

Der genetische Fingerabdruck aus historischen Skeletten

DNA-Analysen zur Verwandtschaftsfeststellung der Individuen der Wittekindsburg

Tobias Schultes und Susanne Hummel

Die Verwandtschaftsfeststellung an Skelettindividuen ist seit langem ein Desiderat der archäologischen und anthropologischen Forschung. Die herkömmlichen Methoden umfassen den Vergleich bestimmter epigenetischer Variationen sowie metrischer Merkmale am Knochen und Zahn (z.B. RÖSING 1986, ALT/VACH 1994). Die bislang ungeklärten Vererbungswege und die nicht gesicherte genetische Determiniertheit einer Vielzahl dieser Merkmale schränken allerdings die erfolgreiche Anwendung ein oder machen sie in vielen Fällen, gerade bei fragmentiertem Skelettmaterial, unmöglich.

Durch den Einzug neuer molekularer Techniken in die Anthropologie bietet sich heute ein erweitertes Spektrum an Möglichkeiten (HUMMEL u.a. 1995). Die Gewinnung und Analyse der menschlichen Erbsubstanz aus Knochenmaterial bietet einen Weg, der grundsätzlich definitive Antwort auf Fragen der Verwandtschaft oder Nichtverwandtschaft von Individuen geben kann. In der modernen Gerichtsmedizin sind Verfahren entwickelt worden, die über die Erstellung eines genetischen Fingerabdruckes mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit Aussagen in strittigen Vaterschaftsfällen treffen können (z.B. KRATZER/BÄR 1997). Vor relativ kurzer Zeit gelang die Übertragung dieser Verfahren auf menschliches Skelettmaterial aus archäologischen Funden (z.B. GERSTENBERGER u.a. 1999, SCHULTES u.a. 1997, HUMMEL/HERRMANN 1996).

Auch für die Individuen der Wittekindsburg wurden neben der klassischen Befundung des Skelettmaterials molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt, um Antworten auf die Frage zu erhalten, ob es sich bei den Individuen um Mitglieder einer Familie handeln könnte.

Alte DNA aus Knochen

Unter „alter DNA“ (engl. ancient DNA - aDNA) versteht man DNA, die einem nicht mehr lebenden Organismus oder Teilen dessen entstammt. Im weiteren Sinne wird auch die DNA eines lebenden Organismus als alte DNA bezeichnet, wenn diese extrakorporal vorliegt. Gemeinsamkeiten liegen in der Eigenschaft, daß die alte DNA autolytische und diagenetische Prozesse durchlaufen hat, mit der Folge ihrer Degradierung (vgl. HERRMANN/HUMMEL 1993).

In der Regel liegen der anthropologischen Untersuchung Überreste des menschlichen Skelettes vor. Knochen und Zähne sind aufgrund ihrer anorganischen Bestandteile sehr gut vor Einflüssen des Liegemilieus geschützt und können somit auch lange Zeiträume überdauern. In der Knochenmatrix eingebettet liegen die Zellen des Knochens (Abb. 1). Knochenzellen erfüllen vielfältige Aufgaben, beispielsweise

sind sie bei Heilungsprozessen für den Knochenauf- und -umbau verantwortlich. Die Osteocyten vermitteln ebenfalls die Abgabe von mineralischen Substanzen im Knochen. Die Knochenzellen mauern sich gewissermaßen selbst ein. In den Zellkernen jeder dieser Zellen befindet sich die DNA des Individuums. Aufgrund des guten Schutzes, den die Knochenmatrix den Knochenzellen bietet, kann die DNA im Knochen oder Zahn, wie der Knochen selbst, viele Jahre, sogar Jahrtausende überdauern. Hierbei ist die Zeit nicht der einzige bestimmende Faktor. Die Beschaffenheit des Liegemilieus ist von fundamentaler Bedeutung. Die Bedingungen, die die DNA Erhaltung befördern beziehen sich auf ein kühles, vorzugsweise trockenes Liegemilieu mit einem neutralen bzw. schwach basischen pH-Wert (BURGER u.a. 1997). Bei guten Liegemilieubedingungen kann DNA auch noch aus sehr altem Skelettmaterial gewonnen werden. Andererseits kann es bereits problematisch sein, DNA aus einem nur einige Jahrzehnte alten Knochen zu gewinnen, falls dieser extrem schlechten Bedingungen ausgesetzt war.

Mit Hilfe spezieller Methoden (DNA-Extraktion s. Abb. 2) ist es möglich, die Überreste der DNA aus dem Knochen herauszulösen und einer genetischen Analyse zugänglich zu machen. Bei der Arbeit mit historischem oder prähistorischem Skelettmaterial handelt es sich in der Regel um extrem kleine Mengen an DNA, die noch gewonnen werden können. Es ist deshalb außerordentlich wichtig, daß Verunreinigungen (Kontaminationen) mit „moderner“ DNA, die durch den Bearbeiter oder den Ausgräber auf die Probe gelangen könnten, vermieden werden. Aus diesem Grund werden bei der Arbeit mit alter DNA strenge Vorkehrungen getroffen. Als Beispiele sind das Tragen von Schutzkleidung (Handschuhe, Haarhaube und Mundschutz) und das Abtragen der Probenaußenflächen mit einem Skalpell, um eventuell dem Knochen anhaftende Kontaminationen zu entfernen, zu nennen. Ideal wäre es, wenn schon

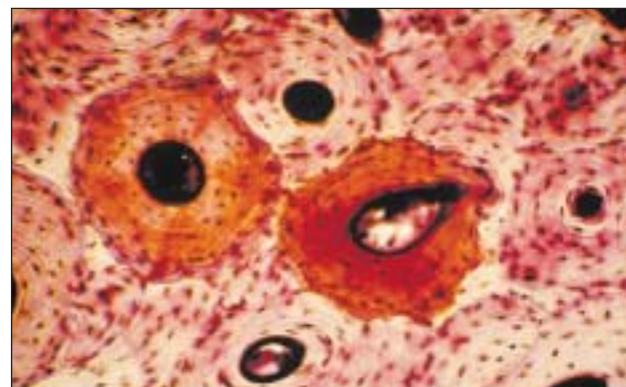


Abb. 1 Querschnitt eines Knochens in ca. 150facher Vergrößerung. In der Knochenstruktur sind die Knochenzellen (Osteocyten) als kleine schwarze Punkte zu sehen.

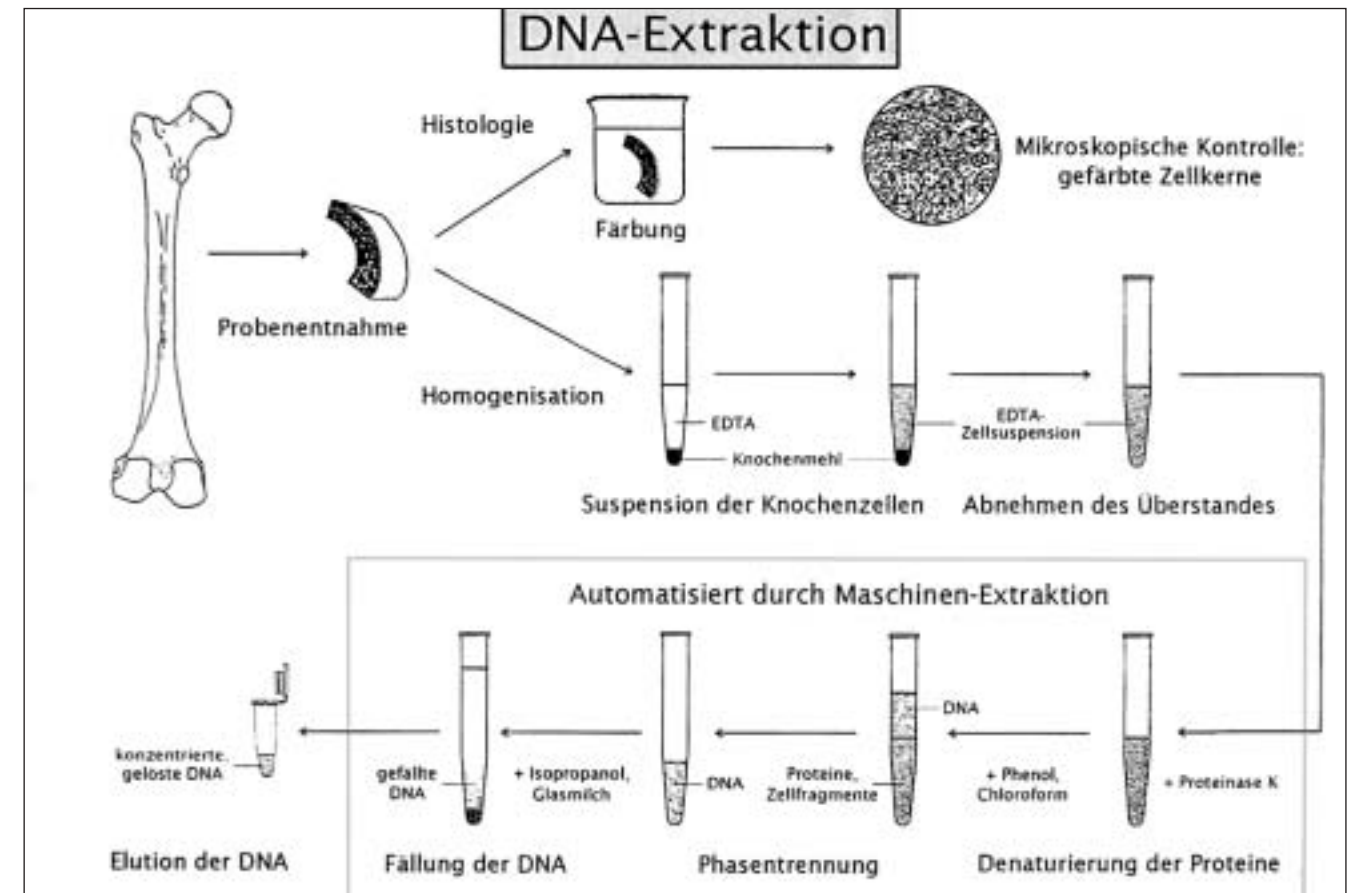


Abb. 2 Schema der DNA-Extraktion aus Knochen. Ausgehend von einem Knochenstück mit ca. 3 cm Kantenlänge wird aus jeweils ca. 0,3 g Knochenpulver DNA gewonnen. Die extrahierte Menge ist ausreichend, um weitere Analyseschritte anzuschließen.

während der Bergung des Skelettmaterials Schutzkleidung getragen werden könnte. Die Untersuchung des genetischen Fingerabdruckes bietet darüber hinaus die Möglichkeit, den Abdruck der zu untersuchenden Probe mit den genetischen Profilen der Bearbeiter zu vergleichen. Eventuelle Kontaminationen können auf diese Weise zurückverfolgt werden.

Um noch Informationen aus der minimalen Menge an DNA aus dem Knochen ziehen zu können, ist es erforderlich, die DNA-Menge zu vervielfältigen. Mit der Methode der Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction - PCR) kann eine solche Vervielfältigung erzielt werden. Diese im Grundsatz einfache Methode, für die ihr Erfinder Kary Mullis 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde, ist heutzutage aus der modernen Genetik nicht mehr wegzudenken. Sie wird in nahezu allen Bereichen der genetischen und biochemischen Forschung angewandt. Für die Arbeit an alter DNA ist die PCR von zentraler Bedeutung, da ohne Vervielfältigung keine weiteren Analysen möglich wären.

Bei der PCR werden mit Hilfe eines Enzyms und verschiedener weiterer Reaktionskomponenten spezifische Abschnitte der DNA vervielfältigt. Diese Abschnitte enthalten die für die jeweilige Fragestellung des Forschers interessante Information. In einem Reaktionszyklus findet jeweils eine Verdopplung des DNA-Abschnittes statt (Abb. 3). Bei ausreichender Wiederholung dieses Vorganges

erhält man eine hinreichend große Menge des gesuchten Abschnittes, so daß ein Nachweis möglich wird.

Der Nachweis der vervielfältigten DNA-Fragmente erfolgt auf einem Gel. In Abhängigkeit von ihrer Länge durchlaufen die einzelnen DNA-Abschnitte das Gel unterschiedlich schnell. Computergestützte Analysen ermöglichen eine exakte Längenbestimmung. Über die Längenbestimmung von verschiedenen DNA-Abschnitten läßt sich der genetische Fingerabdruck eines Menschen erstellen.

Der genetische Fingerabdruck

Der genetische Fingerabdruck ist eine Kombination von verschiedenen Abschnitten der DNA. Diese Abschnitte werden als Short Tandem Repeats (abgekürzt: STR) bezeichnet und befinden sich an unterschiedlichen Stellen (Loci) auf den Chromosomen. Die STRs liegen in ihrer Länge polymorph in der Bevölkerung vor (Abb. 4). Die Kombination der Ergebnisse von Untersuchungen an mehreren STRs erlaubt die Erstellung eines Profils, das für jeden Menschen einzigartig ist. Hierfür müssen die Längenausprägungen an einem STR-Locus bestimmt werden. Da im Menschen jedes Chromosom zweimal vorliegt (eines wird vom Vater, das andere von der Mutter geerbt), gibt es auch für jeden STR-Locus zwei Ergebnisse. So lassen sich über den Vergleich zweier STR-Profile Aussagen über Verwandtschaftsbeziehungen von Personen treffen. Kinder müssen jeweils

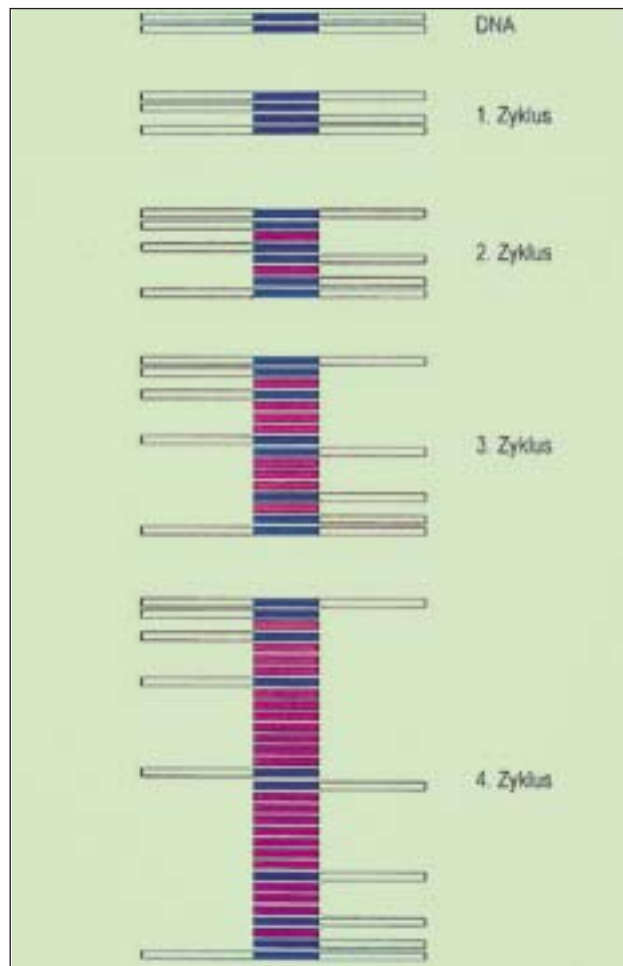


Abb. 3 Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Ein bestimmter Bereich der DNA (blau) wird spezifisch vervielfältigt. Von zwei Seiten werden Stränge aufgebaut, die eine Kopie des ursprünglichen DNA-Stranges darstellen. Nach dem zweiten Zyklus entstehen so Produkte, die genau die Länge des gesuchten DNA-Abschnittes aufweisen (rot). Die Produkte dienen wiederum als Vorlage für weitere Vermehrungsschritte. Etwa 40-50 Zyklen sind erforderlich, um aus historischem Skelettmaterial nachweisbare Mengen zu erhalten.

eine Längenausprägung (man bezeichnet unterschiedliche Längenausprägungen als Allele) mit einem der Allele des Vaters bzw. der Mutter gemeinsam haben. Liegen unterschiedliche Ergebnisse vor (z.B. das Kind hat zwei Allele, die beim Vater nicht nachgewiesen werden können) kann eine Elternschaft ausgeschlossen werden.

Für die Anthropologie eröffnet sich so eine Möglichkeit, Verwandtschaftsbestimmungen an historischen und prähistorischen Skelettindividuen durchzuführen. Ein hypothetisches Beispiel ist graphisch (Abb. 5) näher erläutert.

Die Individuen, die in der Wittekindsburg geborgen wurden, sind neben der herkömmlichen anthropologischen Befundung auch genetisch analysiert worden, mit dem Ziel der Erstellung eines genetischen Fingerabdruckes. Hierüber sollte die Frage geklärt werden, ob die Individuen über ein Eltern-Kind-Verhältnis miteinander verwandt sein können.



Abb. 4 Schematischer Aufbau von Short Tandem Repeats (STR). Die Primer Bindungsstellen (blau) bezeichnen die Startpunkte der PCR Reaktion zur Vervielfältigung. Davon eingeschlossen ist der längenpolymorphe Bereich. Es existieren unterschiedliche Längenausprägungen in der Bevölkerung, die sich in der Anzahl der Wiederholungseinheiten unterscheiden (hier als Beispiel: Allel 1-3).

Die Skelettreste der Individuen der Wittekindsburg

Auf der Wittekindsburg konnten fünf Individuen identifiziert werden. Während zwei Skelette nahezu vollständig, wengleich zum Teil stark fragmentiert vorlagen, waren von drei Skeletten nur noch Teile erhalten. Das Individuum aus Grab 5 (Individuum 5) ist nur durch diverse Rippenfragmente, ein rechtes Sprungbein, ein Schlüsselbein, einen Zehenknochen sowie drei isolierte Zähne repräsentiert. Dieses Individuum konnte aufgrund des Reifegrades der Knochen als erwachsen angesprochen werden. Die genetischen Untersuchungen weisen auf ein weibliches Individuum hin. Die vier anderen Individuen sind im Kindesalter verstorben. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Individualdaten der einzelnen Skelette. Die Abbildung (Abb. 6) zeigt das Skelett des Kindes aus Grab 4, das nahezu vollständig vorlag.

Bereits in Voruntersuchungen wurde die nur bedingte Tauglichkeit des Skelettmaterials für genetische Analysen festgestellt. Über die Liegezeit sind vom Boden Stoffe in die Knochen gewandert, die die PCR behindern (z.B. Huminsäuren). Für das Individuum 1 konnte keine DNA nachgewiesen werden. Als Material stand hier nur die dünne Schädeldecke zur Verfügung. Sehr wahrscheinlich liegt eine vollständige Degradierung der DNA in diesem Skelettelement vor.

Für die anderen Individuen konnte DNA erst nach zusätzlichen Aufreinigungsschritten reproduzierbar vervielfältigt werden. Danach war eine STR-Analyse für einen Teil der untersuchten Loci möglich, die die Erstellung eines genetischen Fingerabdruckes erlaubte.

Verwandtschaftsanalyse der Individuen

Die Situation, daß eine erwachsene Frau mit vier Kindern an einem Ort bestattet wurde, legt die Vermutung nahe, daß es sich um die Mitglieder einer Familie handeln könnte. Die Abbildung (Abb. 7) zeigt schematisch die einfachste Familiensituation in der die fünf Individuen miteinander

Abb. 5 Prinzip der Verwandtschaftsbestimmung von Skelettindividuen mit den Ergebnissen einer Analyse des genetischen Fingerabdruckes. Die schwarzen Balken symbolisieren die Längenausprägung, die in dem jeweiligen STR-Locus bei der betreffenden Person nachgewiesen wurden. Die weißen Balken beschreiben die überhaupt möglichen Längenausprägungen in einer Bevölkerung. Kinder erben jeweils zur Hälfte die DNA der Mutter und des Vaters. Deshalb muß ein Allel des Kindes bei der Mutter, das andere Allel beim Vater ebenfalls nachgewiesen werden (hier schwarze Balken in der gleichen Höhe). Ist nur ein Allel nachweisbar, so existieren zwei Allele der gleichen Länge (Homozygotie).

verwandt sein könnten. Mit Hilfe der genetischen Untersuchungen soll überprüft werden, ob die hier dargestellte Verwandtschaftsbeziehung wahrscheinlich ist oder ob sie aufgrund der Ergebnisse ausgeschlossen werden kann.

Hierzu wurden mehrere unterschiedliche STR-Loci untersucht. In drei Genorten konnten für alle vier Individuen Ergebnisse erzielt werden, die einen Vergleich der Profile erlauben. In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Analysen zusammengefaßt (gleiche Zahlen bezeichnen Allele der gleichen Länge).

Die Hypothese, daß Individuum 5 Mutter der drei Kinder ist, würde dann verworfen, wenn in einem STR-Locus ein Allel bei den Kindern nachgewiesen wurde, das bei der Mutter nicht zu finden ist.

In dem STR-Locus TH01 wurde für das Individuum 5 das Allel 9.3 nachgewiesen, das auch bei allen drei Kindern vorliegt. In dem STR-Locus F13A1 findet sich das Allel 3.2 der erwachsenen Frau bei dem Kind 2 und dem Kind 3. Kind 4 hat mit Individuum 5 das Allel 6 gemeinsam.

Etwas komplizierter stellt sich der Fall in dem dritten STR-Locus dar. Hier konnte sicher nur ein Allel für Individuum 5 bestimmt werden (Allel 11). Dieses Allel findet sich auch bei den Kindern 2 und 3 wieder. Für das Kind 4 konnte nur das Allel 10 nachgewiesen werden. Jedes Individuum hat zwei Allele für einen STR-Locus. Es besteht die Möglichkeit, daß das gleiche Allel auf beiden Chromosomen vorliegt (Homozygotie). In diesem Fall wäre auch nur ein Allel nachzuweisen. Bei der Untersuchung von stark degradiertem DNA, also alter DNA, muß jedoch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß von zwei unterschiedlichen Allelen nur eines vervielfältigt wird. Dieses Phänomen wird als Allelic Dropout beschrieben (vgl. SCHMERER u.a. 1997, KIMPTON u.a. 1994). Bei den hier ermittelten Ergebnissen kann aus diesem Grund nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob Kind 4 oder Individuum 5 noch ein weiteres Allel besitzen. Der Nachweis von Allel 10 für das Kind 4 und das Allel 11 für Individuum 5 reicht deshalb nicht aus, um die Elternschaft auszuschließen. Die Wahrscheinlichkeit für die Elternschaft ist allerdings im Vergleich zu den beiden anderen Kindern stark verringert.

Um die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, mit der die Hypothese angenommen werden kann, daß Individuum 5 die Mutter der drei Kinder ist, müssen die Häufigkeiten der einzelnen Allele in der Herkunftspopulation miteinbezogen werden. Für historische Bevölkerungen gibt es noch keine

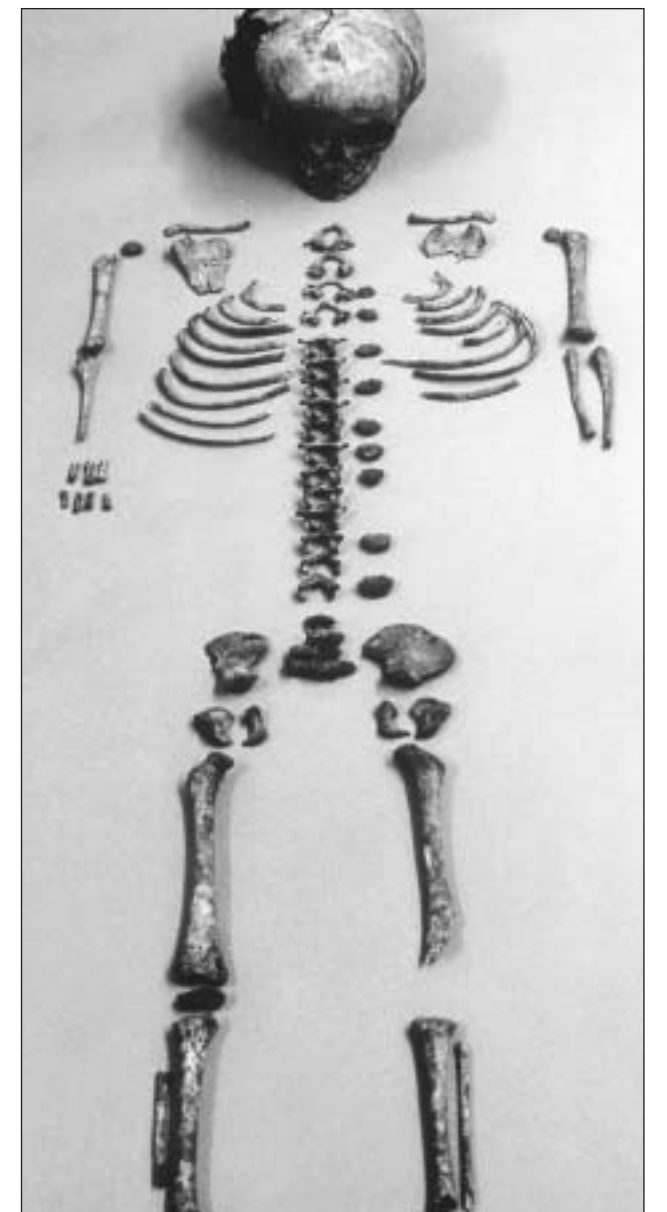
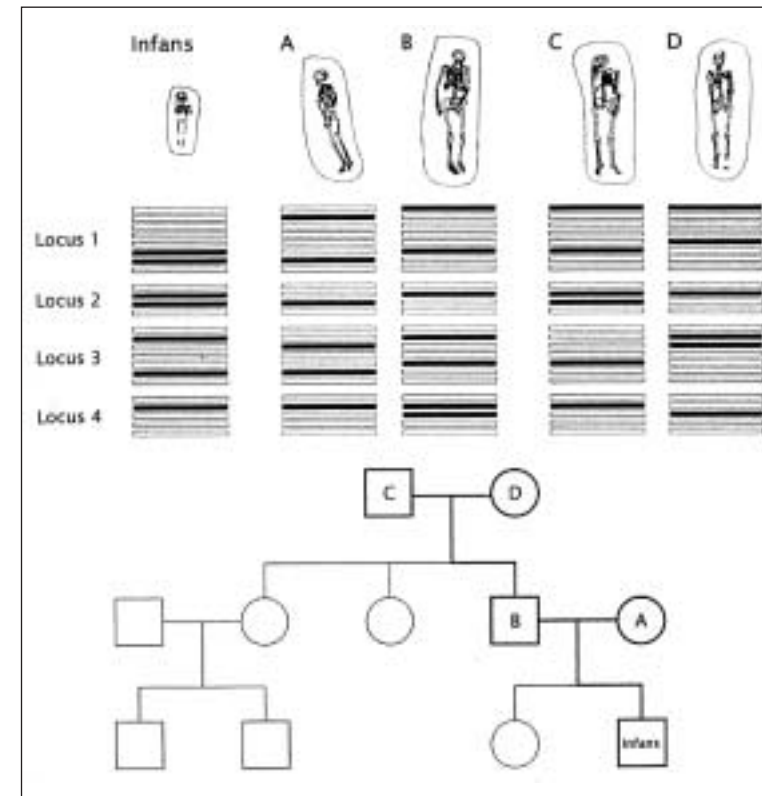


Abb. 6 Skelett des Individuums aus Grab 4.

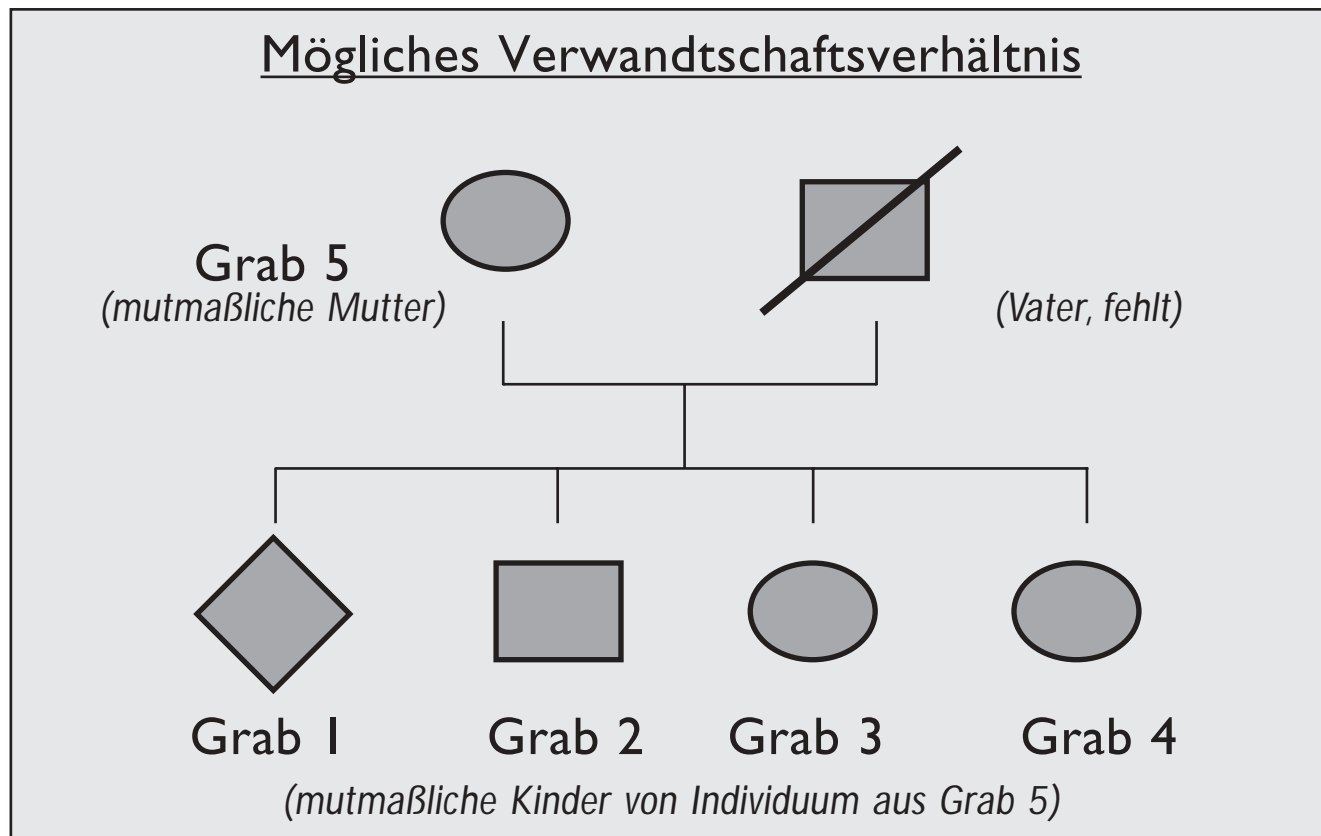


Abb. 7 Vermuteter Stammbaum der Individuen aus Grab 1-5.

Erhebungen über Allelfrequenzen. Um eine Näherung zu erreichen, nutzt man die Daten, die an heute lebenden Bevölkerungen für forensische Zwecke gewonnen wurden (Populationsdaten Deutschland).

Es wird berechnet, wieviel wahrscheinlicher es ist, daß das vermutete Elternteil wirklich die Mutter (oder der Vater) ist, gegenüber der Möglichkeit, daß es sich um eine nichtverwandte Person handelt (z.B. BRENNER 1993). Für die Wahrscheinlichkeitsberechnung ist es von Bedeutung, wie häufig ein Allel in einer Bevölkerung vorliegt. Teilen die untersuchten Individuen sehr seltene Allele, so ist die Wahrscheinlichkeit höher, daß es sich um verwandte Personen handelt als bei einer Gemeinsamkeit in sehr häufigen Allelen. Hier ist die hohe Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung auch bei nichtverwandten Personen gegeben.

Für die Individuen der Wittekindsburg bedeutet das, daß für die Elternschaftswahrscheinlichkeit mit den Indi-

viduen 2 und 3 ein Paternitätsindex von ca. 66 ermittelt wird, während für das Individuum 4 dieser Wert nicht über 1 liegt. Daraus folgt, daß es 66 mal wahrscheinlicher ist, daß das Individuum 5 die Mutter von Kind 2 und Kind 3 ist, als daß Individuum 5 eine nicht verwandte Person repräsentiert. Das Verwandtschaftsverhältnis von Individuum 5 zu Kind 4 kann mit den ermittelten Ergebnissen noch nicht geklärt werden. Eine Elternschaft ist aber nicht auszuschließen. Um die These der Elternschaft signifikant zu stützen, müßten allerdings noch weitere Analysen an anderen STR-Loci durchgeführt werden.

In der Zusammenfassung läßt sich herausheben, daß eine Verwandtschaft für drei Individuen (Grab 5, Grab 2 und Grab 3) mit hoher Wahrscheinlichkeit festgestellt wurde. Die Verwandtschaft mit den beiden anderen Kindern (Grab 1 und Grab 4) wird nicht ausgeschlossen.

Grab-Nr.	Skelettreste	Altersstufe	Geschlecht
1	Schädelfragmente	Infans 1 (ca. 1 - 2 Jahre)	???
2	Skelett nahezu vollständig, Knochen mäßig bis stark (Schädel) fragmentiert	Infans 1 (ca. 4 Jahre)	männlich
3	Skelett unvollständig, hoher Fragmentierungsgrad, Teile des Schädels fehlen völlig	Infans 2 (ca. 6 - 7 Jahre)	weiblich
4	Skelett nahezu vollständig, mäßig fragmentiert	Infans 1 (ca. 4 Jahre)	weiblich

Tabelle 1: Individualdaten der Individuen aus Grab 1 - 4.

Individuum	STR-Locus 1 / TH01	STR-Locus 2 / F13A1	STR-Locus 3 / FES/FPS
5 mutmaßliche Mutter	? / 9.3	3.2 / 7	? / 11
2 mutmaßl. Kind von 5	? / 9.3	3.2 / 6	? / 11
3 mutmaßl. Kind von 5	7 / 9.3	3.2 / 7	10 / 11
4 mutmaßl. Kind von 5	6 / 9.3	6 / 7	10 / ?

Tabelle 2: Ergebnisse der STR-Analysen. (Fragezeichen zeigen an, daß das jeweils zweite Allel noch nicht mit Sicherheit bestimmt werden konnte)

Literatur

ALT, K.W./VACH W. 1994: Rekonstruktion biologischer und sozialer Strukturen in ur- und frühgeschichtlichen Bevölkerungen - Innovative Ansätze zur Verwandtschaftsanalyse in der Archäologie. *Prähistorische Zeitschrift* 69, 1994, 56-91.

BRENNER, C.H. 1993: A note on paternity computation in cases lacking a mother. *Transfusion* 33.1, 1993, 51-54.

BURGER J./HUMMEL, S./HERMANN, B. 1997: Nachweis von DNA Einzelkopiesequenzen aus prähistorischen Zähnen - Liegemilieu als Faktor für den Erhalt von DNA. *Anthropologischer Anzeiger* 55.2, 1997, 193-198.

GERSTENBERGER J./HUMMEL, S./SCHULTES, T./ HÄCK, B./ HERMANN, B. 1999: Reconstruction of a historical genealogy by means of STR analysis and Y-haplotyping of ancient DNA. *European Journal of Human Genetics* (im Druck).

HERMANN, J./HUMMEL, S (Hrsg.) 1993: *Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from palaeontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens.* New York/Berlin/ Heidelberg (1993).

HUMMEL, S./HERMANN, B. 1996: aDNA typing for reconstruction of kinship. *Homo* 47.1-3, 1996, 215-222.

HUMMEL, S./NORDSIEK, G./RAMELECKERS, J./LASSEN, C./ZIERDT, H./BARON, H./HERMANN, B. 1995: aDNA - Ein neuer Zugang zu alten Fragen. *Zeitschrift für Morphologie und Anthropologie* 81.1, 1995, 41-65.

KIMPTON, C./FISHER, D./WATSON, S./ADAMS, M./URQUHART, A./LYGO, J./GILL, P. 1994: Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *International Journal of Legal Medicine* 106, 1994, 302-311.

KRATZER, A./BÄR, W. 1997: Forensische Hämogenetik - Abstammungsbegutachtung. *Therapeutische Umschau* 54.5, 1997, 280-285.

RÖSING, F.W. 1986: Kith or kin? On the feasibility of kinship reconstructions in skeletons. In: A.R. DAVID (Hrsg.), *Science in Egyptology.* Manchester (1986) 223-237.

SCHMERER, W.M./HUMMEL, S./HERMANN, B. 1997: Reproduzierbarkeit von aDNA typing. *Anthropologischer Anzeiger* 55.2, 1997, 199-206.

SCHULTES, T./HUMMEL, S./HERMANN, B. 1997: Zuordnung isolierter Skelettelemente mittels aDNA-typing. *Anthropologischer Anzeiger* 55.2, 1997, 207-216.