

**Aus dem Pathologischen Institut des Krankenhauses München Bogenhausen
Lehrkrankenhaus der Technischen Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A.G. Nerlich**

**Paläopathologische Untersuchungen von parasitären Erkrankungen mit
molekularer Analyse von aDNA zum Nachweis von Plasmodien und Leishmanien**

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

**vorgelegt von
Bettina Schraut
aus
München
Jahr
2009**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. A. G. Nerlich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Graw
Priv. Doz. Dr. D. Vöhringer

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2009

Widmung

Meiner Mutter, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals
möglich geworden wären

Paläopathologische Untersuchungen von parasitären Erkrankungen mit molekularer Analyse von aDNA zum Nachweis von Plasmodien und Leishmanien.....	I
1 Einführung.....	1
1.1 Leishmaniose.....	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Historische Entwicklung	5
1.2 Malaria.....	7
1.2.1 Allgemeines	7
1.2.2 Historische Entwicklung	11
1.3 Paläopathologische Befunde zur Leishmaniose und Malaria	13
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	15
2 Material	16
2.1 Fundorte	16
2.2 Fundmaterial.....	20
2.3 Erhaltungszustand	22
2.4 Morphologische Veränderungen	23
2.5 Verwendete Geräte.....	23
2.6 Einwegmaterial und Hilfsmittel	24
2.7 Chemikalien.....	25
2.8 Reagenzien und Enzyme	26
2.9 Standard Lösungen und Puffer	27
3 Methoden.....	28
3.1 Allgemeines	28
3.2 Probenentnahme und Probenaufbereitung	28
3.3 DNA-Extraktion.....	30
3.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	31
3.4.1 Allgemeines	31
3.4.2 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen.....	32
3.5 Amplifikation der DNA.....	33
3.5.1 Amplifikation von humaner DNA	34
3.5.2 Amplifikation von Leishmanien-DNA	35
3.5.3 Amplifikation von Plasmodien-DNA.....	36
3.5.4 Agarosegelelektrophorese	39
3.5.5 Sequenzieren.....	40

4	Ergebnisse	42
4.1	Überblick.....	42
4.2	Nachweis von humaner DNA	43
4.3	Nachweis von Leishmanien-DNA.....	44
4.4	Nachweis des Leishmanienreggers in einem rezenten Fall.....	46
4.5	Nachweis von Plasmodien-DNA	49
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	52
5	Diskussion.....	53
5.1	Interpretation der Ergebnisse des β -Aktin-Nachweises und der rezenten Vergleichsproben	53
5.2	Interpretation der Ergebnisse zum Leishmaniose-Nachweis	54
5.3	Interpretation der Ergebnisse zum Malaria-Nachweis	56
5.4	Einschränkungen der Analyse	59
5.4.1	Material und Lagerungsbedingungen	59
5.4.2	Kontamination.....	63
5.4.3	Methoden.....	64
5.5	Ausblick	65
6	Zusammenfassung.....	66
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang Untersuchungsmaterial	76
9	Lebenslauf Bettina Lucie Schraut.....	83
10	Danksagung	85

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Endemiegebiete der Leishmaniose
- Abbildung 2: Zeichen und Symptome der viszeralen Leishmaniose
- Abbildung 3: Die weibliche Sandmücke Phlebotomus
- Abbildung 4: Stadien des Erregers Leishmania donovani
- Abbildung 5: Risikoendemiegebiete der Malaria 2003
- Abbildung 6: Hauptsymptome der Malaria
- Abbildung 7: Die weibliche Anophelesmücke
- Abbildung 8: Stadien des Erregers Plasmodium falciparum im Blut
- Abbildung 9: Die Nekropole von Theben-West
- Abbildung 10: Lageplan der Grabkomplexe Theben-West
- Abbildung 11: Übersichtsplan von Dra Abu-el-Naga
- Abbildung 12: Anordnung der Grabkomplexe von Abydos und U-Friedhof
- Abbildung 13: Mumientorso
- Abbildung 14: Konservierungszustand eines Mumienexemplars aus der Fundsammlung
- Abbildung 15: Säuberung der Knochenoberfläche
- Abbildung 16: Fräsen
- Abbildung 17: Sägen
- Abbildung 18: PCR Amplifikation von β -Aktin
- Abbildung 19: PCR Amplifikation von Leishmania DNA
- Abbildung 20: Sequenzierung der Leishmania DNA nach PCR Amplifikation
- Abbildung 21: BLAST Sequenzvergleich einer Mumienprobe mit vollkommener
Übereinstimmung mit der Referenzsequenz von L. donovani
- Abbildung 22: Amplifikation von Leishmania DNA des rezenten Falles
- Abbildung 23: Sequenzunterschied zwischen L. donovani und L. infantum
- Abbildung 24: PCR Amplifikation von Plasmodien DNA
- Abbildung 25: Sequenzierung der Plasmodien DNA nach PCR Amplifikation
- Abbildung 26: BLAST Sequenzvergleich einer Mumienprobe mit fast vollkommener
Übereinstimmung mit der Referenzsequenz von Plasmodium falciparum
- Abbildung 27: Blick auf das Grabungsareal
- Abbildung 28: Bild einer vollständigen Mumie

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitstellung und Fundorte ägyptischen Ausgrabungsmaterials

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mastermixes

Tabelle 3: Primersequenzen für β -Aktin-Nachweis

Tabelle 4: Primersequenzen für Leishmanien-Nachweis

Tabelle 5: Primersequenzen für die Outer-PCR

Tabelle 6: Primersequenzen für die Nested-PCR

Tabelle 7: Reaktionsansätze für Outer- und Nested-PCR

Tabelle 8: Outer-Amplifikation

Tabelle 9: Probenname mit identifiziertem Leishmania-Erreger

Tabelle 10: Probenname mit identifiziertem Plasmodium-Erreger

Abkürzungen

A:	Adenosin
Abb.:	Abbildung
Act:	Aktin
aDNA:	ancient Desoxyribonukleinsäure
bp Standard:	Basenpaar-Standard
c.a.:	circa
C:	Cytosin
Ca ²⁺ :	Calcium
DDT:	Dichlordiphenyltrichlorethan
dH ₂ O:	destilliertes Wasser
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.:	englisch
et. al.:	et alii (und andere)
EtOH:	Ethanol
evtl.:	eventuell
g:	Gramm
G:	Guanin
griech.:	Griechisch
GSCN:	Guanidiumthiocyanat
h:	Stunde
HIV:	Humanes Immundefizienz-Virus
HCl:	Chlorwasserstoff
Jh. n. Chr.:	Jahrhundert nach Christus
kbp:	Kilobasenpaare
KCl:	Kaliumchlorid
km:	Kilometer
L.:	Leishmania

l:	Liter
LSH:	Leishmaniose
M:	Molar
m:	milli (10 ⁻³)
μ:	mikro (10 ⁻⁶)
mA:	milliAmpere
mg:	Milligramm
MgCl ₂ :	Magnesium-Chlorid
min:	Minute
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mmol:	Millimolar
μl:	Mikroliter
μm:	Mikrometer
nm:	Nanometer
PCR:	Polymerase Ketterreaktion
PD:	Privatdozent
Pfcr:	Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter
pmol:	Pikomol
Prof.:	Professor
rpm:	rounds per minute
rRNA:	ribosomale Ribonukleinsäure
sec.:	Sekunde
T:	Thymin
TAE-Puffer:	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq:	Thermophilus aquaticus
TBE:	Triboressigsäure
Tris- Cl:	Trihydroxymethylaminlethan- Chlorid
TT:	Theben Tomb
u.a.:	unter anderem
U:	Unit
UV-Licht:	Ultraviolett-Licht

v.a.:	vor allem
V:	Volt
z.B.:	zum Beispiel

1 Einführung

1.1 Leishmaniose

1.1.1 Allgemeines

Leishmaniose ist eine parasitäre Erkrankung, die durch einen Vektor übertragen und von einem obligat intrazellulären Erreger herbeigeführt wird. Endemiegebiete finden sich mit Ausnahme Australiens auf allen Kontinenten (Abb. 1).

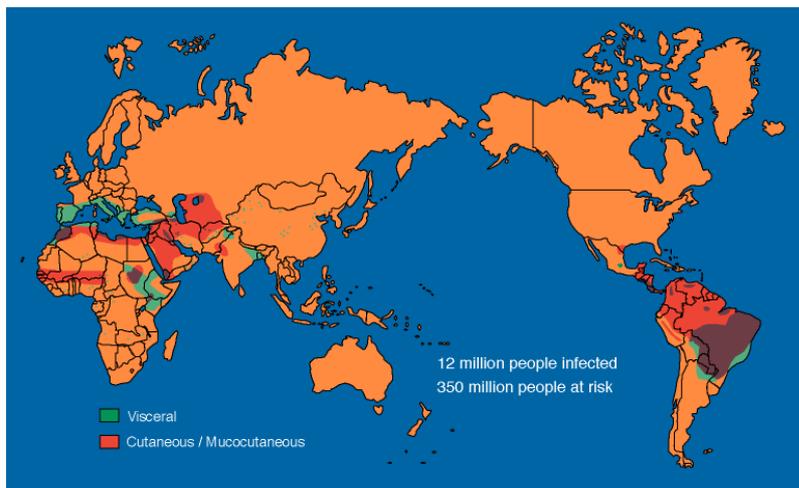


Abb. 1:
Endemiegebiete der
Leishmaniose

In den letzten Jahren kam es zu einem starken Anstieg viszeraler Leishmaniose in Gebieten wie dem Sudan, Pakistan und China

Quelle: <http://www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html>

In 88 Ländern, 66 lassen sich der alten Welt zuordnen, sind derzeit rund 12 Millionen Menschen mit Leishmaniose-Erregern infiziert und jährlich kommen 2 Millionen Neuerkrankungen hinzu, wovon 500.000 an viszeraler und 1,5 Millionen an kutaner Leishmaniose erkrankt sind [www.who.int/leishmaniasis/epidemic/en/]. Infiziert ist die Land- sowie die Stadtbevölkerung, auch im Süden Europas und entlang der Nordküste

Afrikas (Ägypten, Tunesien, Algerien). Im Süden des Sudan starben von 1995-2000 10% der Bevölkerung an viszeraler Leishmaniose [Roberts et al., 2000]. Die letzte große Epidemie brach 2002 in Afghanistan aus. Der starke Anstieg in den letzten zehn Jahren, bedingt auch durch Koinfektionen mit HIV, gibt Anlass zur Besorgnis [Desjeux et Alvar, 2003].

Leishmaniose kann verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen, klinisch unterschieden werden die Formen viszerale, kutane und mukokutane Leishmaniose.

Die viszerale Leishmaniose, Kala-Azar (hindi: kala=schwarz; azar=Fieber), verursacht durch Erreger des Leishmania donovani-Komplexes, kann asymptomatisch verlaufen oder aber eine lebensgefährliche systemische Infektion durch Befall des mononukleären Phagozytensystems herbeiführen [Bucheton et al., 2003]. Abbildung 2 zeigt einen mit Leishmania donovani infizierten kleinen Jungen aus dem „National Vector Borne Disease Control Programme“.



Abb. 2:

Zeichen und Symptome der viszeralen Leishmaniose

Splenomegalie, Hepatomegalie, Anämie, Gewichtsverlust mit Kachexie, Schwäche, Appetitlosigkeit, rezidivierende Fieberschübe, trockene schuppige Haut, evtl. Haarverlust und Lymphadenopathie;
hellhäutige Patienten zeigen Verfärbungen an Händen, Füßen, Abdomen und Gesicht.

Quelle: <http://namp.gov.in/kal2.html>

Befallen sind hierbei v. a. Knochenmark, Milz und Leber. Die Inkubationszeit dauert zehn Tage bis sieben Monate. Nach dieser Periode beginnt die Erkrankung mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Kopfschmerzen und gastrointestinalen Störungen. Danach folgt Fieber mit Schüttelfrost. Im Verlauf sind auch Fieberpausen möglich. Charakteristisch für Kala-Azar ist eine schwere Kachexie, Hepatosplenomegalie, Panzytopenie sowie eine Hypergammaglobulinämie [Herwaldt, 1999]. Das Krankheitsbild führt unbehandelt fast immer zum Tod.

Die kutane Form der Leishmaniose - bekannt als Orientbeule - wird v.a. verursacht durch den Erreger *Leishmania major*, aber auch *Leishmania tropica* und manifestiert sich an der Einstichstelle. Dort entsteht eine symptomfreie Papel. Sie entwickelt sich zu einem Knötchen und letztendlich zu einem Ulkus. Dieses wird als weich, krustös mit einer rund-ovalen Form beschrieben und heilt unter Bildung einer Narbe ab [Heckmann, 1999]. Meist sind Arme, Kopf oder Hals betroffen. Weitere Papeln können durch Sekundärinfektion entstehen.

Die mukokutane Form, Espundia, wird hervorgerufen von Erregern der *Leishmania brasiliensis*-Gruppe. Betroffen sind v. a. Gesicht, aber auch Haut, Muskulatur und Knorpelgewebe im Mund-, Nasen-, Rachenraum. Dort entwickeln sich aus einer primären Hautläsion papulöse Ulzerationen. Die Heilungsrate ist gering. Oft bleibt ein entstelltes Gesicht zurück.

Die Erreger des Leishmanien-Komplexes sind zum Überleben auf Vektor und Wirt angewiesen. Vektor ist die weibliche 2-3 mm große Sandmücke (Abb. 3), die in der alten Welt als *Phlebotomus* und in der neuen Welt als *Lutzomyia* bezeichnet wird.



Abb. 3:

Die weibliche Sandmücke Phlebotomus

Der Stich dieses mit dem Erreger *Leishmania* infizierten Insekts sorgt für die Verbreitung des Erregers.

Quelle:

http://medicine.plosjournals.org/archive/15491676/2/7/figure/10.1371_journal.pmed.0020211.g001-M.jpg

Insgesamt sind 30 Subtypen der Spezies bekannt. Diese nachtaktiven Wesen beanspruchen als optimalen Lebensraum eine Jahresdurchschnittstemperatur von 10°C und hohe Luftfeuchtigkeit. Bei einer Lebensdauer von ca. 40 Tagen legt das Insekt nach dem Blutsaugakt durchschnittlich 100 Eier im feuchten Boden ab [www.leishmaniose.de/sandmuecken.html]. Es wird vermutet, dass Phlebotomen nur eine relativ kurze Flugstrecke zurücklegen können und daher Menschen im Umkreis von nur ca. 50 Metern infizieren [Bern et al., 2005].

Die begeißelten, beweglichen, extrazellulär lebenden Promastigoten vermehren sich im Mitteldarm der Sandmücken, während die nicht-begeißelten, unbeweglichen, intrazellulär lebenden Amastigoten sich in den Phagolysosomen der Makrophagen und anderer retikuloendothelialer Zellen des Menschen befinden (Abb. 4) [Boitz et Ullman, 2006].



Makrophage mit 11 Amastigoten mit jeweils 3 μm Länge



Kennzeichnend für Promastigoten sind ihre Flagellen und der Kinetoplast.

Dieses Stadium ist für den Menschen infektiös.

Quelle: <http://www.msu.edu/course/zol/316/lspsscope.htm>

Abb. 4: Stadien des Erregers *Leishmania donovani*

Der Entwicklungszyklus vollzieht sich folgendermaßen: die Sandmücke sticht einen befallenen Wirt und saugt das infizierte Blut. Anschließend reifen die Erreger im Darm der Mücke, wandern in den Rüssel der Phlebotomen und verschließen diesen. Um der gestörten Nahrungsaufnahme entgegen zu wirken erhöht die Mücke ihre Stechfrequenz und verbreitet dadurch die in ihr herangereiften Erreger. Im Wirt nehmen Makrophagen, Endothelzellen und Histiocyten die Leishmanien auf. Sie werden zu Amastigoten, teilen sich zwei- oder mehrfach bis zum Platzen der Wirtszelle und setzen dadurch weitere Leishmanien frei. Der Zyklus schließt sich mit dem erneuten Stich einer Mücke, bei dem die Mücke das infizierte Blut saugt.

1.1.2 Historische Entwicklung

Der Ursprung der menschlichen Leishmaniose ist unbekannt. Ikonographische Untersuchungen legten jedoch nahe, dass ein Leishmaniose-Befall bereits auf jahrtausend alten peruanischen Vasen dargestellt ist. Auch die an Pre-Inka-Skulpturen aus dem 1. Jh. n. Chr. dargestellten auffälligen Haut- und Gesichtsveränderungen wurden als kutaner oder mukokutaner Leishmaniose-Befall gedeutet. Erste mit Leishmaniose in Verbindung gebrachte schriftliche Erwähnungen lassen sich aus

altägyptischen Papyri, insbesondere dem auf das Alte Reich (1.-4. altägyptische Dynastie) zurückreichenden medizinischen Papyrus Ebers ablesen.

Trotz des lang bekannten Auftretens der Kala-Azar im Fernen Osten wurde erstmals 1824 in Bengalien eine Epidemie dokumentiert. In den sechziger Jahren des 19. Jahrhunderts wurde aus Indien von einer „Typhomalaria“ berichtet, deren Krankheitsbild dem der Kala-Azar entspricht. Zehn Jahre später wurde die Erkrankung aus Assam gemeldet [Ackerknecht, 1963a].

1756 beschrieb Alexander Russell erstmals das Erscheinungsbild der Haut-Leishmaniose, die Aleppo-Beule. 1885 identifizierte Cunningham Parasiten in Hautbiopsien. Weitere wesentliche Beiträge zur Erforschung der Erreger lieferten Wissenschaftler wie Buchner (1886), Riehl (1886), Firth (1891) und Borovsky (1898). 1903 beschrieb Leishman in einer Publikation kleine, intrazelluläre Körperchen, die er in der Milzpulpa eines an Fieber verstorbenen Soldaten fand. Donovan forschte im selben Jahr in Indien an eben diesen Körperchen, entdeckte diese allerdings auch im Blut eines lebenden Menschen. Leishman und Donovan beschrieben den neu entdeckten parasitären Erreger als einzelligen eukaryoten Organismus mit einer Länge von 2-4 µm und einer Breite von 1,5-2 µm. Dies entspricht etwa einem Drittel der Erythrozytengröße. 1903 prägte Ross den Namen für diesen neu entdeckten parasitären Erreger: *Leishmania donovani* [Ross, 1903].

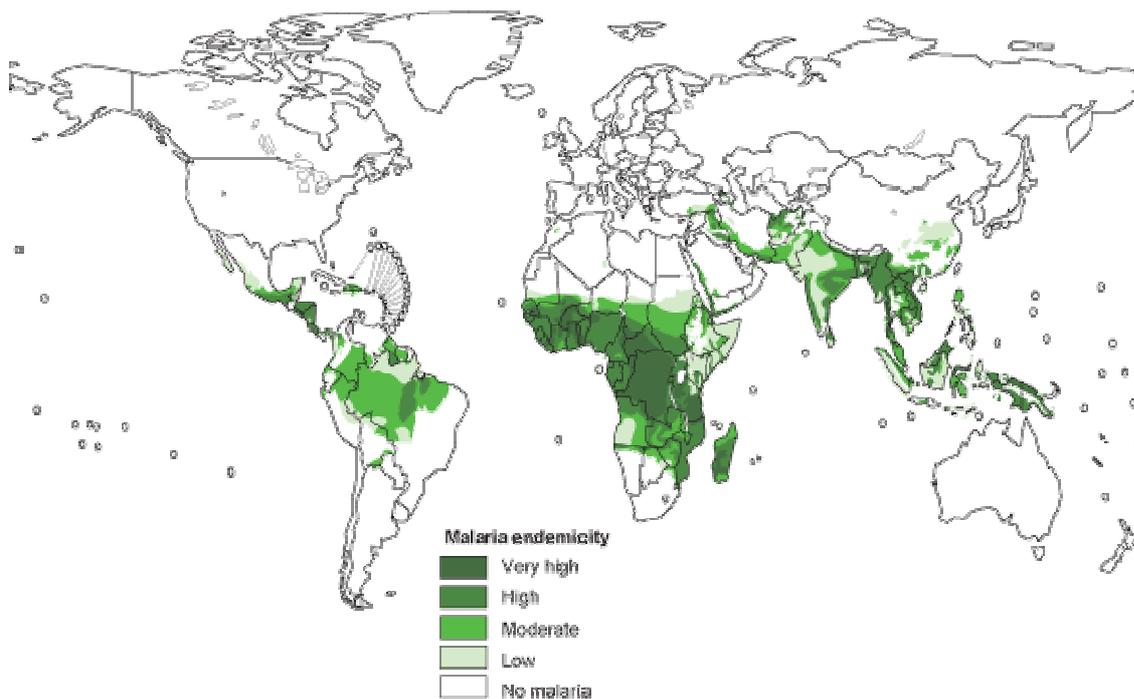
Im gleichen Jahr wurden diese Erreger von Manson und Low diagnostiziert. Ein Jahr später gelang Rogers die Kultivierung von *Leishmania donovani* in Zitratblut. Nicolle wies 1908 nach, dass die bekannten Erreger der Leishmaniose Flagellaten sind. Zu deren Anzucht entwarfen Nicolle, Novy und McNeal einen Blutagar („NNN-Agar“), zusammengesetzt aus Agar und defibriniertem Kaninchenblut [Sonnenschein, 1944]. 1912 erkannte Wenyon schließlich, dass Phlebotomen Überträger der Leishmaniose sind [www.leishmaniose.de/leishman_history.html, 2005]. Sergent und Parrot wiesen 1921 in einem Experiment Flagellaten in Sandmücken nach [Müller, 1946].

Im Jahr 2005 wurde durch die vollständige Entschlüsselung des Genoms von *Leishmania major* der vorläufig letzte Baustein zur Erforschung des Erregers geliefert und somit gleichzeitig die Grundlage für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen gelegt [Ivens et al., 2005].

1.2 Malaria

1.2.1 Allgemeines

Malaria, auch bekannt unter Sumpffieber, Wechselfieber, römisches Fieber, intermittierendes Fieber und Dschungelfieber, gilt als eine der häufigsten Tropenkrankheiten. Nach Schätzungen der WHO 2005 stirbt alle 30 Sekunden ein Kind in Afrika an Malaria, 3000 Kinder unter fünf Jahren jeden Tag. Jährlich fallen ihr 1 Million Menschen, 90% davon in Afrika, zum Opfer. Die WHO zählt weltweit 300 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr. Neben Afrika sind Asien, Zentral- und Südamerika sowie die Karibischen Inseln und Ozeanien betroffen (Abb. 5).



Quelle: <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>

Abb. 5: Risikoendemiegebiete der Malaria 2003

Es ist anzunehmen, dass der Ursprung der Malaria in Afrika liegt. Hier dominiert der Erreger *Plasmodium knowlesi*, Wirt sind Affe und Mensch. Ebenso in Afrika heimisch ist die *Anopheles Gambiae*, eine Stechmücke, die zu den aggressivsten ihrer Art zählt [Ackerknecht, 1963b].

Die Malaria (ital.: mal: Übel; aria: Luft) ist eine chronisch rezidivierende Infektionskrankheit. Die Krankheitsbilder werden durch die Erreger Plasmodien hervorgerufen. Humanpathogen sind vier Arten: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae* [Reader, 1997]. *Plasmodium falciparum* induziert das Krankheitsbild der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *ovale* das der Malaria tertiana und *Plasmodium malariae* führt zur Malaria quartana.



Quelle: http://www.ratsteachmicro.com/Malaria_notes/HCOE_CAI_Review_Notes_Malaria.htm

Abb. 6: Hauptsymptome der Malaria

Unspezifische Symptome aller Plasmodien-Erreger sind Fieber, Mattigkeit, Schmerzen und Anämie (Abb. 6). Im schlimmsten Fall erliegt der Patient seiner Erkrankung. Die Klinik der Malaria ist durch den periodischen Zerfall der mit Plasmodien infizierten Erythrozyten charakterisiert. Hierbei wird ein Fieberschub ausgelöst.

Bei der durch *Plasmodium falciparum* verursachten Malaria tropica ist der Fiebrerrhythmus uncharakteristisch. Die gefährlichste der drei Arten beginnt oft schlagartig mit hohem Fieber, Schüttelfrost, Beschwerden im Magen-Darm-Trakt, Nierenfunktionsstörung und Enzephalopathie. Dies kann bereits nach wenigen Tagen durch Mikrozirkulationsstörungen im Gehirn und Herzen, ausgelöst durch Veränderung

der Erythrozytenoberfläche, zum Tod führen. Übersteht der Patient die Fieberperiode, kommt es durchschnittlich nach einem Jahr zur Ausheilung ohne Rezidive.

Malaria tertiana (Erreger Plasmodium vivax/ovale) und Malaria quartana (Erreger Plasmodium malariae) erhielten ihren Namen durch die antike Zählweise des Fiebrhythmus. Hier wurde der erste Fiebertag bereits mitgezählt. Bei der Malaria tertiana tritt der Fieberanfall am dritten Tag mit einer Dauer von ca. sechs bis acht Stunden auf, bei der Malaria quartana jeden vierten Tag [Winkle, 1997]. Bei Persistenz der Erkrankung kommt es zur Hepatosplenomegalie und Anämie. Rezidive sind relativ häufig und können bei der Malaria quartana noch nach Jahren auftreten.

Plasmodien lassen sich der Klasse der Sporozoen, genauer Hämosporidien, zuordnen. Sporozoen sind Sporentierchen, Einzeller mit einer Größe von 2–100 µm. Diese meist intrazellulär lebenden parasitären Erreger reifen sowohl im infizierten Wirt wie auch im Vektor. Um eine Reifung der Parasiten zu ermöglichen darf die Temperatur nicht unter 17°C und die Luftfeuchtigkeit nicht unter 63% fallen.

Vektor ist die weibliche Anophelesmücke (Abb. 7).



Abb. 7:

Die weibliche Anophelesmücke

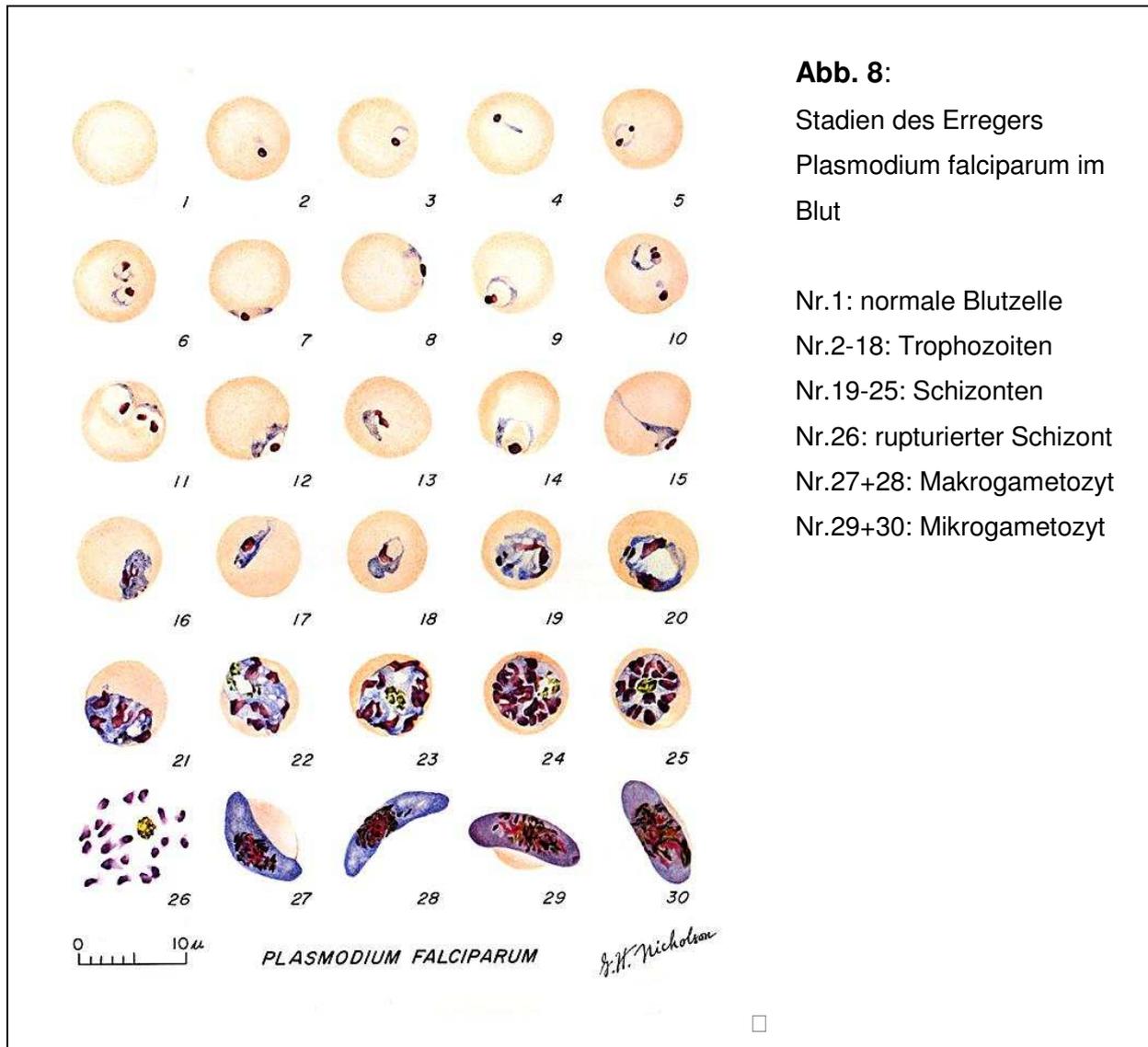
Während der Einnahme der Blutmahlzeit kann der Erreger übertragen werden.

Quelle: <http://www.cdc.gov/travel/temsam.htm>

Derzeit sind 400 Anophelesarten bekannt, nur 60 jedoch können die Krankheit übertragen. Als Lebensraum bevorzugt die Stechmücke flaches Gebiet mit hoher Luftfeuchtigkeit und warmer ruhiger Luft. Zur Eiablage sucht sie ein nächstgelegenes Wasserreservoir auf.

Durch den Stich einer infizierten Anophelesmücke gelangen die Erreger in Gestalt von Sporozoiten in den menschlichen Organismus. Sie dringen über die Blutbahn in die

Leberzelle ein und durchlaufen dort verschiedene Stadien, vom Schizonten zum Merozoiten, abhängig von der Gattung des Erregers (Abb. 8). Durch Zerstörung der Leberzelle gelangen die Merozoiten in die Blutbahn und infiltrieren Erythrozyten.



Quelle: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971.

Dort wandeln sie sich in Trophozoiten und weiter in Schizonten um. Durch erregerbedingtem Zerfall der Erythrozyten werden erneut Merozoiten freigesetzt, die weitere Erythrozyten befallen oder Vorstadien der Geschlechtsformen, Gametozyten, ausbilden. Aus ihnen entwickeln sich geschlechtlich differenzierte Stadien, die Makro- und Mikrogameten. Damit ist der ungeschlechtliche Zyklus der Erreger im Menschen abgeschlossen. Gametozyten überleben ausschließlich in der Mücke und werden durch deren Rüssel mit dem Speichel aufgesogen. Dabei mit aufgenommene Schizonten werden zusammen mit den Erythrozyten verdaut. Im Magen der Anophelesmücke vereinigen sich Mikrogamet und Makrogamet zu einer Zygote. Diese Entwicklung und folgende Zwischenschritte gehören dem sexuellen Zyklus des Erregers an. Dieser dauert temperaturabhängig 4-15 Tage. Nach Formumwandlung durchdringt der Parasit die Magenwand und entwickelt sich zu einem Ookineten. Weitere Kernteilungen führen zur Umbenennung in eine Oozyste mit darin befindlichen Sporozoiten. Durch Zerstörung gelangen diese in das Gewebe der Mücke und führen schließlich über den Speichel zum Verschluss des Rüssels. Dieser Reiz veranlasst das Insekt zu mehrmaligem Stechen, womit sich der Lebenszyklus schließt.

1.2.2 Historische Entwicklung

Den ältesten möglichen Hinweis auf Malaria und ihren Vektors liefert eine über 3000 Jahre alte babylonische Tontafel, auf der in Keilschrift eine „Fieberfliege“ erwähnt wird [Winkle, 1997]. In Schriften der Azteken und Maya konnten keine Hinweise auf Malaria gefunden werden, in Asien hingegen stieß man auf mythologische Angaben über Malariaanfälle in indischen Schriften der Veda. Auch die Ägypter berichteten (schon um ca. 1600 v. Chr.) über eine Krankheit mit Fieberattacken, die in regelmäßigen Abständen auftraten.

Im 5. Jh. v. Chr. wurde Rom, wie Livius berichtet, von einigen Malariawellen heimgesucht. Aus der Zeit des Mittelalters liegen vereinzelt weitere Hinweise auf das Wüten der Malaria vor. Es wird von Feldzügen deutscher Kaiser in Italien berichtet, welche aufgrund von Malariabefall abgebrochen werden mussten. Dichter wie Dante

und Peter von Eboli thematisierten die Erkrankung. Die erste Pandemie in Europa wurde 1557 beschrieben. In verschiedenen Teilen Englands war die Malaria von 1564-1730 eine der Hauptursachen für Krankheit und Tod [Reiter, 2000]. Indianer verwendeten als Therapieform die Cinchonabaumrinde. Diese Erkenntnis überlieferten Jesuiten aus Südamerika und brachten die Rinde 1640 nach Europa und 1657 nach Indien.

Das 17. Jh. war geprägt von zahlreichen Kriegen in Europa. Mit ihnen wuchs das Malariarisiko und der Ausbruch der Erkrankung. Viele Kliniker wie Morton, Sydenham, Lancisi, Torti, Mercato oder Masdeval beschäftigten sich mit diesem Thema.

Im 18. und 19. Jh. trat eine Regression der Malaria ein [Ackerknecht, 1963b]. 1717 verlieh der Italiener Giovanni Lancisi dem Krankheitsbild Malaria seinen Namen: mal: schlecht; aria: Luft. Während Großbritannien sich 1880 frei von Malaria sprechen konnte, wurden die USA schwer von der Erkrankung heimgesucht. Im Bürgerkrieg 1861-1865 war deshalb die Hälfte der Soldaten gefechtsunfähig. In vielen Ländern gelang die Ausrottung der Malaria, während sich in anderen Ländern, wie z.B. Australien, die Krankheit erst neu etablierte.

Anfang des 20. Jh. verursachte eine Hungersnot in Russland ein erneutes Aufflammen der Malaria. Wenige Jahre später wurde J. Wagner von Jauregg mit dem Nobelpreis für Medizin für seine Erkenntnis Syphilis mit Malaria heilen zu können ausgezeichnet. Diese Behandlungsmethode wurde erst durch die Gabe von Antibiotika abgelöst. Durch Einführung des Insektizids DDT gelang es den USA die Malaria zu besiegen. Die WHO startete Kampagnen zur weltweiten Vernichtung der Infektionskrankheit, die sich jedoch als erfolglos erwiesen.

Einige Male wurden die Weiterverbreitung der Malaria vom Menschen selbst durch Kriege, Expeditionen, Bau von Eisenbahnen oder Kanälen, Abholzungen und Anbau von Plantagen, also durch Zerstörung der Biosphäre verschuldet. Erst positive Wandlungen der sozialen Verhältnisse wie allgemeiner Wohlstand, besser gebaute Häuser und medikamentöse Behandlung können jetzt die Malaria zurückdrängen.

Die Historie der eigentlichen Erreger begann bereits 400 v. Chr. mit Hippokrates, dem es gelang einen Bezug zwischen der Krankheit Malaria und Sumpfgebieten herzustellen. Um ca. 50 v. Chr. ging Marcus Terentius Varro einen Schritt weiter und beschuldigte kleine Lebewesen in den Sümpfen der Verseuchung des Wassers und der Luft. 1678 entdeckte Leeuwenhoek erstmals Protozoen, die er „animalcules“ nannte.

Eine Charakterisierung des Krankheitsbildes der Malaria lieferte Morton 1696. Etwa 20 Jahre später verdächtigte Giovanni Lancisi Stechmücken als Überträger der Erkrankung. Eine Identifizierung des Erregers der Malaria gelang 1880 dem Franzosen Charles Louis Laveran. Fünf Jahre später erreichte Camillo Golgi eine Differenzierung der Erreger in zwei Arten, Plasmodium vivax und Plasmodium malariae. Sakharov forschte 1889 am Erreger Plasmodium falciparum. Den ersten Beweis der Übertragung der Malaria durch Anophelesmücken erbrachte Ronald Ross 1897. Ihm gelang der Nachweis von Oozysten im Darmgewebe einer weiblichen Anophelesmücke. 1949 konnte der Erreger Plasmodium falciparum in der Leber nachgewiesen werden.

Einen zweckmäßigen therapeutischen Ansatz gegen die Malaria fanden Indianer in Südamerika im 17. Jh. mit der Rinde des Cinchonabaumes. 1820 gelang es Pelletier und Caventou aus dieser Rinde reines Chinin zur Prophylaxe zu gewinnen. Im Laufe vieler Jahrzehnte wurden zahlreiche weitere Medikamente zur Malariabehandlung entwickelt. Für die insektizide Wirkung von DDT erhielt Paul Müller 1948 den Nobelpreis. Gegen das weit verbreitete Chloroquin konnten erstmals 1957 Resistenzen beobachtet werden. In den Jahren 1970-1980 wurde an Patienten eine Immunisierung mit bestrahlten Sporozoiten durchgeführt, bei der eine schützende Immunisierung gegen Plasmodium falciparum erreicht werden konnte [Clyde et al., 1973]. Erst 1987 wurde ein synthetischer Impfstoff von Manuel Elkin Patarroyo entwickelt. Er übergab diesen 1992 der WHO.

1.3 Paläopathologische Befunde zur Leishmaniose und Malaria

Im 19. Jh. wurden erste Untersuchungen an Mumien in ägyptischen Gräbern vorgenommen, diese waren jedoch zunächst noch ohne medizinisch-wissenschaftliche Intention. Der berühmte deutsche Pathologe Rudolf Virchow, der 1858 in seinem grundlegenden Werk „Die Cellular-Pathologie“ maßgeblich das Verständnis der Krankheitsentstehung auf zellulärer Ebene prägte, beschäftigte sich darüber hinaus auch mit entomologischen, anthropologischen und ersten paläopathologischen Untersuchungen an menschlichen und tierischen Knochenfunden. Im Jahr 1896

analysierte Petrie mit Kollegen ca. 2000 Mumien und Skelette [Petrie et Quibell, 1896]. Anfang des 20. Jh. führte Sir Marc Armand Ruffer (Anatom und Pathologe) erste systematische Untersuchungen altägyptischer Gräberfelder durch [Zink, 2003]. Er beschrieb Infektionskrankheiten wie Bilharziose und Tuberkulose [Ruffer, 1910 a, b]. Im Zuge der Notausgrabungen vor dem Bau des ersten Assuan Staudammes 1910 inspizierten Smith und Jones rund 6000 zum Teil mumifizierte menschliche Überreste [Smith et Jones, 1910]. Weitere Untersuchungen an Fundmaterialien aus verschiedenen Epochen und Regionen des alten Ägypten unternahm Strouhal 1980/81 im ägyptisch-nubischen Raum und Abusir [Strouhal et Jungwirth, 1980; Strouhal et Vyhnánek, 1981], Rösing 1990 in der Nähe von Assuan [Rösing, 1990], Alvrus 1999 in Nubien [Alvrus, 1999], Molto 2000 bei Luxor [Molto, 2000] und Zink mit Kollegen in Theben und Abydos [Zink et al., 2003].

Trotz der zunehmenden Erkenntnisse über Leben, Lebensumstände und Krankheiten im paläopathologischen Untersuchungsgut blieben die Befunde zu Infektionskrankheiten auf (makro-)morphologische Berichte beschränkt. Erst in jüngster Zeit wurden unterschiedlichste, auch molekulare Untersuchungsmethoden angewandt. Deelder und seinen Kollegen gelang es 1990 mithilfe eines immunologischen Nachweis eines Schistosomen spezifischen Antigens Bilharziose-Antigene nachzuweisen [Deelder et al., 1990]. Miller und seine Kollegen versuchten zwei Jahre später ebenfalls einen positiven Antigen-Nachweis zu erzielen [Miller et al., 1992]. Da es zu diesen Ergebnissen keine molekularbiologischen Analysen gibt, steht ein zuverlässiger Beweis noch aus. Die Anwendung immunologischer Tests aus der Routinediagnostik an ägyptischen Mumien erweisen sich durch das Auftreten von Kreuzreaktionen als unbrauchbar [Sallares et Gomzi, 2000]. 1994 unternahm Miller einen Versuch mithilfe eines Antikörper-Tests in ägyptischen Mumien unterschiedlicher Epochen das Plasmodium falciparum zu identifizieren [Miller et al., 1994]. Auch dieses Projekt wurde durch Taylor 1997 in Frage gestellt, da mittels ParaSight™-F-Test und molekularer Amplifikation von Plasmodien-DNA keine Bestätigung des positiven Ergebnisses erzielt werden konnte [Taylor et al., 1997].

Die Problematik zur Entwicklung von PCR-Systemen, die spezifische Mikroorganismen in der molekularen Paläopathologie identifizieren sollen, liegt darin, dass hoch konservierte ribosomale RNA-Gene keine optimalen Untersuchungsprodukte darstellen,

da sie, beispielsweise verursacht durch Kreuzreaktionen (z.B. mit sehr ähnlichen Sequenzen im Genom von Pilzen und saprophytären Bakterien), zu unspezifische Ergebnisse geliefert haben.

Für Leishmaniose und Malaria existieren bisher keine Belege im Pharaonischen Ägypten.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der molekularbiologische Nachweis der Infektionskrankheiten Leishmaniose und Malaria und die genaue Identifizierung ihrer zugrunde liegenden Erreger in altägyptischen Mumien und Skeletten. Das Fundmaterial stammte aus der prädynastischen Epoche bis zur Spätzeit des pharaonischen Ägyptens (ca. 3500-500 v. Chr.). Unter Zuhilfenahme moderner molekularbiologisch-paläopathologischer Untersuchungsmethoden wurde DNA extrahiert, auf humanes β -Aktin getestet und von rezenten Paraffinproben konkomitiert.

Des Weiteren soll überprüft werden, in wieweit Rückschlüsse auf die Ausbreitung und Häufigkeit von Leishmaniose und Malaria gezogen werden können und mögliche Unterschiede in den ägyptischen Epochen belegt werden können.

2 Material

2.1 Fundorte

Die Forschungsgruppe um Prof. Nerlich am Institut für Pathologie des Klinikums München Bogenhausen nimmt in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Archäologischen Institut in Kairo seit 1996 an verschiedenen Ausgrabungen in Ägypten teil. Das in dieser Promotionsarbeit verwendete Material stammt von Mumien und Skeletten aus Grabkomplexen, die Teile zweier der bedeutendsten Nekropolen (griech. Nekropolis, „Totenstadt“) des alten Ägyptens waren, aus der Nekropole Theben-West (Abb. 9) und der von Abydos [Nerlich et al., 2001].



Abb. 9:

Die Nekropole von Theben-West
Ort paläopathologischer Untersuchungen

Die in Oberägypten gelegene Totenstadt Theben-West war die Begräbnisstätte von Ägyptens Hauptstadt Theben während des Neuen Reiches (Tabelle 1). Diese Zeit gilt als die Blütezeit Ägyptens, hier fand es gleichzeitig seine größte geographische Ausdehnung bis weit in den heutigen Sudan hinein.

Tabelle 1: Zeitstellung und Fundorte ägyptischen Ausgrabungsmaterials

Epoche	Zeitspanne	Fundort	Begräbnisstätte
Prä- /Frühdynastisch	3500-2850 Chr.	v. Abydos	U-Friedhof, Aha, Semerchet, Qa'a TT 196 – Komplex
Mittleres Reich	2100-1650 Chr.	v. Theben/El-Asasif Theben/Dra Abu el- Naga	DAN 01.1/4/8/12 DAN 02.2
Neues Reich	1450-1350 Chr.	v. Theben/Gurna	TT 95 Kammer-1 TT 85 Schacht-2
3. Zwischenzeit	1070- 700 v. Chr.	Theben/Gurna	TT 95 Längs- /Querhalle
Mittleres Reich – Spätzeit	2100- 500 v. Chr.	Theben/ Dra Abu el- Naga	DAN 95.1/97.1
Neues Reich - Spätzeit	1450- 500 v. Chr.	Theben/Gurna, El- Khokha, Dra Abu el- Naga	TT 84/85/95/183 DAN 91.1 – 97.1

Bestattet wurden dort nicht nur die „Könige“ (Pharao und andere zentrale Machthaber im „Tal der Könige“) sondern in weiteren Grabkomplexen auch hohe Persönlichkeiten, v. a. Beamte und Gelehrte mit ihren Familien. Allerdings wurden eben diese Gräber bis in die

Spätzeit (~500 v.Chr.) hinein zusätzlich von verschiedenen Bevölkerungsgruppen für ihre Toten genutzt [Zink, 2003].

Eine Reihe dieser Gräber wurden inzwischen vollständig anthropologisch-paläopathologisch untersucht. Darunter fanden sich Gräber, die im Mittleren und Neuen Reich errichtet wurden (Abb. 10):

TT („Theben Tomb“): TT 84, TT 85, TT 95: Hügel von „Scheich-Abd-el-Qurna“

TT („Theben Tomb“): TT 183: Hügel von „El- Khokha“

TT („Theben Tomb“): TT 196: Hügel von „El Asasif“ .

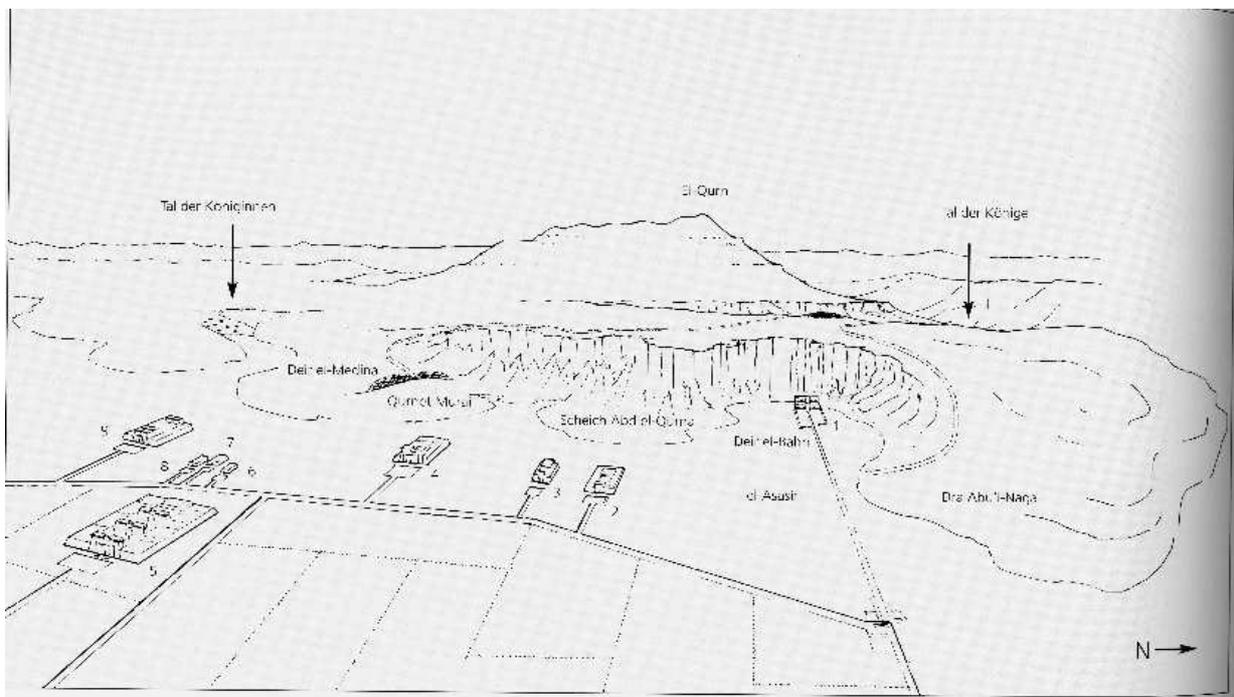


Abb. 10: Lageplan der Grabkomplexe Theben-West

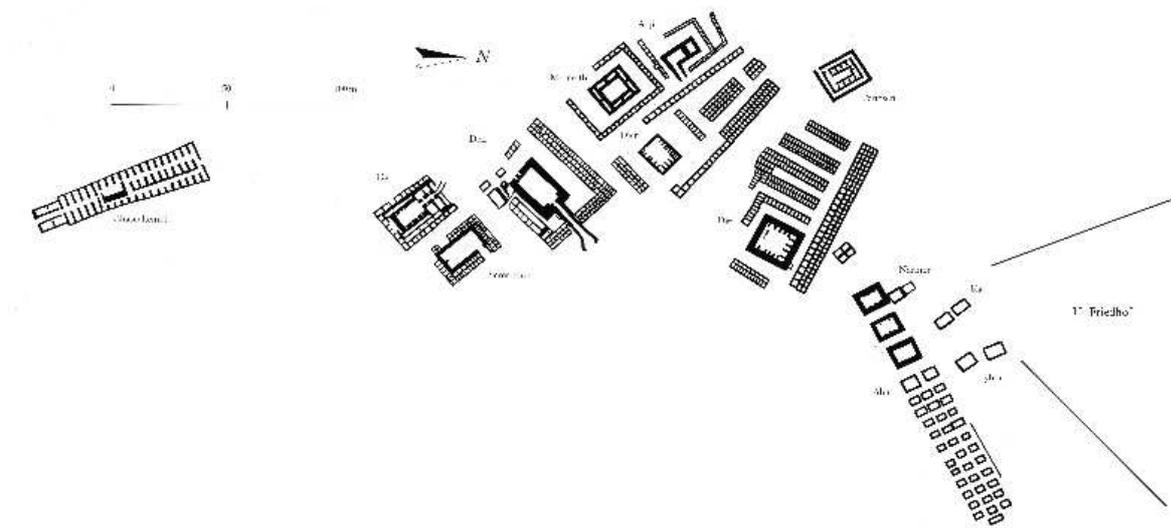


Abb. 12: Anordnung der Grabkomplexe von Abydos und U-Friedhof

An die ersten Königsgräber schließt sich weiter nördlich ein großer prädynastischer U-Friedhof (Uum el- Qaab) an, der im Zuge der Ausgrabungen vollständig erfasst wurde.

2.2 Fundmaterial

Im vorliegenden Fundmaterial (Anhang: Untersuchungsmaterial) erwies es sich in den meisten Fällen als schwierig die menschlichen Überreste einer gewissen Epoche oder einem Individuum zuzuordnen (Abb. 13). In Abydos wurde durch vorausgegangene Ausgrabungen von Émile Amélineau (1895-1899) und Flinders Petrie (1899-1901) die Fundsituation erheblich gestört.

Die Beamten- und Gelehrtengräber wurden großteils von späteren Bevölkerungsschichten nachbelegt und zusätzlich durch massive Grabplünderungen zerstört. Dies erlaubt eine exakte Datierung der Grabkomplexe lediglich in vereinzelten Fällen, in denen die Kammern und Schächte unversehrt blieben.

Die Funde von El-Asasif können dem Mittleren Reich (2100-1650 v. Chr.) und die DAN-Gräber dem Mittleren Reich bis Spätzeit (2100-500 v. Chr.) zugeordnet werden. Gurna sowie El-Khokha enthalten menschliche Überreste aus dem Neuen Reich bis Spätzeit (1450-500 v. Chr.) [Zink, 2003].



Abb. 13: Mumientorso

Die Mumien- und Skelettfunde wurden bereits im Zuge der Ausgrabungen morphologisch untersucht. Dabei wurde eine Alters- und Geschlechtsbestimmung durchgeführt. Diese ergab einen Sterbegipfel im Alter von 20 bis 40 Jahren. Die Kindersterberate lag mit 20.2% vergleichsweise niedrig [Nerlich et al., 2000].

2.3 Erhaltungszustand

Vorteilhaft auf den Erhaltungszustand der Mumien haben sich die natürlichen Umgebungsbedingungen in dem trockenen Gebiet ausgewirkt. Auch die Art der Mumifizierung trug ihren Teil zur Erhaltung der menschlichen Überreste bei.



Abb. 14: Konservierungszustand eines Mumienexemplars aus der Fundsammlung

Diese unterschied sich je nach Epoche. In Zeiten der Prä- und Fröhdynastie wurden aufgrund der noch unausgereiften Mumifizierungstechnik, bei der die Toten meist nur in Tücher gehüllt waren, vorwiegend nur Überreste der Bestatteten vorgefunden. Später im Mittleren und Neuen Reich führte die Ausreifung der Mumifizierungsmethodik, z.B. durch Balsamierungen, zu einem verbesserten Erhaltungszustand. In manchen Mumientorsi fanden sich noch erhaltene Weichteilreste.

Vorarbeiten zu dieser Promotionsarbeit haben einen generell guten Gewebe- und Biomolekülerhalt gezeigt.

Durch natürliche Umgebungsbedingungen und artifizielle Maßnahmen, wie z.B. Balsamierungen, wurde der menschliche Körper konserviert.

2.4 Morphologische Veränderungen

In historischen Mumien- und Skelettfunden sind keine morphologischen Veränderungen bekannt, die direkte Hinweise auf Leishmaniose und Malaria geben. Lediglich Knochenveränderungen, die auf eine chronische Anämie hinweisen, wie z.B. Cribra orbitalia und Hyperostosen, können einen indirekten Anhaltspunkt für eine Malariainfektion liefern. Für die viszerale Leishmaniose gibt es keinen Anhaltspunkt. Daher wurde als Untersuchungsmaterial auf eine Großzahl von Proben zurückgegriffen, die teilweise aus einem Pool von vorherigen Untersuchungen stammten.

2.5 Verwendete Geräte

Autoklaven, Heraeus Instruments

Brutschrank, Heraeus Instruments

Computer, ABI PRISM™ 310 Gene Analyser, Perkin Elmer

Computer, Deskpro, Compaq

Computer, Fujitsu Amilo Pro V3515, Siemens

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

Dentalbohrmaschine, MN Dental Instruments, München

DNA Thermocycler Typ Primus, MWG AG, Biotech

DNA Thermocycler Typ Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer

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

Gefrierschrank Typ economic super, Bosch

Kühlschrank Typ ecc (energy computed controll), Liebherr

Kugelschwingmühle Typ MM2, mit Zirkonium-Malbechern, Retsch

Magnetrührer Typ MR 2002, Heidolph

Mikrowellenherd Typ MWE 700, Bauknecht

Präzisionswaage Typ Navigator™, Ohaus®

Rotationsmischer, Agitateur rotatif, Marke unbekannt

Speed Vac Typ DNA 110, Savant
Stromversorgung, Mupid-21, Cosmo Bio Co., LTD.
Thermomixer Typ compact, Eppendorf
UV-Lampe, 245 nm, Marke unbekannt
UV-Transluminator Typ Mighty Bright, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco
Vortexer Typ MS 2, IKA- Labortechnik
Werkbank, steril, Typ Herasafe, Heraeus Instruments
Zentrifuge Typ 2-4, Sigma
Zentrifuge Typ 1.OR, Heraeus Universalzentrifuge, Laborteam Schultheiss
Zentrifuge Typ 5417R, Eppendorf
Zentrifuge Typ 5415CR, Eppendorf

2.6 Einwegmaterial und Hilfsmittel

Aluminiumfolie S, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dental-Diamant-HM-Fräse, MN Dental Instruments, München
Dental-Diamant-Trennscheibe, MN Dental Instruments, München
Dye ExTM Spin Kits (50), Quiagen GmbH, Hilden
Eppendorf Reaktionsgefäße safe lock (2,0 ml), Eppendorf
Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns, Quantum Prep[®], Biorad
Laboratories
Genetic Analyser Sample Tubes (0,5 µl), Perkin Elmer, Applied Biosystems Division
Kleenex[®] Tücher, Kimberley-Clark
Microcon[™] 30 Filter, Millipore GmbH, Eschborn
Multi-PCR-Tubes (0,2 ml), PEQ LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Multireaktionsgefäße (0,65 ml), Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filter (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Biozym, Oldendorf
PS-Tubes (4,5 ml), Greiner Labortechnik
Reaktionsgefäße (0,6 ml), Biozym, Oldendorf

Skalpelloklinge (22), BAYHA

ThermoTubes (0,2µl), PEQ LAB Biotechnologie GmbH

Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Safeskin[®], California

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

2.7 Chemikalien

Aceton, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Agarose, SeaKem[®] LE agarose, Biozym Diagnostik

Aqua ad injectabilia, B. Braun, Melsungen AG

Aqua bidest, H. Kerndl GmbH, Weißenfeld

Bromphenol-Blau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Diatomeen-Erde, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

DNA-Leiter (100 bp), Promega Corporation, Wisconsin (USA)

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

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

Eisessig, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Ethanol absolut, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Guanidinium-Thiocyanat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

HCl, Merck Eurolab GmbH, Ismaning

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

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

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

Tris-Cl, Merck Eurolab, GmbH, Ismaning

2.8 Reagenzien und Enzyme

AmpliTaq Gold™ DNA-Polymerase (5 U/μl), Applied Biosystems, Weiterstadt

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

DNA Sequencing Kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction enthält A-, C-, G-, T-Dye Terminator; dITP, dATP, dCTP, dTTP; Tris-HCl (pH 9,0); MgCl₂; thermal stable pyrophosphatase; AmpliTaq DNA Polymerase), ABI PRISM™ P.E. Applied Biosystems

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

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

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

Primer LSH 1/2, TCR P1/P2, TCR D1/D2 (50 pmol), Thermo Hybaid Interactiva Division, Ulm

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

Proteinase K, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Termination ready mix, Applied Biosystems, Weiterstadt

2.9 Standard Lösungen und Puffer

Diatomeen-Erde:

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

Ethidiumbromid-Lösung:

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

GSCN-Lösung (Guanidiniumthiocyanat-Lösung):

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

Ladepuffer (6x):

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

TAE-Puffer (20x):

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

3 Methoden

3.1 Allgemeines

In dieser Promotionsarbeit wurden spezielle Untersuchungstechniken der Molekularbiologie eingesetzt. Sie dienten dem Nachweis bestimmter Protozoen und den durch sie hervorgerufenen Krankheitsbildern. Durch Amplifikation charakteristischer Zielsequenzen der DNA aus bereits erwähntem Fundmaterial konnte der Erreger identifiziert werden. Zur Austestung und Optimierung der Methodik wurden rezente Proben der Erreger mitgeführt.

3.2 Probenentnahme und Probenaufbereitung

Die in der Promotionsarbeit untersuchten Knochenproben stammten aus der Probensammlung des Instituts für Pathologie, Klinikum München-Bogenhausen. Dabei konnte teilweise auf bereits vorhandene DNA-Lösungen zurückgegriffen werden, in einigen Fällen wurde aus noch unbehandeltem Knochenmaterial neue DNA extrahiert. Die Knochensplitter wurden bei Ausgrabungen vor Ort weitestgehend kontaminationsfrei entnommen. Im Labor wurde dann das Knochenmaterial vor der eigentlichen Probenentnahme mit 0,5% Natriumhypochloridlösung von anhaftenden Rückständen befreit (Abb. 15).

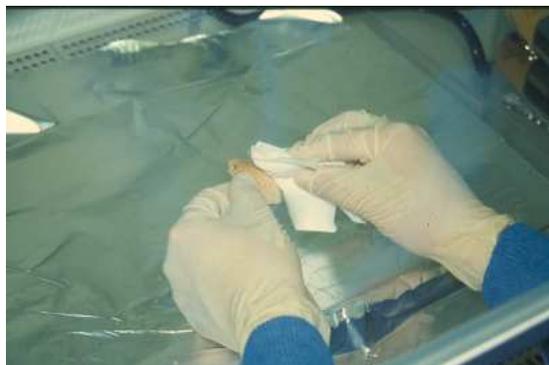


Abb. 15: Säuberung der Knochenoberfläche

Anschließend wurde der gereinigte Knochen mit einer Fräse abgeschliffen (Abb. 16).



Abb. 16: Fräsen

Arbeitsflächen, Geräte und Chemikalien wurden vor und nach jedem Arbeitsschritt dekontaminiert, da eine Verunreinigung eine differenzierte Betrachtung der Proben gefährden und Ergebnisse verfälschen kann. Um an geeignetes Trägermaterial für die Extraktion zu gelangen, bediente man sich einer mit Diamant-Trennscheibe bestückten Dentalbohrmaschine (Abb. 17).



Abb. 17: Sägen

Das entnommene Knochenmaterial aus dem Inneren des Knochens wurde mittels einer Kugelschwingmühle (25 Hz, Retsch MM200, Haan, Germany) zu Pulver verarbeitet [Haas et al., 2000], das Knochenmehl in Portionen à 1 g in Reaktionsgefäße gefüllt und bei Labortemperatur gelagert.

3.3 DNA-Extraktion

1 g Knochenpulver wurde mit 2,0 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0) und 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. EDTA ist ein Chelatkomplexbildner und führt besonders in Zusammenhang mit Ca^{2+} zu sehr stabilen Komplexen. Ca^{2+} per se besitzt eine sehr geringe Tendenz Komplexe zu bilden. Proteinase K weist endo- und exoproteolytische Aktivität auf.

Das gewonnene Produkt wurde bei Raumtemperatur drei Tage im Rotationsmischer inkubiert und nach jeweils 24 Stunden wurden weitere 25 µl Proteinase K zugeführt [Evison et al., 1997]. Nach einer Zeitspanne von 72 Stunden wurde das Material bei 4000 rpm 15 Minuten zentrifugiert, der die DNA enthaltende Überstand entnommen, 0,5 ml davon in ein frisches Reaktionsgefäß umgefüllt und der Rest eingefroren. Die 0,5 ml Aliquot wurden mit 1 ml GSCN (Guanidiniumthiocyanat)- Lösung und 50 µl Diatomeen-Erde versetzt [Boom et al., 1990]. Diatomeen-Erde besteht maßgeblich aus den Schalen der Kieselalgen und weist eine hohe Bindungsaffinität zur DNA auf.

Es schloss sich eine zweistündige Inkubation dieses Reaktionsgemisches im Rotationsmischer bei Raumtemperatur an.

Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde der Überstand verworfen und der entstandene Niederschlag nachfolgend zweimal mit 1,5 ml EtOH (70%) gewaschen, wobei jeweils für fünf Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Es folgte die einmalige Spülung mit 1,5 ml Aceton und im weiteren Verlauf die Trocknung des Niederschlags bei 56 °C für die Dauer von zehn Minuten.

Anschließend erfolgte die DNA-Eluation. Der Niederschlag wurde in 120 µl sterilem Wasser aufgenommen, im Thermomixer bei 800 rpm, 56 °C und 15 Minuten bearbeitet und alle fünf Minuten aufgeschüttelt und abschließend erneut zehn Minuten bei 13000

rpm zentrifugiert. Währenddessen wurden 300 µl Wasser in ein Reaktionsgefäß mit Filter (Millipore, Bedford, MA) vorgelegt. Das weitere Prozedere diente dem Aufkonzentrieren der DNA, welche zum Schluss mit 20 µl Aqua ad iniectabilia versetzt wurde.

Die gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C aufbewahrt.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion

3.4.1 Allgemeines

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) ermöglicht mithilfe spezieller Enzyme (bis zu 10 kbp) die Amplifikation einer festgelegten DNA-Sequenz. Dadurch lassen sich beispielsweise Krankheitserreger, Mutationen und genetisch bedingte Erkrankungen nachweisen. Obligatorisch für die Herstellung eines PCR-Ansatzes sind die DNA-Polymerase, die Primer, das DNA-Template, Nukleotide und Puffer. Jeder neu synthetisierte DNA-Strang dient als Matrize für einen weiteren Strang.

Der PCR- Zyklus beinhaltet drei Schritte:

1. Melting (Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA bei 96 °C und anschließende Abkühlung in Einzelstränge)
2. Annealing (Primer-Anlagerung an die Komplementär-Sequenz)
3. Elongation (Verlängerung der Primer mit Hilfe einer DNA-Polymerase und Renaturierung der DNA)

Die Zyklen werden bis zu 45-mal wiederholt. Die dabei verwendete Taq (Thermophilus aquaticus)-Polymerase verhält sich äußerst hitzeresistent.

Har Gobind Khorana unternahm 1970 erstmals den Versuch DNA zu amplifizieren. Er verwendete hierzu zwei flankierende Primer [Kleppe et al., 1971]. Dieser Gedanke wurde 1985 von Saiki, Ehrlich und Mullis aufgegriffen und weiterentwickelt [Saiki et al., 1985]. Mullis erhielt für die Entwicklung der PCR-Methode den Nobelpreis für Chemie.

In dieser Arbeit wurde an einer sehr geringen Menge von DNA-Molekülen das Erbgut von Leishmaniose- und Malariaerregern sowie das von ägyptischen Mumien analysiert. Um Störfaktoren bei der Amplifikation von aDNA auszuschalten, mussten vor der PCR-Anwendung zunächst geeignete Primer gefunden und getestet werden. Benötigt wurden Primerpaare, die konservierte Regionen des gesuchten Gens erkennen. Nach Abschluss der Vervielfältigung wurde das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen, im Elektrophoresegerät aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Anhand der Größe des PCR-Fragments konnte eine vorläufige Aussage über das Produkt und dessen Zuordnung zu einem Organismus getroffen werden.

3.4.2 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Kontaminationsvermeidung hat äußerste Priorität im Umgang mit aDNA. Da diese oft nur in sehr geringer Menge zu entnehmen und die PCR sehr sensibel ist, kann dies schnell zu Fehlamplifikationen führen. Durch standardisierte Methoden wurde in dieser Promotionsarbeit versucht eine Vervielfältigung von v. a. rezenter DNA zu vermeiden. Das sterile Arbeiten begann bereits am Ort der Ausgrabung und wurde in den Laboratorien fortgesetzt. Es standen für jeden Arbeitsschritt eigene Räumlichkeiten, ein prä-PCR-, ein PCR- und ein post-PCR-Labor, zur Verfügung. Jeder dieser Räume verfügte über notwendige Arbeitsgeräte, die nach jedem Gebrauch mit Aceton gereinigt wurden [Hummel et al., 1995]. Für den Transport der Tubes zwischen den Laboratorien wurden spezielle Träger verwendet. Die Verbrauchsmaterialien waren frei von DNA und RNA oder mussten bei Bedarf einer Autoklavierung unterzogen werden. Sterile Pipetten mit Filterspitzen (Safeseal Tipps, Biozym, Hess. Oldendorf, Germany) verhinderten weitgehend einen carry-over-Effekt [Zink et al., 2001]. Jeder Raum war mit Schutzkleidung ausgestattet. Oberflächen wurden vor und nach jedem Arbeitsschritt entweder mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt oder mit DNA-ZAP-Lösung behandelt und Einmalhandschuhe fortwährend gewechselt um jeglichen Kontakt mit rezenter humaner DNA zu vermeiden. Standard war das Mitführen von Kontrollen (2 Extraktionskontrollen und 1 PCR- Kontrolle) pro Extraktion.

3.5 Amplifikation der DNA

Mit der Herstellung des Mastermix begann der PCR-Ansatz. Der Mastermix, Mengenangaben finden sich in Tabelle 2, bestand aus folgenden Bestandteilen:

- dH₂O
- 10x PCR-Puffer
- MgCl₂ (25 mM)
- dNTP's (DNA Polymerization mix 20mM/dNTP, 500 µl)
- Primer 1 (Sense, 50 pmol)
- Primer 2 (Antisense, 50 pmol)
- Ampli-Taq-Gold (Taq-Polymerase, 250 Units)
- DNA-Template

Vor der Zusammenstellung des Mastermixes wurde eine für die DNA spezifische Primer-Testung durchgeführt. Verwendung fanden dabei bereits getestete Primer (in der Literatur beschrieben) oder es wurden anhand der bekannten Zielsequenzen neue Primer entworfen. Zur Optimierung der Primer verwendete man DNA aus rezenten Fällen. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Kreuzreaktionen mit Bakterien oder Pilzen auftraten. Zudem musste die optimale Temperatur für die Primer gefunden werden. Dabei spielten der Guanin-Cytosin-Gehalt (Optimum < 50%) und die Länge des Primers (Optimum ~23 Nukleotide) eine Rolle [MacHugh et al., 2000; Newton et Graham, 1994]. Nach der Primertestung wurden die Primer für die aDNA-Ansätze verwendet. Bei jeder Amplifikation wurden Extraktions- und PCR-Kontrollen ohne Zugabe von DNA-Template mitgeführt.

3.5.1 Amplifikation von humaner DNA

DNA degradiert schnell nach dem Tod und zerfällt in zahlreiche Fragmente. Diese bleiben allerdings bei einer Größe bis zu ~200 Basenpaaren bei altem biologischen Material über einen langen Zeitraum erhalten [Paabo, 1989]. Das humane β -Aktin-Gen ist ein Multicopygen. Es kommt mehrfach verteilt im Genom vor, ist oft nicht funktional, aber die genomische DNA-Sequenz des β -Aktin-Gens ist sichtbar. Es dient der Kontrolle amplifizierbarer DNA isoliert und die PCR nicht inhibiert zu haben [Ghossein et al., 1994]. Das β -Aktin-Gen findet man weder in Pilzen noch Bakterien. In dieser Promotionsarbeit wurde ein 202-Basenpaar großes Fragment des β -Aktin-Gens bei allen Proben parallel zur Amplifikation der Erreger-DNA mit amplifiziert. Die Herstellung des PCR-Mastermixes mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 μ l zeigt Tabelle 2:

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mastermixes

Ingredienz	Zielkonzentration	Volumen pro Ansatz
Puffer	1 fach	2,0 μ l
MgCl ₂	2 mM	1,6 μ l
dNTP	0,2 mM	0,2 μ l
Taq-Polymerase	0,05 U/ μ l	0,2 μ l
Primer Act 1	1 pM	0,4 μ l
Primer Act 2	1 pM	0,4 μ l
dH ₂ O		14,2 μ l
DNA		1,0 μ l

Die für die Amplifikation von humaner DNA nötigen Primersequenzen zeigt Tabelle 3:

Tabelle 3: Primersequenzen für β -Aktin-Nachweis

ACT-1: 5'- CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G-3
ACT-2: 5'- GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC-3'

Bei jeweils zehn Proben wurden zwei Extraktions- und eine PCR-Leerprobe mitgeführt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch im Thermocycler folgendem Prozess unterzogen:

Initiale Denaturierung der DNA bei 95°C für zehn Minuten, anschließend bei allen 45 Zyklen jeweils einminütige Denaturierung bei 94°C, Annealing drei Minuten bei 60°C und Extension drei Minuten bei 72°C [Zink et al., 2001]. Zur weiteren Synthese von noch nicht fertig gestellten Strängen schloss sich dem letzten Zyklus eine achtminütige Phase bei 72°C mit abschließender Kühlung auf 4°C an.

3.5.2 Amplifikation von Leishmanien-DNA

Eine molekularbiologische Untersuchung des Mumienmaterials half unter Verwendung von geeigneten Primerpaaren die Erreger-DNA des Leishmanienkomplexes zu identifizieren. Dabei wurden Primer ausgewählt, die gezielt ein 120 Basenpaar großes Fragment aus der minicircle kinetoplasten DNA der Protozoen amplifizieren [Degraeve et al., 1994; Rodgers et al., 1990]. Die für die Amplifikation von Leishmanien-DNA nötigen Primersequenzen zeigt Tabelle 4:

Tabelle 4: Primersequenzen für Leishmanien-Nachweis

LSH1: 5'- GGG TAG GGG CGT TCT GCG AA -3'
LSH2: 5'- SSS* CCM** CTA TW***T TAC ACC AAC CCC -3'

*S = G+C; **M = A+C; ***W = A+T

Hierbei handelt es sich um ein Gemisch von Primern unterschiedlicher Sequenzen.

Die Zusammensetzung des Mastermixes entspricht der in Tabelle 2 unter Verwendung der in Tabelle 4 aufgelisteten Leishmaniose-Primer.

Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocyclergerät unter den gleichen Bedingungen wie die β -Aktin-PCR durchgeführt.

Alle Proben aus dieser PCR wurden reamplifiziert, um geringste Mengen an Erreger-DNA detektieren zu können.

3.5.3 Amplifikation von Plasmodien-DNA

In Zusammenarbeit mit dem Tropeninstitut Berlin wurde das Gen Pfcr (Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter Gene) zur Amplifikation ausgewählt, da dieses Resistenzgen im Gegensatz zu rRNA keine Kreuzreaktionen mit Pilzen hervorruft und sich dieses als hoch spezifisch für den Nachweis von Plasmodium falciparum erweist [Djimde et al., 2001; Fidock et al., 2000]. Andere diagnostische Targets stellten sich in Bezug auf Mumienproben als unzuverlässig heraus. Primer, die auf repetitive Elemente des spezifischen Genoms gerichtet waren, wiesen folgende Primersequenzen auf:

Tabelle 5: Primersequenzen für die Outer-PCR

TCRP1: 5'- cgt tta ata ata aat aca cgc ag- 3'
TCRP2: 5'- cgg atg tta caa aac tat agt tac c- 3'

Tabelle 6: Primersequenzen für die Nested-PCR

TCRD1: 5'- tgt gct cat gtg ttt aaa ctt- 3'
TCRD2: 5'- caa aac tat agt tac caa ttt tg- 3'

Die erste Amplifikation, die Outer-PCR, vervielfältigte eine Gensequenz in einem größer abgesteckten Rahmen. Um eine höhere Spezifität dieser PCR zu erreichen, bediente man sich der Nested-PCR mit den Primern TCRD1 und TCRD2. Bei der Outer-PCR bildete ein ausgewählter Sense-Primer (TCRP1) zusammen mit dem Antisense-Primer (TCRP2) ein 537 Basenpaar langes Fragment. Die Spezifität der Sequenz dieses Fragments wurde mithilfe der Nested-PCR durch Benutzung des Sense-Primers (TCRD1) und des Antisense-Primers (TCRD2) deutlich erhöht. Aus der Outer-PCR wurde 1 µl des amplifizierten Produktes entnommen und dem Mastermix der Nested-PCR beigefügt. Das Endergebnis war frei von unspezifischen, noch in der Outer-PCR vorhandenen, Fragmenten. Die Reaktionsansätze zeigt Tabelle 7:

Tabelle 7: Reaktionsansätze für Outer- und Nested-PCR

Outer-PCR (50 µl):

Bestandteil	Volumen	Molarität im Ansatz
H ₂ O	38	
Puffer	5	50 mM KCl
MgCl ₂ (25 mM)	2	2,5 mM MgCl ₂
dNTPs (25 mM jedes)	0,4	4x 200 µM
TCRP 1 (20 µM)	2,5	1 µM
TCRP 2 (20 µM)	2,5	1 µM
Taq	0,3	1,5 U

Nested-PCR (50 µl):

Bestandteil	Volumen	Molarität im Ansatz
H ₂ O	35	
Puffer	5	50 mM KCl
MgCl ₂ (25 mM)	2	2,5 mM MgCl ₂
dNTPs (25 mM jedes)	0,4	4x 200 µM
TCRP 1 (20 µM)	1	1 µM
TCRP 2 (20 µM)	1	1 µM
Taq	0,3	1,5 U

Das PCR-Programm im Thermocycler für die Outer-Amplifikation zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Outer-Amplifikation

Outer			Nested		
Temperatur	Zeit	Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklus
94 °C	5 min		94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	45 Zyklen	94 °C	30 sec	30 Zyklen
56 °C	30 sec	45 Zyklen	48 °C	30 sec	30 Zyklen
60 °C	1 min	45 Zyklen	60 °C	1 min	30 Zyklen
60 °C	3 min		60 °C	3 min	
10 °C	Pause		10 °C	Pause	

In der Nested-PCR wurde ein PCR-Produkt mit der Länge von 134 Basenpaaren amplifiziert.

3.5.4 Agarosegelelektrophorese

Der Gesamtansatz jeder PCR wurde nach der Amplifikation zur Erfolgskontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese dient dem Auftrennen von Nukleinsäuren. Das amplifizierte Produkt wurde nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und konnte durch die Bestimmung der Größe des Fragments identifiziert werden.

Das Aufgießen der Trägermatrix benötigte 1x TBE (Triboessigsäure). 900 ml entmineralisiertes Wasser wurden mit 100 ml 10x TBE Puffer (10x TBE Buffer, Invitrogen, life technologies) gemischt. Um eine 2%-ige Agarosekonzentration herzustellen, wurden 200 ml des hergestellten 1x TBEs entnommen und 4 g Agarosepulver (peqGold Universal Agarose Pulver, peqlab) hinzugegeben. Nach Aufkochen in der Mikrowelle wurden 20 µl Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff, hinzu pipettiert. Ethidiumbromid ist hoch toxisch, da es in die DNA interkaliert. Daher war bei diesem Schritt höchste Sorgfalt während der Arbeit geboten. Nach Abkühlung wurde die Flüssigkeit in eine Form (10 cm x 5 cm) mit jeweils zwei Kämmen gegossen. Ein Kamm besitzt 11 Zähne, welche im Gel die Taschen formen (5 mm x 1 mm). Die Zähne müssen in das Gel eingetaucht sein. War die Agarose nach mindestens 30 Minuten abgekühlt, wurde sie in die Elektrophoresekammer gestellt und mit ausreichend 1x TBE übergossen. Die erste Tasche wurde mit 5 µl Standard gefüllt. Der Standard bestand aus 80 µl 1x TBE, 10 µl 50 Base-Pair-Ladder und 10 µl Ladebuffer. In jede weitere Tasche wurden 8 µl des PCR- Produktes und der Leerkontrollen mit 2 µl Ladebuffer pipettiert. Der Ladebuffer beinhaltete Bromphenolblau. Dies ließ die Lauffront erkennen.

Durch Einschalten des Gerätes wurde ein elektrisches Feld aufgebaut. Die DNA-Fragmente sind negativ geladen. Bei Nukleinsäuren tragen die Phosphatgruppen die Hauptladung. Deshalb wandern sie abhängig von ihrer Größe und Ladung unterschiedlich schnell Richtung Pluspol. Die Ladung wiederum ist abhängig von der Ionenstärke und dem pH-Wert des Puffers. Der Reibungswiderstand wird bestimmt durch die Porengröße der Matrix [Knippers et al., 1990]. Der Prozess wurde bei Raumtemperatur, 100 V, 90 mA gestartet und lief 40 Minuten. Nach Beendigung wurde

das Gel auf einen UV-Tisch gelegt, der Raum abgedunkelt und die aufgetrennten DNA-Fragmente beurteilt und photographiert.

3.5.5 Sequenzieren

Sequenziert wurden zur Bestätigung jene Proben, die in der PCR positive Ergebnisse, d.h. Banden im erwarteten Bereich, gezeigt hatten. Für die Sequenzierungs-PCR wurde ein 100 µl Ansatz mit dem jeweiligen auf die Erreger-DNA zugeschnittenen Primer hergestellt. Das DNA-Template (5 µl) stammte aus der Original-PCR. Die Konzentrationen und PCR-Bedingungen blieben unverändert.

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf ein 1 %-iges Agarosegel (200 µl 1x TBE, 2 g Agarosepulver, 20 µl Ethidiumbromid) aufgetragen und, wie oben beschrieben, 40 Minuten bei 100 V im Gelelektrophoresegerät aufgetrennt. Nach Beendigung wurde das Gel unter dem UV-Licht inspiziert und die passenden Banden zur weiteren Analyse sorgfältig mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein DNA-Gel-Extraction-Kit gegeben. Bei 8000 rpm wurde das Tube zehn Minuten zentrifugiert. Dies diente der Trennung von DNA und Gel. Im Anschluss wurden der Aufsatz (Sample Filter Cup und Gel Nebulizer) mit dem dort gesammelten Gel verworfen. Die DNA befand sich nun im Vial und wurde in das mit 200 µl sterilem Wasser vorgelegte Microcon-PCR-Tube pipettiert. Erneutes Zentrifugieren bei 11000 rpm für 15 Minuten folgte. Der Filter wurde gewendet und in ein neues Tube gebracht. Die folgende Zentrifugation dauerte fünf Minuten bei 11000 rpm. Der Filter wurde verworfen, im Tube befand sich nun die auf 1 µl aufkonzentrierte DNA. Diese wurde mit 10 µl sterilem Wasser verdünnt.

Dem weiteren Prozedere diente der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, eine Kombination für PCR und Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode [Sanger, 1981; Innis et al., 1988]. Folgend wurde zu jeder DNA-Probe ein Reaktionsansatz mit „Sense“-Primer und einer mit „Antisense“-Primer hergestellt. Der Reaktionsmix bestand aus:

- 4 µl Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix
- 6 µl steriles H₂O
- 2 µl 5x Puffer
- 2,5 µl „Sense“-oder „Antisense“-Primer (2 pM)
- 5,5 µl DNA aus der Sequenzier-PCR

Damit ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl. Die Bearbeitung im Thermocycler begann mit einer anfänglichen Denaturierung der DNA für drei Minuten bei 96°C, der sich 25 Zyklen anreihen:

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

Die Proben wurden zur weiteren Analyse an die Firma Medigenomics verschickt. Das Ergebnis der Sequenzen war über Internet abrufbar und wurde aus der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit dem BLAST-Algorithmus auf Übereinstimmungen mit Erregersequenzen verglichen. Ergebnisse lagen in Form von Elektropherogrammen vor.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick

Insgesamt wurden 91 Individuen analysiert. Durch Mehrfachextraktionen dieses Genmaterials entstand ein Pool aus 148 Proben, die alle auf β -Aktin-DNA, Leishmaniose-DNA und Malaria-DNA getestet wurden.

Die 91 Individuen sind unterschiedlichen Zeitepochen zuzuordnen. Sieben Mumien stammten aus der prä- bis fröhdynastischen Epoche und 42 aus dem Mittleren Reich. Weitere 42 Mumien wurden der Periode des Neuen Reichs bis zur Spätzeit zugeordnet. Zu allen DNA-Nachweisen wurden die Primer für die PCR-Durchläufe mithilfe von rezenter DNA getestet und auf die passende Hybridisierungstemperatur optimiert.

4.2 Nachweis von humaner DNA

Parallel zu allen folgenden Testungen auf Erreger-DNA wurde eine PCR zum Nachweis des humanen β -Aktin-Gens durchgeführt. Zweck dieses Vorgehens bestand in der Kontrolle des Extraktionserfolges einerseits und der Kontrolle der Hemmung der PCR durch Inhibitoren andererseits. Nicht jede Probe, in der Erreger-DNA identifiziert werden konnte, beinhaltete gleichzeitig auch den Nachweis von humaner DNA im untersuchten Skelettmaterial.

In jeder PCR wurden Extraktions- und PCR-Kontrollen mitgeführt. Bei den Extraktionskontrollen handelte es sich um Extraktionen, bei denen kein Probenmaterial eingesetzt wurde, aber zuvor erwähnte Puffer und Materialien verwendet wurden. Bei der PCR-Kontrolle handelte es sich um den PCR-Mastermix ohne Zugabe von DNA.

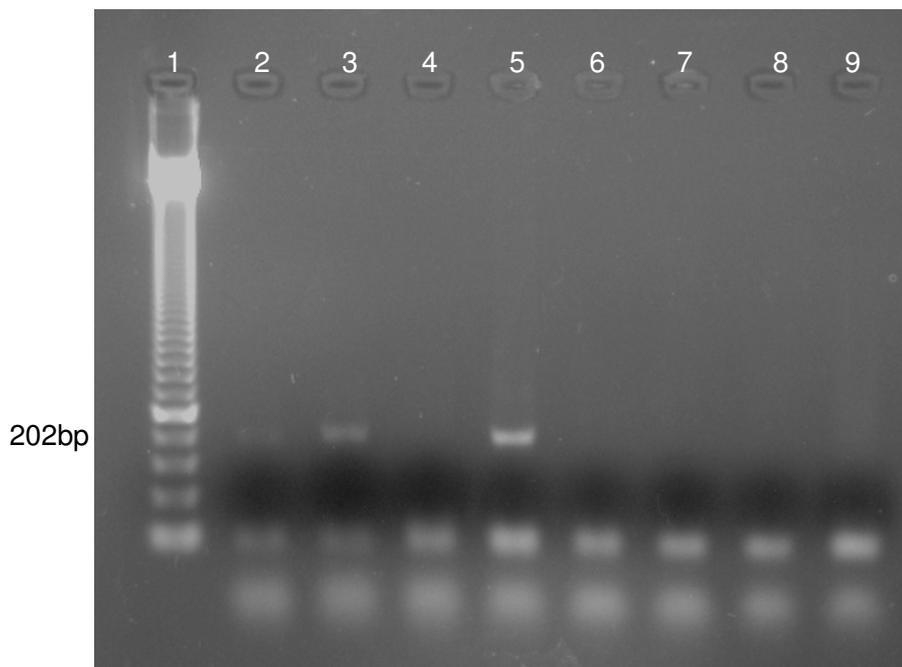


Abb. 18: PCR Amplifikation von β -Aktin. Bahn 1: 50bp Standard, Bahn 2-6 Mumienproben, Bahn 7-8: Extraktionskontrollen, Bahn 9: PCR Kontrolle.

Bei 91 analysierten Individuen zeigten 46 (49%) positive Banden im erwarteten Bereich von 202 Basenpaaren (Abb. 18). Die anderen 45 Proben blieben negativ. In zwei der auf Leishmaniose positiv getesteten Fälle konnte auch β -Aktin nachgewiesen werden.

4.3 Nachweis von Leishmanien-DNA

Bei Untersuchungen zum Befall der Mumien mit Leishmaniose zeigten 13 von 148 Proben in der PCR ein Amplifikat in etwa der zu erwartenden Größe von 120 Basenpaaren (Abb. 19).

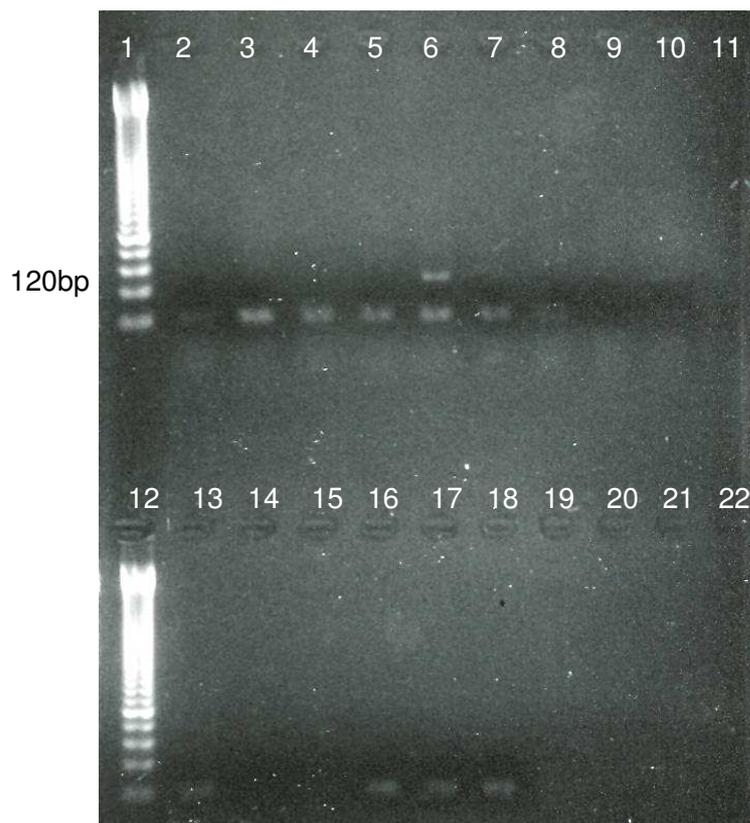


Abb. 19: PCR Amplifikation von Leishmania DNA. Bahn 1,12: 50bp Standard, Bahn 2-10, 13- 15: Mumienproben, Bahn16-17: Extraktionskontrollen, Bahn 18: PCR Kontrolle. Bahn 6 zeigt ein Amplifikat in der zu erwartenden Größe von 120bp.

Diese 13 Proben wurden sequenziert, wobei acht Proben eine lesbare Sequenz aufwiesen (Abb. 20).

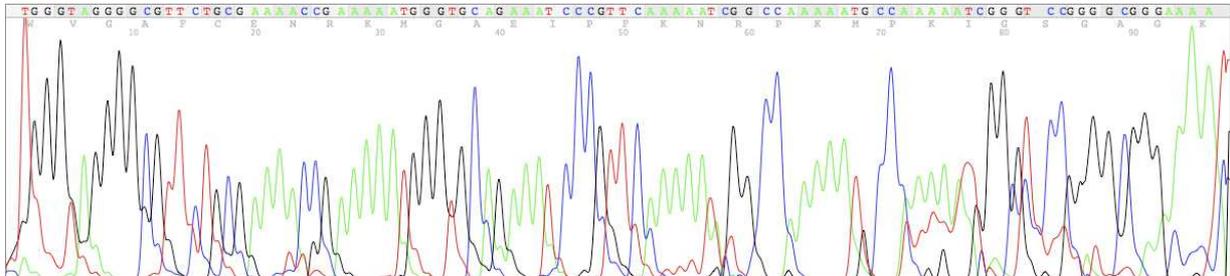


Abb.20: Sequenzierung der Leishmania DNA nach PCR Amplifikation.

```

gb|AF167714.1|AF167714    Leishmania donovani isolate MHOM/BD/93/MASUM-10
kinetoplast minicircle, sequence
Length=809

Score = 170 bits (188), Expect = 6e-40
Identities = 94/94 (100%), Gaps = 0/94 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  2   GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAAACCGAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAAAAATCGGC  61
      |||
Sbjct  713 GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAAACCGAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAAAAATCGGC  772

Query  62   CAAAATGCCAAAATCGGGTCCGGGGCGGGAAA  95
      |||
Sbjct  773   CAAAATGCCAAAATCGGGTCCGGGGCGGGAAA  806
  
```

Abb. 21: BLAST Sequenzvergleich einer Mumienprobe mit vollkommener Übereinstimmung mit der Referenzsequenz von *L. donovani*.

In der anschließenden manuellen Vergleichsanalyse der Sequenzen mithilfe des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) des National Center for Biochemical Information der U.S. National Library of Medicine (Abb. 21) zeigten sich abschließend vier Fälle mit Leishmaniose spezifischer Sequenz. Von diesen vier Proben waren zwei positiv und zwei negativ für β -Aktin (Tabelle 9).

Tabelle 9: Probenname mit identifiziertem Leishmania-Erreger

Probe	Erreger	β-Aktin
TT 196-2-78	Leishmania donovani	+
TT 196-MW3	Leishmania donovani	-
TT 196-48	Leishmania donovani/ infantum	-
TT 196-2-42	Leishmania donovani/ infantum	+

Von diesen vier positiven Proben konnten zwei eindeutig dem Erreger *Leishmania donovani* zugeordnet werden. Bei TT 196-48 und TT 196-2-42 war eine Identifikation der Leishmanienart nicht mit Sicherheit festzustellen. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass *Leishmania donovani* an Position 104 ein Nukleotid T aufweist, während bei *Leishmania infantum* an dieser Stelle ein Nukleotid C steht.

In den sieben aus der prä- bis frühdynastischen Epoche stammenden Mumien ließen sich keine Leishmaniose-Erreger identifizieren. Ebenso gelang bei den 42 Funden aus der Periode des Neuen Reichs kein Erregernachweis. Von den 42 untersuchten Individuen aus der Zeit des Mittleren Reiches stammten die oben genannten vier positiven Fälle.

4.4 Nachweis des Leishmanienerrregers in einem rezenten Fall

Zur Überprüfung der Methodik wurde nach Analyse der Mumienproben ein rezenter Patientenfall mit in das Experiment integriert, um sicherzustellen, dass die gewählte Analytik auch tatsächlich ein plausibles Ergebnis zeigen kann (Abb. 22). Dieses Vorgehen wurde dabei gewählt, um einerseits eine Plausibilitätskontrolle zu haben, andererseits jedoch durch die zeitliche Staffelung nach dem Mumienansatz einen carry-over Effekt und somit eine Kontamination ausschließen zu können. Darüber hinaus wurde die Vergleichsprobe aus einem in Paraffin eingebetteten Material in einem getrennten Laborbereich der Molekularpathologie bearbeitet. Ein Kontakt mit

Leishmaniose fand zuvor in keinem der Labore statt. Der rezente Fall stammt aus dem Bereich der Molekulardiagnostik des Instituts für Pathologie des Krankenhauses München Bogenhausen. Der Patient wurde dort mit Verdacht auf Leishmaniose eingeliefert und untersucht. Als Erreger konnte *Leishmania infantum* nachgewiesen werden, da die Sequenz, wie oben erwähnt, ein Nukleotid C an Position 104 des untersuchten Genomabschnitts aufwies (Abb. 23).

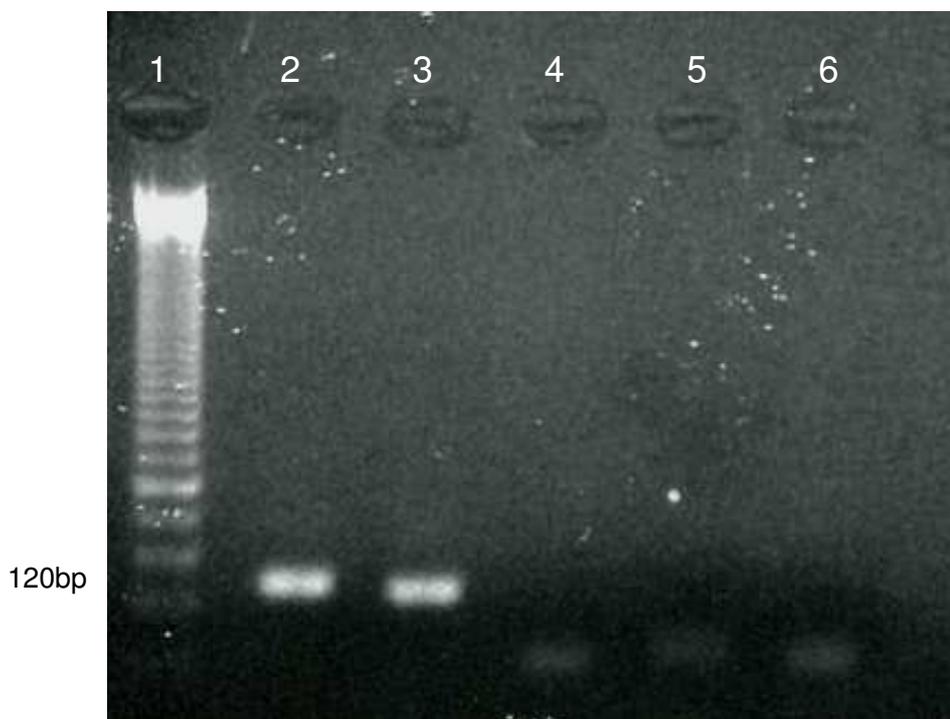


Abb. 22: Amplifikation von *Leishmania* DNA des rezenten Falles. Bahn 1: 50bp Standard, Bahn 2-3 Patientenprobe, Bahn 4-5: Extraktionskontrolle, Bahn 6: PCR Kontrolle.

L. donovani

1 aaaggcgaaa aataggccaa attcccaaac tttctggtc ctccgggtag gggcgttctg
61 caaaatcgga aaaatgggtg cagaaatccc gtcaaaaat cggc caaaaa tgccaaaaat
121 cggctccggg gcgggaaaact gggggttggt gtaaaatagg gccgggtggt ggccggaaat
181 ggctcctggg ctggattggg ctctctgggc tggattgggc tgaaccctg gggttggggc
241 ttggtttgg gtggctgac gttttttgg tgtttaatg gttgggtgc cttgatgtg
301 ggtgttggt gtgtggctt agtgggttg agcctggtg aggcttgc tttgtggga
361 ttagctggt ggggatgctt cggggtact ctacgggtg cttgatgat gatgggtg
421 gttgactta atgtgggt tagccgatg tggcttggg ttggccttag gtggtgattc
481 tcttaatat tgatataaa ggtaagtct tggacatat atatagccat agcgcttag
541 aatagtcga ctccgaagag ccagtctgag gtagttaa gtatacatta atctagtata
601 taatttagca tataataact gacattact gtacactata agtattatg ttaatatatt
661 gctgtagtat gtatttgt gctgtgtga gtagtaatat ctataccgat atattatag
721 gttggcgcat actgcagtga attgaaaatt aatgaattg ggtcgggctg tggggaggtg
781 tcgtaaatt cggaaaatga cggaa

L. infantum

1 aaaggcgaaa aataggccaa attcccaaac tttctggtc ctccgggtag gggcgttctg
61 caaaatcgga aaaatgggtg cagaaatccc gtcaaaaat cggc caaaaa tgccaaaaat
121 cggctccggg gcgggaaaact gggggttggt gtaaaatagg gccgggtggt ggccggaaat
181 ggctcctggg ctggattggg ctctctgggc tggattgggc tgaaccctg gggttggggc
241 ttggtttgg gtggctgac gttttttgg tgtttaatg gttgggtgc cttgatgtg
301 ggtgttggt gtgtggctt agtgggttg agcctggtg aggcttgc tttgtggga
361 ttagctggt ggggatgctt cggggtact ctacgggtg cttgatgat gatgggtg
421 gttgactta atgtgggt tagccgatg tggcttggg ttggccttag gtggtgattc
481 tcttaatat tgatataaa ggtaagtct tggacatat atatagccat agcgcttag
541 aatagtcga ctccgaagag ccagtctgag gtagttaa gtatacatta atctagtata
601 taatttagca tataataact gacattact gtacactata agtattatg ttaatatatt
661 gctgtagtat gtatttgt gctgtgtga gtagtaatat ctataccgat atattatag
721 gttggcgcat actgcagtga attgaaaatt aatgaattg ggtcgggctg tggggaggtg
781 tcgtaaatt cggaaaatga cggaa

Abb. 23: Sequenzunterschied zwischen *L. donovani* und *L. infantum*. Die Sequenzierung des rezenten Falles ergab ein Nukleotid C an Position 104 und konnte somit als *L. infantum* bestimmt werden.

4.5 Nachweis von Plasmodien-DNA

Zum Nachweis von Plasmodien wurden die 148 Proben auf das Vorhandensein des Pfcr-t-Gens (Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter Gene) molekular untersucht. Ein Großteil der Proben wurde parallel im Tropeninstitut Berlin (Leiter Prof. Dr. T. Jelinek) freundlicherweise analysiert und die Ergebnisse somit in einem unabhängigen Labor überprüft. Nach der PCR zeigten 13 Proben ein Amplifikat in etwa der zu erwartenden Größe von 134 Basenpaaren (Abb. 24).

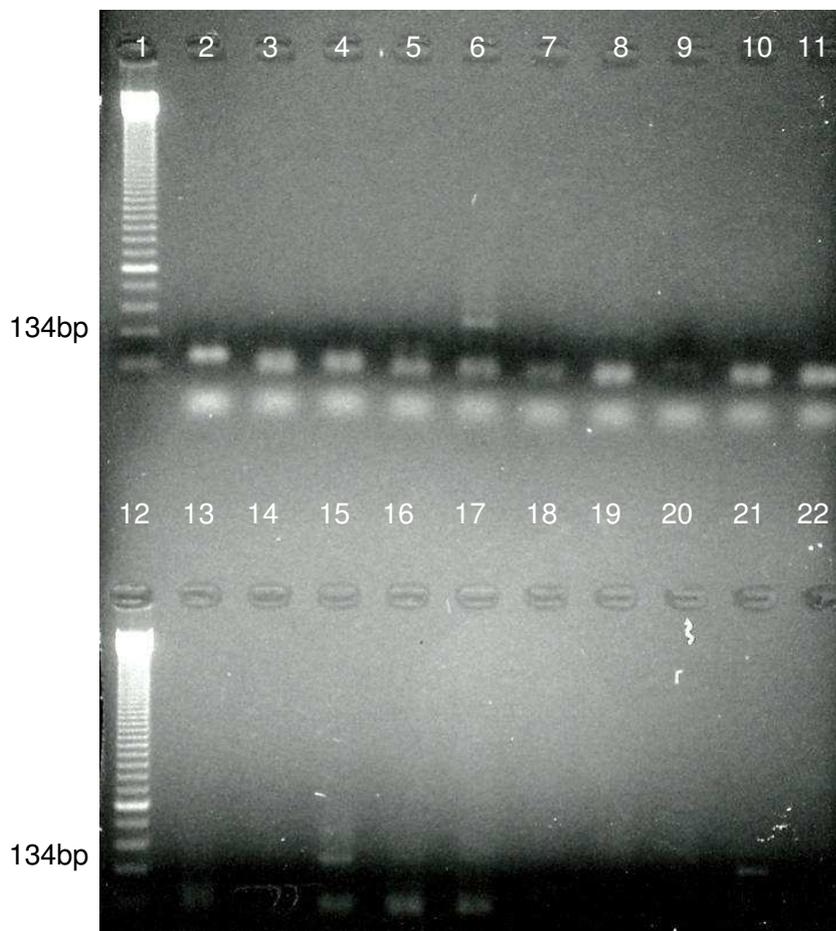


Abb. 24: PCR Amplifikation von Plasmodien DNA. Bahn 1,12: 50bp Standard, Bahn 2-11, 13-16: Mumienproben, Bahn 17-18: Extraktionskontrollen, Bahn 19-20: PCR Kontrollen. Bahn 6 und 15 zeigen ein Amplifikat in der zu erwartenden Größe von 134bp.

Diese 13 Proben wurden sequenziert, wobei nach Sequenzierung zwei Proben im Sequenzvergleich als Plasmodium falciparum-Sequenz identifiziert wurden (Abb. 25), wengleich bei einer dieser beiden Proben nur eine weitestgehende Sequenzübereinstimmung festgestellt werden konnte. Bei den restlichen Proben waren drei nicht lesbar, zwei unvollständig und sechs Proben stellten sich nicht als Plasmodium-spezifisch dar. Die zwei unvollständigen Sequenzen zeigten lediglich eine Übereinstimmung von 30% mit der untersuchten Plasmodium falciparum-Sequenz und wurden daher nicht als Plasmodium falciparum spezifisch gewertet.

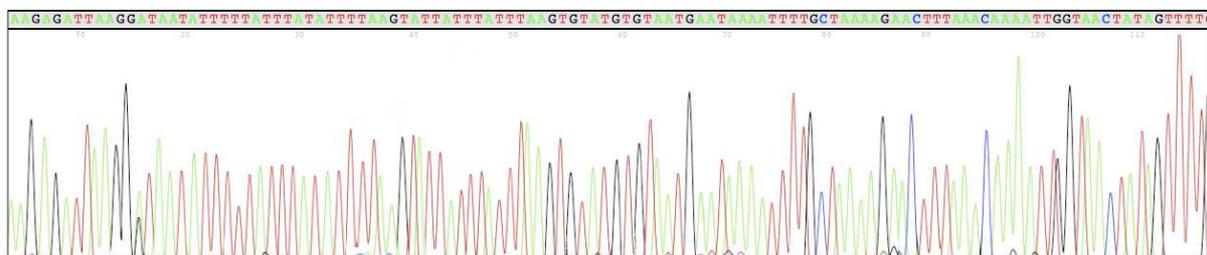


Abb.25: Sequenzierung der Plasmodien DNA nach PCR Amplifikation.

```

gb|DQ126095.1| Plasmodium falciparum isolate CHI-HN14 chloroquine resistance
transporter (crt) gene, partial cds
Length=148

Score = 203 bits (224), Expect = 1e-49
Identities = 116/117 (99%), Gaps = 1/117 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AAGAGATTAAGGATAATATTTTTATTTATATTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGTATGTG 60
      |||
Sbjct 118 AAGAGATTAAGGATAATATTTTTATTTATATTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGTATGTG 59

Query 61 TAATGAATAAAA-TTTTGCTAAAAGAACTTTAAACAAAATTGGTAACTATAGTTTTG 116
      |||
Sbjct 58 TAATGAATAAAAATTTTTGCTAAAAGAACTTTAAACAAAATTGGTAACTATAGTTTTG 2
  
```

Abb. 26: BLAST Sequenzvergleich einer Mumienprobe mit fast vollkommener Übereinstimmung mit der Referenzsequenz von Plasmodium falciparum.

Nach anschließender manueller Vergleichsanalyse der Sequenzen mithilfe des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) des National Center for Biochemical Information der U.S. National Library of Medicine (Abb. 26) konnte in zwei Fällen Plasmodien-DNA nachgewiesen werden. Diese waren auch beide positiv für β -Aktin (Tabelle 10):

Tabelle 10: Probenname mit identifiziertem Plasmodium-Erreger

Probe	Erreger	β -Aktin
TT 95 - 158	Plasmodium falciparum	+
TT 85 - 2	Plasmodium falciparum	+

Die beiden Proben TT 95 - 158 und TT 85 - 2 stammten aus dem Neuen Reich bis Spätzeit. In der prä- bis fröhdynastischen Epoche und während der Zeit des Mittleren Reiches ließen sich keine Plasmodien-Erreger identifizieren.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Promotionsarbeit ist erstmalig der eindeutige Nachweis der humanpathogenen Erreger der Leishmaniose im alten Ägypten über den archäologisch definierten Zeitraum von ~3000 Jahren gelungen. Die Sequenzierung des Genomabschnitts machte eine Differenzierung einzelner Vertreter innerhalb der Stämme möglich, obwohl alle Vertreter des Leishmaniose-Komplexes eine sehr ähnliche genetische Struktur aufwiesen.

Leishmaniose-Erkrankungen zeigten sich ausschließlich in der Zeit des Mittleren Reiches.

Zudem gelang der Nachweis des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* in alten ägyptischen Mumien. Zwar lieferten diese Ergebnisse keine Daten zur Quantität, nichtsdestoweniger konnte mithilfe dieser Promotionsarbeit die Frage, ob Malaria für die Epoche des Neuen Reiches zuverlässig nachgewiesen werden kann, eindeutig mit „Ja“ beantwortet werden. Der Nachweis beschränkte sich auf das Neue Reich bis Spätzeit.

Zur vergleichenden Untersuchung diente bei den Leishmaniose-Fällen rezentes Material aus einem klinischen, später pathologisch bestätigtem, Verdachtsfall. Dieses eignete sich, um die molekularen Strategien zur Erregerdiagnostik an historischem Gewebe zu überprüfen sowie den Leishmaniose-Komplex zu identifizieren und zu charakterisieren.

Humane β -Aktin-DNA, die ein Marker für den Erhalt von menschlicher DNA in Knochenfunden ist, konnte in 46 Fällen (49%) isoliert und amplifiziert werden.

5 Diskussion

5.1 Interpretation der Ergebnisse des β -Aktin-Nachweises und der rezenten Vergleichsproben

Um eine Inhibition der PCR ausschließen und damit die Amplifizierbarkeit nachweisen zu können, wurde mit jeder Erreger-DNA-PCR eine β -Aktin-PCR mitgeführt.

Aktin ist Hauptbestandteil des mikrofilamentären Systems in allen eukaryotischen Zellen und steuert Zellmotilitätsvorgänge [Rommelaere et al., 2004]. Es kommt jedoch nicht im Genom von Mikroorganismen wie Pilzen und Bakterien vor. Die Struktur verschiedener Gattungen des Aktinproteins blieb während der Evolution hoch konserviert [Gallwitz et Sures, 1980]. Die zwei nicht-muskulären Typen des Aktins sind das zytoplasmatische β - und γ -Aktin [Nakajima-Iijima et al., 1985].

Das Primerpaar wurde so bestimmt, dass das Amplikon eine Sequenzlänge von 202 Basenpaaren besaß. Gerade wegen dieser Kürze der Sequenz und dem mehrfachen Vorhandensein im menschlichen Genom eignete sich β -Aktin besonders bei der Untersuchung von aDNA.

Die hier erzielten 45 positiven Ergebnisse von insgesamt 91 Individuen sprechen für einen guten Erhaltungszustand der aDNA. In anderen Studien, in denen aDNA untersucht wurde, lag die Isolation und Amplifikation des β -Aktin-Gen bei vergleichbaren Werten [Zink et al., 2001].

In einigen auf Erreger-DNA positiv getesteten Fällen fanden sich keine Positivnachweise für β -Aktin. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass in einem Infektionsfall die infizierte Person eine große Anzahl Erreger in sich trägt und somit die Wahrscheinlichkeit steigt Erreger-DNA zu amplifizieren, selbst wenn keine humane DNA mehr nachweisbar ist.

Die PCR-Analysen wurden von Untersuchungen an rezenten Fällen (Paraffinproben) zur Kontrolle der Methodik und zu Vergleichszwecken begleitet. Die Kontrollproben wurden in anderen Laborbereichen getestet, die streng von den aDNA-Laboren getrennt waren.

Somit kam es zu keinem Zeitpunkt zu Kontaminationen mit rezenter DNA, da dort zuvor weder Leishmaniose noch Malaria untersucht wurden. Ein weiterer Beleg für eine kontaminationsfreie Untersuchung ist der Nachweis von *Leishmania donovani* in den Mumienproben, während die klinische Vergleichsprobe vom *Leishmania infantum*-Typ war.

5.2 Interpretation der Ergebnisse zum Leishmaniose-Nachweis

Leishmaniose ist eine durch die Sandmücke *Phlebotomus orientalis* übertragene Erkrankung, die sich auf unterschiedliche Art und Weise manifestiert. Sie kann klinisch unauffällig verlaufen, nur an bestimmten Hautstellen auftreten oder systemische (kutan, mukokutan oder viszeral) Ausprägung finden [Murray et al., 2005]. Die Krankheitsbilder werden durch die Art des Erregers, nämlich durch *Leishmania donovani*, *Leishmania major* und *Leishmania tropica* bedingt [Morsy et al., 1988].

In dieser Promotionsarbeit konnte erstmals in ägyptischen Mumien eindeutig *Leishmania donovani* als Krankheitserreger nachgewiesen werden, welcher die viszerale Leishmaniose hervorruft. *Leishmania infantum* unterscheidet sich von diesem lediglich durch den Austausch eines Nukleotids C. In zwei Fällen konnte keine genaue Zuordnung erfolgen, da hier die Sequenzierung nicht eindeutig gelungen war.

Von 148 untersuchten Proben konnte in vier Fällen eindeutig viszerale Leishmaniose nachgewiesen werden. Alle stammten aus dem gleichen Grabkomplex TT196 und ließen sich dem Mittleren Reich zuordnen. Es konnten keine Fälle aus der Prä- und Frühdynastie und aus dem Neuen Reich bis Spätzeit nachgewiesen werden.

Der Überträger der viszeralen Leishmaniose, die Sandmücke, benötigt einen speziellen Lebensraum. Diesen findet sie in Akazien- und Balanitenwäldern [Thomson et al., 1999]. Diese Bäume gedeihen besonders gut auf lehmiger Erde in trockener und heißer Atmosphäre und sind äußerst widerstandsfähig. Auch *Phlebotomus orientalis* ist somit auf heißes (34-38°C) und trockenes (400-1200 mm Regenfall) Klima angewiesen. Die erforderlichen Umgebungsbedingungen sind in Ägypten nicht zu finden, wohl aber im Sudan.

Im Ost-Sudan forderten in den letzten Jahren gehäuft auftretende Kala-Azar-Epidemien mehrere tausend Todesopfer [Elnaiem et al., 1998; Ritmeijer et Davidson, 2003].

Pratlong und seine Kollegen vermuteten, dass der Sudan Ursprungsort der viszeralen Leishmaniose gewesen sein muss und sich die Krankheit erst von dort weiter nach Indien ausbreitete und in die Neue Welt gelangte [Pratlong et al., 2001]. Daher lässt sich die Hypothese aufstellen, dass sich Ägypter im Zuge ihrer Handelsreisen im Sudan mit Leishmaniose infizierten und den Erreger nach Ägypten einschleppten und dort ihrer Krankheit erlagen. Gerade zur Zeit des Mittleren Reiches, in der die vier positiven Fälle nachgewiesen werden konnten, herrschten verstärkt Handelsbeziehungen zum Sudan. Für die Möglichkeit einer Krankheitsübertragung im Sudan spricht weiter die Klinik der viszeralen Leishmaniose. Sie ist geprägt von einer langen Latenzperiode, die Wochen bis Monate dauern kann [Herwaldt, 1999]. Somit konnte die Krankheit erst in Ägypten zum Ausbruch gekommen sein.

Die vier an Leishmaniose Erkrankten der 42 untersuchten menschlichen Überreste aus dem Mittleren Reich weist auf eine hohe Inzidenz von 9,3% hin. Dies lässt per se auf eine damals große Anzahl an Infektionsfällen schließen.

Da es sich im untersuchten Fundmaterial um aDNA, die sich in einem Teil der Fälle nicht mehr amplifizieren ließ, handelt und dies eine sichere Bestimmung und ein Auffinden des Erregers erschwert, ist von einer noch größeren Anzahl von Infizierten auszugehen. Unter Umständen herrschte gerade zu dieser Zeit im Sudan eine Epidemie.

Noch heute ist die Leishmaniose eine Erkrankung der ärmeren Gesellschaftsschichten [Murray et al., 2005]. Dies lässt sich u. a. auf die schlechte Behausung und fehlende Medikamente zurückführen. Ohne geeignete Therapie, die den Ägyptern damals noch nicht zur Verfügung stand, verläuft die viszerale Leishmaniose meist tödlich. Die Versorgungslage während der Periode des Neuen Reiches war erheblich besser als zur Zeit des Mittleren Reiches [Zink, 2003]. Unter Umständen konnten genau aus diesem Grund keine Fälle aus dem Neuen Reich nachgewiesen werden, sondern ausschließlich Fälle aus dem Mittleren Reich. Demzufolge spielen die Umgebungsbedingungen der gefährdeten Personen mindestens eine ebenso wichtige Rolle wie die medikamentöse Therapie.

Einen weiteren Gesichtspunkt zum Infektionsrisiko mit Leishmaniose beschreibt eine Untersuchung während eines Kala-Azar-Ausbruchs in einem sudanesischen Dorf 1995-2002. Dort waren fast alle Bewohner mit dem Erreger infiziert, aber nur bestimmte Familien und ethnische Gruppen erkrankten manifest [Bucheton et al., 2003]. Bucheton und seine Kollegen wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen Kala-Azar und einem Genort auf Chromosom 22q12 nach und vermuteten einen weiteren auf Chromosom 2q23-q24. Infolgedessen könnte die hohe Inzidenz im Grabkomplex TT196 auf eine erhöhte genetische Prädisposition für viszerale Leishmaniose hinweisen, die z.B. in einem familiären Kontext zu sehen ist.

Der Anstieg mit Leishmaniose infizierten Patienten in der heutigen Zeit lässt sich auf Koinfektionen mit dem HIV-Virus zurückführen. Im Osten Afrikas wird eine weitere Zunahme der Leishmaniose erwartet [Desjeux & Alvar, 2003]. Schließlich ist anzunehmen, dass schon im alten Ägypten Koinfektionen existierten, die das Immunsystem geschwächt haben. Koinfektionen konnten bereits durch Amplifikation von Tuberkulose-Erregern in weiteren Publikationen des hiesigen Instituts im selben Fundmaterial bestätigt werden [Zink et al., 2005].

5.3 Interpretation der Ergebnisse zum Malaria-Nachweis

Ziel war es mit einer möglichst sensitiven Methode Plasmodien-Arten in Mumien durch ein Amplikon in der Größe von 134 Basenpaaren nachzuweisen. Von den 148 molekular untersuchten Proben zum Nachweis von Plasmodien konnten 13 nach der PCR als möglich positiv eingestuft werden. Zum Ausschluss falsch positiver Proben nahm die Sequenzierung einen hohen Stellenwert ein. Nach Sequenzierung und anschließendem BLAST-Vergleich konnte sicher in einem Fall eine Übereinstimmung der Sequenz mit Plasmodien-DNA nachgewiesen werden. In einer weiteren Probe konnte nur eine weitestgehende Sequenzübereinstimmung festgestellt werden.

Die beträchtliche Zahl an positiven Verdachtsfällen nach der PCR-Durchführung lässt sich auf eine unspezifische Amplifikation von beispielsweise Pilzsequenzen oder anderen Fremdsequenzen zurückführen.

Mit ähnlichen Problemen hinsichtlich aDNA sahen sich auch andere Autoren konfrontiert [Taylor et al., 1997; Sallares et Gomzi, 2000]. Sie hatten mithilfe einer hemi-nested-PCR zwei menschliche Rippen unterschiedlicher Individuen auf den Erreger Plasmodium falciparum untersucht. Das Untersuchungsmaterial war jedoch nur 60 Jahre alt, d.h. im paläopathologischen Sinne sehr „jung“, so dass ein noch sehr guter Erhalt von DNA vermutet werden kann. In einer Mumie aus der Spätzeit Altägyptens (der so genannten Granville-Mumie aus Gurna/Theben-West; ~700 v. Chr.) hingegen fanden die oben genannten Autoren keine aDNA-Spuren des Erregers mit Hilfe der von ihnen entworfenen Primer, obwohl Miller und Kollegen (1994) bei eben dieser Mumie mittels immunologischem Test ein Plasmodium-falciparum-Antigen nachgewiesen haben wollen [Miller et al., 1994]. Anzumerken ist, dass beide Untersuchungen der Granville-Mumie auf Fundmaterial aus einem Muskel beruhten und der zur Diagnostik von Miller und Kollegen eingesetzte ParaSight-F-Test als vergleichsweise sehr unspezifisch für paläopathologisches Untersuchungsmaterial gewertet wurde [Sallares et Gomzi, 2000]. Die Schwierigkeit aDNA von Plasmodium falciparum nachzuweisen, lag bisher darin, dass das Primersystem für altes Material zu unspezifisch war und folglich vermehrt Fehlamplikate aufgezeigt wurden [Herberth, 2004].

Demgegenüber wurden die in der hier vorliegenden Studie verwendeten Primer für rezente Diagnostikfälle entwickelt, um akute Infektionen feststellen zu können. Anschließend wurden sie nach optimaler Anpassung an der aDNA angewandt.

In dieser Promotionsarbeit wurde ausschließlich Knochenmaterial verwendet, da dieses stabil gegenüber mechanischen Einflüssen und widerstandsfähig gegenüber Dekomposition ist.

Ein Großteil der Proben wurde zugleich im Tropeninstitut Berlin untersucht. Das positive Resultat der zwei Mumien wurde zudem durch die anschließende Sequenzierung und den Sequenzvergleich bestätigt. Beide Fälle waren Proben aus dem Neuen Reich bis Spätzeit. Zwar lieferten diese Ergebnisse keine Daten zur Quantität, nichtsdestoweniger konnte mithilfe dieser Promotionsarbeit die Frage, ob Malaria für die Epoche des Neuen Reiches zuverlässig nachgewiesen werden kann, eindeutig mit „Ja“ beantwortet werden.

Gerade während des Neuen Reiches blühte der Handel. Ägypten erlebte eine relativ sorgenfreie Zeit. Die Bevölkerungsdichte wuchs und um einen ausreichenden Nahrungsvorrat für die zahlreichen Bewohner sicherzustellen bedurfte es einer erfolgreichen Ernte. Diese konnte in den trockenen Gebieten Ägyptens nur durch die Bewässerung der Böden gewährleistet werden. Die feuchten Äcker eigneten sich jedoch auch als ideales Reservoir für Brutstätten der Anophelesmücken. Wurden in Zeiten von Unruhen die bedeutsamen Bewässerungsanlagen durch Feinde zerstört, verwandelte sich zusätzlich fruchtbares Ackerland in Sumpfgebiet. Die periodischen Überschwemmungen des Niltals begünstigten zusätzlich die rasche Expansion der Anophelesmücken.

Bereits Plinius der Ältere beschrieb in seiner „Naturalis historia“ die Malaria tropica als „eine alte und häufige Plage der Ägypter“. Der Versuch sich vor dieser Erkrankung zu schützen, bestand in der Anrufung der Götter, v. a. von Horus, und der Dämonen, sowie im Tragen von Amuletten [Winkle, 1997]. Eine ~3000 Jahre alte babylonische Tontafel weist mit dem Wort „Fieberfliege“ darauf hin, dass schon damals ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einer Anhäufung der Mücken bekannt war.

Der Ursprung des Erregers wird weiter diskutiert. Escalante und Kollegen (1995) sowie Qari mit Kollegen (1996) vertraten die These, dass sich *Plasmodium falciparum* vor vier bis zehn Millionen Jahren von *Plasmodium reichenowi*, einen Schimpansen befallenden Erreger, abgespalten hat. Sallares und Gomzi sprachen von einem einige tausend Jahre jüngeren Ursprung, da sich Erreger und Wirt gemeinsam weiterzuentwickeln scheinen und *Plasmodium falciparum* noch immer für den Menschen überaus gefährlich ist. Setzt man also eine jüngere Abstammung voraus, so gibt es einerseits einen demographischen Erklärungsansatz, der davon ausgeht, dass der Erreger aus einer geographisch begrenzten Population hervorging, und andererseits einen Ansatz, der die natürliche Selektion eines Stammes favorisiert [Rich et al., 1998]. Der geographische Ansatz vermutet den Ursprung in den afrikanischen Tropen. Von dort könnte sich der Erreger innerhalb der letzten 6000 Jahre in die subtropischen und tropischen Regionen der nördlichen Halbkugel ausgebreitet haben.

Die gemeinsam gewachsene Erreger-Wirt-Beziehung führte beim Menschen durch wiederholte Epidemien in einigen Gebieten zu erworbener Immunität gegen den Erreger (z.B. Sichelzellanämie). Dies könnte einst im alten Ägypten von Bedeutung gewesen

sein, wodurch sich die letztlich geringe Anzahl an Plasmodien-DNA-haltigen Proben erklären ließe. Aber auch der Erreger unterliegt ständigen Mutationen. Sehr schnell kann dieser Resistenzen gegen Medikamente, wie z.B. Chloroquin, entfalten. Verschiedene Gene sind mit Medikamenten-Resistenz bei *Plasmodium falciparum* in Zusammenhang gebracht worden [Rich et al., 1998]. Resistenzen traten auch bei dem Vektor, der Anophelesmücke, auf. Nach dem zweiten Weltkrieg entwickelte das Insekt in einigen Regionen nach nur temporärem Rückgang Resistenzen gegen das Insektizid DDT. Diese genetischen Mutationen erschweren weitere Behandlungsstrategien.

In dieser Promotionsarbeit ist es trotz der derzeit noch nicht gänzlich ausgereiften Methodik gelungen *Plasmodium falciparum* in Mumien nachzuweisen. Weitere Studien werden erforderlich sein noch zielgerichtete Primer oder Gene für die Amplifikation zu entdecken. Um ein besseres Verständnis und Behandlungsstrategien gegenüber dem Erreger zu erzielen, ist es von Bedeutung künftig weiter dem Ursprung des Erregers und seiner Evolution nachzugehen.

5.4 Einschränkungen der Analyse

5.4.1 Material und Lagerungsbedingungen

Die hier untersuchte aDNA wurde aus Skelettmaterial längst verstorbener Individuen gewonnen.

Im Allgemeinen degradiert DNA bereits kurz nach dem Tod, bei Mumien ist sie zumeist bis auf eine Länge von 200 Basenpaaren abgebaut [Paabo, 1989]. Durch fehlende Reparaturmechanismen der aDNA, Strangbrüche und Fehlkodierungen ist eine Destruktion unaufhaltsam [Hansen et al., 2001; Hoss et al., 1996]. Zudem erklären sich die geringe Haltbarkeit sowie die Fragmentierung der DNA durch die Zersetzung durch Enzyme und die Besiedelung mit Mikroorganismen.

Diese Faktoren und das in Mumien nur noch spärlich existente Gewebe erschwerten die DNA-Extraktion.

Deshalb wurden die Proben aus Knochenmaterial entnommen, da dieses hydrophob, hart und widerstandsfähig gegenüber Dekomposition ist. Aus den Knochenfunden konnte häufig nur eine sehr geringe Konzentrationsmenge an DNA, die als Ausgangssubstanz für das weitere Procedere eingesetzt werden konnte, isoliert werden. Experimentell erfasst wurden aDNA-Fragmente mit einer Größe von nur wenigen 100 Basenpaaren, da diese aufgrund der Kürze eine größere Haltbarkeit gewährleisten [Lassen et al., 1994]. Diese wurde unter anderem auch durch Mumifizierung intensiviert. Zur Einbalsamierung wurde Natron verwendet, welches dem Körper Wasser entzieht, den pH-Wert ansteigen lässt und somit für eine schnelle Austrocknung des Gewebes sorgt [Brier, 1998].

Einige Autoren stellen Ergebnisse im Umgang mit aDNA in Frage, da Experimentieren mit aDNA ein hohes Risiko für falsch positive Resultate durch Amplifikation von Fremd-DNA in sich birgt [Zink et Nerlich, 2003]. Deshalb soll hier auf einige Aspekte der Kritikpunkte eingegangen werden. Marota und Mitarbeiter beispielsweise, Kritiker im Umgang mit alter DNA, hegten Zweifel an der Authentizität von aDNA, da diese ihrer Meinung nach im Zuge des heißen Wüstenklimas degradiert und deshalb nur eine maximale Haltbarkeit von 700-800 Jahren erreicht [Marota et al., 2002]. Hohe Temperaturen beschleunigen in der Tat den DNA-Zerfall, ebenso Bodenfeuchte, Luftfeuchtigkeit, radioaktive Strahlung und ein niedriger pH-Wert [Zink et al., 2002]. Dennoch konnte insbesondere in altägyptischem Mumienmaterial ein wesentlich besserer Erhalt der aDNA nachgewiesen werden als bisher angenommen [Zink et Nerlich, 2003]. Heißes trockenes Klima, wie es bei Wüstenbestattungen zu finden ist (Abb. 27), führt zu einer schnellen Austrocknung der Körper und Gewebe.



Abb.27: Blick auf das Grabungsareal

Die mangelnde Fähigkeit des Wüstenbodens Feuchtigkeit zu speichern und die Einbalsamierung mit Natron unterstützen die Exsikkation zusätzlich. Der pH-Wert, dem eine große Rolle beim Erhalt des Gewebes zugeschrieben wird, kann seine beste konservierende Wirkung auf aDNA im neutralen Bereich entfalten. All diese Argumente sprechen für einen verwertbaren Erhalt der aDNA und die Akzeptanz von Ergebnissen.

Auch Untersuchungen anderer Wissenschaftler widersprechen der Ansicht Marotas. Krings und seinen Kollegen gelang es bereits 1997 aDNA aus 30.000-100.000 Jahre alten menschlichen Überresten zu isolieren [Krings et al., 1997].

Zusammenfassend lässt sich ein geeignetes Mikroklima in den Grabstätten feststellen, das für den Erhalt der aDNA von größtem Vorteil ist und eine erfolgreiche Identifikation der aDNA ermöglicht (Abb.28). Es verhindert den schnellen Abbau, verursacht durch Oxidation, Luftaustausch und Hydrolyse. Zwar hydriert DNA durch ihre Hydrophilie selbst in trockener Umgebung und führt dadurch zu DNA-Schäden, dennoch hält sich der Schaden an der DNA durch den trockenen Aufenthaltsort während der gesamten Liegezeit in Grenzen.



Abb. 28: Bild einer vollständigen Mumie.

In den Gräbern herrschten Temperaturen von 15-25°C. Tief unter der Erde, bestattet in Felsengräbern, fielen die menschlichen Überreste keiner Überflutung zum Opfer. Das umgebende Klima war also trocken und kühl, ideal für einen guten Zustand der DNA [Zink et Nerlich, 2003].

5.4.2 Kontamination

Bereits bei der Exhumierung der Knochen vor Ort bestand die Gefahr der Kontamination. Um initialer Kontamination vorzubeugen, hatte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Nerlich selbst das Material sichergestellt und war dabei mit größter Sorgfalt vorgegangen.

In den Laboren bildeten das Arbeitspersonal per se und Aerosole häufige Kontaminationsquellen, die es zu vermeiden galt, da rezente DNA wesentlich besser erhalten ist und durch Anhaften an Reagenzgläsern oder Pipetten zu Amplifikationen mit falsch positivem Ergebnis führen kann.

Pathogene Keime konnten als Quelle weitestgehend ausgeschlossen werden, da diese in den Laboren weder untersucht noch amplifiziert wurden. Labore, in denen rezente Infektionsfälle bearbeitet wurden, lagen in getrennten Bereichen des pathologischen Instituts und wurden mit äußerster Vorsicht untersucht. Einen Beweis für das präzise und kontaminationsfreie Vorgehen lieferte der in den Skelettgeweben der Mumien identifizierte Erreger, denn dieser erwies sich als *Leishmania donovani*, während die klinische Vergleichsprobe vom *Leishmania infantum* Typ war.

Alle Reagenzien wurden DNA- und RNA-frei geliefert. Falls nötig wurde das instrumentelle Equipment einer Autoklavierung unterzogen. Um Kreuzkontaminationen auszuschließen, wurden ausschließlich sterile Filterspitzen (Biozym, Oldendorf Deutschland) verwendet.

Während jeder Extraktion wurden zwei Leerkontrollen und bei jeder PCR zwei Negativ-Kontrollen mitgeführt. Extraktionen oder PCRs mit positiven Kontrollen wurden nicht weiterverwendet.

Durch die genannten Vorsichtsmaßnahmen und durch die strikte räumliche Trennung der Arbeitsplätze sowie durch ständigen Wechsel der Handschuhe und durch das Mitführen von Kontrollen wurde eine Verschleppung von Fremd-DNA, sogenannter „Carry-over-Effekt“, weitestgehend unterbunden. Zudem wiesen parallele Untersuchungen der Malaria-DNA sowohl in München wie auch in Berlin identische Ergebnisse auf.

5.4.3 Methoden

Die hier angewandte Extraktionsmethode ist sehr sensitiv und detektiert DNA bis in den Nanogramm-Bereich hinein. Zudem hat sich in den zahlreichen Vorarbeiten gezeigt, dass sie sich besonders für mumifiziertes Fundmaterial eignet.

Die Amplifikation der DNA mittels PCR ist eine sehr spezifische Methode zur Analyse der DNA. Bereits ein sehr geringer Anteil von aDNA ist ausreichend zur Erzeugung größerer Mengen eines DNA-Abschnittes. Trotz geringer Größe von nicht mehr als 200 Basenpaaren weist das Fragment eine hohe Spezifität auf. Kehrseite dieser spezifischen Methodik kann die nicht erwünschte Amplifikation von Fremdmaterial sein. Ein weiterer Störfaktor in der PCR können Inhibitoren sein. Diese zeigen unter Umständen falsch negative Ergebnisse an, die durch das Fehlen von Primerdimeren und unspezifischen Amplifikationsprodukten charakterisiert sind. Inhibitoren können der Taq-Polymerase-Inhibitor, der Kollagen-I-Inhibitor, Mikroorganismen oder z.B. Abbauprodukte sein.

Da in dieser Promotionsarbeit erfolgreich DNA amplifiziert werden konnte, ist dieser Schwachpunkt also auszuschließen. Um festzustellen, ob die DNA amplifizierbar war und nicht gehemmt wurde, führte man parallel zu der PCR der Erreger-DNA eine PCR mit β -Aktin durch. Die Ausbeute bei Amplifikation von β -Aktin-DNA in altägyptischen Proben lag bei ca. 50%, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt wurde [Zink et al., 2001]. Eindeutige Erregerbestimmungen resultierten ausschließlich durch Sequenzierung in Kombination mit „BLAST“. Da Agarosegele nur eine ungefähre Größenbestimmung zulassen, wurde in dieser Promotionsarbeit zur Sicherstellung positiver PCR-Ergebnisse nach jeder PCR sequenziert. Die nach der Sequenzierung resultierende geringere Anzahl an Positivproben lässt sich durch Fehlamplifikationen anderer Sequenzen erklären, die anschließend durch Sequenzierung herausgefiltert wurden. Mithilfe des BLAST-Algorithmus konnten die PCR-Produkt-Sequenzen mit den Zielsequenzen verglichen und analysiert werden.

Aufgrund des hohen Alters der analysierten DNA kam es zu unspezifischen und unvollständigen Amplifikationen, die etwa im Bereich der Fragmentgröße lagen und es entfiel in einigen Fällen die eindeutige Zuordnung zu einem Organismus. Bei geringen Unterschieden in der Basenabfolge war die Spezieszuordnung hoch. Unterschiedliche

Basen traten gehäuft an den Stellen auf, an denen sich die Erregerarten von Natur aus stark unterschieden.

Die PCR-Ansätze wurden in Zusammenarbeit mit dem Tropeninstitut Berlin experimentell erfasst.

Zusammenfassend ermöglichte der in dieser Promotionsarbeit beschriebene molekularbiologische PCR-Ablauf mit anschließender Sequenzierung eine direkte Identifizierung der Erreger. Mithilfe der PCR konnte nach Extraktion aus Gewebeprobe und gezielter Amplifikation charakteristischer Genomabschnitte aDNA nachgewiesen werden. Bisher war es zwar gelungen Plasmodium falciparum mittels PCR in rezenter DNA nachzuweisen [Taylor et al., 1997], die Methodik zum Nachweis von Plasmodium falciparum in alter DNA aber musste erst verbessert werden. Dies ist in der vorliegenden Arbeit gelungen.

5.5 Ausblick

Durch die geringe Anzahl an verfügbarem Biomaterial in Form ägyptischer Mumien können nur Einzelfalluntersuchungen durchgeführt werden. Eine ausgedehntere Menge an Untersuchungsmaterial könnte in Zukunft weiteren Aufschluss über die Expansion der Erreger im alten Ägypten geben und neue Evolutionstheorien ermöglichen.

Die Auswirkungen der Infektionskrankheiten Leishmaniose und Malaria auf die damalige Bevölkerung bleiben bis zu ihrer vollständigen Klärung Ziel weiterer Untersuchungen.

Um weitere Fortschritte in diesem Bereich der Paläopathologie zu erzielen sind ein präzises Arbeiten und die Verbesserung der Arbeitsschritte, wie z.B. die Erforschung spezifischerer Targets im Genom des Erregers die wichtigste Voraussetzung um die Aussagefähigkeit der Ergebnisse zu steigern. Durch Ausreifung der Methoden können in Zukunft weitreichende Kenntnisse über paläopathologische Infektionskrankheiten wie Malaria und Leishmaniose in alten menschlichen Knochenfunden erzielt werden.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Publikationen über das Genom des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* sowie des Leishmanioseerregers *Leishmania donovani* und die aus diesen neuen Erkenntnissen resultierenden Behandlungsstrategien veröffentlicht. Über die Existenz dieser Erreger vor einigen tausend Jahren konnten hingegen bislang nur Vermutungen angestellt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand paläopathologisch molekularbiologischer Untersuchungen an Mumienskelettmaterial Auftreten und Häufigkeiten von Leishmaniose- und Malariaerkrankungen nachzuweisen und diese verschiedenen ägyptischen Epochen zuzuordnen, um ein besseres Verständnis für die Pathogenese, Übertragung und Biologie der Erreger gewinnen zu können.

Ausgangsmaterial waren 148 Proben von 91 Mumien- und Skelettfunden aus den beiden altägyptischen Hauptstadtnekropolen von Abydos (prä-/frühdynastische Periode) und Theben-West (Mittleres Reich, Neues Reich bis Spätzeit).

Im Zentrum der Arbeit stand die Identifizierung der Erreger mittels molekularer Untersuchungsmethoden. Dazu mussten neuartige molekulare Diagnoseverfahren modifiziert und optimiert werden, um sie an degenerierter alter DNA anwenden zu können. Nach Extraktion der aDNA aus dem Knochenmehl des Fundmaterials folgte die gezielte Amplifikation charakteristischer Genomabschnitte der humanen- und Erreger-DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion unter Auswahl spezifischer Primer. Eine anschließende Sequenzierung und ein BLAST-Algorithmus-Vergleich dienten dem Ausschluss falsch positiver Proben und der Bestätigung des Nachweises alter DNA des Leishmanien- und Plasmodien-Komplexes.

Aus vier von 42 dem Mittleren Reich stammenden Proben konnte erstmalig der Erreger *Leishmania* isoliert werden. Eine genaue Identifikation führte bei zwei Proben zum eindeutigen Nachweis des Erregers *Leishmania donovani*. In den anderen zwei Proben musste auf eine definitive Zuordnung der Spezies verzichtet werden, da sich *Leishmania donovani* und *Leishmania infantum* in nur einem Nukleotid C (Stelle 173) voneinander unterscheiden. Im Fundmaterial der prädynastischen Epoche und des Neuen Reiches bis in die Spätzeit konnte kein Leishmanioseerreger nachgewiesen werden.

In einer Probe aus dem Neuen Reich gelang die Identifikation von Plasmodium falciparum. Zwar konnte keine Aussage über die zahlenmäßige Ausbreitung von Malaria im pharaonischen Ägypten getroffen werden, jedoch gelang in dieser Arbeit auch der Nachweis des Auftretens der Malaria tropica im alten Ägypten.

7 Literaturverzeichnis

1. Ackerknecht EH (1963a): Chronische Tropenkrankheiten: Leishmaniasis. In: Ackerknecht EH (Hrsg.): Geschichte und Geographie der wichtigsten Krankheiten. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 123-124
2. Ackerknecht EH (1963b): Chronische Infektionskrankheiten: Malaria. In: Ackerknecht EH (Hrsg.): Geschichte und Geographie der wichtigsten Krankheiten. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 78-90
3. Alvrus A (1999): Fracture pattern among the Nubians of Semna South, Sudanese Nubia. *Int J Osteoarcheol* 9: 417-429
4. Bern C, Hightower AW, Chowdhury R, Ali M, Amann J, Wagatsuma Y, Haque R, Kurkjian K, Vaz LE, Begum M, Akter T, Cetre-Sossah CB, Ahluwalia IB, Dotson E, Secor WE, Breiman RF, Maguire JH (2005): Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 11: 655-662
5. Boitz JM, Ullman B (2006): A conditional mutant deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and xanthine phosphoribosyltransferase validates the purine salvage pathway of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 281: 16084-16089
6. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
7. Brier B (1998): *The Encyclopedia of Mummies.*- New York: Checkmark Books
8. Bucheton B, Abel L, El-Safi S, Kheir MM, Pavek S, Lemainque A, Dessein AJ (2003): A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. *Am J Hum Genet* 73: 1052-1060
9. Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, Hornick RB (1973): Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* 266: 398-403
10. Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. *The Primate Malarias.* U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971

11. Deelder AM, Miller RL, DeJonge N, Krijger FW (1990): Detection of schistosome antigen in mummies. *Lancet* 335: 724-725
12. Degraeve W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U (1994): Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*- a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469. Review
13. Desjeux P, Alvar J (2003): *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 3-15. Review
14. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D (2001): A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 344: 257-263
15. Elnaiem DA, Connor SJ, Thomson MC, Hassan MM, Hassan HK, Aboud MA, Ashford RW (1998): Environmental determinants of distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 877-887
16. Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ (1995): Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol* 12: 616-626
17. 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: 1032-1038
18. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE (2000): Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 6: 861-871
19. Gallwitz D, Sures I (1980): Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2546-2550
20. Ghossein RA, Ross DG, Salomon RN, Rabson AR (1994): A search for mycobacterial DNA in sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*. 101: 733-737
21. Haas CJ, Zink A, Palfi G, Szeimies U, Nerlich AG (2000): Detection of Leprosy in Ancient Human Skeletal Remains by Molecular Identification of *Mycobacterium leprae*. *Am J Clin Pathol* 114: 428-436

22. Hansen A, Willerslev E, Wiuf C, Mourier T, Arctander P (2001): Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Mol Biol Evol* 18: 262-265
23. Heckmann M (1999): Leishmaniose. In: Heckmann M (Hrsg.): Taschenlexikon Dermatologie- Klinik, Diagnostik, Therapie. 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York: 199
24. Herberth K. (2004): Paläopathologische Untersuchungen zur chronischen Anämie mit molekularer Analyse von aDNA zum Plasmodien-Nachweis (Malaria) in Skelettmaterial aus dem 15. –18. Jahrhundert aus Süddeutschland (Rain am Lech). Dissertation LMU München. Med.Fak.: 1-77
25. Herwaldt BL (1999): Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199. Review
26. Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Paabo S (1996): DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24: 1304-1307
27. Hummel S, Nordsiek G, Rameckers J, Lassen C, Zierdt H, Baron H, Herrmann B (1995): aDNA—a new approach to old questions. *Z Morphol Anthropol* 81: 41-65
28. Innis, MS, Myambo, KB, Gelfand, DH, Brow, MA (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Biotechnology* 24: 6-10
29. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RMR, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang YT, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou SG, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ (2005): The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania Major*. *Science* 309: 436-442
30. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S (1997): Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90: 19-30

31. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56: 341-361
32. Knippers R, Philippsen P, Schäfer KP, Fanning E (1990): *Molekulare Genetik*. 5. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart: 18
33. 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
34. 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. *Anc Biomol* 3: 81-102
35. Marota I, Basile C, Ubaldi M, Rollo F (2002): DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. *Am J Phys Anthropol* 117: 310-318
36. Miller RL, Armelagos GJ, Ikram S, DeJonge N, Krijger FW, Deelder AM (1992): Palaeoepidemiology of *Schistosoma* infection in mummies. *BMJ* 304: 555-556
37. Miller RL, Ikram S, Armelagos GJ, Walker R, Harer WB, Shiff CJ, Baggett D, Carrigan M, Maret SM (1994): Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 31-32
38. Molto JE (2000): The skeletal biology and epidemiology of population samples from the Dakhleh Oasis, Egypt. In: Mills AJ, Marlow M (Hrsg.): *The Oasis papers*. Oxbow Books, Oxford: 81-100
39. Morsy TA, Schnur LF, Feinsod FM, Michael SA, Saah A, Salama MM, Wahba MM (1988): The discovery and preliminary characterization of a novel trypanosomatid parasite from *Rattus norvegicus* and stray dogs from Alexandria, Egypt. *Ann Trop Med Parasitol* 82: 437-444
40. Müller R (1946): Urtierchen Protozoa. In: Müller R (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie: Parasiten, Bakterien, Immunität*. 3. Auflage. Urban und Schwarzenberg, Berlin München Wien: 72-74
41. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005): Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577. Review

42. Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T (1985): Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6133-6137
43. Nerlich AG, Zink A, Hagedorn HG, Szeimies U, Weyss C.(2000): Anthropological and palaeopathological analysis of the human remains from three "Tombs of the Nobles" of the necropolis of Thebes-West, Upper Egypt. *Anthropol Anz* 58: 321-343
44. Nerlich AG, Rohrbach H, Zink A (2001): Krankhafte Befunde an Kinder- und Erwachsenenmumien aus dem alten Ägypten. Eine paläopathologische Studie. Demographische Daten, pathologische Zahnbefunde und angeborene Skelettfehlbildungen. *Pädiatr. Praxis* 59: 717-728.
45. Newton CR, Graham A (1994): PCR. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford
46. Paabo S (1989): Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1939-1943
47. Petrie WMF, Quibell JE (1896): Naqada and Ballas. BSAE I., London
48. Pratlong F, Dereure J, Bucheton B, El-Safi S, Dessein A, Lanotte G, Dedet JP (2001): Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitology* 122: 599-605
49. Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE, Lal AA (1996): Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Phylogenet Evol* 6: 157-165
50. Reader J (1997): Africa: Biography of a Continent; Harnish Hamilton, London, S.258-262
51. Reiter P (2000): From Shakespeare to Defoe: malaria in England in the Little Ice Age. *Emerg Infect Dis* 6: 1-11
52. Rich SM, Licht MC, Hudson RR, Ayala FJ (1998): Malaria's Eve: Evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4425-4430

53. Ritmeijer K, Davidson RN (2003): Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene joint meeting with Medecins Sans Frontieres at Manson House, London, 20 March 2003: field research in humanitarian medical programmes. Medecins Sans Frontieres interventions against kala-azar in the Sudan, 1989-2003. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 609-613

54. Roberts LJ, Handman E, Foote SJ (2000): Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ* 321: 801-804. Review

55. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF (1990): Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Exp Parasitol* 71: 267-275

56. Rösing F.W. (1990): *Qubbet el Hawa und Elephantine*.- Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

57. Rommelaere H, Waterschoot D, Neiryneck K, Vandekerckhove J, Ampe C (2004): Structural plasticity of functional actin: pictures of actin binding protein and polymer interfaces. *Structure* 11: 1279-1289

58. Ross R. (1903): Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J.* 2(2237): 1261–1262

59. Ruffer MA (1910a): Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the xxth Dynasty. *Brit Med J* 1:16

60. Ruffer MA (1910b): Pott'sche Krankheit an einer ägyptischen Mumie aus der Zeit der 21. Dynastie. Zur historischen Biologie der Krankheitserreger. 3 Heft. Giessen

61. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

62. Sallares R, Gomzi S (2000): Biomolecular archaeology of Malaria. *Anc Biomol* 00: 1-19

63. Sanger, F (1981): Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214: 1205-1210

64. Smith G.E., Jones F.W. (1910): *The Archaeological Survey of Nubia: Report for 1907-1908. - vol II: Report on the human remains*.- National Printing Department, Kairo.

65. Sonnenschein C (1944): Kala-Azar. In: Gundel M (Hrsg.): Die ansteckenden Krankheiten: Ihre Epidemiologie, Bekämpfung und Spezifische Therapie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Leipzig: 472-476
66. Strouhal E., Jungwirth J. (1980): Paleopathology of the Late Roman – Early Byzantine Cemeteries at Sayala, Egyptian Nubia.- *J Hum Evol* 9: 61-70
67. Strouhal E., Vyhnánek L. (1981): New Cases of Malign Tumours from Late Period Cemeteries at Abusir and Saqqara (Egypt).- *Sssa* 8: 165-189.
68. Taylor GM, Rutland P, Molleson T (1997): A sensitiv p.c.r. method for the detection of Plasmodium species DNA in ancient human remains. *Anc. Biomol.* 1: 193-203
69. Thomson MC, Elnaiem DA, Ashford RW, Connor SJ (1999): Towards a kalar azar risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. *Trop Med Int Health* 4: 105-113
70. Winkle S (1997): Geisseln der Menschheit: Malaria. In: Artemis und Winkler (Hrsg.): Kulturgeschichte der Seuchen. Komet, Düsseldorf/Zürich, 707- 730
71. Zink A (2003): Paläopathologie von Krankheiten im alten Ägypten unter besonderer Berücksichtigung molekularer Untersuchungen zur Tuberkulose. Habilitationsschrift, LMU München: 1-84
72. Zink A, Haas CJ, Reischl U, Szeimies U, Nerlich AG (2001): Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J Med Microbiol* 50: 355-366
73. Zink A, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG (2002): Molecular analysis of ancient microbial infections. *FEMS Microbiol Lett* 213: 141-147
74. Zink A, Nerlich AG (2003): Molecular analyses of the “Pharaos”: Feasibility of molecular studies in ancient Egyptian material.- *Am. J. Phys. Anthropol.* 121: 109-111
75. Zink A, Nerlich AG (2003): Anthropologische und paläopathologische Untersuchungen des Skelettmaterials. In: Dreyer G, Hartmann R, Hartung U, Köpp H, Lacher C, Müller A, Nerlich AG, Zink A. Umm el-Qaab-Nachuntersuchungen im frühzeitlichen Königsfriedhof 13./14./15. Vorbericht. *Mitt. Dtsch. Archäol. Inst. Kairo* 59: 49-64

76. Zink A, Grabner W, Nerlich AG (2005). Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples. A study on the role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *Am J Phys Anthropology*, 126:32-47

Internetquellen

1. www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html
2. www.who.int/leishmaniasis/epidemic/en
3. www.namp.gov.in/kal2.html
4. www.medicine.plosjournals.org/archive/15491676/2/7/figure/10.1371_journal.pmed.0020211.g001-M.jpg
5. www.leishmaniose.de/sandmuecken.html
6. www.msu.edu/course/zol/316/lspscope.htm
7. www.leishmaniose.de/leishman_history.html
8. rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm
9. www.ratsteachmicro.com/Malaria_notes/HCOE_CAI_Review_Notes_Malaria.htm
10. www.cdc.gov/travel/temsam.htm
11. www.ncbi.nlm.nih.gov/

8 Anhang Untersuchungsmaterial

Probe	Fundort	Material	Morphologie	β-actin
B 16 4a N (A2)	Abydos/B-Friedhof	BWK	leichte Knochenreaktion WK-Deckplatte	-
T-N H(A1)	Abydos/Den Nord Halde	LWK	unauffällig	+
DEN T-NW	Abydos/Grab Den	Kalotte	unauffällig	-
DEN-T-00	Abydos/Grab Den	Kalottenfragment	unauffällig	-
DEN-T-NNO	Abydos/Grab Den	LWK	(ingesintert, zerbrochen)	-
DEN-T-O	Abydos/Grab Den	LWK	unauffällig	-
Den-Zw	Abydos/Grab Den			-
Q W5 (A3)	Abydos/Grab Qa'a	BWK	leichte Knochenreaktion und Loch WK-Deckplatte	+
Q-W	Abydos/Grab Qa'a			-
U-ZW	Abydos/Semerchet			+
U-475	Abydos/U-Friedhof	LWK	(stark eingesintert)	-
U-503	Abydos/U-Friedhof	LWK	(stark eingesintert)	+
U-559	Abydos/U-Friedhof	Wk		+
DAN 117	DAN			-
DAN 121	DAN	Langknochendiaphyse	unauffällig	-
DAN 24	DAN	Fibula	(Auflagerungen)	+
DAN 37	DAN	LWK	(ingesintert)	-
DAN 41	DAN			
DAN 92a	DAN	BWK	(ingesintert)	+
DAN 94	DAN	Fibula/LWK	(Auflagerungen)/ingesintert	-
DAN 0	DAN		Osteolyse	+
DAN C	DAN	Felsenbein	unauffällig	-

DAN E	DAN	Felsenbein	unauffällig	-
DAN 7	DAN K01.1	LWK	(Osteophyten)	-
DAN 2	DAN K01.12	BWK	Spondylose	+
DAN LWK	DAN K01.12	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
DAN 14	DAN K01.12 K A3	Humerus li	Osteopenie	-
DAN 1	DAN K01.12 S A1	Langknochen	Ausgedehnte Auflagerungen	-
DAN 7	DAN K01.12 S A3	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
DAN 8	DAN K01.12 S A9	LWK	Spondylose, stark	+
DAN 9	DAN K01.12 S A9	LWK	Spondylose, stark	-
DAN1.4-3	DAN K01.4	Tibia	Verdickung Diaphyse	-
DAN1.4-6	DAN K01.4	LWK	Spondylitis/Einsinterung	-
DAN A11	DAN K01.8	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
DAN A4	DAN K01.8	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
DAN A5	DAN K01.8	BWK	unauffällig	+
DAN KW-E	DAN K01.8	Fußknochen	unauffällig	+
DAN KW-F	DAN K01.8	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
DAN S6	DAN K01.8	Schädel	flächige Auflagerungen	-
DAN S7	DAN K01.8	Calotte/Orbita	Cribrä/ flächige Auflagerungen	+
DAN S8	DAN K01.8	Calotte	Schlagdefekt/ Cribrä	+
DAN WK	DAN K01.8/ K01.12	LWK	Spondylose, leicht	-
DAN M2	DAN K02.2	Tibia + Fibula	ausgedehnte Auflagerungen	-
DAN M3	DAN K02.2	Talus	evt. Pilzbefall der Weichteile	-
DAN M4	DAN K02.2	Fußknochen	unauffällig	-
DAN M5	DAN K02.2	Tibia/Talus	Flächige Auflagerung Tibia	+
DAN 3	DAN K93.11	Felsenbein	unauffällig	-

DAN 33	DAN K93.11	BWK12/LW1	verblockt/ingesintert	+
DAN 50(KM)	DAN K93.11	Lunge/ BWK/Muskel	Pleuraladhäsionen	+
DAN 6	DAN K93.11	Felsenbein	unauffällig	+
DAN 74	DAN K93.11	Orbita	Cribrä	+
DAN 75	DAN K93.11	Kalotte	Hyperostose	-
DAN M1	DAN K93.11	LWK	unauffällig	-
DAN M2	DAN K93.11	BWK	unauffällig	-
DAN M7	DAN K93.11	LWK	unauffällig	-
DAN 106	DAN K94.1	LWK	Spondylolyse	-
DAN 22 (vorher 32)	DAN K94.1	LWK	Spondylose	+
DAN 31	DAN K94.1	LWK	Deckplatte leicht eingesintert	-
DAN 1 (PC 21)	DAN K95.1	Zahn	apikaler Prozeß	+
DAN 18	DAN K95.1	Herz	unauffällig	-
DAN 1-PC66	DAN K95.1	Gewebe	unauffällig	-
DAN 21	DAN K95.1	Muskel/Blase	unauffällig	+
DAN 46	DAN K95.1	WK	Spondylose/Einsinterung	-
DAN C1-PC20	DAN K95.1	Psoas	unauffällig	-
DAN PC3	DAN K95.1	Felsenbein	unauffällig	+
DAN PC50	DAN K95.1	Gewebe	unauffällig	+
DAN S3	DAN K95.1	Felsenbein	unauffällig	+
DAN-?	DAN K95.1	LWK	(fok. Läsion)	+
TT183-20	THEBEN/TT183	Lunge/Darm/Blasé	Pleuraladhäsionen	+
TT183-29	THEBEN/TT183	LWK	Knochenumbau ventraler Rand	+
TT183-KW	THEBEN/TT183	Felsenbein	unauffällig	-
TT183-OW	THEBEN/TT183	LWK	unauffällig	-

TT183-S3	THEBEN/TT183	Felsenbein	unauffällig	+
TT183-S4	THEBEN/TT183	Felsenbein	unauffällig	-
TT183-T45b	THEBEN/TT183	Felsenbein	unauffällig	+
TT196/101	THEBEN/TT196	LWK	Spondylose, schwer	-
TT196/104	THEBEN/TT196	BWK	ingesintert	+
TT196/132	THEBEN/TT196	LWK	Spondylose, mittel	-
TT196/137	THEBEN/TT196	BWK	Spondylitis/Einsinterung	-
TT196/148	THEBEN/TT196	LWK	Spondylitis/Einsinterung	-
TT196/23	THEBEN/TT196	LWK	Spondylose, schwer	+
TT196/48	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
TT196/80	THEBEN/TT196	LWK	Destruktion WK-Decke	+
TT196/89	THEBEN/TT196	LWK	Spondylose, schwer	-
TT196/93	THEBEN/TT196	LWK	Spondylose, schwer	-
TT196/94	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
TT196/96	THEBEN/TT196	BWK	Spondylose, leicht	-
TT196/M5	THEBEN/TT196	Fingerknochen	unauffällig	+
TT196/MW1	THEBEN/TT196	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
TT196/MW10	THEBEN/TT196	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	
TT196/MW11	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	
TT196/MW12	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	
TT196/MW13	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
TT196/MW14	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
TT196/MW15	THEBEN/TT196	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
TT196/MW16	THEBEN/TT196	BWK	leichte Einsinterung	-
TT196/MW17	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-

TT196/MW18	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
TT196/MW19	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
TT196/MW2	THEBEN/TT196	BWK	Spondylose, stark	-
TT196/MW20	THEBEN/TT196	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
TT196/MW3	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	-
TT196/MW4	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
TT196/MW5	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	+
TT196/MW6	THEBEN/TT196	BWK	Spondylitis/Einsinterung	-
TT196/MW7	THEBEN/TT196	LWK	Spondylitis/Einsinterung	+
TT196/MW8	THEBEN/TT196	BWK	Leichte Kno-Reak. ventral	
TT196/MW9	THEBEN/TT196	LWK	Leichte Kno-Reak. ventral	
TT196-2/144	THEBEN/TT196	Talus	Arthrose	+
TT196-2/152	THEBEN/TT196	BWK	ingesintert	-
TT196-2/182	THEBEN/TT196	BWK	ingesintert	+
TT196-2/202	THEBEN/TT196	LWK	Spondylitis/Einsinterung	+
TT196-2/25	THEBEN/TT196	BWK	ingesintert	+
TT196-2/42	THEBEN/TT196	LWK	Spondylitis/Einsinterung	+
TT196-2/78	THEBEN/TT196	Axis	Verwachsung	+
TT196-2/82	THEBEN/TT196	Os occipitale	T. interna Impressionen	-
TT196-2/S13	THEBEN/TT196	Os parietale	unregelmäßige Oberfläche	-
TT-M163	THEBEN/TT196	LWK	Spondylitis/Einsinterung	+
TT-Ma	THEBEN/TT196	LWK	Spondylose, leicht	+
TT-Mb	THEBEN/TT196	LWK	Spondylose, leicht	+
TT453-14	THEBEN/TT453	Organ	unauffällig	+
TT453-15	THEBEN/TT453	Wks	Verblockungen	+

TT453-9	THEBEN/TT453	Zahn/ Auge	Paradontose	+
TT84-3	THEBEN/TT84	Gehirn	unauffällig	-
TT84-4	THEBEN/TT84	WK	Osteodestruktion ventral	+
TT84-70	THEBEN/TT84	WKs + Lunge	Spondylitis	? (+)
TT85-2-?	THEBEN/TT85-2	Schädelfragment	(Spong. occip.)	-
TT85-2-12	THEBEN/TT85-2	Mittelfinger	unauffällig	-
TT85-2-120	THEBEN/TT85-2	WK	(verbacken, Exostose?)	-
TT85-2-21	THEBEN/TT85-2	LWK/ H7-B1	Spondylose/Verblockung	+
TT85-2-22	THEBEN/TT85-2	HWS	unauffällig	+
TT85-2-35	THEBEN/TT85-2	Kalotte	(Hyperostose)	+
TT85-2-36	THEBEN/TT85-2	Kalotte	part. Hyperostose?	-
TT85-2-37	THEBEN/TT85-2	HWK	(Osteophyten)	-
TT85-2-48	THEBEN/TT85-2	Schädelknochen	unauffällig	+
TT85-2-51	THEBEN/TT85-2	LWK	Verblockung	? (+)
TT85-2-61	THEBEN/TT85-2	HWS	unauffällig	-
TT85-2-A	THEBEN/TT85-2	Schädelfragment	(Spongiosierung)	-
TT85-2-B	THEBEN/TT85-2	Schädelfragment	(Hyperostose)	-
TT85-3-PC70	THEBEN/TT85-3	Niere rechts	unauffällig	-
TT95-122	THEBEN/TT95	Lunge rechts	nicht kollabiert	+
TT95-13	THEBEN/TT95	Fußwurzel	leichte Knochenreaktion	+
TT95-158	THEBEN/TT95	Humerus	Arthritis	+
TT95-164	THEBEN/TT95	Rippe	Auflagerung	-
TT95-169	THEBEN/TT95	Humerus li	Osteomyelitis dist	+
TT95-171	THEBEN/TT95	HWS	(verblockt, destruiert)	-
TT95-20	THEBEN/TT95	Haut/WT	unauffällig	-

TT95-202	THEBEN/TT95	Schädelknochen (neonat)	unauffällig	-
TT95-28	THEBEN/TT95	Rippe	Auflagerung	+
TT95-2-A	THEBEN/TT95	Schädelfragment	unauffällig	+
TT95-2-B	THEBEN/TT95	Haut/WT	unauffällig	-
TT95-34	THEBEN/TT95	Clavicula	Periostitis	+
TT95-35	THEBEN/TT95	Rippe	Auflagerung	+
TT95-40	THEBEN/TT95	Lunge links	Pleuraladhäsionen	+
TT95-41	THEBEN/TT95	HWK	Spondylitis	+
TT95-44	THEBEN/TT95	Fußwurzel	leichte Kochenreaktion	+
TT95-8	THEBEN/TT95	Haut	unauffällig	-
TT95-PC148/3?	THEBEN/TT95	Haut	unauffällig	-
TT95-PC95-15	THEBEN/TT95	Haut	unauffällig	-

9 Lebenslauf Bettina Lucie Schraut

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 01.06.1981
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Eltern und Geschwister: Mutter: Dr. C. Seibert-Schraut, Fachärztin für Allgemeinmedizin
Vater: R. Schraut, Regisseur
Bruder: J. Schraut, Medizinstudent

Schulausbildung

Sept. 1987 - Aug. 1991 Grundsule an der Forellenstraße in München
Sept. 1991 - Juni 2000 Michaeli-Gymnasium München
Juni 2000 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

April 2002 - Juli 2004 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität,
Göttingen (Vorklinik bis einschließlich 1. klinisches Semester)
März 2004 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Okt. 2004 Studium der Humanmedizin an der TU in München
Feb. 2007 - Feb. 2008 Praktisches Jahr
(1.Tertial: Chirurgie, Bürgerspital Solothurn, Schweiz)
(2.Tertial: Innere Medizin, KH Bogenhausen, München)
(3.Tertial: Psychiatrie, Klinikum Rechts der Isar, München)
Mai 2008 Ärztliche Prüfung

Auslandsaufenthalt

Jan. 2001 - Feb. 2002 Aupair, Washington, D.C., USA

Wissenschaft

Okt. 2004 Dissertation : Thema: „Paläopathologische Untersuchungen
parasitärer Erkrankungen mit molekularer Analyse von
ancientDNA zum Nachweis von Plasmodien und Leishmanien“
Forschungsgruppe Prof. Nerlich, Pathologisches Institut des
Klinikums München Bogenhausen

Praktika

Juli - Sept. 2000 Krankenpflegepraktikum im Krankenhaus München-Bogenhausen
Juli - Aug. 2004 Famulatur in der Gynäkologie im KH München-Neuperlach

Sept. 2004	Famulatur in der Pathologie im KH München-Bogenhausen
Juli - Aug. 2005	Famulatur in der Dermatologie und Venerologie, LMU, München
Juli - Sept. 2006	Famulatur in der pädiatrischen Praxis Dr. Hirte, München

Berufliche Erfahrungen

April 2005 - Aug. 2005	Nachtwache, Klinikum Rechts der Isar, TU-München
Sept. 2005 - Jan. 2007	Aufwachraum, Anästhesie/Chirurgie LMU Innenstadt, München
Aug. 2008 – Okt. 2008	Assistenzärztin in der Schreiber-Klinik München
Seit Okt. 2008	Assistenzärztin für Innere Medizin am Klinikum München Bogenhausen

Besondere Kenntnisse

Sprachen	Englisch: sehr gute Kenntnisse in Schrift und Sprache Französisch: Grundkenntnisse
EDV	MS-Office: Word, Windows, Excel, Access, Powerpoint, SAP

Persönliche Interessen

Reisen	Städtereisen, Nord- und Südamerika
Sport	Skifahren, Wandern, Tennis, Schwimmen, Fitnessstudio

10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Nerlich für die Bereitstellung des Themas und Arbeitsmaterials. 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 Fachgebiet der Pathologie ermöglicht.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. rer. nat. A. Zink bedanken ohne dessen Wissen, seine Ideen und seine konstruktive Kritik mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen wäre.

Er stand mir bei der Durchführung der Arbeiten jederzeit beratend und helfend zur Seite sowohl in menschlicher wie auch in wissenschaftlicher Hinsicht. Er hat meine Arbeit mit hohem Zeitaufwand und viel Engagement betreut.

Dem Tropeninstitut Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. T. Jelinek, insbesondere Frau Dr. S. Dittrich, und der Firma Medigenomics danke ich für die wertvolle Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Oberarzt Dr. H. Rohrbach dafür, dass er nicht nur in fachspezifischen, sondern auch in privaten Gesprächen immer wieder für den nötigen Ansporn gesorgt hat. Zudem danke ich Frau S. Lösch, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite stand.

Ich danke meinen Eltern und meinem Freund nicht zuletzt für ihre zahlreichen Korrekturvorschläge zu Form und Inhalt der vorliegenden Arbeit.

