Eine gute Übersicht

über einige dieser Produkte haben MacHugh et al. im Jahre 2000 veröffentlicht. Sie selbst halten das nach Yang et al. (1998) modifizierte Extraktionsverfahren von QIAquick für das geeignetste im Umgang mit aDNA, stellen aber auch klar, dass mit anderen Methoden durchaus erfolgreich gearbeitet werden kann. Letztlich muss die Entscheidung für oder gegen ein bestimmtes Produkt immer individuell, abhängig von der Zielsetzung des jeweiligen Vorhabens getroffen werden.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst die Extraktionsmethode nach Boom et al. (1990) in der Modifikation von Haas et al. (2000b) angewandt. Dabei wird die DNA durch Bindung an Silikat-haltige Diatomeen isoliert und gereinigt. Im ersten Teil der Untersuchungen konnte jedoch über photometrische DNA-Messungen festgestellt werden, dass diese Methode nicht sehr effizient ist. Deshalb wurden zwei weitere Verfahren zunächst getestet. Das erste Verfahren basiert auf dem kommerziellen First-DNA Kit von GEN-IAL. Diese Extraktionsmethode erwies sich als deutlich erfolgreicher und ergab sowohl quantitativ als auch qualitativ hochwertigere DNA-Extrakte. So ließ sich an Hand photometrischer Messungen feststellen, dass die Ausbeute der DNA nicht nur größer ($\text{ng}/\mu\text{l}$), sondern deren Qualität auch besser ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \approx 1,8$) war. Letzteres bestätigte sich ebenfalls bei der Durchführung der PCRs. Sie führten jetzt unter Verwendung identischer DNA-Konzentrationen und identischer PCR-Bedingungen deutlich häufiger zu positiven Amplifikationen als früher. Lediglich bei zwei der untersuchten Knochen war noch eine nachträgliche Dialyse der DNA-Lösung nötig. Es wurden daraufhin alle Untersuchungen mit diesem Verfahren vorgenommen. Dementsprechend konnte die Feststellung von Cattaneo et al. (1997) bestätigt werden, dass die verwendete Extraktionsmethode einen signifikanten Einfluss auf die PCR-Ergebnisse hat.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der unabhängig von der Menge der extrahierten DNA die Ergebnisse einer PCR stark beeinflussen kann, ist die unterschiedliche Fähigkeit der einzelnen Methoden zur wirksamen Eliminierung von PCR-Inhibitoren, die zumeist als Hemmstoffe der Polymerase wirken. Dabei sind nicht-ionische Detergentien wie z.B. das von uns gebrauchte Triton X nicht so entscheidend, da sie die PCR bis zu einer Konzentration von 5% im allgemeinen nicht hemmen. Ionische Detergentien oder

Enzyme wie Proteinase K hingegen toleriert eine PCR nur in extrem niedrigen Konzentrationen, da die Taq-Polymerase gegen Proteasen empfindlich ist. Diese Stoffe müssen daher vollständig aus der DNA-Lösung entfernt oder wenigstens inaktiviert werden. Ähnliches gilt für EDTA, für eiweißhaltige Verunreinigungen des Knochens sowie für restliche Phenolspuren aus eventuell durchgeführten Phenolextraktionen (Newton, Graham, 1994).

Auf Grund der dargelegten Unterschiede wird verständlich, warum nicht alle Verfahren zur DNA-Extraktion für alle Sequenzen gleich gut geeignet sein können (Cattaneo et al., 1997). Vielmehr gilt es, die Auswahl der Extraktionsmethode einerseits auf die Art und das Alter des Untersuchungsmaterials und andererseits auf die zu amplifizierende Gensequenz abzustimmen. Die genannten Umstände zeigen, dass dies schwierig und mit einem großen Zeitaufwand verbunden sein kann.

4.2.3 Optimierung der PCR-Bedingungen

Trotz der außerordentlichen Sensitivität und Leistungsfähigkeit der PCR-Technik, die den Nachweis minimaler Mengen an DNA erlaubt, muss im Umgang mit ancient DNA eine Optimierung der Reaktionsbedingungen angestrebt werden. Diese kann zumeist nur durch selektive Variation einzelner Parameter erfolgen. Dabei empfiehlt es sich, anfangs v.a. bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen für die gewählten Primerpaare (sofern nicht schon Daten vorab aus anderen Untersuchungen verfügbar sind) mit rezenter DNA zu arbeiten, da in der Regel bis zur Etablierung einer PCR zahlreiche Probedurchläufe nötig sind, wodurch viel DNA verloren geht. Dies spielt vor allem dann eine Rolle, wenn die zu untersuchende aDNA entweder sehr rar oder aus anderen Gründen sehr wertvoll ist. In dieser Arbeit wurde für die Optimierung der PCR-Bedingungen überwiegend rezentes Material (Keratinocyten Zelllinie HaCaT) verwendet, gelegentlich wurde aber auch schon mit aDNA (#12 E1) gearbeitet.

Ein zweiter wichtiger Punkt für die erfolgreiche Anwendung der PCR ist die sorgfältige Auswahl geeigneter Primer. In der vorliegenden Arbeit wurden vier Primerpaare aus dem β -Actin-Gen verwendet. Nachdem dieses Gen für Menschen spezifisch ist, können auf diese Weise bereits falsch positive PCR-Ergebnisse auf Grund bakterieller oder Pilz-DNA vermieden werden. Ferner sollten die beiden kombinierten Primer eine ähnliche Schmelztemperatur T_m besitzen. Für deren Berechnung existieren verschiedene Formeln, die unter anderem den Guanin-Cytosin-Gehalt (Optimum $< 50\%$) und die Länge des Primers (Optimum ≈ 23 Nucleotide) berücksichtigen (MacHugh et al., 2000; Newton, Graham, 1994). Die geeignete Bindungstemperatur der Primer lässt sich allerdings nur in etwa aus der T_m ableiten und liegt meist einige $^{\circ}\text{C}$ darüber, so dass in der Regel eine experimentelle Abklärung notwendig ist.

Ähnlich wird bei der Optimierung der für eine PCR benötigten DNA-Menge (Template) verfahren. Auch hier werden verschiedene PCRs durchgeführt und der gesuchte Wert so lange verändert, bis ein optimales Ergebnis vorliegt. Üblicherweise werden bei den Optimierungsversuchen DNA-Mengen eingesetzt, die für klonierte Matrizen unter einem Nanogramm und für genomische DNA, wie in unserem Fall, unter einem Mikrogramm liegen (Newton, Graham, 1994). Theoretisch reicht zwar schon ein einziges Molekül einer Matrize aus, um mit Hilfe einer PCR vervielfältigt zu werden, doch sollte berücksichtigt werden, dass hierbei die Gefahr von Verunreinigungen extrem hoch ist. Generell muss versucht werden, einen Kompromiss zwischen ausreichender Spezifität auf der einen Seite und maximaler Intensität auf der anderen Seite zu erreichen. In dieser Absicht wurden in der vorliegenden Arbeit PCRs mit sechs verschiedenen DNA-Mengen zwischen 50 und 250 ng in einem Gesamtreaktionsvolumen von jeweils 25 μl durchgeführt. Dabei hat sich die Verwendung von 200 ng als am besten erwiesen. Allerdings kann sich bei veränderten Fragestellungen, bei anderen Primern oder vor allem bei mehr oder weniger degradierter DNA ein davon abweichender Wert als besser geeignet herausstellen. So sind auch die entsprechenden Angaben in der Literatur keineswegs einheitlich und variieren zwischen 5 ng (z.B. Lutz et al., 1996) und 500 ng (z.B. Fisher et al., 1993).

Der letzte und vielleicht sogar der sensitivste Parameter einer PCR, den es zu optimieren gilt, ist die MgCl_2 -Konzentration. Sie kann die Spezifität und Ausbeute einer PCR in ganz erheblichem Maße beeinflussen. Mg^{2+} -Ionen bilden zusammen mit dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Zusätzlich stimulieren sie die Polymerasenaktivität und erhöhen die Schmelztemperatur der Primer. In aller Regel verringert sich bei einer zu niedrigen MgCl_2 -Konzentration die Ausbeute, während überschüssige Mg^{2+} -Ionen die Bildung unspezifischer Produkte fördern. Normalerweise sind Konzentrationen von 1,0 bis 1,5 mM optimal. Daher beginnt man üblicherweise die Austestung der günstigsten MgCl_2 -Menge innerhalb dieses Bereiches. Nur in äußerst seltenen Fällen sind höhere oder niedrigere Werte nötig (Newton, Graham, 1994). Im Laufe unserer Versuche hat sich für Primerpaar 1 (150 bp) eine MgCl_2 -Endkonzentration im Reaktionsansatz von 1,0 mM als ideal herausgestellt, während bei den Primerpaaren 2 (200 bp), 3 (507 bp) und 4 (763 bp) ein etwas höherer Wert von 1,2 mM besser geeignet war. Ähnliche Angaben zur MgCl_2 -Konzentration finden sich auch in der Literatur. Am häufigsten taucht hier ein MgCl_2 -Wert von 1,5 mM auf (z.B. Evison et al., 1997).

4.3 Quantitative DNA-Bestimmung

Zunächst wurde die quantitative Bestimmung der DNA-Konzentrationen in den extrahierten Lösungen durchgeführt, um eine konstante Menge an DNA-Lösung in die PCR einsetzen zu können. Die Untersuchung mit dem GeneQuant-Photometer hat zudem den Vorteil, dass neben der DNA-Quantität auch ihre „Qualität“ im Sinne der Reinheit der DNA-Proben bestimmt werden kann. „Saubere“ DNA weist ein Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ von ca. 1,8 auf, während eine Kontamination der DNA durch Proteine oder Phenol eine deutliche Erniedrigung dieses Wertes zur Folge hat. Der Proteingehalt der DNA-Lösungen kann außerdem durch die Gleichung $1,55 \times (\text{OD}_{280} - \text{OD}_{320}) - 0,76 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320})$ direkt berechnet werden.

Darüber hinaus interessierte die Menge an DNA in den verschiedenen, getrennt untersuchten Bereichen auch hinsichtlich möglicher Unterschiede, die als Hinweise für denkbare lagerungsbedingte Degradationsprozesse dienen könnten. Gedacht war dabei

auch an eine Überprüfung, ob hierbei eine Korrelation zwischen DNA-Menge und Lagerungszeit post mortem erkennbar wäre. Allerdings kann dabei nicht zwischen bakterieller, viraler oder humaner (genomischer oder mitochondrialer) DNA unterschieden werden.

Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Knochenquerschnitte zirkulär in drei etwa gleich breite Bereiche zersägt: einen Inneren, dem Knochenmark zugewandten (inneres Drittel), einen Mittleren (mittleres Drittel) sowie einen Äußeren mit Kontakt zur Umgebung (äußeres Drittel). Es ist anzunehmen, dass diese topographische Verteilung einen Einfluss auf den Erhalt bzw. auf die Degradation der DNA hat. Denn der innere und der mittlere Abschnitt sind deutlich besser vor möglichen Umwelteinflüssen wie dem Erdreich oder Sonneneinstrahlung geschützt als der äußere Abschnitt und auch die Zerstörung durch Bakterien und andere Organismen betrifft überwiegend die Knochenoberfläche. Bei stark fortgeschrittener Verwitterung der Knochen können die Bakterien allerdings auch über den Markkanal in den Knochen gelangen und diesen von innen heraus zerstören. Demnach müsste also das äußere Knochendrittel die tendenziell niedrigsten, das mittlere Drittel die höchsten Konzentrationen an DNA aufweisen. Doch genau das Gegenteil war der Fall: bei 8 von 14 Proben konnten im äußeren Knochensegment die größten Werte gemessen werden, wohingegen bei 9 dieser 14 Proben das mittlere Segment die geringste DNA-Menge enthielt. Zusätzlich lag die durchschnittlich gemessene DNA-Konzentration (Mittelwert) außen mit 180,4 ng/µl deutlich über der in der Mitte (121,6 ng/µl) und innen (142,3 ng/µl).

Eine denkbare Erklärung für diese Beobachtung liegt in einer möglichen Verfälschung der mit dem Photometer erhobenen Daten durch das Miterfassen von fremder, v.a. bakterieller DNA. Zusätzlich können eventuell vorhandene Verunreinigungen der Proben durch Protein- oder Zuckerreste die Genauigkeit des Messverfahrens beeinträchtigen.

Zu den gemessenen Werten ergab sich noch eine letzte und abschließende Frage: besteht überhaupt ein Zusammenhang zwischen der extrahierten DNA-Menge und der Möglichkeit zu erfolgreichen Amplifikationen?

Fisher et al. (1993) verneinten dies. Bei ihren Untersuchungen kamen sie zu dem Ergebnis, dass weder der photometrisch bestimmte OD_{260}/OD_{280} -Quotient, noch die gemessene Konzentration an DNA mit der Fähigkeit, Produkte amplifizieren zu können, korreliert. Diese Aussage konnte mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Wie oben schon beschrieben, war die durchschnittliche DNA-Konzentration im mittleren Knochendrittel am niedrigsten. Bei den anschließend durchgeführten PCRs zeigte sich aber, dass sich im mittleren Knochenabschnitt wesentlich häufiger spezifische Amplikons nachweisen ließen als im inneren und äußeren Abschnitt. Dies spricht eindeutig dafür, dass die DNA in dem zentralen Anteil des Knochens (mittleres Drittel) zwar in geringerer Menge vorliegt, aber von besserer Qualität ist. Oder anders ausgedrückt: aus dem äußeren Knochendrittel kann zwar die größte Menge an DNA extrahiert werden, doch ist diese entweder besonders stark degradiert oder sie ist vermutlich mit viel Fremd-DNA (insbesondere bakterieller DNA) vermischt.

4.4 Untersuchungen zur forensischen Relevanz von aDNA-Analysen für die Bestimmung des Liegealters

4.4.1 Quantitative aDNA-Messungen

Wie zuvor bereits ausführlich dargestellt, konnte die quantitative Bestimmung der DNA-Konzentrationen keine Anhaltspunkte dafür liefern, dass ein forensisch verwertbarer Zusammenhang zwischen Liegealter und Menge an messbarer aDNA besteht. Dies gilt insbesondere für die unter gleichen Bedingungen aufgearbeiteten Proben, die unter vergleichbaren Lagerungsbedingungen aufbewahrt worden waren, sodass auch bei dieser Konstellation die „jüngeren“ Knochen nicht mehr DNA enthielten als die „alten“.

Es besteht jedoch ein gewisser Zusammenhang zwischen der Menge an extrahierter DNA, Lokalisation innerhalb des Knochens (bezogen auf „inneres“, „mittleres“ und „äußeres“ Drittel einer Knochenscheibe) und der Amplifizierbarkeit unterschiedlich großer aDNA-Fragmente (s. unten). Wie zuvor bereits beschrieben, dürfte hierfür der Erhaltungszustand der aDNA von Bedeutung sein, eine Beobachtung, die

möglicherweise für die forensische Praxis Bedeutung erhält. So sollte überprüft werden, ob gerade in forensisch-diagnostisch problematischen Fällen (Lagerungsbedingungen, Erhaltungszustand eines Leichnams etc.) nicht die gezielte Entnahme von Material aus „innerem“ und „mittlerem“ Drittel eines Röhrenknochens zu einer besseren Ausbeute an aDNA und damit möglicherweise zu aussagekräftigerer Information führt.

Zusammenfassend lässt sich jedoch bezüglich des Kapitels „Quantitative DNA-Bestimmung“ festhalten, dass die aus einem Knochen extrahierbare DNA-Menge weder mit der Möglichkeit zu erfolgreichen Amplifikationen, noch mit dem postmortalen Alter des betreffenden Knochens korreliert.

4.4.2 Untersuchung der Fragmentlängen zu unterschiedlichen Liegezeiten

Im Hinblick auf die Liegezeitbestimmung von Knochenfunden bietet die Durchführung von Polymerase-Ketten-Reaktionen wesentliche Vorteile gegenüber der quantitativen DNA-Messung. Zum einen kann durch die Auswahl geeigneter Primer aus einem humanspezifischen Gen im Gegensatz zu photometrischen Verfahren eine „Verfälschung“ der Ergebnisse durch bakterielle oder virale DNA verhindert werden. Zum anderen kann mit Hilfe der verschiedenen PCRs die Degradation der DNA erfasst werden, da durch die getrennte Untersuchung unterschiedlich langer Sequenzen (im vorliegenden Fall 150 bzw. 200, 507 und 763 bp) der Abbau bzw. die hydrolytische Spaltung der DNA berücksichtigt und beurteilt werden kann.

Aus den zuvor detailliert aufgeführten Untersuchungen kann klar abgeleitet werden, dass die Effizienz der aDNA-Extraktion und damit die mögliche Nachweisbarkeit abhängig ist von der angewandten Methodik. Dementsprechend kann in der vorliegenden Arbeit nur zu Beobachtungen Stellung genommen werden, die mit den drei oben genannten Aufarbeitungs-Verfahren gewonnen wurden. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass die Benutzung anderer Extraktionsverfahren dementsprechend auch andere Resultate liefern kann.

Als eine essentielle Beobachtung konnte eine Abhängigkeit in der Nachweisbarkeit der Fragmentlänge der aDNA von der Liegezeit gezeigt werden (s. hierzu insbesondere Tab. 13). Auch hier muss einschränkend berücksichtigt werden, dass nur zu einem Kollektiv sehr ähnlich oder unter nahezu identischen Bedingungen (gleiche oder ähnliche Friedhöfe) gelagerten Materials Aussagen getroffen werden können. Dies bedeutet also, dass sich grundsätzlich aus der nachgewiesenen DNA-Fragmentlänge die Liegezeit einer Leiche nicht eindeutig ableiten lässt.

Im untersuchten Kollektiv lässt sich jedoch festhalten, dass große Fragmente an aDNA lediglich innerhalb der ersten 8 Jahre post mortem nachweisbar sind, etwas kleinere Fragmente mit einer Größe bis 507 bp lassen sich überwiegend bis ca. 15 Jahren nachweisen, während kleine Fragmente von 150 bp Größe (ebenso wie in die in den zusätzlichen „Kontrolluntersuchungen“ erfassten Amplifikate von 200 bp Größe) auch in erheblich älterem Material nachgewiesen werden können. So fanden sich diese kleinen Fragmente in dem bis 34 Jahre post mortem reichenden Material wie auch in historischem Material eines Gebeinhauses, das – trotz anderen Lagerungsbedingungen als bei dem rein bodengelagerten Material – mindestens 200 Jahre (bis 600 Jahre) alt war. Diese letztere Konstellation kann abgeleitet werden aus historischen Daten, die eine Belegung des Friedhofes, aus dem die exhumierten Knochen des Gebeinhauses stammen, bis zum Jahre 1803, nicht aber zu einem späteren Zeitpunkt belegen (Haas et al., 2000a). Gleichwohl fällt auf, dass nicht in jedem Fall ein positives Amplifikationsergebnis erzielt werden konnte. In der vorliegenden Serie z.B. war bereits bei einem 30 Jahre bodengelagerten Fall keine aDNA der Größe 150 bp mit dem gewählten Primerset amplifizierbar und bei den historischen Knochenproben (>200 Jahre) konnte ebenfalls nur in einem Teil der Fälle ein Amplikon beobachtet werden. Inwieweit hier die Ausbeute mit der zunehmenden Liegedauer korreliert, kann derzeit nicht beantwortet werden. Ein erfolgreiches Amplifikationsergebnis in historischen Knochenproben (Neuzeit, Mittelalter, altes Ägypten) in rund 50 – 60% der Fälle ist aus früheren Untersuchungen bekannt (Haas et al., 2000a; Zink et al., 2001). Dementsprechend kann die hier vorgelegte Studie die Tatsache bestätigen, dass nur in einem Teil der Fälle – möglicherweise in Abhängigkeit vom Liegealter abnehmend – aDNA-Untersuchungen erfolgreich sind.

Überraschenderweise ließ sich jedoch auch in einem Fall mit Liegealter von 34 Jahren ein spezifisches Amplifikationsprodukt von 507 bp Größe feststellen. Dieses Ergebnis erscheint im vorliegenden Kollektiv zunächst „aberrant“. Es wurde jedoch auch in früheren Untersuchungen bereits beschrieben, dass längere Fragmente (bis über 1000 bp Größe) auch in erheblich älteren Knochenfunden belegt sind (Hummel, Herrmann, 1994). Hierbei wurde in heftigen Diskussionen immer wieder der Verdacht geäußert, dass derart „große“ aDNA-Fragmente nur aus rezenten Kontaminationen stammen könnten. Allerdings zeigt die hier vorliegende Untersuchung durchaus, dass höhermolekulare aDNA-Fragmente auch nach 30 Jahren Liegezeit (und vermutlich erheblich länger) nachweisbar sein können.

Zu dem Thema „Liegezeitbestimmung von Knochenfunden“ existieren insgesamt nur sehr wenige weitere Untersuchungen und somit nur wenig Literatur. Zwar haben sich zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren grundsätzlich mit molekularbiologischen Untersuchungsmethoden an aDNA aus menschlichen Knochen beschäftigt, doch hatten diese Arbeiten meist die Identifikation (z.B. Sasaki et al., 1997) oder die Geschlechtsbestimmung (z.B. Meyer et al., 2000) des jeweiligen Individuums zum Ziel.

Außerdem wurden in vielen Fällen keine PCRs, sondern RFLP-Analysen (**r**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphism) von VNTR-Loci (**v**ariable **n**umber of **t**andem **r**epeats) durchgeführt. Gemäß Lee et al. (1991b) sowie Hochmeister et al. (1991) ist diese Methode jedoch nicht geeignet, wenn das zu untersuchende Material entweder in geringer Menge vorliegt oder stark degradiert ist. So konnten beispielsweise Lee et al. (1991a) bei zwei ihrer Proben kein positives RFLP-Ergebnis erzielen, während beide dieser Proben erfolgreiche Amplifikationen mittels PCR ergaben.

Ein weiterer Punkt ist, dass – v.a. zum Zwecke der Identifikation – fast ausschließlich die Amplifikation und Sequenzierung von mitochondrialer DNA an Stelle von genomischer DNA durchgeführt wird. Dies hat mehrere Vorteile: 1. Jede menschliche Zelle enthält mehrere hundert oder tausend Kopien des mitochondrialen, aber nur zwei Kopien des nukleären Genoms. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit für erfolgreiche PCRs stark an. 2. mtDNA wird ausschließlich maternal vererbt und unterliegt deshalb nicht den Rekombinationsvorgängen während der Meiose. Diese „Stabilität“

prädestiniert sie für Verwandtschaftsanalysen. 3. Gegenüber dieser „Stabilität“ ist jedoch zugleich die nicht-codierende Region die am stärksten polymorphe Region der menschlichen mtDNA. Sie enthält den Replikations-Ursprung für einen Strang, beide Transkriptions-Ursprünge sowie die D-loop-Region. Diese Hypervariabilität hat sich als besonders hilfreich für die Identifikation von menschlichen Überresten erwiesen (Sullivan et al., 1992; Lutz et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden trotzdem Primer aus der genomischen DNA (β -Actin-Gen) verwendet. Die Durchführung von PCRs mit mitochondrialer DNA mag zwar für die Identifikation von Menschen und für Verwandtschaftsanalysen von Vorteil sein, zum Zwecke der Liegezeitbestimmung erschien aber die Untersuchung des nukleären Genoms als besser geeignet. Denn das Grundkonzept dieser Studie besteht darin, die Degradation der DNA an Hand der Verkürzung der Fragmentlänge und nicht an Hand der Anzahl an Genkopien zu „messen“. Dabei hat das β -Actin-Gen den Vorteil, dass die Kopienanzahl für Kern-DNA-Verhältnisse relativ hoch ist, bei einer – im Vergleich zu mtDNA – deutlich geringeren Kontaminationsgefahr durch das Laborpersonal.

Einen grundsätzlich vergleichbaren Ansatz hatte auch die Untersuchung von Perry et al. (1988). Diese Autoren hatten jedoch – im Gegensatz zur hier vorliegenden Untersuchung – keine bestatteten Knochenfunde untersucht, sondern „frische“ Knochen bis zu 84 Tage lang künstlich hergestellten Umweltbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit) ausgesetzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach Inkubation unter identischen Bedingungen die DNA-Degradationsraten in den untersuchten Proben unterschiedlicher Individuen sehr ähnlich waren. Aus dieser Tatsache wurde geschlossen, dass bei bekannten Lagerungsbedingungen von Knochenfunden an Hand des Ausmaßes der DNA-Degradation eine Abschätzung des postmortalen Alters möglich sein müsste. Zu einer ähnlichen Erkenntnis kamen auch Bär et al.. In ihrer 1988 erschienenen Arbeit legten sie dar, dass die Menge an degradiertem DNA direkt mit der Dauer des postmortalen Intervalls korreliert. Cattaneo et al. (1997) erhielten dementsprechend bei Extraktionen aus „jungen“ Knochen deutlich häufiger PCR-Produkte als aus „alten“. Diese wenigen bisher getroffenen Beobachtungen decken sich somit weitgehend mit den Ergebnissen dieser Studie.

Die Beobachtung einer positiven Amplifikation auch von „größeren“ Produkten – obwohl dies nur in einem kleinen Teil der Fälle einzutreten scheint – schränkt jedoch die mögliche forensische Anwendbarkeit des hier aufgezeigten Ansatzes deutlich ein. So lässt sich aus dieser Beobachtung folgern, dass die Fragmentlängen-Bestimmung von aDNA nur einen unzuverlässigen Wert für die forensische Beurteilung darstellt. Gleichwohl kann die in dieser Arbeit aufgezeigte Analytik wichtige Zusatzinformationen liefern.

Über die forensische Anwendung hinaus bieten die in dieser Arbeit erfassten Daten weitere wichtige Informationen, die vor allem für die Paläopathologie und Anthropologie von erheblicher Bedeutung sind. Gerade die Entwicklung der molekularen Analytik hat in diesen Wissenschaftsbereichen in den letzten Jahren zu einem massiven Fortschritt in der Datenerfassung geführt. So sind die Ermittlung von Infektionskrankheiten durch Bestimmung von bakterieller aDNA, die Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen historischer Personen und die Bestimmung des Individualgeschlechts bei anthropologisch nicht weiter feststellbaren Konstellationen nur einige wichtige Anwendungsbereiche. Begrenzt wird diese „Diagnostik“ (sowohl von humaner als auch von bakterieller aDNA) durch zwei Problempunkte: 1. das außerordentlich große Risiko falscher Ergebnisse durch rezente Kontamination und 2. den kompletten Verlust der aDNA durch DNA-Degradation. Während der erste Punkt durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen (s. auch die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methodik) minimiert werden kann, ist der zweite Punkt wenig beeinflussbar. Hier kann lediglich die Steigerung der Extraktionseffizienz helfen. Dementsprechend konnte hier gezeigt werden, dass das Verfahren der Extraktion erhebliche Vorteile bringen kann. Die weitere technische Entwicklung lässt also bald auch dort erfolgreiche Analytik von aDNA erwarten, wo heute noch negative Amplifikationsergebnisse zu finden sind.

Erheblich wichtiger ist jedoch die Beobachtung, dass die Degradation und Fragmentierung der DNA sehr rasch post mortem abläuft und somit bereits innerhalb der ersten Jahre nach dem Tod zu einem Verlust des größten Teils von höhermolekularer DNA führt. Dabei bleibt allerdings der Einfluss von Balsamierungs- oder Mumifikations-Prozessen außer acht, die möglicherweise hier eine Protektion der

aDNA bewirken können. Dies übersteigt den Rahmen dieser Arbeit, hierzu wären weitere Studien nötig. Dementsprechend ist die Auswahl von Primern und somit der Größe der Amplifikationsprodukte immer noch ein ganz wesentliches Kriterium für die Durchführung von aDNA-Analysen.

5. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Publikationen zur Identifikation und Geschlechtsbestimmung von menschlichen Leichen und Knochenfunden an Hand von DNA-Analysen veröffentlicht. Entsprechende Ansätze zur Liegezeitbestimmung existieren hingegen nur sehr wenige. Dies mag seine Ursachen darin haben, dass über den Zerfall der DNA nach dem Tode (Degradation) nur sehr wenig bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden 14 Proben aus menschlichen Oberschenkelknochen mit bekannter Liegedauer zwischen 1 und 200-600 Jahren untersucht. Diese stammen mit Ausnahme der ältesten Knochen allesamt aus Umbettungen bzw. Exhumierungen von lokalen Münchner Friedhöfen, sodass die dort vorherrschenden Liegebedingungen bezüglich Witterungseinflüsse und Bodenart auf Grund ihrer engen geographischen Beziehung als vergleichbar betrachtet werden können. Aus jedem der langen Röhrenknochen wurde exakt aus der Mitte der Diaphyse ein ca. 2 cm breites Stück herausgesägt. Die dadurch entstandenen Knochenquerschnitte wurden wiederum in drei etwa gleich breite Bereiche zersägt: einen inneren, dem Knochenmark zugewandten Bereich, eine mittlere Zone sowie ein äußeres Areal mit Kontakt zur Knochen-Umgebung (Weichteile, Sarg, Erde etc.). Aus jeder dieser Zonen wurde die DNA extrahiert; anfangs mit der Methode nach Boom et al. (1990) und Haas et al. (2000b), später mit Hilfe des First-DNA Kits von GEN-IAL. Im direkten Vergleich der beiden Extraktionsmethoden erwies sich die letztgenannte als wesentlich effektiver, sowohl im Hinblick auf die Quantität als auch auf die Qualität der DNA.

Die Quantität der extrahierten DNA wurde mit einem RNA/DNA-Calculator photometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die äußeren Knochenabschnitte tendenziell die höchsten (Mittelwert 180,4 ng/μl), die mittleren Abschnitte die niedrigsten (Mittelwert 121,6 ng/μl) Konzentrationen an DNA aufwiesen. Ein Zusammenhang zwischen dem Liegealter der Knochen und der gemessenen DNA-Menge konnte nicht verifiziert werden.

Um den Erhaltungszustand der extrahierten DNA beurteilen zu können, wurden verschiedene Polymerase-Ketten-Reaktionen (Produktlängen: 150, 200, 507, 763 bp) durchgeführt. Hierfür wurden Primer aus dem humanspezifischen β -Actin-Gen

verwendet, wodurch eine Verfälschung der Ergebnisse durch bakterielle DNA bereits ausgeschlossen werden konnte.

Bevor mit der extrahierten aDNA gearbeitet werden konnte, mussten zunächst die PCR-Bedingungen, d.h. die Hybridisierungstemperatur, die MgCl₂-Konzentration und die einzusetzende DNA-Menge (Template) optimiert werden. Mit Hilfe des optimierten Protokolls wurden dann die eigentlichen Untersuchungen vorgenommen. Im Gegensatz zur quantitativen DNA-Bestimmung ließ sich feststellen, dass im mittleren Knochenabschnitt wesentlich häufiger spezifische Amplikons nachweisbar sind als im inneren und äußeren Drittel. Dies spricht dafür, dass die DNA im mittleren Bereich des Knochens zwar in geringerer Menge vorliegt, aber von besserem Erhaltungszustand ist. Dies weist zudem darauf hin, dass aus dem äußeren Knochendrittel zwar die größte Menge an DNA extrahiert werden kann, doch ist diese entweder besonders stark degradiert oder sie ist mit einer großen Menge an Fremd-DNA (v.a. bakterieller DNA) vermischt. Somit scheint die DNA-Degradationsrate in den zentralen Knochenanteilen am geringsten zu sein, bedingt durch den besten Schutz vor Umwelteinflüssen und bakterieller Besiedelung.

Die Untersuchungen zur Fragmentlänge der aDNA ergaben einen Zusammenhang zwischen Fragmentgröße und Liegealter. So konnte festgestellt werden, dass „große“ Fragmente der aDNA (763 bp) lediglich innerhalb der ersten 8 Jahre post mortem nachweisbar sind, während etwas kleinere Fragmente mit einer Größe bis 507 bp überwiegend bis rund 15 Jahren nachweisbar sind. Kleine Fragmente von 150 bp Größe (ebenso wie in die in den zusätzlichen „Kontrolluntersuchungen“ erfassten Amplifikate von 200 bp Größe) sind auch in erheblich älterem Material nachweisbar. So fanden sich diese kleine Fragmente in dem bis 34 Jahre post mortem reichenden Material, wie auch in historischem Material eines Gebeinhauses, das – trotz anderen Lagerungsbedingungen als bei dem rein bodengelagerten Material – mindestens 200 Jahre (bis 600 Jahre) alt war.

Darüber hinaus ließ sich in einem Fall mit Liegealter von 34 Jahren ein spezifisches Amplifikationsprodukt von 507 bp Größe feststellen. Somit können auch „größere“ aDNA-Fragmente über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben. Diese Tatsache schränkt den prinzipiellen Wert der Analyse für die forensische Diagnostik ein, da der Nachweis von größeren aDNA-Fragmenten demnach keine sichere Zuordnung zu

bestimmten Bereichen des Liegealters erlaubt. In der forensischen Praxis kann jedoch eine Untersuchung, wie hier vorgestellt, im Einzelfall durchaus relevante Informationen liefern und zu einer möglicherweise genaueren Aussage führen. Zweifellos sind weitere Untersuchungen unter Einbeziehung zusätzlicher technischer Entwicklungen notwendig, um die Aussagefähigkeit noch zu verbessern.

Literaturverzeichnis

1. Anslinger K, Weichhold G, Keil W, Bayer B, Eisenmenger W (2000) Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 114 : 194-196
2. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Experimental Med* 79/2: 137-158
3. Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W (1988) Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int* 39 : 59-70
4. Berg S (1964) Die Altersbestimmung von Skelettfunden als forensische und archäologische Aufgabe. *Münch med Wschr* 21: 989-995
5. Berg S, Specht W (1958) Untersuchungen zur Bestimmung der Liegezeit von Skeletteilen. *Dtsch Z gerichtl Med* 47: 209-241
6. Beumer O (1914) Die Unterscheidung von Menschen- und Tierknochen in forensischer Beziehung. In: Lochte Th. *Gerichtsärztliche und polizeiärztliche Technik*. Bergmann, Wiesbaden
7. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28/3: 495-503
8. Casper JL (1858) *Handbuch der gerichtlichen Medizin. Thanatologischer Teil*. Hirschwald, Berlin

9. Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ (1997) Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sci* 42/6 : 1126-1135
10. Devergie A (1841) Stichwort „Mors“ in: *Universal-Lexicon der practischen Medizin und Chirurgie*. Bd. 9, Franke, Leipzig
11. Dietz G, Dürwald W (1976) *Gerichtliche Medizin*. Johann Ambrosius Barth, Leipzig
12. Evison MP, Smillie DM, Chamberlain AT (1997) Extraction of single-copy nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories. *J Forensic Sci* 42/11 : 1032-1038
13. Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Wilcox AW, Wadhams M, Weeden VW (1993) Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States civil war bone. *J Forensic Sci* 38/1 : 60-68
14. Franz H (1960) *Feldbodenkunde*. Fromme u Co, Wien, München
15. Gabriel M (1930) Die bisherigen Ergebnisse der Moorleichenforschung. *Dtsch Z gerichtl Med* 15: 226-238
16. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ (1985) Forensic application of DNA “fingerprints”. *Nature* 318: 577-579
17. Haack K (1998) Screening auf aDNA-Sequenzen von über 300 bp Länge. *Homo* 49 (Suppl.): 40

18. Haas CJ, Zink A, Palfi G, Szeimies U, Nerlich AG (2000a) Detection of leprosy in ancient human skeletal remains by molecular identification of *Mycobacterium leprae*. *Am J Clin Pathol* 114/3: 428-436
19. Haas CJ, Zink A, Molnár E, Szeimies U, Reischl U, Marcsik A, Ardagna Y, Dutour O, Pálfi G, Nerlich AG (2000b) Molecular Evidence for Different Stages of Tuberculosis in Ancient Bone Samples from Hungary. *Am J Phys Anthropol* 113 : 293-304
20. Hagelberg E, Sykes B, Hedges R (1989) Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342: 485
21. Hagelberg E, Clegg JB (1991) Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 244: 45-50
22. Henßge C, Madea B (1988) Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, Band 18: Methoden zur Bestimmung der Todeszeit an Leichen. Schmidt-Römhild, Lübeck
23. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R (1991) Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci* 36/11 : 1649-1661
24. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S (2001) Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2/5: 353-359
25. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, Weeden VW (1993) Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains : Identification of Remains from The Vietnam War. *J Forensic Sci* 38/1 : 542-553

26. Höss M, Pääbo S (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res* 21: 3913-3914
27. Hummel S, Herrmann B (1994) *Ancient DNA*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
28. Hunger H, Leopold D (1978) *Identifikation*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
29. Hunger H, Wunderlich S, Wunderlich G (1968) Studies on the determination of the length of interment of human skeletons. *Zacchia* 4/1: 114-122
30. Hunger H, Wetzstein H, Lützelberger R (1971) Untersuchungen an fossilen Skeletten. *Kriminalistik u forens Wiss* 4: 159-165
31. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316: 76-79
32. Knight B (1969) Methods of dating skeletal remains. *Med Sci Law* 9/4: 247-252
33. Koslowsky HG (1953) *Untersuchungen über die Altersbestimmungen von Skeletteilen*. Inaugural-Diss, Erlangen
34. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90/1: 19-30
35. Lassen C, Hummel S, Herrmann B (1994) Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. *Int J Legal Med* 107 : 152-155

36. Lee HC, Pagliaro EM, Berka KM, Folk NL, Anderson DT, Ruano G, Keith TP, Phipps P, Herrin GL, Garner DD, Gaensslen RE (1991a) Genetic markers in human bone : deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sci* 36/1 : 320-330
37. Lee HC, Ruano G, Pagliaro EM, Berka KM, Gaensslen RE (1991b) DNA analysis in human bone and other specimens of forensic interest: PCR typing and testing. *J Forensic Sci Soc* 31: 213-216
38. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715
39. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S (1996) mtDNA as a tool for identification of human remains. *Int J Legal Med* 109 : 205-209
40. MacHugh DE, Edwards CJ, Bailey JF, Bancroft DR, Bradley DG (2000) The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth : a survey of current methodologies. *Ancient Biomolecules Vol 3* : 81-102
41. Mall G (2000) Temperaturgestützte Bestimmung der Todeszeit mit Hilfe der Methode der Finiten Elemente. *Habil, München*
42. Meyer E, Wiese M, Bruchhaus H, Claussen M, Klein A (2000) Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. *Forensic Sci Int* 113: 87-90
43. Mende LJC (1829) Ausführliches Handbuch der gerichtlichen Medizin. 5. Teil, Dyksche Buchhandlung, Leipzig
44. Mendel G (1866) Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines, Abhandlungen, Brünn* 4: 3-47

45. Müller B (1975) Gerichtliche Medizin, Teil 1 : Tod und Sterben, Leichen-, Spurenunters., Identifizierung, Todesursachen. 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
46. Neckermann A (1950) Untersuchungen über Todeszeitbestimmung an menschlichen Knochen. Inaugural-Diss, Erlangen
47. Newton CR, Graham A (1994) PCR. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
48. Nysten PH (1811) Recherches de physiologie et chimie pathologiques pour faire suite à celles de Bichat sur la vie et la mort. Paris. Zit. nach Lochte Th (1923)
49. Oakley KP (1949) The fluorine-dating method. Yearb phys Anthropol 5: 44-52
50. Pääbo S (1985) Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. Nature 314: 644-645
51. Pääbo S (1986) Molecular genetic investigations of ancient human remains. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51: 441-446
52. Penning R (1997) Rechtsmedizin systematisch. 1. Aufl., UNI-MED, Bremen, Lorch/Württemberg
53. Perry WL, Bass WM, Riggsby WS, Sirotkin K (1988) The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. J Forensic Sci 33/1 : 144-153
54. Rankin DR, Narveson SD, Birkby WH, Lai J (1996) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis on DNA from Human Compact Bone. J Forensic Sci 41/1 : 40-46

55. Richards MB, Hedges REM, Sykes BC (1995) Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *J Archaeol Sci* 22: 291-299
56. Rubeshansky AP (1971) Zur Bestimmung des Todeszeitpunktes nach den im Boden gefundenen Knochenresten. *Kriminalistik u forens Wiss* 4: 167-170
57. Sasaki M, Shiono H, Fukushima T, Shimizu K (1997) Human identification by genotyping of personal articles. *Forensic Sci Int* 90: 65-75
58. Schwerd W (1992) *Rechtsmedizin, Lehrbuch für Mediziner und Juristen*. 5. Aufl., Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
59. Sullivan KM, Hopgood R, Gill P (1992) Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int J Legal Med* 105 : 83-86
60. Swift B (1998) Dating human skeletal remains: Investigating the viability of measuring the equilibrium between ^{210}Po and ^{210}Pb as a means of estimating the post-mortem interval. *Forensic Sci Int* 98: 119-126
61. Swift B, Lauder I, Black S, Norris J (2001) An estimation of the post-mortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace element approach. *Forensic Sci Int* 117: 73-87
62. Toldt C (1882) Die Knochen in gerichtsärztlicher Beziehung. *Handbuch der gerichtlichen Medizin*. Hrsg.: Maschka J, Lauppsche Buchhandlung, Tübingen, Bd. 3: 569-577
63. Urban E (1974) Das postmortale Verhalten der Mukopolysaccharide und Lipide des Knochens. *Inaugural-Diss*, Göttingen

-
64. Wagner HJ (1960) Die Bedeutung der Antibiotika und Sulfonamide für Todes- und Tatzeitbestimmungen in der gerichtlichen Medizin. Habil, Mainz
 65. Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738
 66. Weibel J (1912) Gerichtlich-medizinische Bedeutung der Knochenfunde. Inaugural-Diss, Zürich
 67. Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders SR (1998) Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol* 105/4: 539-543
 68. Zink A, Haas CJ, Reischl U, Szeimies U, Nerlich AG (2001) Molecular analysis of skeletal tuberculosis in ancient Egyptian population. *J Med Microbiol* 50/4: 355-366

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Eisenmenger für die Bereitstellung des Themas. Er hat mir bei der Durchführung der Arbeiten in seinem Institut jede nur erdenkliche Hilfe zukommen lassen und mir darüber hinaus interessante und lehrreiche Einblicke in das Fach Rechtsmedizin ermöglicht.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. R. Penning bedanken, ohne dessen großzügige Bereitstellung von Knochenmaterial diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Nerlich und Frau Dr. B. Bachmeier für die hervorragende Zusammenarbeit sowohl in menschlicher als auch in wissenschaftlicher Hinsicht. Sie haben meine Arbeit mit hohem Zeitaufwand und viel Engagement betreut.

Bei meinem Betreuer Herrn Dr. O. Peschel möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir bei der Durchführung der Arbeiten jederzeit beratend und helfend zur Seite gestanden ist.

Ich danke Herrn Dr. A. Zink und Frau W. Grabner für ihre geduldige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche im Labor, Herrn C. Conrad für die umfassende und zeitaufwendige Hilfe am Computer und meinen Eltern für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Christina Martina KAISER

Geburtsdatum: 15.01.1978

Geburtsort: München

Eltern: Hartmut Kaiser, (Richter)
Mathilde Kaiser, geb. Gallist, (Bankkauffrau)

Geschwister: Ulrich Kaiser, geb. 1975, (Regierungsrat z.A.)

AUSBILDUNG

1984-1988 Grundschule an der Grandlstrasse, München

1988-1997 Louise-Schroeder-Gymnasium (math.-nat.), München

1997 Abitur

Seit 1997 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

1999 Ärztliche Vorprüfung

2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002/2003 Praktisches Jahr:

1. Terial:

- Innere Medizin – Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) Lausanne (Schweiz), 4 Monate

2. Terial:

- Gynäkologie und Geburtshilfe – Toronto East General Hospital (Kanada), 2 Monate
- Gynäkologie und Geburtshilfe – St. Luke's Hospital Guardamangia (Malta), 2 Monate

3. Terial:

- Chirurgie (Kinderchirurgie) – Krankenhaus München Schwabing, 4 Monate

11/03-12/04 Ärztin im Praktikum / Assistenzärztin am Pathologischen Institut der LMU München

Seit 01/05 Assistenzärztin in der Psychiatrischen Privatklinik Sanatorium Kilchberg, Zürich (Schweiz)