

# Paläogenetik – Methodik und Ziele eines neuen naturwissenschaftlichen Forschungsansatzes in der Archäologie

MICHAEL SCHOLZ und CARSTEN M. PUSCH

Auf die ersten wissenschaftlichen Untersuchungen an isolierten ancient DNA-Rudimenten (aDNA) eines ausgestorbenen Zebras, die Mitte der achtziger Jahre vorgelegt wurden,<sup>1</sup> folgte ein wahrer Boom paläogenetischer Untersuchungen von verschiedensten Forschungsgruppen in aller Welt. Dabei hatten diese ersten Bemühungen ihre Berechtigung allein in der methodischen Herausforderung, die die Extraktion und Charakterisierung von Jahrtausende alten DNA-Fragmenten an die Wissenschaft stellte. Heute sind diese Pioniertage Vergangenheit, und wer in unseren Tagen den Anspruch erheben will, ernstzunehmende Forschung auf diesem Gebiet zu betreiben, der kann dies nur tun, indem er bereits im Vorfeld klare Aufgaben und Ziele geplanter aDNA-Analysen an vorge-schichtlichem Probenmaterial definiert. Besonderes Interesse an der Entwicklung der molekularen Paläogenetik zeigen die Wissenschaftsgebiete der Archäologie, Paläontologie und Anthropologie. Für Lösungsansätze der in diesen Disziplinen anstehenden Fragen zur Individual- und Populationsanalyse wird die aDNA-Analytik in Zukunft ein zusätzliches und sehr effizientes Werkzeug sein. Zu Beginn wurde vorwiegend aus speziell konservierten Geweben DNA extrahiert.<sup>2</sup> Abgesehen von mumifizierten Geweben war für die Erhaltung organischer Bestandteile in den meisten Fällen die schnelle Einbettung in Sediment, Teer, Harz, Salz etc. und das damit verbundene anaerobe Milieu ausschlaggebend. Es galt lange Zeit die Ansicht, daß jeglicher Fossilisationsprozeß, der diagenetisch unter Ausbildung von Steinkernen oder Körperfossilien zur In- oder Intuskrustation führt, in der Regel spätere DNA-Extraktionen ausschließt.<sup>3</sup> Jüngste molekulargenetische Untersuchungen an

- 
- 1 R. G. HIGUCHI/B. BOWMANN/M. FREIBERGER/O. RYDER/A. C. WILSON, DNA sequences from a quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312, 1984, 282–284.
  - 2 HIGUCHI u. a. (Anm. 1) 282 ff.; S. PÄÄBO, Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314, 1985, 644 f.; G. H. DORAN/D. N. DICKEL/W. E. J. BALLINGER/O. F. AGEE/P. J. LAIPIS/W. W. HAUSWIRTH, 8000 year old human brain tissue: anatomically, cellular and molecular analysis. *Nature* 323, 1986, 803–806; S. PÄÄBO/R. G. HIGUCHI/A. C. WILSON, Ancient DNA and the polymerase chain reaction: the emerging field of molecular archaeology. *Journ. Biol. Chem.* 264, 1989, 9709–9712; G. DEL POZZO/J. GUARDIOLA, Mummy DNA fragment identified. *Nature* 339, 1989, 431 f.; R. H. THOMAS/W. SCHAFFNER/A. C. WILSON/S. PÄÄBO, DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340, 1989, 465–467; E. M. GOLENBERG/D. E. GIANNASI/M. T. CLEGG/C. J. SMILEY/M. DURBIN/D. HENDERSON/G. ZURAWSKI, Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* 344, 1990, 656–658; W. W. THOMAS/S. PÄÄBO/F. X. VILLABLANCA/A. C. WILSON, Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *Journ. Mol. Evol.* 3, 1990, 101–112; D. A. LAWLOR/C. D. DICKEL/W. W. HAUSWIRTH/P. PARHAM, Ancient HLA from 7500-year-old archaeological remains. *Nature* 349, 1991, 786–788; R. DESALLE/W. WHEELER/D. GRIMALDI/J. GATESY, DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257, 1992, 1860–1862; M. HÖSS/M. KOHN/S. PÄÄBO/F. KNAUER/W. SCHRÖDER, Excrement analysis by PCR. *Nature* 359, 1992, 199.
  - 3 E. BERAUD-COLOMB/R. ROUBIN/J. MARTIN/N. MAROC/A. GARDEISEN/G. TRABUCHET/M. GOOSSENS, Human  $\beta$ -globin gene polymorphisms characterized in DNA extracted from ancient bones 12000 years old. *Am. Journ. Hum. Genet.* 57, 1995, 1267–1274.

den Überresten des namengebenden Frühmenschensfundes aus dem Neandertal<sup>4</sup> und erste genetische Ergebnisse am fossilen Schädelfragment des Neandertalers von Warendorf-Neuwarendorf<sup>5</sup> verdeutlichen eindrucksvoll das Gegenteil.

Abhängig von der Qualität des Erhaltungszustandes der DNA kann eine erstaunliche Fülle an Daten erzielt werden. Das Ausnahmebeispiel in punkto extrem guter Gewebeerhaltung wurde durch die partielle Sequenzierung der isolierten DNA eines mesozoischen Käfers illustriert, der vor 120 bis 135 Millionen Jahren (Unterkreide/Malm) in Bernstein eingeschlossen wurde.<sup>6</sup> Da aber Knochenreste viel häufiger vorkommen als gut erhaltenes Weichteilgewebe, stellen diese den mit Abstand größten Anteil an typisierbarem prähistorisch-biologischen Arbeitsmaterial.

## Aufbau und Funktion des Erbmoleküls DNA

Die DNA (engl.: deoxyribonucleic acid) speichert in der Abfolge (Sequenz) ihrer Bausteine (Basen) die genetische Information (Gene) eines Organismus. Sie besteht aus einer sehr langen Kette, in der sich Zucker- und Phosphatgruppen alternierend abwechseln.<sup>7</sup> Es handelt sich dabei stets um den gleichen Zucker (Desoxyribose), der immer auf die gleiche Weise mit einer Phosphatgruppe verbunden ist. An jedem Zucker dieser Zucker-Phosphat-Kette hängt eine Base. Im Aufbau der DNA findet man vier verschiedene Basen, nämlich die zwei Purine Adenin und Guanin sowie zwei Pyrimidine Thymin und Cytosin. Sie sind gegenüberliegend durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Diese Verbindung erfolgt nur in ganz bestimmten Kombinationen (A : T und C : G) und wird als Basenpaar (bp) bezeichnet. Diese vier Basen liefern in ihrer für jeden Organismus spezifischen Anordnung jene Vielfalt, die notwendig ist, um die unzähligen Genotypen und zwischengelagerten repetitiven Einheiten des Genoms zu konstruieren. Bei der Expression der verschiedenen Gene, deren codierte Information dazu genutzt wird, ständig neue Proteinmoleküle zu synthetisieren, dient der DNA-Doppelstrang als Matrize für die sogenannte RNA (engl.: ribonucleic acid). Dabei wird der Doppelstrang der DNA an der entsprechenden Stelle enzymatisch in zwei Einzelstränge aufgeschlossenen und transkribiert (RNA-Polymerase). In der RNA ist das Thymin durch die funktionell äquivalente Base Uracil ersetzt. Die einzelsträngige RNA wird in ihrer endgültigen Form schließlich selbst zur Vorlage für den Zusammenschluß einer Kette aus Aminosäuren, aus denen in vielerlei Kombinationen und Sequenzen alle Proteine aufgebaut sind.

## PCR als Wegbereiter paläogenetischer Analysen

Für die in dieser Arbeit vorgestellten molekularbiologischen Verfahrensweisen an prähistorischer DNA war die Erfindung und Weiterentwicklung der PCR<sup>8</sup> eine wesentliche Voraussetzung. Unter Anwendung dieser PCR (engl.: polymerase chain reaction) ist es mit relativ geringem labortechnischen Aufwand möglich geworden, gezielt ausgewählte Abschnitte des DNA-Moleküls in hohen

- 
- 4 M. KRINGS/A. STONE/R. W. SCHMITZ/H. KRAINITZKI/M. STONEKING/S. PÄÄBO, Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90, 1997, 19–30; M. KRINGS/H. GEISERT/R. W. SCHMITZ/H. KRAINITZKI/S. PÄÄBO, DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 1999, 5581–5585.
  - 5 M. SCHOLZ/C. M. PUSCH, Neandertaler-DNA: genetische Untersuchungen am fossilen Schädelfragment von Warendorf. In: *Neandertaler und Co. – Begleitbuch zur Ausstellung Westf. Mus. f. Arch. Münster (Münster 1998)* 18–21; M. SCHOLZ/L. TRELISÓ CARRENO/C. M. PUSCH, Application modifiée de l'Analyse Dot Blot pour la détermination de l'Os pariétal fossile de Warendorf-Neuwarendorf. *Anthropologie (Paris)* 103/2, 1999, 307–311; M. SCHOLZ/C. M. PUSCH, The Neandertal Find of Neuwarendorf: molecular genetic evidence and perspectives. *Bull. Soc. Suisse Anthr.* 5/1, 1999, 55–61.
  - 6 R. J. CANO/H. N. POINAR/N. J. PIENIAZEK/A. ACRA/J. G. O. POINAR, Amplification and sequencing of DNA from a 120–135-million-year-old weevil. *Nature* 363, 1993, 536–538.
  - 7 R. P. L. ADAMS/J. F. KNOWLER/D. P. LEADER, *Biochemistry of the nucleic acids* (London 1992).

Kopienzahlen zu vervielfältigen. Dabei wird der native DNA-Doppelstrang unter Temperatureinfluß (ca. 90 °C) in zwei Einzelstränge zerlegt (denaturiert). Der Startbereich der Reaktion wird durch vorher synthetisierte Primer definiert und die gewünschte Sequenz anschließend mit Hilfe des Enzyms *Taq*-DNA-Polymerase und freier Nukleotide komplementär amplifiziert. Nach erneuter Denaturierung des so wieder neu entstanden Doppelstranges kann mit weiteren Synthesesyklen innerhalb kurzer Zeit (1–2 Stunden) eine sehr hohe Kopienzahl der jeweiligen Zielsequenz hergestellt werden.

Ohne den essentiellen Amplifikationsfaktor der PCR – bezogen auf vorher eindeutig definierte DNA Segmente – wäre aufgrund der Piko- bis Nanogramm-Mengen an isolierter und oftmals stark degradiertem aDNA kein einziges Experiment denkbar.

Der Einsatz der PCR birgt allerdings aufgrund ihrer hohen Sensitivität ein schwer kalkulierbares Potential an Artefaktbildung und Daten-Mißinterpretation durch unerwünschte Kontamination mit moderner oder alter Fremd-DNA.<sup>9</sup> Wie kann man bei Untersuchungen an prähistorischer DNA dann aber sicher sein, daß die putative aDNA-Sequenz oder das PCR-Produkt per se tatsächlich prähistorischer Herkunft ist und nicht von rezenter Kontamination herrührt? Eine relative Sicherheit ist diesbezüglich nur dann gegeben, wenn ein enormer Sicherheitsaufwand im Sinne von Sterilität und Kontaminationsprävention betrieben wird.<sup>10</sup>

## Die Problematik der Authentizität prähistorischer/fossiler DNA-Fragmente

Versucht man an vorgeschichtlichem Probenmaterial molekulargenetische Analysen durchzuführen, so ist man stets mit dem Problem eines Kontaminationsrisikos konfrontiert. Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Präventionsmaßnahmen vorgestellt. Prinzipiell stellt es eine Notwendigkeit dar, dieses Problems Herr zu werden. Schließlich ist eine kontaminierte DNA-Probe immer gleichbedeutend einem Verlust an Zeit und Material. Vor allem der Verlust des Materials ist dabei entscheidend, setzt man voraus, daß normalerweise nicht unbegrenzt prähistorisches oder fossiles Probenmaterial für eine Auswertung zur Verfügung steht.

Es erscheint hier notwendig, kurz auf die wichtigsten Vorsichtsmaßnahmen bzw. Begleitexperimente bei der aDNA-Analyse einzugehen. Eine wichtige Voraussetzung für kontaminationsfreies Arbeiten ist die Verwendung steriler Arbeitsmaterialien.<sup>11</sup> Dies beginnt bereits bei der Vorbereitung zur Entnahme der Knochen-/Gewebeprobe. Sterile Arbeitsplätze (clean bench) sind hier ebenso Bedingung wie die Verwendung steriler Trennscheiben und geeigneter Arbeitskleidung (Einwegkittel, Gesichtsmaske, Latexhandschuhe). Das anschließende Abschleifen einer dünnen Schicht der Knochenoberfläche ist ebenso obligatorisch wie die im weiteren Verlauf der Analysen benutzten Aerosol-resistenten und mit steriler Watte versiegelten Pipettenspitzen, ebenso wie die Sterilisierung aller verwendeten Puffer, Lösungen und Medien durch jeweils zweimalige Filtration und Autokla-

- 
- 8 R. SAIKI/D. H. GELFAND/S. STOFFEL/S. J. SCHARF/R. HIGUCHI/G. T. HORN/K. B. MULLIS/H. A. ERLICH, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 1988, 487–491; K. B. MULLIS/F. FALOONA/S. SCHARF/R. SAIKI/G. T. HORN/H. A. ERLICH, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. *Cold Spring harbor Symposia in quantitative biology* 51/1, 1986, 263–273; PÄÄBO u. a. 1989 (Anm. 2) 9709 ff.
  - 9 E. HAGELBERG/B. SYKES/R. HEDGES, Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342, 1989, 458; PÄÄBO u. a. 1989 (Anm. 2) 9709–9712; H. N. POINAR/ M. HÖSS/J. L. BADA/S. PÄÄBO, Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272, 1996, 864–866; T. LINDAHL, Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell* 90, 1997, 1–3; C. M. PUSCH/I. GIDDINGS/M. SCHOLZ, Repair of degraded duplex DNA from prehistoric sample using *E. coli* DNA polymerase I and T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res.* 26/3, 1998, 857–859.
  - 10 E. BERAUD-COLOMB/R. ROUBIN/J. MARTIN/N. MAROC/A. GARDEISEN/G. TRABUCHET/M. GOOSSENS, Reply to Cooper. *Am. Journ. Hum. Genet.* 60, 1997, 1002 f.; M. STONEKING, Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it? *Am. Journ. Hum. Genet.* 17, 1995, 1259–1262.
  - 11 M. SCHOLZ/C. M. PUSCH, An efficient isolation method for high-quality DNA from ancient bones. *Trends Genet.* 13, 1997, 249 (Technical Tips Online, TTO. [<http://www.elsevier.com/locate/tto>] T01045; [<http://www.elsevier.nl/locate/tto>] T01045).

vierung. Eine Kontrolle aller benutzten Reagenzien (z. B. Lyse- und Reinigungspuffer,  $H_2O$ dd) wird vor jedem Extraktions- bzw. bei jedem PCR-Einsatz durch sogenannte Leerexperimente (ohne Einsatz von DNA) durchgeführt. Generell sollten Negativ-Kontrollen mit einer ausreichend hohen Anzahl an PCR-Ansätzen, sowohl mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen als auch Enzymkonzentrationen erfolgen. Nach einer erfolgreichen Extraktion bzw. Amplifikation prähistorischer DNA ist es wünschenswert, die erhobenen Daten in wiederholten Ansätzen erneut zu verifizieren, um so einen Nachweis für deren Authentizität führen zu können. Eines muß an dieser Stelle in aller Deutlichkeit gesagt werden: Welchen Sicherheitsvorkehrungen zur Vermeidung von Kontaminationen man auch immer den Vorzug geben mag, die selbstkritische Prüfung der erhobenen Daten ist in jedem Fall oberstes Gebot bei allen Arbeiten mit prähistorischer DNA. Bei der Untersuchung menschlicher Überreste ist man in der Lage, alle Sequenzen nichtmenschlichen Ursprungs auszusortieren (bodenlebende Mikroorganismen, etc.). Beim Nachweis einer eindeutig menschlichen Sequenz stellt sich aber immer die Frage, mit welcher Sicherheit es sich hierbei tatsächlich um DNA prähistorischen Ursprungs handelt und nicht etwa um eine rezente Kontamination. Eine relativ verlässliche Möglichkeit zwischen alter und moderner DNA bereits visuell unterscheiden zu können, besteht in der gelelektrophoretischen Auftrennung der Extrakte auf einem niedrigprozentigen Agarose-Gel. Da die rezente DNA in ihrer makromolekularen Struktur weitaus besser erhalten ist (d. h. größere Konzentration und längere Fragmente), zeigt sie in einem solchen Gelbild ein intensives und deutlich definiertes Signal im oberen Größenbereich. Bei den meisten Extraktionsmethoden für prähistorische DNA ist dagegen eine derart hochmolekulare Ausbeute nicht zu erwarten. Im Gelbild stellt sich dieses Isolat dann als sog. Schmier entlang der Gelspur dar, der sich in einem weitaus kleineren Größenbereich manifestiert. Ein Vergleich zwischen den – je nach Analyseverfahren – klar definierten Genotypen der in die Untersuchungen involvierten Wissenschaftler sollte schließlich eine zusätzliche Sicherheit in Bezug auf den Ursprung und somit der Aussagequalität der eruierten Daten geben.

## Mitochondriale DNA vs. Kern-DNA – Analytische Möglichkeiten und Grenzen

Innerhalb einer Zelle existieren zwei verschiedene DNA-Typen. Neben der chromosomalen Fraktion des Zellkerns besitzen auch die Mitochondrien, die Energielieferanten der Zelle, eine eigene ringförmig aufgebaute DNA. Diese mitochondriale (mt) DNA schien bislang das geeignetere Untersuchungsobjekt für genetische Analysen an prähistorischer, bzw. fossiler DNA zu sein.<sup>12</sup> Zweifellos bietet die Untersuchung dieses extrachromosomalen Elements wichtige Vorteile: es kommt in einer Zelle ungefähr 1000 bis 2000mal häufiger vor (ca. 5–10 Kopien pro Organelle; ca.  $10^{16}$  Kopien pro Individuum) als das haploide nukleare Genom. Weitere Positiva sind das Fehlen von Rekombination und die relativ geringe Größe von etwa 16,5 kb (Kilobasen) doppelsträngiger DNA. Damit ist mtDNA mit einer ungleich höheren Wahrscheinlichkeit aus vorgeschichtlichem Material zu extrahieren als Kern-DNA und stellt ein geeignetes Werkzeug für populationsgenetische und populationshistorische Untersuchungen dar.<sup>13</sup> Da diese episodale Entität maternal vererbt wird und sich zudem auch – im archäologischen Zeitmaßstab gerechnet – schneller verändert als das nukleare Genom, wurde mtDNA vor allem zur Aufdeckung urchenischer Wanderungsbewegungen, sogenannter vertikal-evolutiver Studien, eingesetzt.<sup>14</sup> Die sukzessive Katalogisierung von Verwandt-

12 KRINGS u. a. 1997 (Anm. 4) 19 ff.; dets. u. a. 1999 (Anm. 4) 786 ff.

13 R. CANN/M. STONEKING/A. C. WILSON, Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325, 1987, 31–36; L. VIGILANT/M. STONEKING/H. C. HARPENDING/K. HAWKES/A. C. WILSON, African populations and the evolution of mitochondrial DNA. *Science* 253, 1991, 1503–1507; K. M. SULLIVAN/A. MANNUCCI/C. P. KIMPTON/P. GILL, A rapid quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene Amelogenin. *Biotechniques* 15, 1993, 636–641; H. C. HARPENDING/S. T. SHERRY/A. R. ROGERS/M. STONEKING, The genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.* 34, 1993, 483–496.

schaftsmustern nach Divergenz und Konvergenz bestimmter, heute noch existierender Schlüsselpopulationen ist in diesem Sinne ein durchaus vielversprechender Ansatz.<sup>15</sup>

Allerdings sind mt-Sequenzen für bestimmte Fragestellungen bei der Individual- und Familientypisierung (horizontale Studien) weitgehend uninformativ. Da im prähistorischen Kontext direkte Vorinformationen bezüglich der Generationsabfolge innerhalb einer Population fehlen, sind Analysen auf der Basis eines maternalen Vererbungsmodus nicht praktikabel.<sup>16</sup> Außerdem müssen identische mt-Segmente nicht unbedingt einer homolog-chronologischen Reihe zuzuordnen sein, sie können vielmehr durch multiple Basentransitionen oder Transversionen auch in analoger Beziehung stehen. Hinzu kommt, daß nach der Bevölkerungsexpansion des modernen Menschen in Europa umfangreiche Völkerwanderungen (z. B. die neolithische Wanderungsbewegung [ca. 6000 BC] oder die Völkerwanderungen des frühen Mittelalters) dazu beigetragen haben, daß sich der genetische Pool Europas durchmischte und dadurch homogenisierte.<sup>17</sup> So findet man häufig in verschiedenen europäischen Populationen identische oder hochgradig ähnliche mtDNA-Sequenzen.<sup>18</sup>

Um die Informativität von DNA-Sequenzen in spezifischen Fragestellungen zu erhöhen, muß auf die Auswertung der chromosomalen Kern-DNA (nukleare DNA) umgestiegen werden.<sup>19</sup> Da es durchaus möglich ist, auch nukleare DNA aus prähistorischem Material zu extrahieren<sup>20</sup> und bereits eine große Anzahl nuklearer DNA-Polymorphismen in den vergangenen Jahren katalogisiert wur-

- 
- 14 R. R. SOKAL, Ancient movement patterns determine modern genetic variances in Europe. *Hum. Biol.* 63, 1991, 589–606; M. H. NITECKI/D. V. NITECKI, *Origins of anatomically modern humans* (New York, London 1994).
- 15 A. DI RIENZO/A. C. WILSON, Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991, 1597–1601; R. H. WARD/B. L. FRAZIER/K. DEW-JAGER/S. PÅABO, Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991, 8720–8724; R. PIERCY/K. M. SULLIVAN/N. BENSON/P. GILL, The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int. Journ. Leg. Med.* 106, 1993, 85–90; J. BERTRANPETIT/J. SCALA/F. CALAFELL/P. UNDERHILL/P. MORAL/D. COMAS, Human mitochondrial DNA variation and the origin of the Basques. *Ann. Hum. Gen.* 59, 1995, 63–81; J. L. MOUNTAIN/S. S. HERBERT/P. BHATTACHARYYA/P. UNDERHILL/C. OTTOLENGHI/M. GADGIL/L. L. CAVALLI-SFORZA, Demographic history of India and mitochondrial DNA sequence diversity. *Am. Journ. Genet.* 56, 1995, 979–992; F. CALAFELL/P. UNDERHILL/A. TOLUN/D. ANGELICHEVA/L. KALAYDJIEVA, From Asia to Europe: mitochondrial DNA sequence variability in Bulgarians and Turks. *Ann. Hum. Genet.* 60, 1996, 35–49.
- 16 C. A. III HUTCHISON/J. E. NEWBOLD/J. E. POTTER/M. H. EDGELL, Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251, 1974, 536–538; C. GINTHER/L. ISSEL-TARVER/M. C. KING, Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genet.* 2, 1992, 135–138.
- 17 P. MENOZZI/A. PIAZZA/L. L. CAVALLI-SFORZA, Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science* 201, 1978, 786–792; A. J. AMMERMAN/L. L. CAVALLI-SFORZA, The Neolithic transition and the genetics of populations in Europe (Princeton 1984); S. RENDINE/A. PIAZZA/L. L. CAVALLI-SFORZA, Simulation and separation by principal components of multiple expansions in Europe. *Am. Nat.* 128, 1986, 681–706.
- 18 L. L. CAVALLI-SFORZA/P. MENOZZI/A. PIAZZA, Demic expansions and human evolution. *Science* 259, 1993, 639–646; CALAFELL u. a. (Anm. 15) 35 ff.
- 19 A. J. JEFFREYS/V. WILSON/S. L. THEIN, Hypervariable „minisatellite“ regions in human DNA. *Nature* 314, 1985, 67–73; Y. NAKAMURA/M. LEPPERT/P. O'CONNELL/R. WOLFF/T. HOLM/M. CULVER/C. MARTIN/E. FUJIMOTO/M. HOFF/E. KUMLIN, Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1987, 1616–1622; A. M. BOWCOCK/J. R. KIDD/J. L. MOUNTAIN/J. M. HERBERT/L. CAROTENUTO/K. K. KIDD/L. L. CAVALLI-SFORZA, Drift, admixture, and selection in human evolution: A study with DNA polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991, 839–843; K. KUROSAKI/T. MATSUSHITA/S. UEDA, Individual DNA identification from ancient human remains. *Am. Journ. Hum. Genet.* 53, 1993, 638–643; A. M. BOWCOCK/A. RUIZ-LINARES/J. TOMFOHRDE/E. MINCH/J. R. KIDD/L. L. CAVALLI-SFORZA, High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368, 1994, 455–457; A. DI RIENZO/A. C. PETERSON/J. C. GARZA/A. M. VALDES/M. SLATKIN/N. B. FREIMER, Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 91, 1994, 3166–3170.
- 20 S. HUMMEL/D. HERRMANN, Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human DNA. *Naturwissenschaften* 78, 1991, 266 f.; KUROSAKI u. a. (Anm. 19) 638 ff.; P. GILL/P. L. IVANOV/C. KLIMPTON/R. PIERCY/N. BENSON/G. TULLY/I. EVETT/E. HAGELBERG/K. SULLIVAN, Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat. Genet.* 6, 1994, 130–135; BERAUD-COLOMB, u. a. (Anm. 3) 1267 ff.; M. D. RAMOS/C. LALUEZA/E. GIRGAU/A. PEREZ-PEREZ/S. QUEVEDO/D. TURBON/X. ESTIVILL, Amplifying dinucleotide microsatellite loci from bone and tooth samples of up to 5000 years of age: more inconsistency than usefulness. *Hum. Genet.* 96, 1995, 205–212; S. HUMMEL/C. LASSEN/B. HERRMANN/M. D. SCHÖN, aDNA-Analyse an Knochenproben von einem

*Fortsetzung nächste Seite*

de, kann jede spezifisch im Genom definierte DNA-Sequenz (Genort/Locus) für sich allein oder in Kombination mit anderen für evolutive Studien<sup>21</sup> oder für die Aufklärung genealogischer Strukturen innerhalb vorgeschichtlicher Bestattungsplätze informativ sein.<sup>22</sup> Die Analyse nuklearer aDNA hat damit den großen Vorteil, daß sie sowohl für diachrone (interpopulative) als auch für synchrone (intrapopulative) Studien geeignet ist.

## Repetitive DNA-Motive als Werkzeug zur Individualanalyse an vorgeschichtlichen Menschenresten

Neben den klassischen, proteinkodierenden Sequenzen der Genome (Gene) höherer Zellen sind zahlreiche Sequenzabschnitte mit sich wiederholenden Basenabfolgen (Repeats) bekannt. Sie repräsentieren in Vertebraten die Mehrzahl aller DNA-Sequenzen. Eines der häufigsten repetitiven Motive wird durch die sogenannten Alu-Repeats dargestellt, die in ca. 500 000 Kopien dispers im haploiden menschlichen Genom vorliegen.<sup>23</sup> Andere repetitive Motive, wie die telomeren Repeats, gruppieren sich tandemartig organisiert in definierten chromosomalen Bereichen.<sup>24</sup> Repetitive Blöcke, die unmittelbar vor Genen liegen, können durch Varianz der Zahl ihrer repetitiven Bausteine genetisch bedingte Defekte prädisponieren, so z. B. beim fraX-Syndrom.<sup>25</sup> Daher hat die Aufklärung des Aufbaus der beteiligten Komponenten repetitiver Entitäten und ihrer Wechselwirkungen nicht nur eine rein biologische Bedeutung, sondern auch pathogenetische Relevanz. Die Fülle verschiedenster repetitiver Motive, ihre uneinheitliche Verteilung im Genom, ihre unklare und bis heute größtenteils unverstandene Beteiligung an der Ausführung genetischer Aufgaben haben daher zuerst die abwertenden Begriffe der „Selfish DNA“<sup>26</sup> oder „Junk DNA“<sup>27</sup> entstehen lassen. Erst allmählich versteht man die Bedeutung und Funktionsweise einzelner Repeats. Selbst große chromosomale Bereiche, wie das Zentromer, sind trotz Vorhandensein zahlreicher DNA-Repeats weder eindeutig in ihrer Struktur aufgeklärt, noch sind alle Baukomponenten bekannt. Dadurch ist verständlich, daß bislang nur wenige bereits klassifizierte Motive dieser Art in der molekulargenetischen aDNA-Diagnostik Verwendung finden.

Dabei sind polymorphe Sequenzen, die große Wiederholungseinheiten aufweisen, aufgrund ihrer besser zu unterscheidenden Allele am einfachsten zu interpretieren. Faßbar durch ein wohl gewähltes Primerpaar, das das Repeat umgreift, ist so ein Marker geschaffen, der – ganz allgemein – mit dem Terminus Sequence Tagged Site (STS) belegt ist. Eine Untergruppe solcher überall im Genom verteilten Nukleinsäurewiederholungen sind sogenannte Expressed Sequence Tags (ESTs), die aus

### Fortsetzung Anm. 20

- Gräberfeld des 4./5. Jhs. n. Chr. an der Fallwand bei Wremen (Landkreis Cuxhaven). Arch. Korrbld. 25, 1995, 243–252; C. M. PUSCH/M. SCHOLZ, DNA extraction from ancient human bones via enzymatic treatment. Trends Genet. 13, 1997, 417 (Technical Tips Online, TTO [<http://www.elsevier.com/locate/tto>] T01217, [<http://www.elsevier.nl/locate/tto>] T01217); M. SCHOLZ/C. M. PUSCH, An efficient isolation method for high-quality DNA from ancient bones. Trends Genet. 13, 1997, 249 (Technical Tips Online, TTO [<http://www.elsevier.com/locate/tto>] T01045, [<http://www.elsevier.nl/locate/tto>] T01045); PUSCH, u. a. (Anm. 9) 857 ff.
- 21 A. PÉREZ-LEZAUN/F. CALAFELL/E. MATEU/D. COMAS/R. RUIZ-PACHECO/J. BERTRANPETIT, Microsatellite variation and the differentiation of modern humans. Hum. Genet. 99, 1997, 1–7.
- 22 KUROSAKI, u. a. (Anm. 19) 638 ff.
- 23 M. BATZER/P. DEININGER, A human specific subfamily of Alu sequence. Genomics 9, 1991, 481–487.
- 24 R. K. MOYZIS/D. C. TORNEY/J. MEYNE/J. M. BUCKINGHAM/J. R. WU/C. BURKS/K. M. SIROTKIN/W. B. GOAD, The distribution of interspersed repetitive DNA sequence in the human genome. Genomics 4, 1989, 273–289.
- 25 A. J. VERKERK/M. PIERETTI/J. S. SUTCLIFFE/Y.-H. FU/D. P. KUH/L. A. PIZZUTI/O. REINER/S. RICHARDS/M. F. VICTORIA/F. ZHANG/B. E. EUSSEN/G.-J. B. VAN OMMEN/L. A. BLONDEN/G. J. RIGGINS/J. L. CHASTAIN/C. B. KUNST/H. GALJAARD/C. T. CASKEY/D. L. NELSON/B. A. OOSTRA/S. T. WARREN, Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat in fragile X syndrome. Cell 65, 1991, 905–914.
- 26 L. E. ORGEL/F. H. C. CRICK, Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 284, 1980, 604–607.
- 27 R. NOWAK, Mining treasures from „junk“ DNA. Science 263, 1994, 608–610.

heteronuklearen cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Derartige DNA-Sequenzen, die zudem noch einen hochpolymorphen, also signifikant längenvariablen Charakter aufweisen, eignen sich aufgrund des multiallelischen Systems hervorragend für verschiedenste verwandtschaftsanalytische Betrachtungen. Da mit solchen individualspezifischen Sequenzen die familiäre Segregation eines definierten DNA-Abschnittes inklusive benachbarter Regionen verfolgt werden kann, sind diese Marker zum potenten Werkzeug sowohl in der forensischen Analytik als auch für die Typisierung und Individualisierung in der Paternitätsanalyse geworden. Weiterhin sind sie nutzbar für die Vorbereitung von Knochenmarkstransplantationen und zur Typisierung von Zelllinien. Für einige dieser als Short Tandem Repeats (STRs) bezeichneten Entitäten liegen die entsprechenden Allele für diverse Bevölkerungsgruppen frequenzberechnet vor und lassen sich daher auch im populationsgenetischen Sinne statistisch auswerten.<sup>28</sup>

### Interdisziplinäre Kooperation

Fragestellungen auf der Basis einer einzigen wissenschaftlichen Disziplin beantworten zu wollen ist gängig und beschränkt sich in der Regel auf Material- oder Informationsaustausch kooperierender, fachidentischer Arbeitsgruppen.

Weitaus innovativer und komplexer ist eine multidisziplinäre Kollaboration, um fachübergreifenden Projekten zum Erfolg zu verhelfen, wie dies im neuen Bereich der Paläogenetik unumgänglich ist. Der einzigartige Vorteil eines solchen Ansatzes liegt in der breitgefächerten Vor- und Zusatzinformation verfügbarer Daten und interessierender Fragestellungen. Dies ist umso wichtiger, da das Wissen jeder einzelnen Disziplin für sich (d. h. Archäologie, Anthropologie, Genetik, Populationsbiologie) nur in seltenen Fällen eine gesicherte und umfassende Aussage zulässt. Wenn ein Informationsaustausch zwischen den jeweils involvierten Disziplinen funktioniert, kann das Manko, daß in der Regel keine der Fachrichtungen die Vorgehensweise und Möglichkeiten der anderen Sparten in vollem Umfang einzuschätzen vermag, umgangen werden.

Prähistorische DNA ist und wird wohl auch in Zukunft problematisches Arbeitsmaterial bleiben und in Einzelaspekten immer Fragen offenlassen. Deswegen hat die Paläogenetik in ihren Anfängen nun auch die Aufgabe, Vorbildcharakter für zukünftigen Studien zu sein. Das Erreichen einer Stufe, die den bloßen Selbstzweck von aDNA-Extraktionen überschreitet, wird zweifellos dazu beitragen, durch die Anwendung kombinierter Analyseverfahren die junge Disziplin der Paläogenetik als festen Bestandteil der Vorgeschichtsforschung zu etablieren.

---

28 M. C. EDWARDS/P. R. CLEMENS/M. TRISTAN/A. PIZZUTI/R. A. GIBBS, Pentanucleotide repeat length polymorphism at the human CD4 locus. *Nucleic Acids Res.* 19, 1991, 4791; A. EDWARDS/H. A. HAMMOND/L. JIN/C. T. CASKEY/R. CHAKRABORTY, Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12, 1992, 241–253; C. P. KIMPTON/A. WALTON/P. GILL, A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum. Mol. Genet.* 1, 1992, 287; W. J. WALL/R. WILLIAMSON/M. PETROU/D. PAPAIOANNOU/B. H. PARKIN, Variation of short tandem repeats within and between populations. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1993, 1023–1029; P. WIEGAND/B. BUDOWLE/S. RAND/B. BRINKMANN, Forensic validation of the STR systems SE 33 and TC 11. *Int. Jour. Leg. Med.* 105, 1993, 315–320; A. MÖLLER/E. MEYER/B. BRINKMANN, Different types of structural variations in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. Journ. Leg. Med.* 106, 1994, 319–323; L. CASARINO/A. MANNUCCI/C. P. KIMPTON/S. PRESCIUTTINI/G. BRUNI/M. G. COSTA/F. DE STEFANO, Forensic evaluation of HumCD4: An Italian database. *Int. Journ. Leg. Med.* 109, 1996, 49–51.

*Anschriften der Verfasser*

Dr. CARSTEN M. PUSCH  
Labor für molekulare Genetik, Universität Tübingen,  
Auf der Morgenstelle 15  
D-72076 Tübingen  
E-mail: carsten.pusch@uni-tuebingen.de

Dr. MICHAEL SCHOLZ  
Institut für Ur- und Frühgeschichte, Abteilung Archäobiologie  
Universität Tübingen  
Eugenstrasse 40  
D-72072 Tübingen

sowie  
Osteologische Sammlung der Universität Tübingen  
Wilhelmstrasse 27  
D-72074 Tübingen  
E-mail: michael.scholz@uni-tuebingen.de

*Schlagwortverzeichnis*

Prähistorische DNA; Paläogenetik; PCR; mtDNA; Kern-DNA.