

Molekulargenetische Untersuchungen zur Ergänzung des biologischen Profils eines historischen Grabungsfundes auf der Grundlage autosomaler und uniparentaler aDNA-Marker

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

eingereicht von

M.Sc. Anne-Marie Pflugbeil

geboren am 29.03.1987 in Karl-Marx-Stadt

angefertigt am

Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig

Betreut von

Prof. Dr. med. J. Dreßler
Prof. Dr. rer. nat. D. Labudde

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 24.10.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Bibliographische Beschreibung	IX
1 Einführung	1
1.1 Vorbetrachtungen zum Grabungsfund	2
1.1.1 Chronologie und kulturelle Einordnung des Skelettmaterials	2
1.1.2 Biologisches Profil	4
1.1.3 Archäologische und anthropologische Vorarbeiten	5
1.2 Fragestellungen für historische, osteologische Funde	8
1.3 <i>ancient</i> DNA (aDNA)	11
1.3.1 DNA-Degradation	11
1.3.2 DNA-Erhalt in Knochen und Zähnen	12
1.4 Organisation und Anwendung uniparental vererbter DNA-Systeme	16
1.4.1 Mitochondriale DNA (mtDNA)	16
1.4.2 Y-chromosomale DNA	20
1.5 <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs)	22
1.5.1 Analyse mitochondrialer Abstammungslinien mittels SNPs	23
1.5.2 Analyse Y-chromosomaler Abstammungslinien mittels SNPs	27
1.6 <i>Short Tandem Repeats</i> (STRs)	30
2 Hypothesen und Fragestellungen	35
3 Material und Methoden	39
3.1 Material	39
3.1.1 Studienmaterial	39
3.1.2 Chemikalien und Verbrauchslösungen	41
3.1.3 Primersequenzen Y-SNPs und mtSNPs	42
3.1.4 Geräte und Software	43
3.2 Methoden	44
3.2.1 Dekontaminationsmaßnahmen	44
3.2.2 Probenpräparation und mechanische Zerkleinerung	44
3.2.3 Demineralisierung, aDNA-Extraktion und Aufreinigung	45

3.2.4	aDNA-Quantifizierung	48
3.2.5	Autosomale STR-Analyse	49
3.2.6	Y-chromosomale STR-Analyse	51
3.2.7	Y-SNPs: Auswahl, Primerdesign, Fokussierung, Multiplexanalyse	52
3.2.8	mtSNP-Analyse: Auswahl, Multiplexanalyse	57
3.2.9	Haplotypisierung und Haplogruppenklassifizierung	60
4	Ergebnisse	65
4.1	aDNA-Quantifizierung	65
4.2	Molekulargenetische Geschlechtstypisierung	67
4.3	Mitochondriale Analysen	68
4.3.1	mtSNP Analyse und Haplogruppenklassifikation	68
4.3.2	Statistische Auswertung	72
4.3.3	minimaler Haplotyp	74
4.4	Y-chromosomale Analysen	77
4.4.1	Y-SNP-Analyse und Haplogruppenklassifikation	77
4.4.2	Statistische Auswertung Ychr. STR-Analyse	81
5	Diskussion	87
5.1	Bewertung des aDNA Workflows	87
5.2	aDNA-Quantifizierung	91
5.3	Molekulargenetische Geschlechtsbestimmung	98
5.4	Geschlechterverteilung im Grabungsfeld	101
5.5	Haplogruppenklassifikation und Haplotypstatistik	104
5.5.1	Mitochondriale Analyse	105
5.5.2	Y-chromosomale Analysen	108
5.6	Phylogeografische Einordnung und Haplogruppenentwicklung	112
6	Danksagung	121
7	Publikationsliste	123
8	Literaturverzeichnis	127
A	Primersequenzen Y-SNPs	149
B	Primersequenzen mtSNPs	153

Abbildungsverzeichnis

1.1	Gräberplan kartierter Funde nach Kleinecke (2011)	3
1.2	Extraktion biologischer Individualmerkmale über DNA-basierte und klassische anthropologische Methoden	4
1.3	Einbeziehung phänotypischer Informationen in den Prozess der 3D-Gesichtsweichteilrekonstruktion	10
1.4	Zahnaufbau	14
1.5	Schematischer Aufbau der <i>Substantia compacta</i> mod. nach Adler et al. (2011) .	15
1.6	Priorisierte Probenauswahl für aDNA-Analysen	16
1.7	Organisation des mtDNA-Genoms mod. nach Butler (2011)	18
1.8	Organisation des Y-Chromosoms	20
1.9	Topologie mitochondrialer Haplogruppen mod. nach van Oven und Kayser (2009)	25
1.10	Hg-Häufigkeitsverteilung durch Wiederbesiedlung in Europa nach Torroni et al. (2006)	27
1.11	Monophyletischer Stammbaum des Y-Chromosoms (Deklariert als YCC2003) nach Jobling und Tyler-Smith (2003)	29
1.12	Genetische Landkarte des Y-Chromosoms nach Roewer (2008)	33
3.1	Gesamtumfang und Aufgliederung des Probenmaterials mod. nach Harthun et al. (2015)	40
3.2	Überblick Arbeitsschritte	45
3.3	Klassifikationsbaum nach Paneto et al. (2011)	61
3.4	Monophyletischer Klassifikationsbaum	63
4.1	Vergleich ermittelter Konzentrationen	66
4.2	Auto/D-Index vs. Locus dropout	66
4.3	Aufschlüsselung der Probenanzahl für molekulargenetische Geschlechtsbestimmung nach Harthun et al. (2015)	67
4.4	42-mtSNP Profil	69
4.5	Haplogruppenverteilung	70
4.6	Bewertung Hg-Zuordnung	72
4.7	Allelfrequenzen	74
4.8	Klassifikationsbaum minimaler Haplotyp	76
4.9	4plex Y-SNP Profil	80
4.10	Ermittelte Hg-Verteilung auf Basis ermittelter Y-SNP Haplotypen	81
5.1	Ableitung spezifischer Szenarien bei Beurteilung der Qualitätssensoren	95
5.2	Investigator [®] ESSplex SE QS Ergebnisse Degradation und Inhibition	97

5.3	QS2/QS1-Ratio vs. IPC-Shift	98
5.4	Interpretationskonflikt AMEL-Lokus aDNA	99
5.5	Gegenüberstellung Geschlechterbestimmung aus Morphognostik, Osteometrie und DNA-Analyse	103
5.6	Zusammenhang von Haplotyp und Haplogruppe	108
5.7	Moderne und historische Allelverteilung für den Lokus DYS570	111
5.8	Verteilung Ychr. Hg in Europa und Deutschland	113

Tabellenverzeichnis

1.1	Chronologiesysteme nach Schmidt (1963); Bemmann (2000a)	2
3.1	Probenanzahl in Abhängigkeit des analysierten DNA-Systems.	40
3.2	Demineralisierung und Zellyse	41
3.3	DNA-Quantifizierung und DNA-Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform Isoamylalkohol (PCI)	41
3.4	Prä-PCR, Post-PCR, Minisequenzierung und Fragmentlängenanalyse	42
3.5	Verwendete Geräte	43
3.6	Verwendete Software	44
3.7	Systemeigenschaften DNA-Quantifizierung nach Biosystems (2000); Promega (2015a)	48
3.8	Reaktionsansatz DNA-Quantifizierung	49
3.9	Reaktionsbedingungen Prä- und Postamplifikation, PowerPlex [®] S5	50
3.10	Amplifikationsprotokoll PowerPlex [®] S5	50
3.11	Reaktionsbedingungen Prä- und Postamplifikation, PowerPlex [®] Y23	51
3.12	Amplifikationsprotokoll PowerPlex [®] Y23	52
3.13	Eigenschaften der PCR- und SBE-Primer nach Sanchez und Endicott (2006)	53
3.14	Verwendete Primerkonzentrationen für Y-SNP Analyse	55
3.15	Reaktionschemie beider Ansatzvarianten nach Paneto et al. (2011)	56
3.16	Amplifikationsprotokoll mod. nach Paneto et al. (2011)	56
3.17	Amplifikationsprotokoll SBE-Reaktion nach Kohl et al. (2009)	57
3.18	Reaktionschemie beider Ansatzvarianten	58
3.19	Amplifikationsprotokoll Multiplex-PCR nach Paneto et al. (2011)	59
3.20	Amplifikationsprotokoll SBE-Reaktion nach Paneto et al. (2011)	60
4.1	Verteilung resultierender Hg für die Population	73
4.2	Ergebnis Primerdesign für Loci nach Wei et al. (2013)	78
4.3	Ermittelte Alleldiversität (AD) und Gendiversität (GD)	83
4.4	Metainformationen (YHRD) ermittelter MHT nach Harthun et al. (2015)	85
A.1	Verwendete Primersequenzen für die Multiplex-PCR der Y-SNPs	150
A.2	Verwendete Primersequenzen für die SBE-Reaktion der Y-SNPs	151
B.1	Verwendete Primersequenzen für die Multiplex-PCR der mtSNPs	154
B.2	Verwendete Primersequenzen für die SBE-Reaktion der mtSNPs	155

Abkürzungsverzeichnis

aDNA	<i>ancient deoxynucleidamino acid</i>
AMG	Amelogenin-Gen
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i>
BER	Basen-Exisions Reperaturmechanismus
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENFSI	<i>European Network of Forensic Science Institutes</i>
ESS	<i>Extended European Standard Set</i>
gDNA	genomische DNA
Hg	Haplogruppe
Ht	Haplotyp
IPC	<i>Internal positive control</i>
ISFG	<i>International Society for Forensic Genetics</i>
ISOGG	<i>The International Society of Genetic Genealogy</i>
MDS	Multidimensionale Skalierung
MHT	<i>Minimal haplotype</i>
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
MSY	<i>Male-specific region</i>
Mb	Megabasen
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NRPY	<i>Non-recombining portion of Y chromosome</i>

NRY	<i>Non-recombining of Y chromosome</i>
Nt	Nukleotid
PAR	pseudoautosomale Region
PCI	Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMI	postmortales Intervall
PV	Postmortale Verletzung
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
rCRS	<i>revised Cambridge Reference Sequence</i>
RKZ	Römische Kaiserzeit
RSRS	<i>Reconstructed Sapiens Reference Sequence</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
UV-C	Ultraviolettstrahlung (Bereich C)
Ychr.	Y-chromosomal
YHRD	<i>Y Chromosome Haplotype Reference Database</i>
VWZ	Völkerwanderungszeit
8-oxodG	8-Hydroxydesoxyguanosin

Bibliographische Beschreibung

M.Sc. Anne-Marie Pflugbeil

Molekulargenetische Untersuchungen zur Ergänzung des biologischen Profils eines historischen Grabungsfundes auf der Grundlage autosomaler und uniparentaler aDNA-Marker

Universität Leipzig, Dissertation

156 Seiten, 235 Literaturangaben, 34 Abbildungen, 29 Tabellen

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Erweiterung des biologischen Profils eines historischen Skelettfundes aus dem Zeitalter der römischen Kaiserzeit und beginnenden Völkerwanderungszeit. Bis zum Zeitpunkt der Bearbeitung der Zielstellung wurden keine aDNA-Analysen am Material durchgeführt. Im Rahmen der gesetzten Ziele sollte zunächst das methodische Vorgehen im Hinblick auf die Qualität und Quantität des aDNA-Templates geprüft werden. Neue Analysestrategien wurden zudem auf deren Eignung in den Schritten aDNA-Quantifizierung und STR-Analyse evaluiert. Für die Ergänzung des biologischen Profils wurden sowohl autosomale als auch uniparentale aDNA-Marker untersucht. Im Speziellen erfolgte die Bestimmung des genotypischen Geschlechts über Amelogenin. Desweiteren wurde eine Y-chromosomale STR-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe bisostatistischer Variablen erfolgte zudem eine Beschreibung resultierender Y-chromosomaler Haplotypen. Darüberhinaus wurden erste Aussagen im Hinblick auf die ethnische Herkunft der Skelette mit Hilfe einer synchronen SNP-Analyse des mitochondrialen und Y-chromosomalen Genoms erlangt. Die Analyse der SNPs erfolgte auf beiden Seiten mittels SNaPshot-Minisequenzierung in definierten Multiplexansätzen. Spezifische Makrohaplogruppenfrequenzen wurden bezugnehmend auf die Entwicklungshistorie diskutiert.

Kapitel 1

Einführung

Eine Begutachtung neuzeitlicher und historischer Skelettfunde kann heutzutage sowohl durch die interdisziplinäre Verknüpfung von anthropologischen mit modernen molekularbiologischen und paläogenetischen Verfahren, als auch durch den enormen technischen Fortschritt der letzten Jahre realisiert werden. Das Ziel ist es, die Skelette auf genetischer Ebene zu charakterisieren. Die molekulargenetische Untersuchung von Skelettindividuen hat sich in den vergangenen drei Dekaden zu einem ergänzenden Aspekt der archäologischen und anthropologischen Forschung etabliert (Gilbert et al., 2005; Jorde et al., 1998; Sankararaman et al., 2012). Ergebnisse aus entsprechend umfangreichen Studien sollen mitunter genutzt werden, um die Menschheitsgeschichte zu formen. Weiterhin können z. B. Anhaltspunkte über die Geschlechterverteilung oder Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb und zwischen Skelettkollektiven erlangt werden (Rothe et al., 2015; Gill et al., 1994). Die Bestimmung von Abstammungslinien auf genetischer Ebene dient darüberhinaus der Informationsgewinnung zur geografischen Einordnung in eine ethnische Großgruppe (Chen et al., 1995). Die ersten Meilensteine im Hinblick auf die Anwendung neuartiger molekularbiologischer Verfahren, wie die Technisierung der Polymerasekettenreaktion (engl. PCR), liegen ebenfalls drei Jahrzehnte zurück (Higuchi et al., 1984; Pääbo, 1985, 1986; Mullis und Faloona, 1987). Die Weiterentwicklung technischer Errungenschaften, die Steigerung von Sensitivität und Spezifität der Verfahren und spezialisierte Protokolle machen es heute möglich aussagekräftige Resultate im Rahmen von DNA-Analysen an rezenten und historischen Funden, zu erzielen. Dennoch gilt der Umgang mit Knochenmaterial im Labor, unabhängig von der jeweiligen Lagerungsdauer bzw. vom postmortalen Intervall (PMI), immer noch als besondere Herausforderung. Aufwendige und lang andauernde Aufarbeitungs- und Isolationstechniken können zudem zu einem erhöhten Risiko an Kreuzkontaminationen führen. Wird jedoch gewissen Vorgaben und Empfehlungen zum Arbeitsprozess nachgegangen (Cooper und Poinar, 2000) ist es durchaus möglich konkrete Fragestellungen oder prähistorische Hypothesen in Verbindung mit archäologischen und anthropologischen Daten zu beantworten und Informationslücken zu schließen.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig DNA-basierte Analysen zur Ergänzung des biologischen Individualprofils durchgeführt. Darauf aufbauend werden weiterführend ganzheitliche Aussagen für die historische Population abgeleitet. Wo bis zum Zeitpunkt anthropologische

Methoden an ihre Grenzen stießen, wurde versucht mit Hilfe etablierter DNA-Analysestrategien neue Erkenntnisse zu genetischen Abstammungslinien und dem molekularen Geschlecht zu erlangen. Daneben werden vorliegende Daten aus der klassischen Anthropologie zur Gesamtgeschlechterverteilung mit denen aus der DNA-Analyse gegenübergestellt und vervollständigt.

1.1 Vorbetrachtungen zum Grabungsfund

1.1.1 Chronologie und kulturelle Einordnung des Skelettmaterials

Das molekulargenetisch untersuchte Skelettmaterial stammt von einem birituellen, vorwiegend aus Körpergräbern bestehenden Bestattungsplatz dessen Gräber in der Mehrzahl der ausgehenden römischen Kaiserzeit und beginnenden Völkerwanderungszeit angehören. Zur chronologischen Einordnung des Grabungsfeldes Görzig wurde auf ein System, welches zuletzt in der Habilitationsschrift von J. Bemann veröffentlicht wurde, zurückgegriffen (Bemann, 2000a). Danach ist das Gräberfeld Görzig, ohne Einbeziehung der Brandgräber, den Stufen C3 bis D2 zuzuordnen (Tabelle 1.1). Eine feinere Auflösung der chronologischen Einordnung war durch eine sehr ausgedehnte Palette der Beigabenausstattung nicht möglich (Kleinecke, 2011).

Alle Funde wurden innerhalb von zwei Bergungsaktivitäten gesichert. Die erste Bergungsaktivität fand unter der Aufsicht von W. Götze statt und umfasste etwa die Zeit von 1913 bis 1941. Darauf folgte eine zweite Bergung ab 1958 unter der Leitung von B. Schmidt. Insgesamt

Tabelle 1.1: **Chronologiesysteme nach Schmidt (1963); Bemann (2000a).**

Die Abkürzungen C1 – D2 entsprechen einer gebräuchlichen Nomenklatur für die Einstufung historischer Funde in das entsprechende Zeitalter (n. Chr.).

Stufen	Schmidt (1963)	Bemann (2000a)	Besonderheit	Zeitalter
C1	200 – 250	150 – 250	überwiegend Brandgräber	späte Römische Kaiserzeit (RKZ)
C2	> 250 – 300	> 250 – 300	reiche Körpergräber, „Blütezeit“	späte RKZ
C3	> 300 – 375	> 300 – 350	ärmlichere Ausstattung der Gräber	späte RKZ
D1	> 375 – 450	> 350 – 400	typische Körpergräber der Niemberger Gruppe	frühe Völkerwanderungszeit (VWZ)
D2	> 375 – 450	> 400 – 450	langsamer Übergang zur Reihengraberstätte	frühe VWZ

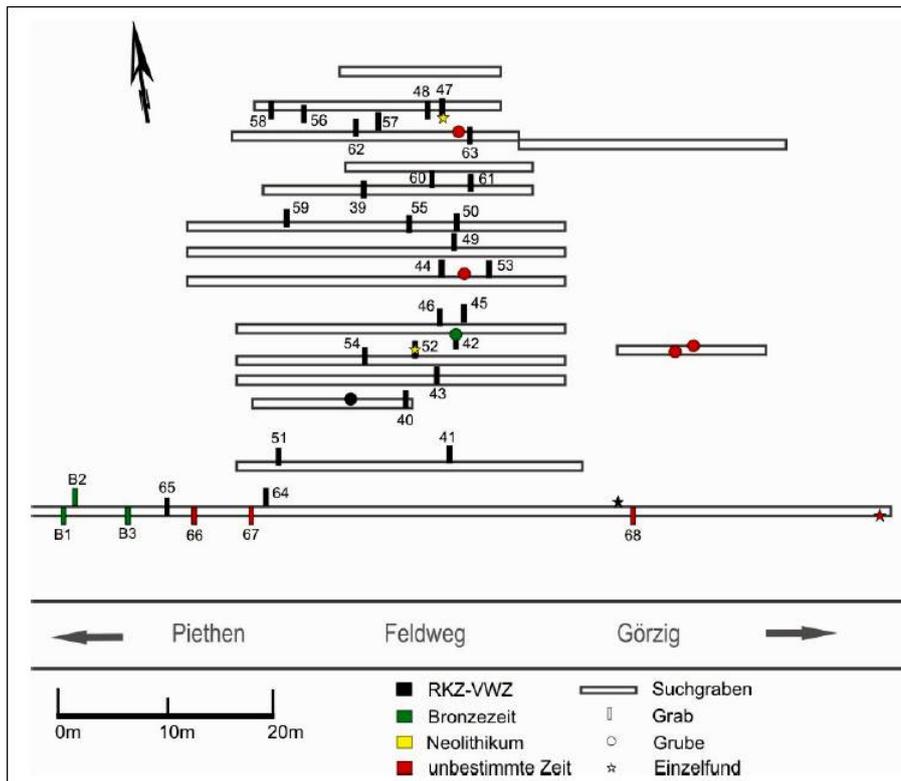


Abbildung 1.1: Gräberplan kartierter Funde nach Kleinecke (2011).

wurden 75 Körperbestattungen gefunden. Davon wurden drei Gräber im Grabungsbericht als bronzezeitlich eingeordnet und in dieser Arbeit zur Erfüllung der Zielstellung nicht einbezogen. Drei weitere Gräber konnten aufgrund von fehlenden Berichten oder Zeichnungen keinem zeitlichen Kontext zugeordnet werden. Diese werden demnach als Gräber „unbestimmter Zeitstellung“ bezeichnet. Der kulturelle Hintergrund der Population wurde bisweilen sowohl durch die Ausdehnung der Gräber, die Lokalisierung des Gräberfeldes auf dem Areal des ehemaligen Domänenackers sowie durch gesichtete Beigaben und Bestattungssitten beschrieben. Zum damaligen Zeitpunkt wies das bestehende Informationspuzzle auf eine in der Nähe von Görzig ansässige homogene Bevölkerung hin. Als schriftliche Grundlage der nachfolgenden anthropologischen und archäologischen Untersuchungen dienten u. a. die Aufzeichnungen und Fotos von W. Götze aus der Ortsakte von Görzig (Götze, 1938). Ergänzend wurde ein Grabungsbericht von B. Schmidt herangezogen, der durch Gräberzeichnungen und von einem Gräberfeldplan zu den Grabungen von 1958-1959 ergänzt wurde (Bemmann, 2000a). Dokumentiert sind auf dem Gräberfeldplan 33 Gräber, sechs Gruben und vier Einzelfunde (Abbildung 1.1). Die Lage aller Gräber konnte anhand der Pläne nicht vollständig rekonstruiert werden.

untersuchen. Charakteristika wie Ethnie oder auch populationsgenetische Aspekte, welche für die Entwicklungsgeschichte verschiedener Völker betrachtet werden, können ausschließlich über DNA-Analysen erlangt werden. Obwohl entsprechende Analysen nicht unfehlbar sind, fällt die Interpretation DNA-basierter Resultate mit weitaus weniger Unsicherheiten, gegenüber klassischer Verfahren, aus.

Mit der Bearbeitung des zur Verfügung gestellten Skelettmaterials sollten auf Grundlage autosomaler und uniparentaler DNA-Systeme erstmalig zum einen neue Erkenntnisse erlangt und zum anderen bisher nicht betrachtete Aspekte zum biologischen Profil der Skelettindividuen untersucht werden. Dies involvierte eine Analyse von Abstammungslinien für Einzelfunde auf Basis haplogruppenspezifischer Marker und eine Verteilungsanalyse der Linien im Grabungsfeld. Des Weiteren wurde eine Bestimmung des genotypischen Geschlechts angestrebt. Die Ergebnisse sollten dazu beitragen bereits bestehende Hypothesen zur Geschlechtsdifferenzierung, basierend auf osteometrischen und morphognostischen Verfahren, zu untersuchen.

1.1.3 Archäologische und anthropologische Vorarbeiten

In den letzten Jahren wurden mehrere wissenschaftliche Arbeiten zur Bestimmung des Geschlechts und zur Sterbealtersschätzung, auf Basis osteometrischer und morphognostischer Verfahren, angefertigt. Dabei sollten u. a. Informationen über die Gesamtverteilung der Geschlechter und des Alters der Individuen im Grabungsfeld erlangt werden. Durch die Zusammenführung der Ergebnisse aus der Betrachtung einzelner Skelettanteile (Schädel, Becken, Langknochen) sollte die Bearbeitung der anthropologischen Zielstellungen zu einer gesicherten Aussage über o. g. Merkmale des biologischen Profils der Individuen führen. An dieser Stelle soll ein Überblick über bereits abgeschlossene akademische Arbeiten, in chronologischer Reihenfolge, erfolgen.

Erste archäologische Untersuchungen am Grabungsfund wurden in der unveröffentlichten Habilitationsschrift von J. Bemann im Jahr 2000 präsentiert (Bemann, 2000a,b). Neben anderen Gräberfeldern wurde der Görzinger Fund als einer von vielen der jüngeren römischen Kaiserzeit und Völkerwanderungszeit im mitteldeutschen Raum in die Arbeit aufgenommen. Als Ergänzung hierzu wurde 2011 eine Magisterarbeit verfasst, mit dem Ziel an diese Erkenntnisse anzuknüpfen und aus archäologischer- sowie ergänzend aus anthropologischer Sicht weitere Stufen der Fundrekonstruktion zu erreichen (Kleinecke, 2011). Die Bestimmung des Geschlechts der Bestatteten wurde bis zum Zeitpunkt am gesicherten archäologischen Material und anhand von geschlechtsspezifischen Grabbeigaben vollzogen. Daher sollte diese Studie die archäologische These der „Männer- und Frauentracht“ zumindest am Beispiel dieses Gräberfeldes, entweder bestätigen oder relativieren. Im Fokus stand demnach sowohl eine Geschlechtsbestimmung als auch eine Altersschätzung der Skelette anhand klassischer anthropologischer Verfahren, die nach 1958 gegraben wurden. Weitere Auffälligkeiten, wie degenerative oder pathologische Veränderungen wurden an dieser Stelle noch nicht betrachtet. Des Weiteren sollte versucht werden, die Einzelgräber zeitlich und kulturell einzuordnen sowie mögliche gesellschaftliche Auffälligkeiten oder Besonderheiten der hier bestatteten Bevölkerung hervorzuheben. In der Schlussbetrachtung konnten dabei, unter Einbeziehung der

Ergebnisse aus einer detaillierten Untersuchung des archäologischen Materials, keine grundsätzlich neuen Erkenntnisse über das Feld gewonnen werden (Kleinecke, 2011). Allerdings war es möglich o. g. Hypothesen zu ergänzen. Die anthropologischen Auswertungen ermöglichten hingegen neue Einblicke in die Alters- und Geschlechterverteilung sowie in die demografische Struktur des Grabungsfeldes. So konnten durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen am Material die Thesen einer geschlechtsspezifischen, jedoch altersunabhängigen Behandlung sowohl in der Ausstattung der Toten als auch bei ihrer Bettung im Grab bestätigt werden.

Zur Erschließung des individuellen Profils werden im Rahmen der folgenden Arbeiten verschiedene Aspekte anthropologischer Analysen betrachtet. Dazu zählen insbesondere die Bestimmung des Geschlechts und die Schätzung des Alters der Einzelindividuen. Weiterhin können die Ermittlung der Körperhöhe und die Feststellung degenerativer Veränderungen oder pathologischer Abnormitäten einbezogen werden. Durch eine Vielzahl an Methoden, wie z. B. morphologische, metrische, röntgenologische und histologische Untersuchungen, können einzelne Aspekte beleuchtet werden. Limitierende Faktoren, die den Einsatz der Methoden eingrenzen, sind in jedem Falle der Erhaltungszustand des zu untersuchenden Materials, technische Gegebenheiten, der zeitlich zur Verfügung stehende Analyserahmen und die Erfahrung des Analysten. Eine erste Bestimmung von Geschlecht und Schätzung des Sterbealters, der im Zeitraum von 1913 – 1941 gegrabenen Skelette, wurde durch W. Götze durchgeführt. Bestandteil seiner Untersuchungen war jedoch nur der Schädel (*Cranium*) der Bestatteten. In der oben beschriebenen Magisterarbeit beschäftigte sich J. Kleinecke im anthropologischen Teil ihrer Abhandlung fast ausschließlich mit morphognostischen Untersuchungen am Schädel und Becken. Von den 42 zur Verfügung stehenden, der im Zeitraum von 1958 – 1959 gegrabenen Skelette, konnten 16 Adulte und mit Vorbehalt acht Subadulte einem Geschlecht zugeordnet werden. Die Autorin wies weiter darauf hin, dass bezüglich der Geschlechterverteilung keine Auffälligkeiten zu erkennen waren. Weiterhin wird zum Zeitpunkt von einer annähernden Gleichverteilung der Individuen in der untersuchten Gruppe ausgegangen. Die Aussage sollte durch ergänzende DNA-Analysen und Einbeziehung eines größeren Untersuchungsumfanges, wie nachfolgend beschrieben, weiterverfolgt werden. Bei der Sterbealtersschätzung konnten für elf Subadulte und für 16 adulte Skelette Hinweise auf eine Altersspanne gewonnen werden (Kleinecke, 2011). Der größte Anteil lag hier im Altersbereich von 23 – 39 Jahren (Acsádi und Nemeskéri, 1970). Im Bereich von null bis sechs Jahren lagen dagegen anscheinend keine Individuen. Die ältesten bestimmten Individuen befanden sich in einem Bereich von ca. 50 – 70 Jahren. In den Folgejahren (2013 – 2015) wurden ergänzend am *Cranium* und *Postcranium* anthropologische Folgeuntersuchungen zur Bestimmung des Geschlechts und der Altersschätzung, durchgeführt (Becker, 2013; Jeraufke, 2013; Seidel, 2013). Ziel sollte es sein, bisher nicht bestimmte Individuen zu charakterisieren und bereits vorliegende Ergebnisse zu Geschlecht und Alter der Einzelindividuen abzusichern. Neben diesen Arbeiten wurden Analysen zu degenerativen und oder pathologischen Erscheinungen am osteologischen Material durchgeführt, die nicht Bestandteil der folgenden Ergebniszusammenfassung sein werden (Sella, 2014). Ab diesem Zeitpunkt wurden neben morphognostischen- auch metrische und röntgenologische Verfahren in die Sterbealtersschätzung einbezogen. Die erste Annahme, dass

es sich bei der Population um eine homogene Bevölkerungsgruppe handelte, befähigte zu einer einheitlichen methodischen Vorgehensweise. Für die Zusammenführung der Ergebnisse und eine präzise Rekonstruktion des Grabungsfeldes wurden gesicherte Schädel und zugehöriger Zahnbesatz einer erneuten morphognostischen und metrischen Untersuchung unterzogen (Jeraufke, 2013). Anders als bei Kleinecke (2011) wurde jetzt das Material aus beiden Grabungszeiträumen (1913 – 1941 und 1958 – 1959), mit der Ausnahme bronzzeitlicher Skelette und drei Individuen, die grundsätzlich nicht verfügbar waren, genutzt. Insgesamt standen für diese Analysen 67 Schädel, mit unterschiedlichem Erhaltungszustand zur Verfügung. Bei der Auswertung der Schädelnahtobliteration wurden 34 Individuen in eine Altersspanne von 23 – 36 Jahren nach Acsádi und Nemeskéri (1970) geordnet. Vier Individuen konnten Stadium IV auf der Nemeskéri Skala zugeordnet werden, das entspricht einem Alter von 53 – 66. Dem Alter 58 – 72 (Stadium V) ließen sich drei Individuen zuweisen. Diese Ergebnisse lassen sich mit der Aussage von Kleinecke (2011), bezüglich der Eingruppierung in das mittlere Alterssegment, nahezu übereinstimmend vergleichen. Mittels morphognostischer Verfahren ließ sich das Geschlecht für 52 Individuen bestimmen. Davon war der überwiegende Teil nicht uneindeutig männlich bzw. weiblich bestimmbar und galt zu diesem Zeitpunkt als indifferent. Von 53 Individuen konnte der Zahnstatus ermittelt werden, was insbesondere für die anschließende DNA-Analyse von Bedeutung war. Der Abrasionsgrad wurde ermittelt jedoch, aufgrund von Unsicherheiten bezüglich der Ernährungsgewohnheiten in der damaligen Zeit, nicht einbezogen (Wirth, 2002). Im gleichen Zeitraum fanden fortführende anthropologische Studien am *Postcranium* als Ergänzung zum Gesamtskelett und um sich der Population weiter anzunähern statt. Gerade in Fällen bei denen keine oder unklare Ergebnisse hinsichtlich der Schätzung des Skeletalters und der individuellen Geschlechtsbestimmung erzielt wurden, ist es unerlässlich auch *postcranielle* Regionen mit zu betrachten. Entsprechende biologische Merkmale wurden hier am *Femur* und *Humerus* ermittelt (Becker, 2013; Seidel, 2013). Zum Zeitpunkt konnten insgesamt 69 Individuen, bei denen entsprechendes Knochenmaterial der unteren Extremität vorhanden war, beurteilt werden. Bei 39 Individuen wurde fast von jedem Knochenbereich der unteren Extremität, d. h. *Femur*, *Patella*, *Tibia*, *Fibula* und *Pes*, Material aufgenommen, wobei dieses teilweise stark fragmentiert vorlag. Für die morphognostische Geschlechtsbestimmung und Altersschätzung wurden insgesamt, spezifisch ausgewählt, sechs Geschlechtsmerkmale und 13 Altersmerkmale beurteilt (Fischer, 1991, 1984). Im Rahmen der hier durchgeführten morphognostischen Skeletaltersbestimmung konnte ein Großteil der Individuen in eine Altersklasse von 40 – 49 Jahren eingeordnet werden. Im Gegensatz zu den morphognostisch bestimmten Geschlechtern am *Cranium*, konnten am *Femur* und *Humerus* geschlechterspezifischere Ergebnisse erreicht werden. Bestimmt wurden 30 weibliche, 23 männliche und sechs indifferente Individuen. Anhand der dargestellten Ergebnisse wird deutlich wie unterschiedlich stark das Ergebnis zur morphognostischen und osteometrischen Bestimmung von Geschlecht und Alter durch verschiedenste Faktoren beeinflusst wird. Zusammengefasst ist dies einerseits der Erhaltungszustand des Materials, der darüber entscheidet, ob ein morphologisches Merkmal beurteilt werden kann oder nicht. Darüberhinaus spielt die Auswahl und Anzahl an Einzelmerkmalen, die am Knochen beurteilt werden müssen, eine wichtige Rolle.

Nicht zuletzt wird das Ergebnis stark von der Erfahrung des Untersuchers und der zugrunde liegenden Datenbasis, die bei Berechnungen von Diskriminanzen genutzt wird, beeinflusst. Werden bestimmte Dogmen in der Arbeit mit besonders alter DNA (aDNA, engl. *ancient DNA*) berücksichtigt und die Möglichkeit einer Verwechslung bzw. Verunreinigung des Materials ausgeschlossen, kann ein DNA-Ergebnis als verlässliches Mittel zur Vorhersage von Individualmerkmalen betrachtet werden. Zur Komplettierung der Ergebnisse aus der morphognostischen und osteometrischen Geschlechtsbestimmung soll im Rahmen dieser Arbeit mitunter das Ziel einer DNA-basierten Geschlechtsdifferenzierung und Verifizierung durchgeführt werden.

1.2 Fragestellungen für historische, osteologische Funde

Die letzten Informationsträger, die nach dem Ableben eines Menschen wertvolle Anhaltspunkte zu dessen biologischem Profil und Lebensumständen über die Zeit hinweg widerspiegeln, sind Knochen. Aus diesen wertvollen Überresten erschließen Rechtsmediziner, Anthropologen und Genetiker neben dem Geschlecht und dem Alter weitere diverse Fakten, sowohl im anthropologischen als auch forensischen Sinn.

Aufgefundenes Knochenmaterial kann von überwiegend oder nahezu skelettierten Leichen stammend, vollständig, teilweise oder sogar in Fragmenten, vorliegen. Die Durchführung von forensisch osteologischen Untersuchungen erfolgt in Deutschland meist durch Rechtsmediziner oder Anthropologen (Verhoff und Kreutz, 2004). Zu Beginn ist durch den Sachverständigen zu klären, ob es sich bei dem Fund um humanes oder tierisches Skelettmaterial handelt. Im forensischen Interesse schließt sich unmittelbar die Bestimmung des PMI an. Dieses kann als Zeitspanne vom Ableben eines Menschen bis zum Zeitpunkt des Auffindes interpretiert werden. Zur Klärung relevanter forensischer Fragestellungen kann ein PMI von bis zu 50 Jahren angesehen werden. Eine weitere besondere Fragestellung in der forensischen Osteologie ist die Klärung der Todesursache anhand von Verletzungsspuren. Da Verletzungen auch zu Lebzeiten oder postmortal und nicht unbedingt im Zusammenhang mit dem Todeseintritt (*perimortal*) entstanden sein können, gilt es diese drei Fälle voneinander zu separieren. Postmortale Verletzungen (PV) sind u. a. auf Tiere (Fraßspuren) oder Menschen (Bergungsschäden) zurückzuführen. Des Weiteren gilt es herauszufinden, ob rezentes oder historisches Knochenmaterial oder sogar Überreste von mehreren Personen vorliegen (Verhoff et al., 2013). Die Anthropologie profitiert aktuell als „*applied Science*“ von zahlreichen Nachbardisziplinen und ihren technischen Entwicklungen. Nur durch den Einsatz von modernen digitalen Analysetechniken kann der Bedarf an Vergleichs- und Untersuchungsmaterial gedeckt werden (Kettner et al., 2013). So hat z. B. der Einzug von technischen Entwicklungen aus der Medizinforschung und Bildgebung in die Anthropologie der Arbeit an rezentem und historischem Skelettmaterial einen großen Vorteil gegenüber subjektiv behafteten morphologischen Herangehensweisen verschafft. Anhand zufällig geborgener historischer Skelettfunde, können neben der bereits angesprochenen Geschlechtsbestimmung und Altersschätzung im Umfeld der anthropologischen Osteologie weitere bedeutungsvolle biologische Variablen, analysiert werden.

Je nach Auffindesituation von Körpergrabskeletten, beschäftigt sich der Kreis von Spezialisten mit verschiedenen Fragestellungen. Darunter oft ein sehr interessanter Aspekt: die Ableitung von Verwandtschaftsverhältnissen zur Rekonstruktion von Familienverbänden und die Erstellung von Genealogien. Häufig werden hierzu Lagerungsinformationen der Skelettindividuen und Bestattungsriten herangezogen. Da die Beurteilung morphologischer Charakteristika mehr oder weniger auf Vermutungen beruht, ist es heutzutage fast unumgänglich Informationen auf DNA-Ebene für die Aufschlüsselung verwandtschaftlicher Beziehungen innerhalb eines Kollektivs einzubeziehen (Schultes et al., 2000). Die größte Herausforderung in der Aufklärung von Familienverhältnissen mittels DNA-Analysen liegt sowohl im Fehlen von Vergleichsmaterial, der Qualität und Quantität des zugrundeliegenden DNA-Templates als auch in der unzureichenden Datengrundlage für räumliche Frequenzwerte, wie bei rezenten Populationen, sodass auch Interpopulationsvergleiche für diesen Zweck häufig eingeschränkt sind.

Natürlich kann heutzutage durch einen nicht mehr zu stoppenden technischen Fortschritt, der in Anthropologie und Forensik als „modern“ bezeichnete Spureenträger DNA, für weitere Fragestellungen neben der Abstammungsanalyse genutzt werden. Häufig ist das Ziel einer DNA-basierten Untersuchung populationspezifische Aspekte am Skelettmaterial als Beitrag zur evolutionären Entwicklung von *ancient* Genomen zu erlangen. Hierfür werden häufig nahezu rekombinationsfreie, uniparentale Systeme wie mitochondriale DNA (mtDNA) und das Y-Chromosom analysiert. Mit Hilfe von spezifischen, mutationsstabilen DNA-Polymorphismen können mitunter im Gebiet der Phylogeografie Migrationsereignisse und -bewegungen erklärt werden (siehe Kapitel 1.4 und 1.5). Eine noch relativ neue Ära der „DNA-Intelligenz“ ist die DNA-Phänotypisierung. Dieser analytische Zweig beschäftigt sich mit der Vorhersage äußerlich sichtbarer Merkmale (Augenfarbe, Haarfarbe, Körperhöhe, Robustizität und Gesichtsmorphologie). Es ist davon auszugehen, dass dieses Forschungsfeld in naher Zukunft eine besonders große Rolle gerade im forensischen Bereich z. B. bei Strafverfolgungen oder der Vermisstensuche einnehmen wird. Auch im Interesse der Rekonstruktion frühzeitlicher Bevölkerungsgruppen, könnte dieses Verfahren neue interessante Fakten für die anthropologische Forschung liefern. Die Weiterentwicklung und Validierung von Analysesystemen zur Vorhersage phänotypischer Merkmale für die forensische Praxis wurde in den letzten Jahren durch verschiedene Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der forensischen Genetik vorangetrieben (Gettings et al., 2014; Walsh et al., 2011, 2013; Weedon et al., 2008). Auf der Grundlage solcher zusätzlichen molekularen Informationen kann eine Art genetisches Phantombild von einer Person erstellt werden. Innerhalb der nächsten Dekade soll die Vorhersage eines Gesichts ausschließlich auf Basis genetischer Merkmale möglich sein (Abbildung 1.3). Für die Etablierung derartiger phänotypischer Assays in der forensischen oder auch anthropologischen Praxis bedarf es in den nächsten Jahren eines tieferen Einblicks in genetische Varianten, welche mit Phänotyp-relevanten Genen gekoppelt sind. Desweiteren sind weitere Studien an heterogenen Populationsgruppen, um die gewonnenen Ergebnisse statistisch abzusichern, notwendig (Kay-

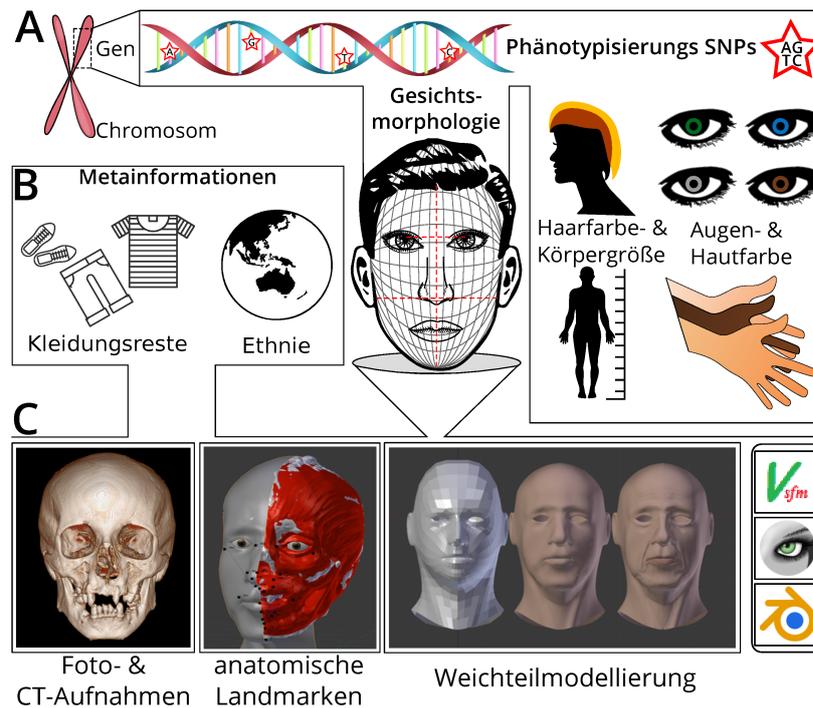


Abbildung 1.3: **Einbeziehung phänotypischer Informationen in den Prozess der 3D-Gesichtsweichteilrekonstruktion.**

Dargestellt ist ein Schema zur Gesichtsweichteilrekonstruktion unter Zuhilfenahme von Phänotypisierungsinformationen, die auf DNA-Ebene extrahiert werden (A). Der dargestellte genetische Informationspool in (A) kann in Verbindung mit ergänzenden Metainformationen (B) in den Prozess einer computergestützten Weichteilmodellierung (C) einbezogen werden und wesentlich zur Rekonstruktion beitragen.

ser und Schneider, 2009). Aufgehalten wird das Prinzip nicht durch technische Hindernisse oder fehlendes *Know-how*, sondern durch die Gesetzesgrundlage, welche die Phänotypisierung bisher in vielen Ländern, darunter auch in Deutschland, unterbindet.

1.3 ancient DNA (aDNA)

Das Interesse an der Analyse von aDNA stieg beträchtlich mit der Entdeckung des Überdauerns von DNA-Molekülen in historischen oder fossilen Geweben. Im Sinne der Begrifflichkeit kann aDNA als molekulargenetische Charakterisierung, von bereits abgebauter oder umgebauter DNA (Degradation) verstorbener Organismen im historischen oder naturgeschichtlichen Kontext, definiert werden (Navascués et al., 2010). Mit Hilfe dieser Moleküle versuchen Anthropologen mehr über die soziale Organisation frühzeitlicher Bevölkerungsgruppen, über evolutionäre Veränderungen von Sequenzen und den Zusammenhang von Phylogenie und Migrationszeitpunkten des modernen Menschen in die Weltbevölkerung sowie über intra- und interpopulations Wechselwirkungen, zu erfahren. Erste Meilensteine auf diesem Gebiet wurden mit dem bakteriellen klonieren (*molecular cloning*) von DNA-Sequenzen des Quagga (*Equus quagga quagga*) und einer ägyptischen Mumie (Pääbo et al., 2004; Pääbo, 1985) erzielt. Allerdings konnte damals die Authentizität der Ergebnisse nicht bestätigt werden, da aufgrund zu geringer DNA-Mengen und technischer Gegebenheiten kein Klonierungserfolg verzeichnet werden konnte. Dazu kam, dass das isolierte 3400 bp lange DNA-Fragment unter den heutigen Kriterien als Kontamination deklariert werden musste. Aufgrund verschiedener Abbauprozesse ist es höchst unwahrscheinlich noch ein DNA-Fragment dieser Größe in einer so alten Probe (2400 Jahre) zu finden. Einen ersten experimentellen Fortschritt, der es ermöglichte aDNA zu analysieren, gelang mit dem Einzug der PCR in die Molekularbiologie im Jahr 1987 (Mullis und Faloona, 1987).

1.3.1 DNA-Degradation

Unter dem Begriff Degradation (von lat. *degrado*, herabsetzen) wird in der Chemie und Biologie die Zerlegung von chemischen Verbindungen in kleinere Moleküle bezeichnet. Im Falle der DNA bezeichnet Degradation den Ab- und Umbau des Biomoleküls bis hin zur Zerlegung in einzelne Nukleotide. *In vivo* ist das Genom durch zellinterne Systeme vor solchen Veränderungen und Modifikationsprozessen geschützt. Nach dem Tod des Organismus werden diese Schutzmechanismen jedoch inaktiv und die einsetzende Autolyse induziert den enzymatischen Abbau von Gewebe und DNA.

Die DNA-Degradation ist ein zeitabhängiger Prozess, d. h. dass DNA nur über einen begrenzten Zeitraum im Gewebe erhalten bleibt. Allerdings sind die Abbauprozesse keinesfalls linear von der Zeit abhängig, sondern vielmehr von dem Zusammenspiel vieler Parameter unterschiedlicher Natur. Während des Dekompositionsprozesses wird die DNA-Degradation durch eine Aktivität von endo- und exogenen Nukleasen im Gewebe initiiert. Eine schnelle Austrocknung des Organismus, niedrige Temperaturen, ein leicht alkalischer pH-Wert und hohe Salzkonzentrationen bewirken wiederum eine Inaktivierung der Nukleasen, bevor eine vollständige Zerlegung der DNA in Mononukleotide stattfindet. Nicht unmittelbar vom enzymatischen Abbauprozess getrennt zu betrachten sind oxidative und hydrolytische Mechanismen, welche zu einer Destabilisierung der DNA führen. So bewirken die chemischen Prozesse der Desaminierung und Depurinierung mitunter eine Destabilisierung und einen Strangbruch

innerhalb der Moleküle. Oxidative Prozesse und UV-Strahlung bedingen eine Veränderung der Stickstoffbasen und des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA. Diese sind der Grund dafür, dass über die Zeit hinweg nur kurze Fragmente von 100 – 500 bp experimentell nachweisbar sind (Pääbo et al., 2004). Infolge solcher verkürzten Fragmentlängen ist es mitunter möglich, dass Oligonukleotidsequenzen nicht mehr an die Template-DNA binden, wodurch die Amplifikation spezifischer Regionen verhindert wird. Die oxidative Veränderung von Cytosin und Thymin zu Hydantoinen inhibiert wiederum die DNA-Polymerase und verhindert damit auch eine mögliche Amplifikation. Ein weiteres schwerwiegendes Problem bei der Analyse von aDNA ist die Desaminierung der Basen, vor allem von Cytosin. Es ist davon auszugehen, dass in stark degradierten Proben jedes zehnte bis zwanzigste Cytosin durch Desaminierung in Uracil hydrolysiert wurde. Als Folge wird nach einer PCR oder Sequenzierung eine Transition von Cytosin zu Thymin sichtbar (Wagner, 2007; Hofreiter et al., 2001).

Wie jeder autolytische Prozess ist zweifellos auch die Degradation der DNA stark von Umweltfaktoren abhängig. In einer Studie von Perry et al. (1988) wurde festgestellt, dass Temperaturschwankungen von wenigen °C ausreichen, um das Degradationslevel im Zeitraum von Wochen bzw. Monaten zu beeinflussen. Ebenfalls hielten sie fest, dass sich hohe Feuchtigkeit negativ auf den DNA-Erhalt auswirkt (Perry 3rd et al., 1988). Neben Bodenlagerungsbedingungen, physikalischen und chemischen Prozessen, beeinflussen Asservierungsbedingungen- und zeiträume den DNA-Erhalt im Material. So kann sich dieser innerhalb kürzester Zeit drastisch reduzieren (Pruvost et al., 2007). Allerdings ist über das genaue Zusammenspiel von depositionellen Faktoren und dem Alter der zu analysierenden Probe im Degradationsprozess noch wenig bekannt (Campos et al., 2012). Durch das Fehlen von empirischen Studien kann der Prozess der Degradationskaskade noch nicht ausreichend genug, in Abhängigkeit des jeweiligen Gewebes, abgebildet und simuliert werden. So ergibt sich am Ende eine Summe aus verschiedenen möglichen Prozessen, die den Zerfall der DNA gegenwärtig erklären. Kenntnisse über geeignete Laborprozesse im Umgang mit aDNA sind daher unverzichtbar, wenn es darum geht, optimale Bedingungen zur aDNA-Isolation, Aufreinigung und Amplifikation, zu schaffen.

1.3.2 DNA-Erhalt in Knochen und Zähnen

Der aktuelle Stand der Forschung auf dem Gebiet der aDNA Extraktion und Analyse verweist auf die präferenzielle Verwendung von Zahnmaterial vor kortikalisreichen Langknochen (Alt et al., 2014). Aufgrund des Feinbaus und der Einbettung im Kieferknochen sind sie zu einem gewissen Grad vor äußeren Umwelteinflüssen und Kontaminationen geschützt. Der Zahn lässt sich allgemein in drei Bereiche aufteilen: Zahnkrone (*Corona dentis*), Zahnhals (*Collum dentis*) und Zahnwurzel (*Radix dentis*). Die Zahnkrone ragt aus dem Zahnfleisch in die Mundhöhle und wird deshalb als der sichtbare Teil des Zahns bezeichnet. Darauf folgt der Zahnhals, welcher den Übergang zur Zahnwurzel bildet, welche den Zahn im Zahnfach des Kiefers verankert. Die äußere Zahnhülle besteht aus drei Hartsubstanzen: dem Zahnschmelz, Dentin und Zahnzement (Abbildung 1.4). Zu den Weichgeweben des Zahnes zählen die Zahnwurzel umhüllende Wurzelhaut und das im Zahninneren liegende Zahnmark (*Pulpa dentis*). Der Zahnschmelz bedeckt das Dentin zur Mundhöhle hin. Dieser besteht zu 97 % aus anorgani-

schem Material, in dem Phosphat und Kalzium stabile Hydroxylapatitkristalle bilden, was das mineralisierte Gewebe zur härtesten Substanz des menschlichen Körpers macht. Dieser Anteil des Zahnes ist zellfrei und besteht vorrangig aus Schmelzprismen, die aus Kohlenhydraten gebildeten, interzellulären Kittsubstanzen zusammengefügt sind. Das Dentin besteht zu 70 % aus anorganischen Substanzen, die diesem Gewebe einen höheren Härtegrad verleihen als Knochengewebe. Die verbleibenden 30 % setzen sich aus 20 % organischen Substanzen und 10 % Wasseranteil zusammen (Scelza et al., 2003; Schiebler, 2007).

Für DNA-Analysen ist zu berücksichtigen, dass der strukturelle Gewebsfeinbau und die Zahnregion die jeweilige Zelldichte und folgend die Menge extrahierbarer DNA, bedingen. Als bevorzugter Angriffspunkt für die DNA-Extraktion gilt immer noch das Dentin, da dieses durch eine Art Barriere, die aus Zahnzement und Zahnschmelz besteht, vor äußeren Einflüssen geschützt ist. Mit wenig Aufwand und ohne große Zerstörung ist Dentin durch die Abtrennung der Zahnkrone leicht vom gesamten Zahn zu präparieren (Merriwether et al., 1994; Rudbeck et al., 2005). Bezogen auf die unterschiedlichen Zahnregionen, befinden sich im Wurzelbereich, verglichen zur apikalen Spitze, drei- bis viermal mehr Odontoblastenfortsätze, welche sich an der Dentin-Pulpa-Grenze befinden. Allerdings sind die Zelleiber- und Kerne der Odontoblasten in der Pulpa gelegen, was diese aufgrund der strukturellen Umgebung angreifbarer für Degradationsprozesse macht. Im Vergleich zum Dentin, wurde Zahnzement bisher mehr oder weniger als potentielle DNA-Quelle ignoriert. Jedoch ist die Zelldichte im Zahnzement deutlich höher, was gegenüber dem Dentin zu einer vier- bis fünffach höheren Ausbeute der Kern-DNA und mtDNA aus dem Zahnzement führt. Die Zementozyten und Zementoblasten befinden sich, umgeben von Kollagenfibrillen und einer verkalkten Grundsubstanz, in schmalen Kanälen nahe der Dentinegrenze. Durch das umliegende mineralisierte Gewebe sind die Zellen besser im Zahnzement geschützt (Adler et al., 2011; De Leo et al., 2000).

Für aDNA-Analysen an historischem Skelettmaterial eignen sich neben Zähnen besonders Langknochen. Im Allgemeinen hat sich gezeigt, dass sich nicht jeder Knochen gleich gut für eine DNA-Extraktion eignet bzw. dass der Feinbau die DNA-Integrität unmittelbar beeinflusst. Langknochen gelten im Vergleich zu Knochen mit einem hohen spongiösen Anteil, aufgrund ihrer massiv ausgebildeten *Substantia compacta*, als besonders praktikabel. Aufgrund ihrer kompakten Knochenstruktur sind Langknochen sehr viel besser gegen äußere Umwelteinflüsse und Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien geschützt, als es bei Rippen oder der Schädeldecke der Fall ist (MacHugh et al., 2000; Alonso et al., 2001). Die Knochenmatrix besteht im Allgemeinen aus denselben Grundsubstanzen wie die der Zähne. Verändert ist lediglich die Zusammensetzung: 70 % anorganische Substanzen, insbesondere Hydroxylapatit und 30 % organisches Material, das zu 95 % aus Kollagen besteht. Röhrenknochen können in drei Abschnitte unterteilt werden: die Epiphysen (Knochenenden), die Diaphyse (Knochenschaft) und die Metaphyse (Übergang von Epiphyse zur Diaphyse). Wird der Diaphysenquerschnitt betrachtet, kann der innere Aufbau noch einmal in eine kompaktere äußere Schicht, die *Substantia compacta* und in eine innere lockere Schicht, die *Substantia spongiosa*, eingeteilt werden. Der Anteil der *Substantia compacta* ist an der Diaphysenmitte höher als an den Epiphysen und wird deshalb bevorzugt für aDNA-Analysen verwendet (Rohland und Hofreiter, 2007a).

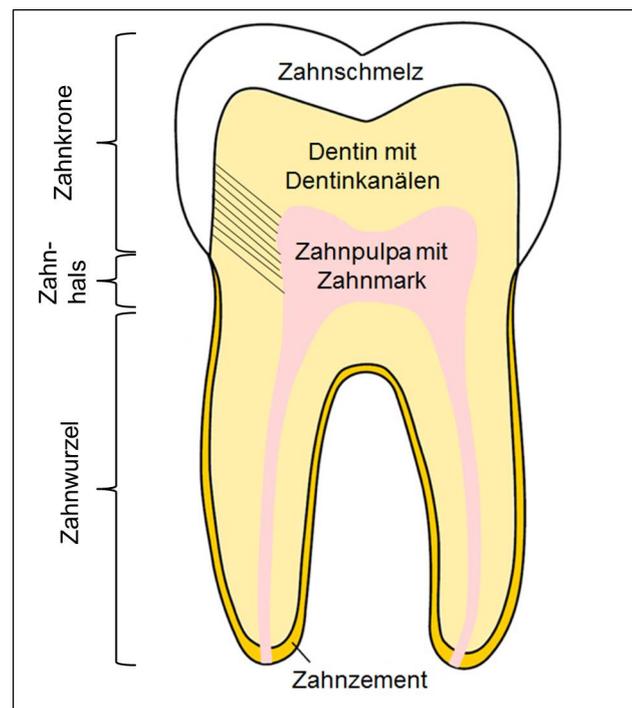


Abbildung 1.4: **Zahnaufbau.**

Abgebildet ist der schematische Aufbau eines Backenzahns (*Molar*). Dieser teilt sich in die Zahnwurzeln, den Zahnhals und die Zahnkrone. Die Zahnwurzel verankert den Zahn im Kiefer (Alveolarknochen) und die Zahnkrone schützt den Zahn nach außen hin.

Sie besteht im Wesentlichen aus Osteonlamellen, die feine Röhrensysteme (Osteone) bilden, welche konzentrisch ausgerichtet in Längsrichtung verlaufen. Zwischen den Lamellen finden sich Osteozyten, die ursprünglich aus morphologisch veränderten Osteoblasten hervorgegangen und im Osteoid eingebettet sind. Diese verfügen über Fortsätze (Knochenkanalikuli), die einen Stoff- und Informationsaustausch zwischen benachbarten Osteozyten ermöglichen. Im Inneren der Osteone verläuft der Havers-Kanal. Diese Kanäle beherbergen Blutgefäße und sind über kleinere Kanäle quer vernetzt. Eine Zementlinie bildet den Abschluss eines Osteons und grenzt es somit von den benachbarten Osteonen ab. Die äußerste Schicht des Knochens, die Zirkumferenz, besteht aus mehreren Lagen von Generallamellen, die sich noch unter der Knochenhaut, dem *Periost*, befinden und über diese versorgt werden (Abbildung 1.5). Ein weiterer Bestandteil des Knochens sind Resorptionslakunen. In ihnen befinden sich sowohl knochenaufbauende Osteoblasten als auch die mehrkernigen knochenabbauenden Osteoklasten, die für einen ständigen Knochenumbau sorgen. Die mineralisierten Bestandteile des Knochens bilden somit eine physikalische Barriere nach Außen und schützen die Knochenzellen sowie darin enthaltene DNA (Loreille et al., 2007).

Die Erfahrung hat gezeigt, dass die Berücksichtigung einer Rangordnung in der Auswahl des Untersuchungsmaterials für die Extraktion von aDNA ratsam ist. Jedoch machen individuelle qualitative Aspekte und der Einfluss von Lagerungsbedingungen jedes historische Untersuchungsmaterial für die Molekulargenetik einzigartig und bedingen den Erfolg jeweili-

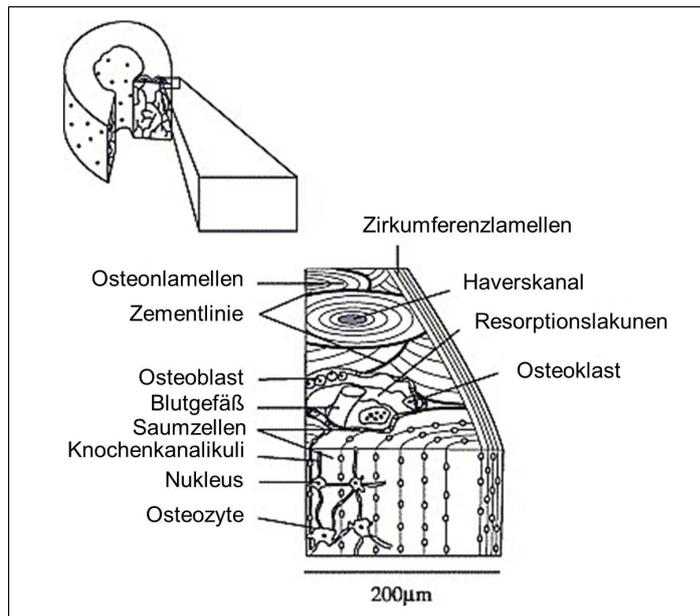


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der *Substantia compacta* mod. nach Adler et al. (2011).

Zu erkennen ist der mikroskopische Aufbau der *Substantia compacta* eines Langknochens. Knochenzellen und deren Zellkerne sind durch ihre Lage gut vor äußeren Umwelteinflüssen geschützt.

ger Analysen am einzelnen Objekt. Wenn vorhanden sollten in der Reihenfolge ihrer Priorität folgende Hartgewebeprobe(n), unter Berücksichtigung des PMI, bevorzugt ausgewählt werden: *Molare*, *Prämolare*, *Canini* und falls keine Zähne vorhanden sind, entweder *Femur* oder *Tibia*, *Humerus* oder *Pars petrosa ossis temporalis* (Abbildung 1.6) (Alt et al., 2014; Mundorff und Davoren, 2014).

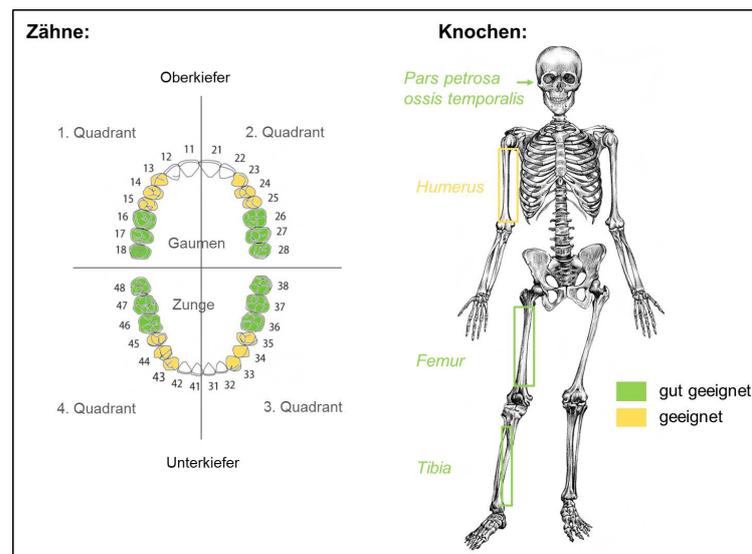


Abbildung 1.6: **Priorisierte Probenauswahl für aDNA-Analysen.**

Molaren (M1, M2, M3) aus Ober- oder Unterkiefer der zweiten Dentition gelten bisher als besonders gut geeignet für die Extraktion von aDNA. Alternativ sind *Prämolare* (PM1, PM2) oder *Canini* (C) zu verwenden. Ist kein Zahnmaterial vorhanden, sind *Femur* oder *Tibia* zu bevorzugen. *Humerus* oder *Pars petrosa* können zudem alternativ entnommen werden. Die Nummerierung der Zähne folgt der internationalen Nomenklatur der Fédération Dentaire Internationale.

1.4 Organisation und Anwendung uniparental vererbter DNA-Systeme

Werden genetische Merkmale ausschließlich von einem Elternteil auf die Nachfolgenerationen vererbt, so wird von einer uniparentalen Weitergabe gesprochen. Zu entsprechend uniparentalen Trägern genetischer Informationen zählen Systeme wie mtDNA, deren Besonderheiten lediglich von der Mutter auf ihre Nachkommen weiter gegeben werden (maternal). Die Weitergabe manifestierter Informationen auf dem Y-Chromosom erfolgt hingegen in der Vererbungslinie nur vom Vater auf die Söhne (paternal). Anders als bei der Weitergabe autosomaler Informationen, findet an dieser Stelle eine nahezu rekombinationsfreie Vererbung statt. Dies hat zur Folge, dass Sequenzvariationen ausschließlich durch den Einfluss von Mutationen zustande kommen. Durch diese Besonderheit rücken beide Untersuchungssysteme in den Fokus evolutionsgenetischer Studien des modernen Menschen.

1.4.1 Mitochondriale DNA (mtDNA)

Neben der Kern-DNA findet sich beim Menschen zusätzlich extrachromosomale DNA in Form von mtDNA, welche sich in der Struktur und Genetik deutlich von der Kern-DNA abgrenzt. Besonderheiten wie eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Degradationsprozessen, das Vorliegen von bis zu mehreren tausend Kopien pro Zelle (Anderson et al., 1981), eine ho-

Die Sequenzvariabilität und der Ausschluss von Rekombination mit einem anderen Genpool, machen das mitochondriale Genom sowohl für forensische Sequenzanalysen als auch für evolutionsgenetische Fragestellungen besonders interessant. Durch die fehlende Rekombination erfolgt eine Art kontrollierte Differenzierung mitochondrialer Linien auf Basis der Bewertung einer mutationsbedingten Sequenzvariabilität. Die genannten Faktoren begünstigen mtDNA Untersuchungen an lang gelagerten biologischen Geweben (z. B. historisches Skelettmaterial) unter weiterer Berücksichtigung, dass die Analyse der Kern-DNA scheitert. Durch eine lineare, maternale Vererbung der mtDNA ist es weiterhin möglich komplexe Abstammungsverhältnisse über mehrere Generationen hinweg aufzuklären (Parson, 2009). Im nativen Zustand liegt das Ringmolekül in einer negativ gewundenen *supercoil*-Konformation vor. Beide Stränge wurden nach deren Nukleotidzusammensetzung, basierend auf der unterschiedlichen Dichte der Stränge in der denaturierenden CsCl-Dichtezentrifugation, in einen H- (*heavy*) und L- Strang (*light*), unterschieden (Scheffler, 2002). Die Replikation beider mtDNA-Stränge verläuft asynchron. Zunächst erfolgt die Replikation des H-Stranges, bis nach circa 2/3 des Molekülumfanges die Signalsequenz zur Initiierung der L-Strang-Replikation freigelegt wird. Das mitochondriale Genom zeichnet sich durch einen langen kodierenden Sequenzbereich, in dem 37 Gene unmittelbar aneinander grenzen, aus. Darunter sind zwei kodierende Gene für ribosomale RNA (rRNA) (12S- und 16S-rRNA), 22 Transfer-RNAs (tRNA) und 13 proteinkodierende Gene (577 – 16 023 bp) (Abbildung 1.7) (Aretz et al., 2008).

Im Extremfall unterliegt das mitochondriale Genom einer Abhängigkeit des Kerngenoms, in der notwendige Faktoren für Replikation und Transkription nukleär kodiert und in Mitochondrien importiert werden müssen. Die Abfolge in der Nummerierung von Nukleotidpositionen erfolgte mehr oder weniger willkürlich. So wurde die Nukleotidposition eins einer *MboI*-Restriktionsenzymstrecke innerhalb der Kontrollregion zugeteilt. Somit ist anders als oft angenommen die erste Position nicht der Replikationsursprung. Nachdem in den späten 1960er Jahren die Funktion und der Aufbau des Moleküls geklärt wurden, konnte erst zwölf Jahre später die vollständige menschliche mitochondriale (mt) Sequenz präsentiert werden (Anderson Sequenz). Diese enthielt jedoch zum Zeitpunkt elf Sequenzierungsfehler, welche weitere 18 Jahre später durch einen Technikfortschritt beseitigt wurden (Anderson et al., 1981). Die korrigierte Sequenz wird als *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) bezeichnet und dient seither als Referenz für den mitochondrialen Sequenzvergleich. Behar et al. stellten 2012 eine neue, hypothetische Referenzsequenz vor (*Reconstructed Sapiens Reference Sequence*, RSRS) (Behar et al., 2012). Anders als bei der rCRS, die einer Vergleichssequenz europäischen Ursprungs entspricht, wurde der phylogenetische Ursprung im Fall der RSRS in Form einer abgeleiteten, ancestralen Variante („*mitochondrial Eve*“) gewählt. Die Autoren argumentierten eine bevorzugte Verwendung dieser neuen Referenzsequenz damit, dass die bisherige aus der rCRS abgeleitete Phylogenie durch die Einbeziehung von Rückmutationen inhärent wäre und die Angabe der Ursprungsvariante unerlässlich sei. Bandelt et al. (2014) diskutierten die Präsentation der RSRS und einhergehende Argumentation zur Verwendung dieser hypothetischen Sequenz kontrovers. Im Falle einer phylogenetischen Analyse würde die Verwendung dieser Referenzsequenz eher verwirren und die Interpretation akkumulierter Mutationen im Verlauf

vergleichend höhere Mutagenese (ca. 10-fach höher) wurde lange Zeit insbesondere durch das Fehlen klassischer nukleärer Reparaturmechanismen, begründet (Ballard und Whitlock, 2004). Ursachen für die Entstehung und Akkumulation von Mutationen sind verschiedene Umweltfaktoren, Basenfehlpaarungen während der Replikation, Fehler in der Maschinerie vorhandener mtDNA-Reparaturmechanismen und die Inhibition der Einleitung von Degradationsprozessen beschädigter mtDNA-Moleküle (Shokolenko et al., 2009).

Der gegenwärtige Forschungsstand verweist entgegen o. g. Annahme darauf, dass die meisten Hauptreparaturmechanismen, wie diese in der Kern-DNA vorzufinden sind, ebenso im Mitochondrium existieren (Boesch et al., 2011; Liu und Demple, 2010). Mitochondrien sind eine der Hauptquellen für reaktive Sauerstoffderivate (ROS), die insbesondere für Basenläsionen verantwortlich sind. Einer der bekanntesten Biomarker für oxidativen Stress ist ein Derivat des Desoxyguanosin, die 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-oxodG) Läsion. Diesen oxidativen Schäden entgegen gesetzt wirkt der Basen-Exisions Reparaturmechanismus (BER) (Thorslund et al., 2002). Der wissenschaftliche Beitrag zu o. g. Basenfehlpaarungen, BER und mtDNA Degradation als Antwort auf zelluläre- oder Molekülschäden zeigt, dass nicht nur Mitochondrien über ein großes Repertoire an Reparaturmechanismen verfügen, sondern auch durch die intrinsische Redundanz aktiviert werden und behilflich sind, beschädigte Moleküle zu beseitigen und neue zu replizieren (Alexeyev et al., 2013). Allerdings kann sich eine Mutation bei Betrachtung einer ausreichend großen Ausgangspopulation nur schwer etablieren. Ein Mutationsevent würde sich demnach lediglich über einen sehr langen Zeitraum durchsetzen können. Im Gegensatz dazu wird sich die Mutation, bedingt durch den genetischen Drift, bei einer kleineren Ausgangspopulation sehr schnell akkumulieren. Über längere Zeiträume hinweg kommt es in solchen rein klonalen Erblinien, wie es bei der mtDNA Weitergabe der Fall ist, zur Anreicherung nachteiliger Mutationen. Dieser Degenerationsprozess wird als „Muller’s ratchet“ bezeichnet. Diesem Phänomen wirken sowohl die verhältnismäßig geringe Molekülgröße und der „Bottleneck-Effekt“ entgegen (MULLER, 1964).

Zwei wesentliche Eigenschaften machen mitochondriale DNA für evolutionäre und populationsgenetische Studien interessant. Zum einen die hohe Variabilität und zum anderen die Vererbung entlang der mütterlichen Linie. Mutationen haben sich im Laufe der Zeit und infolge des „Bottleneck“-Effektes angereichert und Spuren hinterlassen, welche mit subkontinentalen Grenzen spezifische Muster bilden (Parson, 2009). Diese beiden Faktoren begünstigen die Gruppierung von mutations-bedingten Sequenzmotiven in sog. Haplotypen (Ht). Für die Durchführung von Evolutionsstudien werden grundsätzlich zwei Ansätze in Betracht bezogen. Ein Ansatz fokussiert die geschichtliche Entwicklung mitochondrialer Abstammungslinien (Haplogruppen) durch die Analyse spezifischer Mutationsereignisse (siehe Kapitel 1.5.1). Der andere populations-bezogene Ansatz betrachtet die Prähistorie von Bevölkerungsgruppen und Migrationsereignissen auf der Grundlage populations-spezifischer Daten (Salas et al., 2007). Haplogruppen (Hg) repräsentieren verwandte Gruppen von Sequenzen, die durch gemeinsame Mutationen gekennzeichnet sind und eine regionale Spezifität zeigen (Forster et al., 2001).

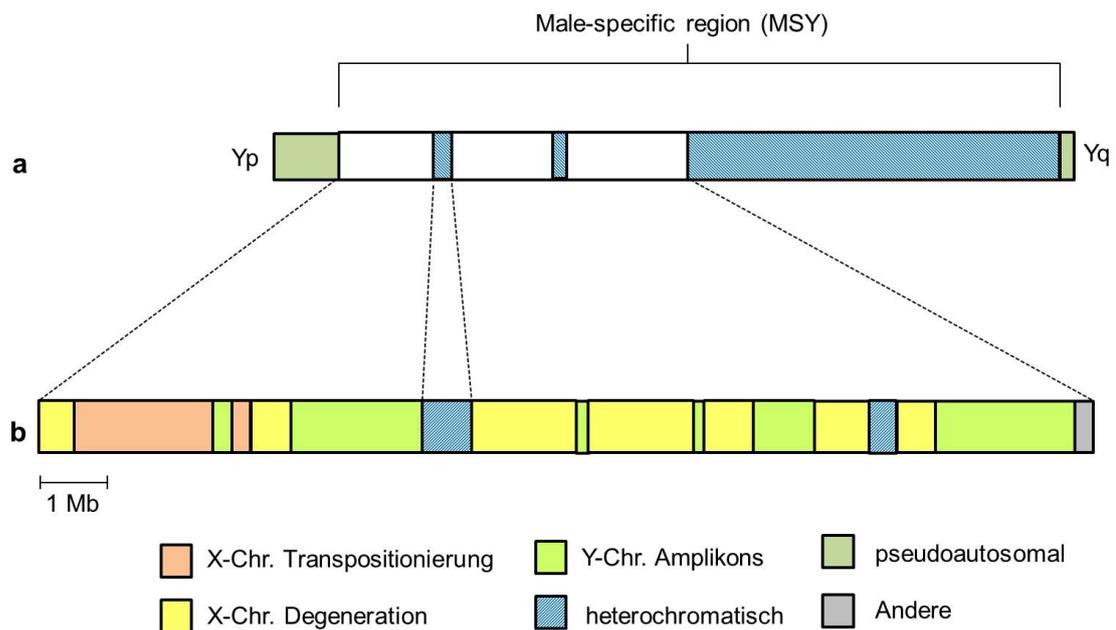


Abbildung 1.8: **Organisation des Y-Chromosoms.**

Schematisch dargestellt ist das Y-Chromosom einschließlich pseudoautosomaler und heterochromatischer Regionen (a). In (b) ist der größte Anteil, die MSY-Region (a) mit drei Klassen euchromatischer und einem großen Anteil heterochromatischer repetetiver Sequenzen in Richtung der Yq-Pseudoautosomalen Region.

1.4.2 Y-chromosomale DNA

Das Y-Chromosom repräsentiert mit ~ 60 Megabasen (Mb) lediglich 2 % des menschlichen Genoms. Viele Jahre bestand die Hypothese, dass es aufgrund der geringen Anzahl an Genen im Vergleich zum X-chromosomalen Gegenstück nicht essentiell für das Überleben eines Individuums notwendig ist. Da es sich bei diesem uniparentalen System um den variabelsten haploiden Marker im menschlichen Genom handelt, ist dieser von entscheidender Bedeutung für populationsgenetische Studien. Die Vererbung des Y-Chromosoms verläuft ausschließlich paternal klonal. Das heißt, dass Y-Chromosom wird *en bloc* vom Vater auf den Sohn übertragen. Wie auch auf den Autosomen finden sich auf dem Y-Chromosom polymorphe Sequenzen (Minisatelliten, Alu-Sequenzen, STRs, SNPs), die im Hinblick auf forensisch relevante Kasuistiken eine klassische molekulargenetische Analyse des Y-Chromosoms erlauben (Roewer, 2008; Jobling und Tyler-Smith, 2003). Determiniert wird das Y-Chromosom durch Gene der *male-specific region of Y* (MSY), die 95 % des Y-Chromosoms einnimmt (Abbildung 1.8). Dieser Bereich unterliegt keiner Rekombination mit dem X-chromosomalen Gegenpol und wird in der Literatur häufig als *non-recombining of Y* (NRY) oder *non-recombining portion of Y* (NRPY) bezeichnet. Begrenzt wird die MSY durch zwei flankierende pseudoautosomale Regionen (PAR). Dieser ~ 3 Mb große Bereich unterliegt wiederum den natürlichen meiotischen Prozessen und erlaubt einen genetischen Austausch von homologen Sequenzabschnitten mit dem X-Chromosom.

Die MSY ist ein Mosaik heterochromatischer sowie X-degenerativer, X-transponierter und euchromatischer Y-chromosomaler Sequenzen, welche theoretisch intakt paternal von Generation zu Generation weitergegeben werden (Abbildung 1.8). Divergenzen zwischen den Y-Chromosomen über Generationen lassen sich ausschließlich durch Mutationen erklären, die unterschiedlich schnell je nach Polymorphismus akkumulieren. Ebenso kann es zu nicht-allelischen Rekombinationen zwischen extrem ähnlichen paralogen Sequenzen kommen, welche eine hohe strukturelle Variabilität des Y-Chromosoms nach sich ziehen. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass ein Basenaustausch auf dem Y-Chromosom mit einer Wahrscheinlichkeit von 2×10^{-8} pro Base pro Generation auftritt. Die Mutationswahrscheinlichkeit von Mikrosatelliten liegt mit $3,17 \times 10^{-3}$ pro Mikrosatellit pro Generation weitaus höher. Verursacht wird diese Mutationsrate durch die Sekundärstruktur der Repeats, welche einen ungleichen Austausch zwischen Schwester-Chromatiden begünstigt (Jobling et al., 1999). Seltener als Basensubstitutionen sind möglich auftretende Genkonversionsereignisse in Folge des autosomalen DNA-Regenerationsprozesses, bei dem durch einen nicht-reziproken Transfer Informationen eines DNA-Abschnittes auf einen anderen Abschnitt des Y-Chromosoms übertragen werden. Folglich kann es aufgrund der geringen Kopienzahl und der nicht-allelischen homologen Rekombination zu nicht pathogenen Umlagerungen sowie zu Deletionen von Sequenzbereichen, die zu einer männlichen Unfruchtbarkeit führen, kommen. Ebenso können Deletionen auf dem Y-Chromosom zu Frauen mit dem Merkmal „XY“ oder einen hermaphroditen Phänotyp führen (Berta et al., 1990).

Neben der mtDNA werden Y-chromosomale Informationen im populationsgenetischen Interesse überwiegend für Evolutions- und Demografiestudien genutzt, um z. B. geografische Migrationsbewegungen zu rekonstruieren und um kulturelle Stratifizierungen vorzunehmen (Roewer, 2008; Jobling und Tyler-Smith, 2003; Forster et al., 2000). Schon lange Bestandteil der forensischen Routine ist die Analyse Y-chromosomaler Polymorphismen, vorrangig für die Aufklärung von Sexualstraftaten, bei denen eine Differenzierung von unbalancierten Mann/Frau-DNA-Mischspuren notwendig ist (Roewer, 2009). In Defizienzfällen kann die Y-chromosomale Analyse für die Konstruktion von Familienstammbäumen verwendet werden. Auch bei historischen Skelettfunden und im Rahmen von anthropologischen Untersuchungen kann dieses System neben der mtDNA genutzt werden, um Hypothesen über verwandtschaftliche Beziehungen zu untersuchen. Möglich wird dies durch die lineare Vererbung des Y-Chromosoms mittels polymorpher Sequenzen- bzw. Sequenzpositionen, die es über die Zeit hinweg ermöglichen, entsprechende Beziehungen abzuleiten. Die Grundlage für eine Beschreibung von Migrationsprozessen und den Ursprung des modernen Menschen bildet die *out-of-Africa* Theorie, nach welcher der moderne Mensch von einem in Afrika lebenden Vorfahren abstammt und im Zuge der Populationsexpansion eine Spreizung auf die übrigen Kontinente stattfand (Quintana-Murci et al., 2001). Mit der globalen Verteilung des Y-Chromosoms kam es zu regionalen Differenzierungen populationspezifischer Haplotypen über die Abstammungslinien innerhalb und zwischen Populationsgruppen gebildet und abgeleitet werden können. Neben genetischen Faktoren wirken auch kulturelle und ethnische Normen auf die Differenzierung des Y-Chromosoms ein. Nicht nur Gründereffekte, Migrations-

und Isolationsereignisse bewirken eine Differenzierung der Ychr. Haplotypen, sondern auch die Anzahl der von einem Vater gezeugten Söhne, Heirats- und Erbfolgeregeln, Promiskuität, Religion sowie das Phänomen der Patrillokalität beeinflussen die Verteilung des Y-Chromosoms (Seielstad et al., 1998).

1.5 *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*

Die Unterscheidbarkeit humaner Genome auf Sequenzebene kann durch eine Vielfalt genetischer Polymorphismen erklärt werden. *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) stellen eine Form der genetischen Heterogenität dar, bei der das Mutationsereignis zur Variation eines einzelnen Nukleotids im Genom führt und folglich eine Vielgestaltigkeit als Differenzierungsmerkmal von Sequenzen im forensischen- und populationsgenetischen Kontext entsteht. Daher werden SNPs zu den binären Sequenzpolymorphismen gezählt. Der Theorie zufolge kann der Austausch durch das Alphabet der DNA in Form von jeweils drei Varianten pro Sequenzposition erfolgen. Tatsächlich handelt es sich jedoch bei den meisten und insbesondere bei bereits etablierten forensisch- und populationsgenetisch relevanten SNPs um biallelische Varianten, d. h. sie weisen genau zwei Merkmalszustände auf: ein ancestrales oder ein mutiertes Allel (Børsting et al., 2007; Butler et al., 2007). Im Hinblick auf die Verteilung im humanen Genom ist davon auszugehen, dass diese mit einer mittleren Dichte von ca. 1 SNP/300 bp verteilt, in kodierenden sowie in nicht-kodierenden Bereichen, auftreten. Darüber hinaus können in Abhängigkeit der zu untersuchenden Fragestellung relevante Polymorphismen des mitochondrialen Genoms und des Y-Chromosoms untersucht werden. Im Jahr 1999 wurde das SNP Konsortium, mit dem Ziel der Präsentation einer „High-density SNP map“ des humanen Genoms, gegründet. Im Ergebnis wurden mehrere Millionen SNPs charakterisiert, klassifiziert und in entsprechende Datenbanken hinterlegt (Butler, 2011). Das Konsortium bildete die Grundlage für das internationale HapMap-Projekt, welches sich an das *Human Genome Project* anschloss (Thorisson und Stein, 2003). Das Projekt beabsichtigte die Typisierung mehrerer Millionen SNPs von 270 Individuen aus Afrika, Europa und Asien (<http://www.hapmap.org/>) (Gibbs et al., 2003). Aktuell umfasst die dbSNP des National Center for Biotechnology Information (NCBI) 97 535 033 validierte SNP-Cluster und 85 591 044 SNPs des humanen Genoms (Build 144, release Aug. 2015) (Sherry et al., 2001). Die in der Forensik relevanten SNPs werden in vier Kategorien unterteilt (Budowle und van Daal, 2008):

Kategorie 1 IISNPs: *Individual Identification SNPs* zur Individualdifferenzierung. Eine hohe Diskriminationskraft wird durch eine hohe Anzahl von SNPs erreicht. Innerhalb des SNPforID Projektes wurde beispielhaft ein Analyseset von 52 autosomalen SNPs zur humanen Identifizierung veröffentlicht (Sanchez et al., 2006).

Kategorie 2 LISNPs: *Lineage Informative SNPs* umfassen gekoppelte SNPs, die in ihrer Kombination einen sog. Haplotypen bilden. LISNPs werden für evolutionäre Untersuchungen und für die Abstammungsanalyse als multi-allelische Marker eingesetzt. Hierzu werden SNPs des Y-Chromosoms und mitochondrialen Genoms genutzt.

Kategorie 3 AISNPs: SNPs, die Rückschlüsse auf die geographische Herkunft eines Individuums zulassen, werden als *Ancestry Informative SNPs* bezeichnet. Zu dieser Kategorie werden sowohl autosomale SNPs, die z. B. selektionsbedingt populationspezifische Mutationsmuster aufweisen, als auch selektionsneutrale Y-chromosomale SNPs, gezählt (Fondevila et al., 2013).

Kategorie 4 PISNPs: Als *Phenotype Informative SNPs* werden Polymorphismen bezeichnet, welche Aussagen bzgl. des Phänotyps eines Individuums über biogeografische Rückschlüsse hinaus zulassen (Hautfarbe, Haarfarbe oder Augenfarbe). Anders als mit AISNPs, können mit diesen Markern direkte Informationen zur physischen Konstitution erlangt werden mit denen eine Personenidentifikation unterstützt werden kann. Für die Phänotypisierung werden überwiegend gekoppelte SNPs verwendet, welche mit Pigmentierungsinformationen assoziieren und keinen Einfluss auf die Genexpression besitzen (Sanchez et al., 2006).

Durch das Vorliegen von effektiv einer interessanten Position ergeben sich, bedingt durch den Austausch eines Nukleotids, gegenüber Längenpolymorphismen, einige methodische Vorteile. Experimentell müssen vergleichsweise nur kurze Sequenzbereiche amplifiziert werden (< 100 bp), wodurch sich diese Art von Polymorphismus insbesondere gut für die Analyse von stark fragmentierter DNA, wie sie oft bei Skelettfunden mit langen PMI vorliegt, eignen. Die Möglichkeit der simultanen Betrachtung mehrerer Positionen in sog. Multiplexverfahren ermöglicht darüber hinaus ein von der Fragestellung abhängiges Assaydesign. Dennoch existieren gegenwärtig wenig kommerzielle SNP-Kits wodurch das *Handling* im Prä-Amplifikationsprozess viel Zeit beansprucht und ein Kontaminationsrisiko durch mehrere aufeinanderfolgende Pipettierschritte gegeben ist. Das klassische Analysevorgehen und die nachfolgende Detektion in Form einer kapillarelektrophoretischen Auftrennung fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente, wird zukünftig voraussichtlich durch den Einzug von *Next Generation Sequencing* (NGS) Technologien in die molekulare Forensik, auch für entsprechende Fragestellungen aus der Anthropologie und Populationsgenetik, abgelöst oder ergänzt werden. Sogenannte Massiv-Parallel-Sequenzierungen überzeugen an dieser Stelle durch einen hohen Informationsgewinn, da eine Vielzahl verschiedener Marker parallel analysiert werden kann. Daneben ermöglicht diese Technologie einen hohen Probendurchsatz und einen tieferen Einblick in spezifische DNA-Varianten. Das bedeutet auch für die SNP-Analyse ein Informationszugewinn für die Phylogenie des mitochondrialen Genoms und des Y-Chromosoms.

1.5.1 Analyse mitochondrialer Abstammungslinien mittels SNPs

Mitochondriale SNPs können gerade im Feld der archäogenetischen Forschung, wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, für die Analyse genealogischer Abstammungslinien entlang der maternalen Vererbung genutzt werden. Der Prozess einer molekularen Differenzierung geht einher mit der globalen Verbreitung von Bevölkerungsgruppen, sodass Sequenzvariationen auf mtDNA Ebene mit geografischen Grenzen in Verbindung gebracht werden können. Mit dieser Eigenschaft des molekularen Markers können somit Bevölkerungsgruppen im Hinblick auf deren Ethnienstatus sowie auf den in diesem Zusammenhang vorherrschenden Abstammungsgrad hin untersucht werden. Die Analyse des vollständigen mtDNA Status erlaubt mitunter die Darstellung der

zeitgeschichtlichen Entwicklung und Ausbreitung spezifischer, im phylogenetischen Kontext stehender, mtDNA-Varianten. Brown's Pionierarbeit aus dem Jahr 1980, in der 21 Personen mit unterschiedlichem ethnischen Status und geografischer Herkunft untersucht wurden zeigte, dass die zum Zeitpunkt noch üblichen RFLP-Muster zur Analyse der humanen genetischen Vergangenheit genutzt werden konnten (Brown, 1980). Auf Basis der Diversität im untersuchten Probensatz ließ sich eine relativ junge Koaleszenzzeit von $\sim 180\,000$ Jahren für die globale mtDNA Variation ableiten. Erste *large-scale* Studien mit dem Ziel sowohl den Ursprung, das Alter der Population als auch die ancestrale Migration aus dem asiatischen Raum zu analysieren, wurden initial an amerikanischen Ureinwohnern durchgeführt (?). Die Variation zwischen mtDNA Sequenzen, die sich infolge einer sequenziellen Akkumulation von Mutationen entlang der maternalen Ebene angereichert haben, können mit Hilfe phylogenetischer Beziehungen bereits bekannter mtDNA Varianten, in Form einer Baumstruktur in Beziehung zueinander dargestellt werden (www.Phylotree.org) (Bandelt et al., 2005, 2006; Kivisild et al., 2006; Kong et al., 2006; Richards, 2004; Salas et al., 2007; Torroni et al., 2006) (Abbildung 1.9). Die heutige Nomenklatur für mitochondriale Haplogruppen entwickelte sich selbstorganisierend in Abhängigkeit der Datengrundlage. Zu Beginn erfolgte die Bezeichnung von vier basalen Ästen bzw. Haplogruppen in alphabetischer Reihenfolge (A, B, C und D). Später, mit der Charakterisierung von Haplogruppenstrukturen in diversen kontinentalen Populationen, entwickelten sich definierte Regeln für die hierarchische Ordnung von Haplogruppen und zugehörigen Subhaplogruppen (Torroni et al., 1994b,a; Richards et al., 1998). Aktuell finden alle Buchstaben aus dem Alphabet für die Hg Bezeichnung Verwendung (van Oven und Kayser, 2009; Kivisild et al., 2006). Gegenwärtig umfasst die Datenbank, welche zur Erstellung des Haplogruppenbaumes (PhyloTree) genutzt wird, 24 275 humane mtDNA Sequenzen (*mtDNA tree Build 17* (18 Feb 2016)). Entsprechende Verzweigungen werden durch haplogruppen-spezifische SNPs der kodierenden und nicht-kodierenden Region der mtDNA bezeichnet. M. van Oven und M. Kayser stellten 2008 ein Update des phylogenetischen Baumes vor (van Oven und Kayser, 2009). Durch die Hinzunahme von Mutationen aus der Kontrollregion, neben den bereits involvierten Varianten aus dem kodierenden Bereich und einer einheitlichen Nomenklaturvorgabe, wurde es möglich die mitochondriale Phylogenie mit einem höheren Informationsgewinn zu beschreiben.

In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll Marker zu nutzen, die aussagekräftige Austauschwahrscheinlichkeiten besitzen und mit keinen pathologischen oder phänotypischen Veränderungen assoziiert werden (Coble et al., 2004). Am häufigsten werden Mutationen betrachtet, die durch Substitutionen einzelner Nukleotide entstehen. Hierbei handelt es sich entweder um Transitionen oder Transversionen. Ein einzelner biallelischer SNP würde wenig bis gar keine hilfreichen Informationen liefern. Jedoch wird es mit einer angemessen großen Anzahl und einer intelligenten Kombination von SNPs möglich die Diskriminationskraft zu erhöhen (Sanchez et al., 2006). Die mitochondriale Phylogenie zeigt tiefe Äste in Afrika, wo auch der Ursprung der letzten gemeinsamen Urahnin (mitochondriale Eva) liegt (mt-MRCA). Tiefer in der Struktur befindet sich die Hg L3 und gliedert sich aus der Sicht stattgefundener Wiederbesiedlungsvorgänge in weitere Abstammungslinien außerhalb von Afrika auf. Der Ur-

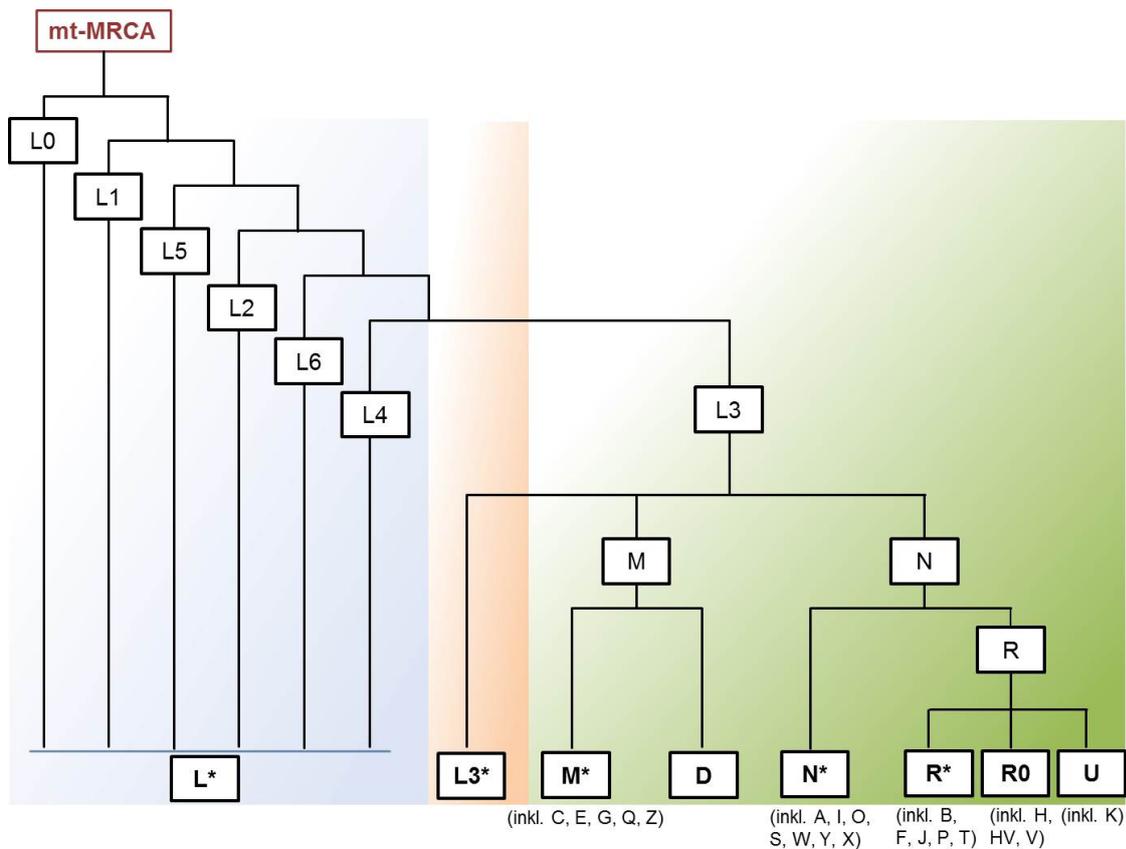


Abbildung 1.9: Topologie mitochondrialer Haplogruppen mod. nach van Oven und Kayser (2009).

Mitochondriale Haplogruppen sind mit alphabetischen Großbuchstaben gekennzeichnet. Die Wurzel des Baumes bildet die mitochondriale Eva (MRCA) und repräsentiert die „Urmutter“ aller Menschen auf sequenzieller Ebene. Die im Baum tiefste Haplogruppe ist die Hg L, welche den afrikanischen Ursprung widerspiegelt. Haplogruppe L3 unterteilt sich in die Makrohaplogruppen M, N und R, welche Sequenzvariationen außerhalb von Afrika einbeziehen. Mit einem Stern markierte Haplogruppen repräsentieren Makrohaplogruppen, welche weitere Subgruppen in der Baumstruktur umfassen und numerisch klassifiziert dargestellt wurden. Es sei erwähnt, dass dieser Baum nicht die vollständige globale mtDNA Variation aufweist. Eher dient dieser zum Nachvollziehen festgelegter Nomenklaturregeln und der Topologie.

sprung von L3 liegt im Horn von Afrika unter weiterer Berücksichtigung, dass die meisten phylogenetischen Verzweigungen im Vergleich zu anderen Teilen Afrikas südlich der Sahara in heutigen äthiopischen Proben wiederzufinden sind (Kivisild et al., 2004). Die Makrohaplogruppen M und N entwickelten sich ca. vor 60 000 – 65 000 Jahren aus L3 mit Herkunft in Ostafrika und verbreiteten sich im Laufe der Zeit und der Wanderungsgeschichte nach Europa und Asien (Mishmar et al., 2003; Quintana-Murci et al., 1999; Kong et al., 2003; Macaulay et al., 2005). Dieses Cluster einschließlich der Makrohaplogruppe R (und ihre Nachkommen) wird zu den außerhalb von Afrika vorkommenden Haplogruppen gezählt. Alle drei Makrohaplogruppen (M, N und R) finden sich heutzutage, mit der Ausnahme kleiner spezifischer Regionen, im

eurasischen, amerikanischen, australischen und ozeanischen Raum. Andere Haplogruppen wie H, I, J, N1b, T, U, V, W und X sind wiederum charakteristisch für das heutige Europa (Abbildung 1.9). Mit der Besonderheit, das auf mitochondrialer Ebene ein gemeinsamer Ursprung reflektiert wird, kann bei gemischten Bevölkerungsgruppen der Anteil des jeweiligen Ursprungs bestimmt werden (Salas et al., 2004; Alves-Silva et al., 2000).

Ausgehend von der bisher aufgeklärten mtDNA Phylogenie wird ersichtlich, dass die europäischen mtDNA Variationen die des West Eurasischen Raumes impliziert und verglichen mit Variationsvorkommen in Südasien, überraschend wenig Vielfalt im Variationsspektrum aufweist. Die meisten europäischen Abstammungslinien entwickelten sich aus drei R-Linien (R0, JT und U) sowie aus drei Sublinien der Makrohaplogruppe N (N1, N2 und X). Einige Linien wie R1 und R2 treten eher selten in Europa auf (Palanichamy et al., 2004). Dieses Phänomen einer Verminderung in der basalen Variation (R1 und R2) lässt sich durch die vermutlich untergeordnete Rolle der Migration in den nahen Osten und nach Europa im Rahmen der *Out-of-Afrika* Theorie erklären. Die Auseinanderentwicklung auf Ebene der basalen mtDNA Haplogruppen wird einhergehend mit der Interstadial-Phase 12 mit einer Zeitspanne von vor 40 000 – 50 000 Jahren datiert (Dansgaard et al., 1993; Schulz et al., 1998). Aktuelle Arbeiten auf dem Gebiet zeigen, dass mehr als 75 % aller gegenwärtig vorzufindenden europäischen mtDNA Varianten direkt von Vorfahren des Mesolithikums oder Palaeolithikums abstammen (Richards et al., 2000). In diesem Zusammenhang weist die geografische Verteilung einer der autochthonen Haplogruppe V in der mitochondrialen Phylogenie darauf hin, dass die späte glaziale Expansion palaeolithischer Populationen ausgehend von Sammlungsstädten in Südeuropa einen enormen Einfluss auf die Wiederbesiedlung des Kontinents hatte (Torroni et al., 1998, 2001). Mit der Untergliederung der Hg H, einer der in Europa am häufigsten vorkommenden Haplogruppe mit einer Frequenz von 40 – 50 % und der Hg U5 wird darüber hinaus das Refugium der Franco-Cantabrian Region während der letzten Eiszeit unterstrichen. In diesem Zusammenhang deuten die geografischen Verteilungen von H1, H3, V und U5b stark auf eine westliche und nördliche Wiederbesiedlung Europas im späten Paläolithikum, ausgehend vom Refugium im Südwesten, hin (Achilli et al., 2004; Loogväli et al., 2004; Pereira et al., 2005) (Abbildung 1.10).

Ein Problem beim Abstammungslinien-basierten Ansatz ist, dass dieser sich lediglich auf die Geschichte der Haplogruppe selbst bezieht und keine direkten Einblicke in die Geschichte einzelner Bevölkerungsgruppen, in denen sie vorkommen, bietet. Zu beachten ist, dass Entstehung und Alter der Haplogruppe nicht mit dem Alter der Population während eines Migrationsprozesses gleichzusetzen ist. Eher ist das erstmalige Auftreten der haplogruppenspezifischen Mutation innerhalb der migrierten Population (Simoni et al., 2000b) hiermit in Verbindung zu bringen. Populationsstudien, welche u. a. zur Abbildung urgeschichtlicher Ereignisse dienen, sollten nicht ausschließlich auf der Grundlage statistischer Ansätze oder genetischer Distanzen nachvollzogen werden. Sowohl Haplogruppen- als auch populationspezifische Affinitäten können zudem mit Hilfe ausgewählter populationsgenetischer Ansätze analysiert werden

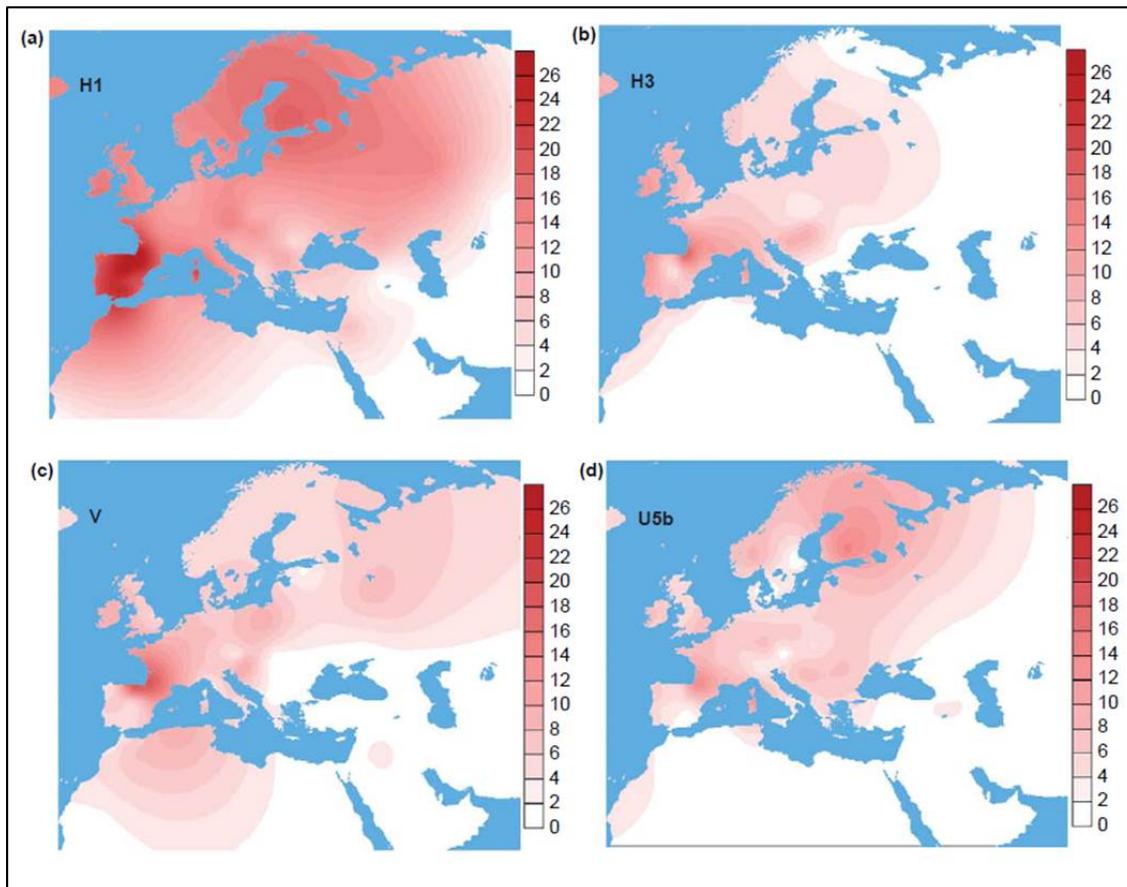


Abbildung 1.10: Hg-Häufigkeitsverteilung durch Wiederbesiedlung in Europa nach Torroni et al. (2006).

Häufigkeitsverteilungen der Haplogruppen (a) H1; (b) H3; (c) V; und 0 (d) U5b.

(Richards et al., 2002; Tambets et al., 2004). Des Weiteren sollten zur Beschreibung einer Abstammungslinie und deren zeitgeschichtlichen Entwicklung beide beschriebene Systeme (mtDNA und Y-Chromosom) betrachtet werden.

1.5.2 Analyse Y-chromosomaler Abstammungslinien mittels SNPs

Wie die übrigen DNA Marker sind die für forensische Analysen annotierten SNPs des Y-Chromosoms im nicht-kodierenden Bereich lokalisiert, wodurch diese einen neutralen Status erhalten, ohne Relation zum Phänotyp des Individuums oder krankheitsassoziierte Eigenschaften. Mit einer Mutationswahrscheinlichkeit von etwa 2×10^{-8} je Basenpaar und Generation sind SNPs nur sehr selten von weiteren Mutationsereignissen, wie Rückmutationen, betroffen. Sofern nicht durch genetischen Drift beeinflusst, bleiben sie im Genpool der Nachkommenschaft erhalten, wodurch Verwandtschaftsbeziehungen unter Berücksichtigung des nahezu rekombinationsfreien Status des Y-Chromosoms nachvollzogen werden können.

Die evolutionäre Beziehung zwischen Y-SNPs und der Möglichkeit Abstammungslinien zu klassifizieren, kann in einem einzigen phylogenetischen Stammbaum nach dem Parsimonie-Prinzip dargestellt werden (Consortium et al., 2002; Karafet et al., 2008) (Abbildung 1.11). Die Wurzel des monophyletischen Stammbaumes und damit der Vorfahr aller heute existierenden Y-Chromosomen bildet der *Most Recent Common Ancestor* (MRCA) oder auch „Y-chromosomale Adam“ Dieser heute nicht mehr existierende Haplotyp weist sequenzspezifisch die ancestrale Allelvariante auf. Das geschätzte Alter des MRCA unter Annahme festgelegter spezifischer Parameter (neutrale Evolution, konstante lokale Mutationsraten, Generationszeiten von 25 – 35 Jahren, festgelegte Populationsgrößen) liegt bei 90 000 Jahren. Damit lebte der „Y-chromosomale Adam“ etwa 150 000 Jahre später als die „mitochondriale Eva“ (Roewer, 2008). Verzweigungen des monophyletischen Baumes werden durch mindestens einen klassifizierenden Y-SNP beschrieben, welche eine Abstammungslinie genealogisch repräsentieren. Anhand der genauen Typisierung vom ancestralen und durch Mutation erworbenen Allelstatus lassen sich Haplotypen ableiten und Haplogruppen konstruieren (Karafet et al., 2008). Die Bezeichnung der Haplogruppen folgt einer vorgeschriebenen Nomenklatur (Consortium et al., 2002). Folglich tragen die Hauptäste des Baumes alphabetisch geordnet Großbuchstaben (z. B. M) und alle Subgruppen werden alternierend mit Zahlen und Kleinbuchstaben (z. B. M1b1a) bezeichnet (Karafet et al., 2008). Der erste Nomenklatur vereinheitlichende phylogenetische Baum wurde 2002 von dem *Y-Chromosom Consortium* (YCC) veröffentlicht. Gegenwärtig besteht der Y-DNA *Haplogroup Tree* aus 20 Hauptästen bzw. Makrohaplogruppen, die das Gerüst des Baumes bilden und mit den Buchstaben A bis T benannt sind (Consortium et al., 2002; Van Geystelen et al., 2013). Nach *Van Geystelen et al.* (2013) finden sich in der aktuellen Version des Haplogruppenbaumes insgesamt 359 Haplogruppen einschließlich 721 Y-SNPs (Van Geystelen et al., 2013). Aktuelle Notationsänderungen und die Aufnahme zusätzlicher Subgruppen sind in entsprechend referenzierten Publikationen beschrieben (Hallast et al., 2015; Karmin et al., 2015).

Im Laufe der modernen Menschheitsgeschichte haben sich durch Migration und andere demografische Prozesse eine spezifische Struktur und Verteilung von Haplogruppen zwischen und innerhalb von Ethnien über kontinentale Grenzen hinaus gebildet, wodurch eine zufällige Verteilung ausgeschlossen wird (Underhill et al., 2001). Eine klare Strukturierung und regionale Zuordnung der Haplogruppen kann in Verbindung mit der Frequenz des Auftretens abgebildet werden. In diesem Zusammenhang ist die Häufigkeit des Vorkommens abhängig vom Ursprungsaufreten des zugehörigen SNPs und nimmt allmählich mit zunehmender Entfernung vom Kern ab. Weiterhin kann vom Kern einer hochfrequenten Haplogruppe von einer gerichteten und radialen Verbreitung ausgegangen werden (z. B. Roma-Population, Haplogruppe H). Der monophyletische Ychr. Stammbaum impliziert, ausgehend von der bereits beschriebenen *Out-of-Africa* Theorie, diese Auseinanderentwicklung durch seine Systematik. So sind die genealogischen Linien A und B, welche sich aus der Wurzel (Y-Adam) in der Phylogenie auftrennen, fast ausschließlich in afrikanischen Populationen zu finden. Weiter tiefer in der Systematik gliedert sich ein Cluster aus den drei Haplogruppen C, DE und F auf. In diesem Teil des Baumes befinden sich weitere afrikanische und alle nicht-afrikanischen Phylae (Underhill

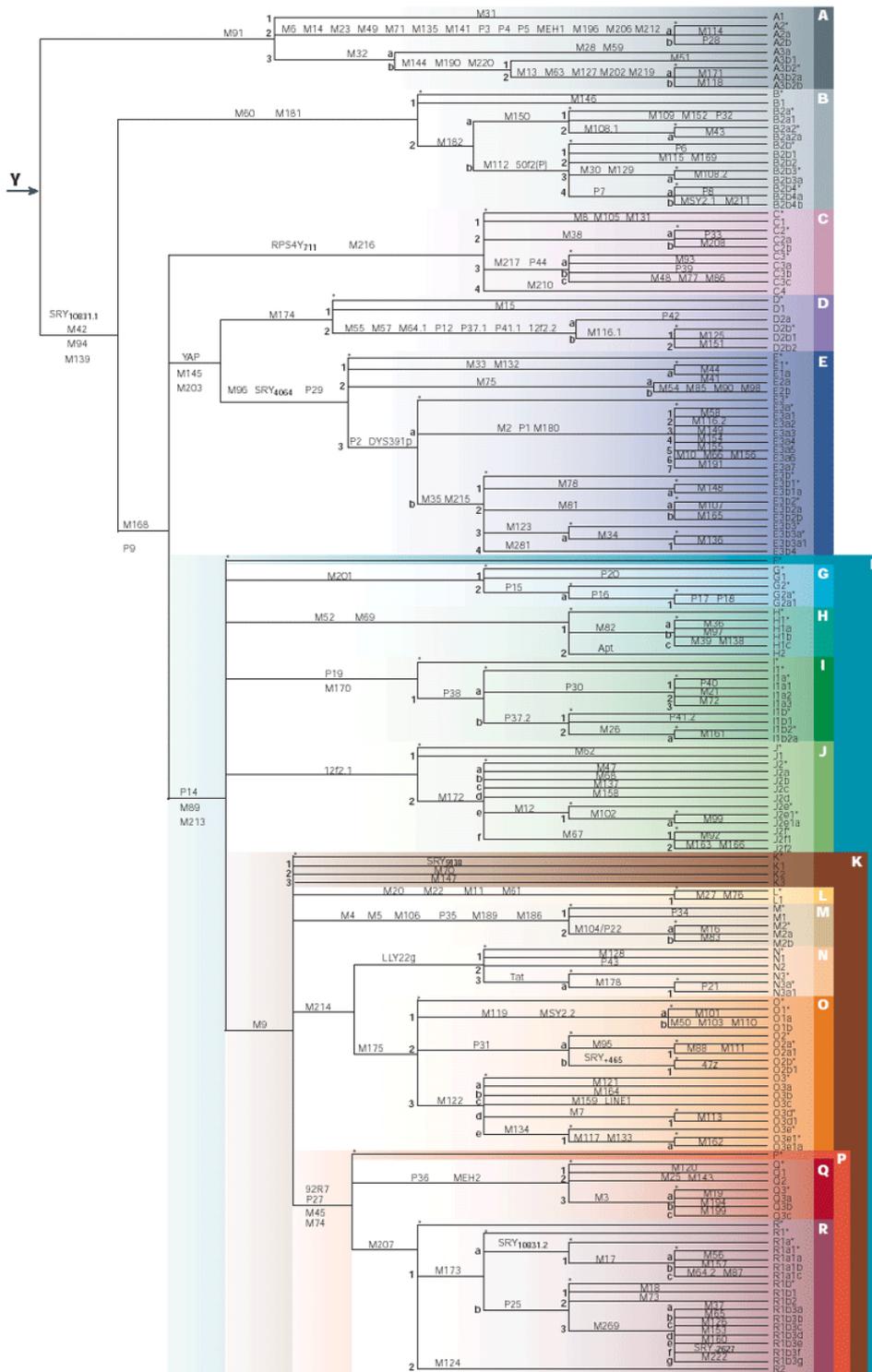


Abbildung 1.11: Monophyletischer Stammbaum des Y-Chromosoms (Deklariert als YCC2003) nach Jobling und Tyler-Smith (2003).

Der dargestellte monophyletische Stammbaum basiert auf dem Parsimonie-Prinzip und gliedert die Hauptäste (A – R) und spezifische Subhaplogruppen auf. Die dargestellte Phylogenie entspricht der Vorgabe des *Y Chromosome Consortium* (YCC). Jede binäre Verzweigung wird durch einen charakteristischen SNP gekennzeichnet, der zur Festlegung in eine Haplogruppe dient. Die Wurzel (Y „MRCA“) wird durch den ancestralen Y-chromosomal Haplotypen beschrieben. Paragruppen, welche durch keine spezifische Mutation erklärt sind, wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Die Astlängen repräsentieren nicht das Alter der Haplogruppen.

et al., 2001; Jobling et al., 2013). Die Haplogruppen C und D charakterisieren vorwiegend ostasiatische Populationen, während E sich auf Bevölkerungsgruppen des südlichen Europas, Afrikas und des westlichen Asiens verteilt. Eine stark differenzierte Linie mit Vorkommen außerhalb von Afrika ist die Haplogruppe F, einschließlich zugehöriger Untergruppen (G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T). Das heutige Europa wird vorrangig durch die Haplogruppen R, I, J und E dominiert. Zeitgeschichtlich können die Subhaplogruppen R1a und R1b mit der paläolithischen Besiedelung Europas vor 40 000 Jahren in Bezug gebracht werden. Die Besiedlung des zentralen und östlichen Südeuropas durch die neolithischen Haplogruppen E, I und J kann durch die Migration von Populationen aus dem Nahen Osten vor 10 000 Jahren erklärt werden (Roewer, 2008). Das Y-Chromosom weist im Vergleich zum autosomalen und mtDNA-Genom die stärksten genetischen Unterschiede mit zunehmender geographischer Distanz auf, wodurch auch regionale Differenzen über kurze Distanzen dargestellt werden können (Jobling, 2012).

1.6 Short Tandem Repeats (STRs)

Neben einem Großteil identischer DNA-Abschnitte sind lediglich 0,3 % des menschlichen Genoms einzigartig. Polymorphismen, die diese Einzigartigkeit hervorrufen, finden sich gerade in nicht-kodierenden Regionen und werden aufgrund der personenabhängigen Individualität im Rahmen von forensischen Identifizierungsmaßnahmen genutzt. Somit werden diese als Unterbrechungen der kodierenden Gensequenz (Exon) unabhängig von der Translation des primären RNA-Transkripts betrachtet (Madea, 2007) und die Heterogenität wird ausschließlich durch Mutationen und Rekombination erreicht. Zur Analyse genetischer Fingerabdrücke werden vorwiegend Fragmentlängenpolymorphismen untersucht. Diese sog. Satelliten-DNA lässt sich in Abhängigkeit von der Größe des polymorphen Sequenzbereiches in drei Stufen unterteilen. Als Satelliten bezeichnete DNA-Abschnitte treten ein bis zwei mal pro Chromosom auf und besitzen einen Wiederholungsgrad von $10^3 - 10^7$ im Genom. Die Länge der zu wiederholenden Einheit (Repeat) kann ein bis einige tausend Basenpaare betragen. Minisatelliten weisen einen geringeren Wiederholungsgrad bis max. 10^3 auf, wobei die Repeat-Länge zwischen 9 – 100 bp variiert. Die in Bezug auf den sich wiederholenden Sequenzabschnitt kleinsten Fragmentlängenpolymorphismen werden als Mikrosatelliten oder auch *Short Tandem Repeats* (STRs) bezeichnet. Der hier charakterisierte Repeat hat eine Länge von ca. 2 – 7 bp und tritt im Abstand von ca. 10 000 nt mit einer Frequenz von 1 – 100 tandemartigen Wiederholungen im Genom auf. Die Anzahl der Loci liegt bei ca. 105 pro Genom und variiert je nach Wiederholungsmotiv (Edwards et al., 1991; Collins et al., 2003; Subramanian et al., 2003; Krawczak et al., 1998). Für eine Person-zu-Person Unterscheidung werden vorrangig STRs, die eine tetramere Repeat-Struktur aufweisen, genutzt. Diese sind weniger anfällig für Stutter-Peaks, deren Auftreten auf eine Strangverschiebung während der PCR zurückzuführen ist und je nach Ausmaß den resultierenden Genotyp verfälschen können (Brinkmann et al., 1998). Die Gesamtheit der Motivwiederholungen am untersuchten Locus wird als Allel bezeichnet und gilt als individualisierendes Merkmal in der Genotypisierung. Infolge von Deletions- und Inser-

tionsereignissen können Veränderungen in der Repeatstruktur des jeweiligen Motivs auftreten, was zu detektierbaren Längenänderungen führt. Intraallelische Basensubstitutionen können mit fragmentlängenbasierten Analysemethoden, wie mit der Kapillarelektrophorese, nicht detektiert werden. Lediglich mittels *state-of-the-art* Sequenzierungstechniken wie NGS können Motivvarianten erkannt werden. Im Allgemeinen kann bei höherer Repeat-Anzahl von einer größeren meiotischen Instabilität und damit einhergehend von einer höheren lokusspezifischen Mutationsrate ausgegangen werden. Als Beispiel für die Entstehung von Mutationsereignissen kann ein intrahelikaler Mechanismus (*Slipped Strand Mispairing*) betrachtet werden, infolge dessen eine Fehlpaarung von Chromatiden während der Replikation hervorgerufen wird, welche den Verlust oder Zugewinn einzelner Motive bewirkt. Im Allgemeinen liegen die Mutationsraten für autosomale und gonosomale STRs zwischen $1,5 \times 10^{-2}$ pro Locus, pro Gamete, pro Generation (Aşicioğlu et al., 2004).

Die Amplifikation der STR-Sequenzen erfolgt in der Routine über kommerziell erhältliche Multiplex-Kits für die DNA-Analyse forensisch relevanter Spuren. Mithilfe der PCR und mit fluoreszenzmarkierten Primern werden mehrere STRs simultan in einen Ansatz amplifiziert. Die resultierenden Amplifikate weisen eine Länge von 100 – 500 bp auf und können z. B. kapillarelektrophoretisch halbautomatisch detektiert werden (Butler, 2007). Diese Assays sind sehr robust, präzise und bieten eine hohe Diskriminationsrate. Nach heutigem Standard wird basierend auf den Empfehlungen des *European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI) für eine Personenidentifikation das *Extended European Standard Set* (ESS) europäischer DNA-Profiling-Standard) genutzt. Dieses beabsichtigt nach aktuellem Standard die Amplifikation von möglichst 16 STR-Systemen sowie Amelogenin als geschlechtsspezifischer DNA-Marker, wodurch eine höhere Diskriminierungsrate im Person-zu-Person Vergleich erreicht werden kann (Schneider, 2009). Die Nomenklatur der STR-Allele erfolgt nach den Empfehlungen der *International Society for Forensic Genetics* (ISFG) (Gill et al., 1997). Wird davon ausgegangen, dass zur STR-Analyse aus einer forensischen Spur DNA in ausreichender Qualität und Quantität vorliegt, ist das Verfahren der STR-Analyse ein sicheres Mittel zur Genotypisierung. Anders verhält sich dieser Aspekt bei der Analyse von aDNA, bei der davon ausgegangen werden muss, dass in Abhängigkeit verschiedener Einflussfaktoren z. T. stark fragmentierte DNA vorliegt oder Inhibitoren das Verfahren stören. Gerade bei der Amplifikation größerer STR-Systeme mit Fragmentlängen > 300 bp können Phänomene wie *Allel dropouts* oder *Lokus dropouts* im STR-Profil auftreten (Alaeddini et al., 2010; Taylor und Buckleton, 2015). Hinzu kommt, dass bei STR-Analysen an historischem Ausgangsmaterial keine DNA zu Vergleichszwecken zur Verfügung steht, sodass ein individuelles STR-Profil durch mehrfach wiederholte Analysen bestätigt werden muss. Im Hinblick auf möglicherweise stark fragmentierte DNA können etablierte miniSTR Kits verwendet werden. Durch die Bindung von *forward* und *reverse* Primer nahe der Repeat-Region werden im Vergleich kürzere Amplikons erzeugt, um den Verlust von Allelinformationen zu vermeiden (Wiegand und Kleiber, 2001; Butler et al., 2003).

Zusätzlich zur o. g. Anzahl analysierter Systeme wird mindestens ein STR-unabhängiger Locus zur genotypischen Bestimmung des Geschlechts untersucht (z. B. Amelogenin). Der für das Amelogenin-Gen kodierende Sequenzabschnitt ist sowohl auf dem X-Chromosom (AMELX)

als auch auf dem Y-Chromosom (AMELY) lokalisiert. AMELX befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms zwischen Xp22.31 und Xp22.1. Hingegen ist der AMELY Locus an der chromosomalen Position Yp11.2 zu finden. Detektiert wird die Längendifferenz der Loci bezüglich der chromosomalen Ortung. Je nach fokussierter Targetregion unterscheiden sich die resultierenden Fragmentlängen. Üblicherweise wird das längere Target in standardisierten STR Kits, wie auch in dieser Arbeit, amplifiziert (AMELX/Y: 106/112 bp) (Abbildung 1.8). Die Geschlechtszuordnung erfolgt deshalb ausschließlich über das Vorhandensein oder Fehlen des 112 bp langen AMELY Peaks. Ein kritischer Punkt ist jedoch, dass das Genprodukt des Amelogeningens nicht für eine maskuline phänotypische Ausprägung notwendig ist. Diese erfolgt über das Vorliegen des Genprodukts des SRY-Gens. Der Wegfall dieses Genbereiches würde einen femininen Phänotyp verursachen. Auf Grund dessen muss ein positiver AMELY-Befund nicht unbedingt auf einen phänotypisch männlichen Verursacher schließen. Ebenso wenig wie bei einem negativen Befund des AMELY nicht automatisch auf eine weibliche Person zu schließen ist, da eine Aberration der SRY-Gene nicht in Verbindung mit AMELY stehen muss. Außerdem können Mutationen in Primerbindungsstellen einen Ausfall des AMELX bzw. AMELY Amplifikationsproduktes verursachen (Laberke et al., 2014; Michael und Brauner, 2004)

Y-chromosomale STR-Analyse

Y-STRs sind ausschließlich auf dem Y-Chromosom lokalisiert und entsprechen in ihrer Struktur autosomalen STRs. Für individualisierende und populationsgenetische Studien eignen sich aufgrund der Motiv- (3 – 6 bp) und Arraylänge (> 8 Repeats) weit über 200 Y-STRs (Roewer, 2008). STR-basierte Haplotypen sind bezüglich ihres Mutationsmechanismus nicht monophyletisch. Vor- und Rückmutationen können mit annähernd gleicher Frequenz an jedem Allel des Längenspektrums erfolgen. Ebenso kann eine zeitliche Abfolge von Mutationen aus beobachteten Haplotypvariationen nicht abgeleitet werden. Auf Grund der Vererbungsregeln des Y-Chromosoms ist eine exakte Individualisierung einer Probe mit Y-STRs jedoch nicht möglich. Ebenso kann bei einer Haplotypidentität zwischen mind. zwei Individuen ohne zusätzliche Informationen, wie z. B. der Haplogruppe, oft kein Unterschied zwischen *identity-by-state* oder *identity-by-descent* festgestellt werden. Dennoch lassen sich jüngste demografische Ereignisse, welche zu unterschiedlichen Haplotypstrukturen führen, mit Hilfe hochauflösender STR-Analysen nachweisen. Hohe Mutationsraten der Y-STRs von 2×10^3 je Meiose erlauben innerhalb von wenigen Generationen eine Vielzahl von Allelen, womit eine hohe Haplotypvariabilität einhergeht. Durch Einflüsse wie den genetischen Drift, demografischen Vorgängen, kulturellen und religiösen Verhaltensweisen oder räumlich-orientierte Familienstrukturen entwickeln sich unterschiedliche Haplotypools, welche eine geografische Kartierung ermöglichen. Ebenso können benachbarte Populationen angesichts unterschiedlicher Allelvarianten und Frequenzen differenziert werden. Methoden wie *Genetic Barrier Analysis*, genetische Distanzanalysen z. B. *Analysis of Molecular Variance* (AMOVA), Autokorrelationsanalysen und *Multidimensional Scaling Analysis* (MDS) ermöglichen die Konstruktion und Analyse von Haplotypclustern (Roewer, 2008) (Abbildung 1.12). Für populationshistorische Studien sollten jedoch aufgrund der speziellen Eigenheiten der Y-STRs zusätzlich

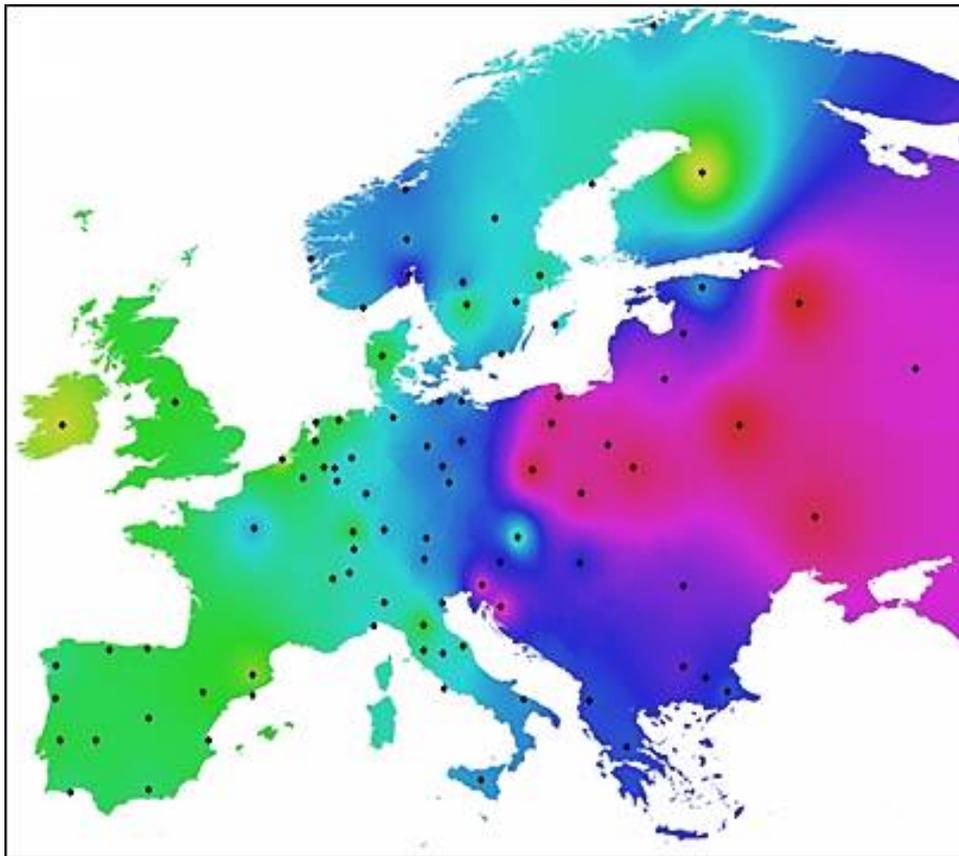


Abbildung 1.12: **Genetische Landkarte des Y-Chromosoms nach Roewer (2008).** Genetische Landkarte resultierend auf paarweisen ϕ_{st} -Werten (MDS-Analyse). Sichtbar ist eine deutliche Differentiation von West- und Osteuropa. Weiterhin lässt sich ein Osteuropäisches Cluster, welches Polen, Kroatien, Russland, Weißrussland, Ukraine, Slowenien, Lettland und Litauen umfasst, deutlich von anderen Populationen, aufgrund der genetischen Distanz, abgrenzen.

Informationen z. B. mit Y-SNPs herangezogen werden. Angesichts der großen Loci Vielfalt Ychr. STRs ist es notwendig ein entsprechend zuverlässiges Repository dem Nutzerkreis zur Verfügung zu stellen. Mit einem 1994 initiierten internationalen Projekt entstand die *Y Chromosome Haplotype Reference Database* (YHRD), welche die Auswertung Y-chromosomaler Haplotypdaten sowohl im forensischen Sektor als auch in der anthropologischen Forschung erleichtern sollte. Seit 2000 wird die Datenbank an der Berliner Charité kuratiert. Die YHRD verwaltet Daten aus umfangreichen Y-chromosomalen Populationsstudien, die für forensische und phylogeografische Studien genutzt werden können. Aktuell umfasst die Datenbank mehr als 160 000 geprüfte Y-chromosomale Haplotypen, welche auf der Grundlage von Y-STRs und z. T. mit Y-SNPs, auf populationsgenetischen Level, analysiert wurden (Release 49, 17.02.2015). Zur Ermittlung der Haplotypfrequenz kann eine web-basierte Anfrage mit dem ermittelten

Haplotypen aus der Probe gestellt werden. Im Ergebnis zeigt sich folglich die Verteilung und das Vorkommen des Haplotypen in entsprechenden Populationen oder Metapopulationen (Willuweit et al., 2007; Roewer et al., 2001).

Kapitel 2

Hypothesen und Fragestellungen

Die zugrundeliegende Aufgabenstellung (s. u.) lässt sich sehr deutlich in Verbindung mit der bisherigen Bearbeitungshistorie des Grabungsfundes begründen. Bestehende Erkenntnisse und Hypothesen konnten bis zu diesem Zeitpunkt nur auf der Grundlage einer anthropologischen und archäologischen Sichtweise formuliert werden. Um die entstandenen Lücken im Hinblick auf das biologische Profil der historischen Population nahezu rekonstruieren zu können, ist es notwendig aDNA-Analysen auf Basis autosomaler und uniparentaler Marker durchzuführen. Dadurch sollte es möglich werden eine Verknüpfung von klassischen, anthropologischen Herangehensweisen mit modernen Methoden herzustellen und Grenzen kritisch zu bewerten. Das Anliegen der vorliegenden Arbeit ließ sich unter Berücksichtigung mehrerer Teilaspekte erläutern. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit lag die initiale Untersuchung des Grabungsfeldes, beruhend auf molekulargenetischen Methoden zur Ermittlung des molekularen Geschlechtes und weiterer populationsspezifischer Informationen auf Grundlage von mitochondrialer DNA (mtDNA) und Y-chromosomaler DNA (Ychr.). Damit sollte das biologische Profil der Population im Hinblick auf den geografisch-ethnischen Hintergrund ergänzt werden. Auf Basis dieser Aufgabe ließen sich verschiedene Hypothesen aufstellen und im Zusammenhang stehende Fragestellungen ableiten. Im Folgenden werden die Hypothesen und assoziierte Fragestellungen definiert. Dabei ist zu erwähnen, dass diese nach keiner strikten Priorität geordnet sind.

Hypothese 1: Die Optimierung von Aufarbeitungsschritten erlaubt eine zielgerichtete Interpretation von aDNA-Ergebnissen in der forensischen Routinearbeit und Forschung.

Fragestellung 1.1: Ist der angestrebte Genotypisierungsworkflow für die Informationsextraktion der verfolgten Ziele geeignet?

Fragestellung 1.2: Sind die neuen Analyse Strategien PowerQuant[®] sowie Investigator[®] ESSplex SE QS Kit für die Schritte der Quantifizierung und STR-Analyse sinnvoll?

Fragestellung 1.3: Können diese Systeme für das Monitoring von DNA-Degradation und Inhibition verwendet werden?

Hypothese 2: Es ist möglich das genotypische Geschlecht der Einzelindividuen auf aDNA-Ebene mittels etablierter Technik zu bestimmen.

Fragestellung 2.1: Ist es möglich eine molekulargenetische Geschlechterbestimmung unter Berücksichtigung des Kit-internen Markers Amelogenin am aDNA Datensatz durchzuführen?

Fragestellung 2.2: Können bereits erlangte Ergebnisse auf Ebene der morphognostischen Geschlechterdifferenzierung mit diesen Resultaten bestätigt und ergänzt werden?

Fragestellung 2.3: Wie verhält sich dieses Ergebnis bezogen auf die Gesamtgeschlechterverteilung im untersuchten Stichprobenumfang und unter Einbeziehung der Aussage von Kleinecke (2011)?

Hypothese 3: Bei der Population handelte es sich um eine homogene, ansässige Bevölkerungsgruppe.

Fragestellung 3.1: Ist es möglich Haplotypen und Haplogruppen (Hg) mittels ausgewählter *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) uniparentaler Systeme (YChr., mtDNA) zu klassifizieren und den kulturellen Hintergrund ergänzend zu anthropologischen Aussagen zu stratifizieren? Grundlage dieser Fragestellung bildete eine Aussage aus der Arbeit von Kleinecke (2011) „Eine ethnische Zuordnung der Gruppe der hier bestatteten Menschen zu einem bestimmten Volk der Germanen, wie W. Götze sie vorgenommen hat, ist allerdings nicht möglich“

Fragestellung 3.2: Lassen sich populationsbezogene Besonderheiten im ermittelten Haplotypdatensatz und klassifizierten Hg statistisch beschreiben?

Hypothese 4: Die Gesamtverteilungen aus den ermittelten mitochondrialen und Ychr. Haplogruppen ähneln der heutiger Populationen des europäischen Raumes.

Fragestellung 4.1: Lassen sich in den Gesamtverteilungen spezifischer Hg im Grabungsfeld weitere Aussagen zur Verteilungsentwicklung einzelner Haplogruppen über die Zeit hinweg erkennen?

Fragestellung 4.2: Ist es möglich unter der Voraussetzung eines linearen Wachstums oder Abfalls in der Verteilung analysierter Hg ein Alter der historischen Population abzuschätzen?

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Studienmaterial

Für beabsichtigte DNA-Analysen wurde die am Untersuchungsort beherbergte Skelettsammlung aus der römischen Kaiser- und Völkerwanderungszeit einbezogen¹. Von den Untersuchungen ausgeschlossen wurden drei Gräber der Bronzezeit und analog die, welche keiner bestimmten Zeitstellung zugeteilt wurden. Grundlage für die Auswahl des Materials bildeten die Arbeiten von Kleinecke (2011); Jeraufke (2013) sowie der Umstand, dass die Sammlung nicht vollständig vorlag. Zur Erstellung eines genetischen Profils für das historische Skelettmaterial auf Basis autosomaler und gonosomaler Marker wurde vorhandenes Zahnmaterial, soweit vorhanden, verwendet. Auf eine Erweiterung der DNA-Analyse auf das *postcranielle* Skelett wurde zunächst verzichtet, um eventuell stattgefundenen Fehlzuordnungen von *Cranium* und *Postcranium* bei der Bergung und anschließender Erstaufnahme, auszuschließen. Arbeiten auf dem Gebiet der aDNA-Analyse von Mundorff und Davoren (2014) und Hollund et al. (2013) zeigten, dass extrahierbare aDNA aus historischem Zahnmaterial verglichen mit anderen *postcraniellen* Abschnitten eine höhere Qualität und Quantität aufweist (Hollund et al., 2013; Adler et al., 2011; Mundorff und Davoren, 2014). Dies lässt sich auf die bereits beschriebenen strukturellen Besonderheiten zurückführen. Wenn möglich wurde aus dem Oberkiefer Zahnmaterial entnommen. Bei vorhandenem Unterkiefer wurden ebenfalls Zähne isoliert. Bei anderen Fundnummern wurden eingangs mehrere Unterkiefer gelistet, deren Zugehörigkeit erst durch eine STR-Analyse geklärt werden konnte. Insgesamt wurde Zahnmaterial (vorwiegend *molare* und *prämolare* Zähne) von 55 Individuen weiter bearbeitet. Daraus resultierend, wurden 82 Einzelzahnproben mechanisch aufbereitet und DNA isoliert (Abbildung 3.1).

Im Folgenden ist der eingesetzte Probenumfang entsprechend des jeweilig untersuchten DNA-Systems, aufgeführt. Zu beachten ist, dass für die haploiden Marker ein z. T. minimierter Probensatz im Vergleich zur genannten Gesamtprobenzahl von 82 Proben, nach Beurteilung

¹Das Skelettmaterial wurde ohne Bedenken durch Herrn Dr. rer. nat. H. Bruchhaus für die angedachten molekulargenetischen Analysen übergeben. Notwendige Maßnahmen, die zur Entnahme von Knochenfragmenten und Zahnmaterial dienten, wurden mit Bedacht und weitgehend zerstörungsfrei durchgeführt.

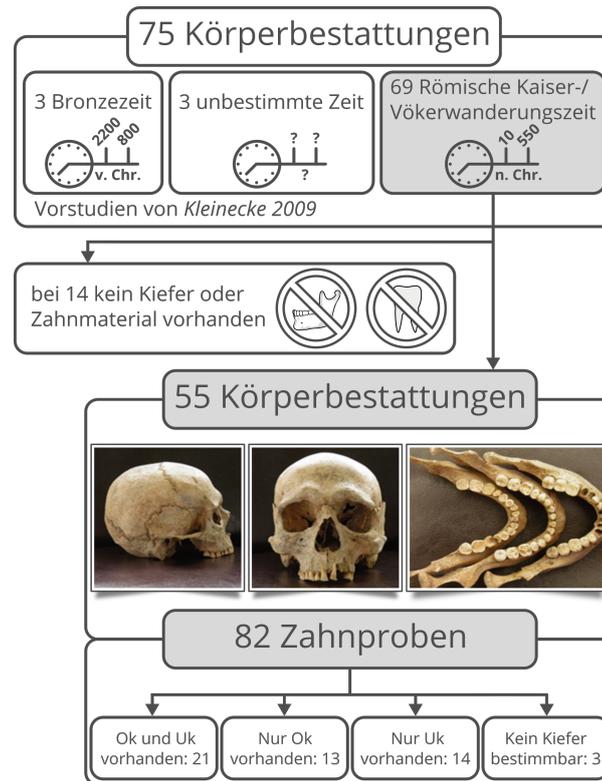


Abbildung 3.1: Gesamtumfang und Aufgliederung des Probenmaterials mod. nach Harthun et al. (2015).

Gezeigt ist die sukzessive Aufteilung des Gesamtprobenmaterials von Beginn bis zu nachfolgenden Aufarbeitungs- und Analyseschritten. Auf Grund divergenter Erhaltungszustände und z. T. mangelnden Materials konnte nur von 55 Körperbestattungen Zahnmaterial entnommen werden. Da zu einigen Körperbestattungen mehrere Kiefer in der Bestandsaufnahme gelistet wurden, fanden autosomale miniSTR-Analysen an insgesamt 82 Zahnproben statt. Aus 21 Individuen konnten Zähne aus Ober- und Unterkiefer entnommen werden. Bei 27 Proben konnte Zahnmaterial entweder nur aus Ober- bzw. Unterkiefer entnommen werden. Im Fall von vier Individuen lagen mehrere Unterkiefer vor.

Tabelle 3.1: Probenanzahl in Abhängigkeit des analysierten DNA-Systems..

Dargestellt ist die effektiv untersuchte Anzahl an Proben bezogen auf das eingesetzte Analysesystem. Bei eindeutiger Zuordnung von Ober- und Unterkiefer wurde im Falle einer mtSNP-Analyse auf eine Doppelbestimmung verzichtet.

Analysen	Anzahl untersuchter Proben
Autosomale STR-Analyse (PowerPlex [®] S5), AMEL	82
Ychr-STR (PowerPlex [®] Y23 System)	43
mtSNPs (Paneto et al., 2011)	59
Y-SNPs (Wei et al., 2013; Kohl et al., 2009)	43

erster Resultate aus der Geschlechtsbestimmung und autosomalen STR-Analyse (Tabelle 3.1), verwendet wurde. Nach einer ersten Auswertung der autosomalen miniSTR-Ergebnisse, konnte die Zugehörigkeit von Unterkiefer zu einem Oberkiefer, geklärt werden.

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchslösungen

Die folgenden tabellarischen Auflistungen umfassen erforderliche Chemikalien für die Arbeitspakete: Demineralisierung, DNA-Extraktion, DNA-Quantifizierung (genomische DNA gDNA), STR-Analyse und SNP-Analyse (mtDNA und Ychr.) (Tabellen 3.2, 3.3, 3.4).

Tabelle 3.2: Demineralisierung und Zellyse.

Chemikalien und Lösungen	Bestandteile	Hersteller
0,5 M Ethylendinitrioltetraessigsäure (EDTA)-Lösung (pH 7,5)	Triplex [®] III (Ethylendinitrioltetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat) Natriumhydroxid (NaOH) Aqua dest	MERCK, Darmstadt MERCK Braun, Sempach
Dithiothreitol	DTT	SERVA, Heidelberg
First-DNA all tissue kit		Gen-ial, Troisdorf
<i>Proteinase K</i> (c = 20 mg/mL)	EC 3.4.21.14, 100 mg Lyophilisat, 30 U/mg, EC 3.4.21.14	MERCK

Tabelle 3.3: DNA-Quantifizierung und DNA-Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform Isoamylalkohol (PCI).

Chemikalien und Lösungen	Bestandteile	Hersteller
Quantifiler [®] Human DNA Quantification Kit		Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Rothi [®] Phenol		ROTH, Karlsruhe
Chloroform/Isoamylalkohol (v/v 24:1)		ROTH
abs. Ethanol (EtOH)		J.T. Baker
TN-Puffer	Aqua dest Tris(hydroxymethyl)-aminomethan HCL (37 % – 38 %) 5M Natriumchlorid (NaCl)	Braun SERVA J.T. Baker Kmf optiChem
AE-Elution Buffer	10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA (pH 9,0)	QIAGEN, Hilden

Tabelle 3.4: Prä-PCR, Post-PCR, Minisequenzierung und Fragmentlängenanalyse.

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Amplificationwater	Promega, Madison, USA
MgCl ₂	Applied Biosystems, Weiterstadt
PCR Gold buffer	
AmpliTaQ Gold [®] (5 un/ μ L)	Thermo Fisher Scientific [™]
Bovine serum albumin	Thermo Fisher Scientific [™]
Oligonukleotide (PCR)	BioTeZ, Berlin-Buch GmbH
Multiplex-PCR-Kit	QIAGEN, Hilden
SNaPshot Multiplexkit [®]	Thermo Scientific [™]
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP 1 un/ μ L)	Affymetrix, Kalifornien, USA
Exonuclease I (EXO I 10 un/ μ L)	Affymetrix
Genescan [™] - 120 LIZ [™] Size Standard	Applied Biosystems, Weiterstadt
Hi-Di [™] Formamid	Applied Biosystems
PowerPlex [®] S5 System	Promega
PowerPlex [®] Y23 System	Promega

3.1.3 Primersequenzen Y-SNPs und mtSNPs

Alle eingesetzten Oligonukleotide für die aufeinanderfolgenden PCR Schritte (PCR1: Multiplex-PCR, PCR2: lokusspezifische *Single base extension* (SBE) *reaction* sind den Tabellen A.1, A.2, B.1 und B.2 im Anhang A und B der Arbeit zu entnehmen (S.149, 153). Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Biotez. Für die Ychr. SNP-Analysen konnte ein großer Anteil an Sequenzen aus der Arbeit von Kohl et al. (2009) übernommen werden. Für die zusätzlichen Loci mussten jedoch neue Sequenzen für die relevanten Amplifikationsschritte generiert werden (Tabellen A.1 und A.2). Die Gesamtanzahl untersuchter Y-SNPs (52) wurde auf vier Systeme aufgeteilt (System 1 – System 4). Als Grundlage dienten die publizierten Y-SNPs aus Kohl et al. (2009). Dieses Set wurde im Verlauf der Literaturrecherche durch weitere zehn Positionen aus der Arbeit von Wei et al. (2013) ergänzt. Für die zehn Loci mussten notwendige Primersequenzen für beide PCR-Schritte neu erstellt werden. Bereits vorliegende Primersequenzen, Amplifikationslängen und Bezeichnungen wurden den Literaturstellen Kohl et al. (2009) und Wei et al. (2013) entnommen. Die Ausgangskonzentration der Primer variierte zwischen 50 μ M und 100 μ M. Das Primerdesign erfolgte unter Berücksichtigung der Vorgaben und Hinweisen von Sanchez und Endicott (Sanchez und Endicott, 2006). Resultierende Ampli-

fikatlängen für alle vier Systeme lagen zwischen 79 bp und 188 bp. Entsprechende Sequenzen und Amplifikatlengthen für die mtDNA Analyse wurden aus der Publikation von Paneto et al. (2011) bezogen. Die 42 Positionen konnten im finalen Reaktionsansatz durch eine Optimierung chemischer Reaktionsbedingungen in einem Multiplexansatz gemeinsam amplifiziert werden, sodass keine Systemeinteilung erfolgte (Tabellen B.1 und B.2). Resultierende Amplifikatlengthen lagen unter Berücksichtigung des u. s. Primerdesigns bei 56 – 196 bp. Die Ausgangskonzentration der Primer lag nach Synthese bei 50 μ M. Diese wurden unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen im Assay modifiziert.

3.1.4 Geräte und Software

Im folgenden Abschnitt werden notwendige Geräte und Software für die Arbeitspakete: Aufarbeitung und Zerkleinerung des Skelettmaterials, DNA-Extraktion und Aufreinigung aus dem biologischen Material und SNP-Analyse, genannt (Tabellen 3.6 und 3.5).

Tabelle 3.5: **Verwendete Geräte.**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kugelmühle	MM200	Retsch, Düsseldorf
Autoklav	Autoklav23	Melag, Berlin
Hartschnittmikrotom	PolycutS	Reichert-Jung, Nussloch
Überkopfschüttler	neo-Lab-Rotator	neo-Lab, Heidelberg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424	eppendorf, Hamburg
Vakuumpzentrifuge	Concentrator 5301	eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Universal 320	Hettich, Weiterstadt
Wärmeschrank	HERAEUS [©]	Thermo Scientific
Wasserbad	SW22	Julabo, Seelbach
Thermocycler	T3000	biometra, Goettingen
Thermocycler	GeneAmp [®] PCR-System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermoblock	TRIO-Thermoblock	biometra, Goettingen
Schüttler	VORTEX-GENE 2	Scientific Industries, New York, USA
Sequencer (CE)	ABI PRISM [™] 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Feinwaage	CP2245	Sartorius, Göttingen
UV-Lampe	TA 150	Solimed-Quarzlampen, Markkleeberg
UV-Schrank	DNA/RNA UV-CLEANER UCV C/T-M-AR	Kisker, Steinfurt

Tabelle 3.6: **Verwendete Software.**

Gerätesoftware	Hersteller
Data collection ABI PRISM™ 310	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneMapper® ID-X 2.0	Applied Biosystems, Weiterstadt
Foundation Data collection 3.0 ABI PRISM™ 3130	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneMapper® ID-X 1.01	Applied Biosystems, Weiterstadt

3.2 Methoden

3.2.1 Dekontaminationsmaßnahmen

Um das Risiko von Kreuzkontaminationen und Kontamination mit moderner DNA zu verringern, erfolgte eine räumliche Trennung für die Arbeitsschritte im Prä- und Postamplifikationsprozess. Des Weiteren wurden alle eingesetzten Gefäße und Materialien nach jedem Probenaufarbeitungsschritt für 24 h mit kurzweiligem UV-C-Licht bestrahlt und alle Geräte sowie Oberflächen mehrfach mit DNA-Exitus (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Um Kreuzkontaminationen bestmöglich zu vermeiden wurde das Zahnmaterial pro Individuum in getrennten Räumlichkeiten bearbeitet. Jedes DNA-Profil wurde zudem mit bereits im Voraus angelegten DNA-Profilen aller Labormitarbeiter abgeglichen.

Das folgende Schema fasst alle Etappen einer fragestellunggebunden Analyse von autosomalen und uniparentalen Markern zusammen (Abbildung 3.2).

3.2.2 Probenpräparation und mechanische Zerkleinerung

Eingangs wurde das Zahnmaterial zunächst auf Eignung für die DNA-Analyse geprüft. Stark z. B. durch Karies verändertes oder beschädigtes Zahnmaterial wurde ausgeschlossen. Falls vorhanden, wurden festsitzende *Molare* aus Ober- sowie Unterkiefer entnommen und folgend von Anhaftungen mit einem Handschleifer befreit. In diesem Zusammenhang sollte durch diesen ersten Reinigungsschritt eventuell adsorbierte moderne DNA beseitigt werden. Des Weiteren erfolgte die Entfernung der Zahnkrone, sodass lediglich die Zahnwurzel für Folgeschritte verwendet wurde. Ein präzises Vorgehen bei der Probenreinigung war bei diesem historischen Skelettmaterial unbedingt notwendig, da vorhergehende Dekontaminationsmaßnahmen während der archäologischen und anthropologischen Begutachtung nicht mehr nachzuvollziehen waren. Nach der initialen Oberflächenreinigung wurden die Zähne mit 99 % igem Ethanol benetzt, getrocknet und mit kurzweiligem ultraviolettem Licht (UV-C) bestrahlt, um eine Degradation von materialfremder, moderner DNA zu induzieren. Zur Vergrößerung der Probenoberfläche und analog der Angriffsfläche für notwendige Chemikalien, wurde das Präparat

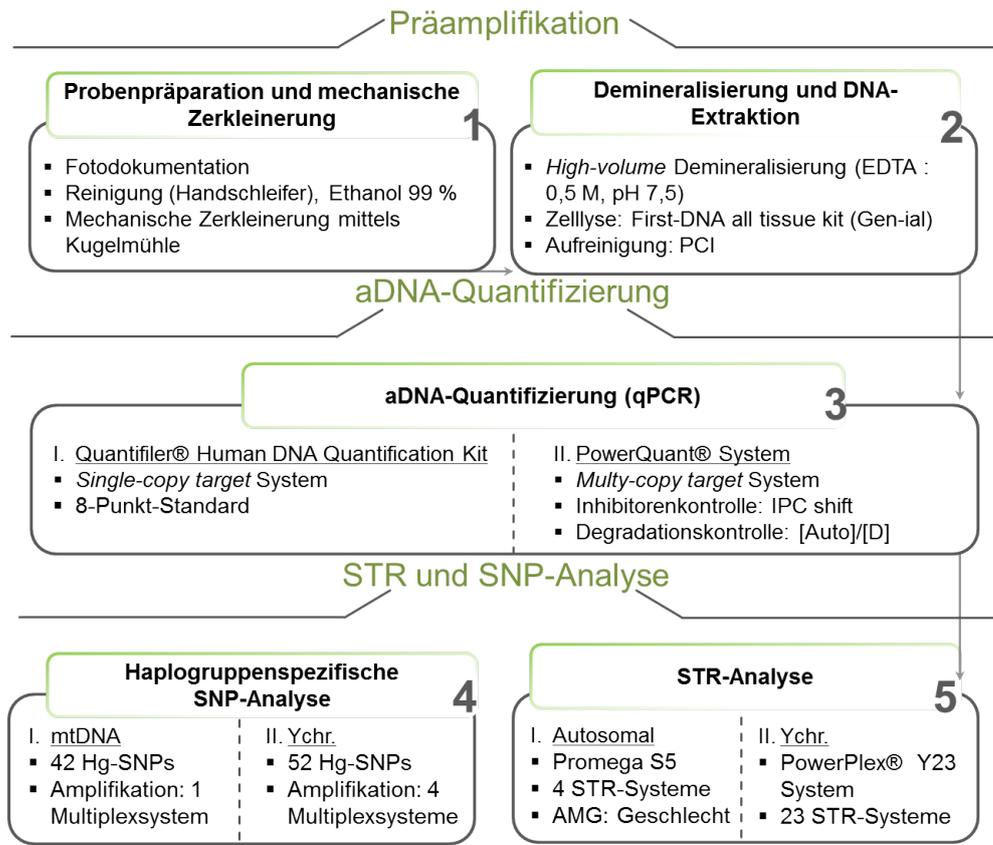


Abbildung 3.2: **Überblick Arbeitsschritte.**

Dargestellt sind die durchgeführten Arbeitsschritte von Probenpräparation über aDNA-Quantifizierung bis hin zur SNP und STR-Analyse. Für jede Etappe sind die genutzten Analyse-systeme angegeben.

in eine Kugelmühle gegeben. Mit einer Frequenz von 30 Einheiten/s wurde das Zahnmaterial in 30 s Intervallen innerhalb dieses Arbeitsschrittes bearbeitet. Der Zerkleinerungsprozess wurde zur Abkühlung des Präparates wiederholt unterbrochen, um künstliche Degradationser-scheinungen an der DNA zu vermeiden. Auf Grund kristalliner Strukturbesonderheiten sind Zähne und auch Knochen schlechte Wärmeleiter, wodurch es bei der Bearbeitung des Materials durch Reibung oder anderen Energieeintrag zu erhöhten Temperaturen innerhalb des Materials kommen kann (Adler et al., 2011).

3.2.3 Demineralisierung, aDNA-Extraktion und Aufreinigung

Das methodische Vorgehen und die Auswahl einer geeigneten Demineralisierungs- sowie DNA Isolationstechnik erfolgte unter Berücksichtigung eines vermutlich hohen Degradationsgrades extrahierbarer DNA aus dem historischen Material. Nicht selten ist dazu mit einem Vorliegen von Inhibitoren, insbesondere bei lang gelagertem Material, zu rechnen (Alaeddini et al., 2010; Alaeddini, 2012; Boles et al., 1995; Putkonen et al., 2010). Um eine möglichst hohe

DNA-Ausbeute und eine sensitive Methodik für die Entfernung möglicher PCR-Inhibitoren zu erreichen, wurde zunächst eine vollständige *high-volume* Demineralisierung mit anschließender Zellyse nach dem Protokoll aus dem First-DNA all tissue kit (Gen-ial) durchgeführt. Die DNA-Isolation und Aufreinigung erfolgte nach der Methodik einer klassischen organischen Phenol-Chloroform/ Isoamylalkohol (PCI) Isolation. Für die DNA-Extraktion aus historischen Knochen bzw. Zähnen haben sich in den vergangenen zwei Dekaden drei Verfahren besonders bewährt: Phenol-Chloroform, silica-basierte Methoden und die Ultrafiltration (Loreille et al., 2007; Hoff-Olsen et al., 1999; Hochmeister et al., 1991). Die Erfahrung mit einer organischen Extraktionstechnik (z. B. PCI) hat gezeigt, dass bei o. g. Material mit einem PMI > 100 Jahren die Ausbeuten an aDNA relativ hoch sind. Weiterhin ist das resultierende Isolat über einen längeren Zeitraum lagerungsfähig. Jedoch ist die Methode sehr zeitaufwendig und der Einsatz von toxischen Substanzen erfordert entsprechende Vorsichtsmaßnahmen (Köchler et al., 2005).

Während der Dekalzifizierung wird das Hydroxylapatit der Zähne aufgespalten und somit endogene DNA freigelegt. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) fungiert dabei als Komplexbildner, das besonders stabile Chelatkomplexe mit zweifach geladenen Kationen, wie Kalzium, eingehen kann (Scelza et al., 2003). Sowohl Kalzium-Ionen als auch der Komplexbildner EDTA können als Inhibitoren während der PCR wirken indem u. a. die Prozessivität der DNA-Polymerase beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund ist die Aufeinanderfolge mehrerer Waschschriffe essentiell (Al-Soud und Rådström, 2001). Die Zellyse und Entfernung von Verunreinigungen erfolgte mit im Kit enthaltenen Lysepuffern, der Verwendung von Proteinase K und Dithiothreitol (DTT). Proteinase K denaturiert Proteine indem die Peptidbindungen an den Proteinenden angegriffen werden. DTT wiederum zerstört die Proteinfaltung durch Reduktion der strukturstabilisierenden Disulfidbrücken und dient ebenso zur Beseitigung von Proteinen. Das Prinzip der PCI-Methodik basiert auf einer durch Phenol induzierten Phasentrennung organischer und anorganischer Lösungsbestandteile. Daneben wird eine Denaturierung von Proteinen bewirkt. Die obere hydrophile Phase enthält wasserlösliche Nukleinsäuren (Köchler et al., 2005; Hoff-Olsen et al., 1999). Eine zweite, organische Phase wird durch in der Lösung zurückbleibendes Phenol und lipophile Substanzen gebildet. Denaturierte Proteine sammeln sich durch hydrophile und hydrophobe Aminosäurereste in einer zwischen der organisch und anorganisch befindlichen Intermediärphase an. Chloroform bewirkt eine Stabilisierung der Phasengrenzen, sodass einer Verunreinigung der Probe durch Phenol entgegengewirkt wird. Zugewetztes Isoamylalkohol verhindert eine Schaumentwicklung in der organischen Phase (Mülhardt, 2009). Nach einer Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol und Natriumacetat wird das erhaltene Präzipitat in TE-Puffer gelöst und durch einen weiteren Schritt der Dialyse von störenden Salzen gereinigt. Im praktischen Ablauf der Demineralisierung und Zellyse wurde jeweils die vollständige Menge an resultierendem Zahnmehl (0,23 – 2,02 g) zuerst in 50 mL Gefäße überführt und anschließend in einem Zeitfenster von 12 h Abständen mit jeweils 25 mL frischem EDTA (0,5 M; pH 7,5) überschichtet. Die Gefäße wurden folgend im Kühlschrank in einem Überkopfschüttler bei 4 °C bis zum nächsten EDTA Wechsel rotiert und gelagert. Für einen EDTA-Wechsel wurde das Gemisch bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das Pellet wurde daraufhin erneut mit 25 mL EDTA

überschichtet. Der Dekalzifizierungsprozess dauerte drei Tage. Beendet wurde der Prozess durch Herauswaschen des Chelatkomplexes aus der Probe, indem das Pellet-EDTA-Gemisch erneut zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen wurde. Das erhaltene Pellet wurde anschließend mit 30 mL Aqua dest. versetzt, aufgeschüttelt und erneut 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt viermal durchgeführt. Das erhaltene Pellet wurde daraufhin mit dem All-tissue DNA Kit weiter bearbeitet. Für die Lyse der Zellbestandteile wurde das Pellet mit 1000 μL des Lyse1-Puffers und 100 μL des Lyse2-Puffers aus dem Kit überschichtet. Des Weiteren wurden 25 μL einer frisch hergestellten 1 M DTT-Lösung und 50 μL Proteinase K hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde daraufhin über Nacht bei 56 °C in einem Wasserbad mit eingeschalteter Schüttelfunktion (90 rpm) inkubiert. Nach Zellyse wurden zur Lösung 750 μL Lyse3-Puffer pipettiert. Anschließend wurde die Probe leicht vermischt und gegebenenfalls durch entstandene Schaumbildung kurz anzentrifugiert. Die Menge des entstandenen Lysats wurde gleichmäßig (jeweils 1 mL) auf 2 mL Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur Weiterbearbeitung bei -20 °C gelagert (GEN-IAL, 2000).

Für diese Arbeit wurde ein optimiertes Verfahren der organischen Phenol-Chloroformextraktion unter Berücksichtigung beschriebener Standardextraktionsprotokolle aus der Literatur angewandt (Yang et al., 1998; Kolman und Tuross, 2000; Ambers et al., 2014). Die 1 mL Lysate wurden für die PCI mit ebenfalls 1 mL Phenol versetzt. Das Gemisch wurde per Hand kurz durchmischt und anschließend bei Raumtemperatur für 15 min im Rotor inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 3000 rpm. Die obere Phase des Phasengemisches wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 500 μL Phenol und 500 μL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v), versetzt. Dieses Gemisch wurde ebenfalls erst mit der Hand kräftig und anschließend weitere 15 min gleichmäßig bei Raumtemperatur durchmischt. Nach der Durchmischung wurden die Proben 15 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde die oberste Phase abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser klaren Flüssigkeit wurde 1 mL Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben. Auch nach der Zugabe von 1 mL Chloroform/Isoamylalkohol wurde das Gemisch erst per Hand und anschließend 15 min per Rotor durchmischt. Ebenso fand auch nach diesem Schritt eine Zentrifugation für 15 min bei 3000 rpm statt. Die noch gelöste DNA wurde mittels Ethanol präzipitiert. Dafür wurde die oberste Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sowohl mit 1 mL abs. Ethanol als auch 40 μL 5 M NaCl versetzt. Das entstandene homogene Gemisch wurde 1 h bei -20 °C inkubiert. Im darauf folgenden Schritt wurde die Probe 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die präzipitierte DNA sammelte sich in einem Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde weitestgehend entfernt, so dass das Pellet anschließend bei 37 °C getrocknet werden konnte. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 50 μL TE-Puffer gelöst und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Abschließend erfolgte eine Art Dialyse zur weiteren Aufreinigung und Entsalzung. Dabei wurde das DNA-Isolat auf eine semipermeable Membran gebracht, wodurch weitere PCR-Inhibitoren entfernt werden sollten. Für diesen Schritt wurden Mini-Petrischalen zur Hälfte mit TN-Puffer befüllt und dieser mit einer semipermeablen Membran bedeckt. Die Proben wurden tropfenweise (jew. 25 μL) auf die

Membran aufgebracht und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Tropfen wieder aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Tropfenstellen auf der Membran wurden mit 5 μL Aqua dest. gespült, so dass eine fast vollständige Aufnahme der DNA von der Membran gewährleistet wurde. Das entstandene DNA-Isolat wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.2.4 aDNA-Quantifizierung

Für die Bestimmung des mengenmäßigen Anteils extrahierter aDNA wurden zwei Systeme beruhend auf dem Prinzip der quantitativen real-time PCR genutzt. Unterschiedliche Systemkonfigurationen sollten vor diesem Hintergrund auf Eignung für die Quantifizierung potentiell stark degradierter DNA geprüft werden. Umstände wie degradationsbedingte Templatemodifikationen und das Vorliegen von Inhibitoren bedingen die Anwendbarkeit von kommerziellen Quantifizierungssystemen in der aDNA Analytik. Eingesetzt und geprüft wurde das gerade in der forensische Routine häufig verwendete Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Life Technologies[™], Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten). Dieses beruht auf einer 5'-Nuklease real-time Technologie (Biosystems, 2000; Green et al., 2005). Zum Einsatz kommen hier sowohl zwei targetspezifische PCR-Primer als auch TaqMan[®]-Sonden mit spezifisch markierten Fluorochromen (Reporter und Quencher-molekül). Zusätzlich zur 3'-Markierung ist die Sonde an diesem Ende durch ein MGB-Molekül chemisch modifiziert (Afonina et al., 1997). Eine interne positive Kontrolle (IPC, engl. *internal positive control*) dient zur Inhibitionskontrolle. Weiterhin wurde das PowerQuant[®] (Promega, Fitchburg, Madison, Vereinigte Staaten) Kit genutzt (Lee et al., 2014). Durch dieses *multicopy-target* System ist es möglich sowohl den Anteil autosomaler als auch Y-Chromosomaler DNA zu bestimmen. Des Weiteren soll durch ein als Degradationstarget bezeichnetes Fragment der Fragmentierungsgrad des DNA-Templates bestimmt werden. In der folgenden Tabelle werden die Unterschiede zwischen beiden Systemen detailliert aufgeführt (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: **Systemeigenschaften DNA-Quantifizierung nach Biosystems (2000); Promega (2015a).**

Dargestellt sind systemspezifische Targets und zugehörige Größen.

Target	Quantifiler Human [®]	PowerQuant [®]
autosomal	62 bp	84 bp
Y-chr.	-	81 bp und 136 bp
Degradation	-	294 bp
IPC	79 bp	435 bp
Prinzip	<i>single-copy target</i> (8-Punkt-Standard)	<i>multi-copy target</i> (4-Punkt-Standard)

Tabelle 3.8: Reaktionsansatz DNA-Quantifizierung.

System	Komponente	Volumen/Reaktion [μL]
Quantifiler Human[®]	Quantifiler [®] Primer Mix	10,5
	Quantifiler [®] PCR-Reaktions Mix Probe/Standard/IPC	12,5 2
PowerQuant[®]	PowerQuant [®] 2x Master Mix	10
	PowerQuant [®] 20x Primer/Sonde/IPC Mix	1
	Probe	2
	Amplifikationswasser	7

Die Reaktionsansätze erfolgten nach den Standardvorgaben (Tabelle 3.8). Zur Analyse beider Systemansätze wurde das Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System verwendet. Für die Auswertung der Ergebnisse stand dem Nutzer eine systemeigene SDS Oberfläche zur Verfügung. Des Weiteren besteht die Möglichkeit ein firmeneigenes Analysetool zur Vorbereitung der Prä- und Postamplifikation für die STR Analyse anhand der Quantifizierungsdaten zu nutzen. Dabei handelt es sich um ein Excel-Datenblatt mit integrierten Makros. Mit diesem können u. a. Quotienten zur Ermittlung von DNA-Mischungen bzw. der Degradationsgrad des DNA-Templates berechnet werden.

3.2.5 Autosomale STR-Analyse

Zur genotypischen Geschlechtsbestimmung wurde das miniSTR-Kit Powerplex[®] S5 (Promega) genutzt. Neben der Bestimmung des geschlechterspezifischen Markers Amelogenin wurde ein Individualisierungsmuster anhand von vier STR-Systemen (D18S51, D8S1179, TH01, FGA) bestimmt. In der Annahme, dass isolierte aDNA fragmentiert vorlag, sollte durch den Einsatz dieses Systems u. a. die Qualität der aDNA geprüft werden. In diesem Zusammenhang war es ebenfalls notwendig die Reaktionsbedingungen für Prä- und Postamplifikation zu modifizieren (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Reaktionsbedingungen Prä- und Postamplifikation, PowerPlex[®] S5.

Präamplifikation	Volumen/Reaktion μL
Amplifikationswasser	-
PowerPlex [®] S5 Master Mix (5x)	5
PowerPlex [®] S5 Primer Pair Mix (10x)	2,5
Template-DNA (max. 150 pg)	max.17,5
Reaktionsvolumen 25	
Postamplifikation	
Hi-Di [™] Formamid (Life Technologies [™])	10
Internal Lane Standard ILS 600	0,25
DNA/ Allelleiter	1
Reaktionsvolumen 11,25	

Die max. einzusetzende aDNA-Menge richtete sich nach den Quantifizierungsergebnissen und wurde standardisiert auf 150 pg festgelegt. Analog erfolgte bei sehr niedrigen Signalverhältnissen im Profil eine Erhöhung der Zyklenzahl (max. 34 Zyklen). Nach der Amplifikation erfolgte die Fragmentlängenanalyse auf dem Sequenzer ABI PRISM[®] 310 und die Analyse der Ergebnisse mit der GeneMapper[®] ID Software 2.0 (PROMEGA CORPORATION 2012). Die Amplifikation erfolgte nach dem Protokoll in Tabelle 3.10.

Tabelle 3.10: Amplifikationsprotokoll PowerPlex[®] S5.

Temperatur [°C]	Zeitschritte	Zyklenzahl
96	2 min	
94	30 s	
60	120 s	32-34 Zyklen
72	90 s	
60	45 min	
4	∞	

3.2.6 Y-chromosomale STR-Analyse

Die dargestellten Methoden für die Ychr. STR- und SNP Analysen wurden zur Unterstützung der vorliegenden Zielstellung im Rahmen einer betreuten Masterarbeit (siehe Auflistung betreuter Abschlussarbeiten) durchgeführt. Ergebnisse aus dieser Studie wurden 2015 gemeinsam publiziert (Harthun et al., 2015).

Für eine Y-chromosomale Individualisierung wurde das PowerPlex[®] Y23 Kit (Promega) verwendet. Auch an dieser Stelle wurden die Reaktionsbedingungen an das historische Material angepasst (Tabelle 3.11). Die Fragmentlängenanalyse erfolgte auf dem Sequenzer ABI PRISM[®] 3130 unter Standardbedingungen. Eine Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der GeneMapper[®] ID Software 1.0.1. Unter Zuhilfenahme Ychr. Daten erfolgte weiterhin eine Beschreibung der historischen Population durch Berechnung populationspezifischer Variablen (Gendiversität, Haplodiversität, Diskriminationskapazität, Haplotypfrequenz und Allelfrequenz) (siehe Kapitel 4.4.2). Auf eine Haplogruppenbestimmung auf Basis der PPIY23 Ergebnisse wurde aufgrund der Inkonsistenz der Marker gegenüber Y-SNPs verzichtet. Die Amplifikation erfolgte nach dem Protokoll in Tabelle 3.12.

Tabelle 3.11: Reaktionsbedingungen Prä- und Postamplifikation, PowerPlex[®] Y23.

Präamplifikation	Volumen/Reaktion μL
Amplifikationswasser	-
PowerPlexY23 [®] Master Mix (5x)	5
PowerPlex [®] S5 Primer Pair Mix (10x)	2,5
Template-DNA (max. 150 pg)	max. 17,5
	Reaktionsvolumen 25
Postamplifikation	
Hi-Di [™] Formamid (Thermo Fisher)	12
Internal Lane Standard ILS 500	0,5
DNA/ Allelleiter	1
	Reaktionsvolumen 13,5

Tabelle 3.12: Amplifikationsprotokoll PowerPlex[®] Y23.

Temperatur [°C]	Zeitschritte	Zyklenzahl
96	2 min	
94	10 s	
61	60 s	32-34 Zyklen
72	30 s	
60	20 min	
4	∞	

3.2.7 Y-SNPs: Auswahl, Primerdesign, Fokussierung, Multiplexanalyse

Die Möglichkeit simultan eine Vielzahl von SNPs in einem kurzen Zeitfenster zu detektieren hat die mittlerweile etablierte Methodik einer SNaPshot-Minisequenzierung zu dem Mittel der Wahl für eine zielgerichtete Haplogruppenklassifikation gemacht. Das Potential dieser Herangehensweise im Feld Forensik und Populationsgenetik wurde in den letzten zwei Dekaden durch die Publikation einer Reihe von Studien wie z. B. von Köhnemann et al. (2008); Grignani et al. (2009); Nohira et al. (2010) bekannt gemacht. Verglichen mit anderen Verfahren, wie z. B. Affymetrix, SNP-Plex und Illumina Sequenzierung werden nur geringe Mengen an DNA in der PCR benötigt. Die Erzeugung und folgende Auftrennung kurzer Amplifikate ist insbesondere bei der Analyse stark degradiertes DNA von Vorteil.

Y-SNP Auswahl

Für die Y-SNP-Analyse wurden insgesamt 52 Loci für eine Haplotypisierung und Haplogruppenbestimmung genutzt (Kohl et al., 2009; Wei et al., 2013). Das von Kohl et al. (2009) eingesetzte System zur Haplogruppenklassifikation zweier afrikanischer Populationen beruhte zum Großteil auf der Arbeit von Brion et al. (2004), in welcher bereits zwei der Multiplexsysteme für eine Haplogruppenbestimmung häufig frequentierter Haplogruppen in Europa, etabliert wurden. Durch die Erweiterung dieses Systems um zehn Loci aus der Arbeit von Wei et al. (2013) musste zunächst eine Umstrukturierung des Ansatzes erfolgen, sodass eine Aufteilung der 52 Loci auf vier Multiplexsysteme notwendig wurde. Aus diesem Grund mussten für die zehn neuen Y-SNPs sowohl PCR-Primer als auch die benötigten SBE-Primer generiert werden. Die Typisierung mittels der vorgestellten Y-SNPs basierte auf dem Prinzip eines allelspezifischen Primer-Extension-Assays (Sobrino et al., 2005). Hierfür findet im ersten Schritt des Assays eine Amplifikation spezifischer Sequenzbereiche des Y-Chromosoms mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern statt. Im Anschluss an die Amplifikation folgt eine SBE-Reaktion, bei der sich unterschiedlich lange Oligonukleotidsequenzen spezifisch so an

amplifizierte DNA anlagern, dass der Strang eine Position vor dem SNP endet. Durch die Einbau von einem einzelnen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid wird der SBE-Primer um eine Position erweitert. In Form von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Nukleotiden ist es möglich, positionsspezifische Unterschiede zu trennen. Die Auftrennung und Detektion erfolgte abschließend mittels Kapillarelektrophorese.

Primerdesign

Das Design der Primersequenzen für die Multiplex-PCR und SBE-Reaktion erfolgte unter Berücksichtigung empfohlener Parameter aus dem Protokoll nach Sanchez und Endicott (2006) (Tabelle 3.13). Benötigt wurden zunächst alle Lokalisationsdaten bzw. Datenbankeinträge für die ergänzten zehn Loci aus Wei et al. (2013), welche in der *Y-Chromosome Haplotype Reference Database* (YHRD) ermittelt wurden. Mit Hilfe dieser Informationen und unter Berücksichtigung der positionsspezifischen Sequenzumgebung wurden PCR-Primer für die Multiplexreaktion mit der Software Primer3 generiert (Untergasser et al., 2012; Koressaar und Remm, 2007). Resultierende Sequenzen wurden zur Verifikation der Bindungsaffinität gegen die Humansequenz mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST[®]) align. Das Design zugehöriger SBE-Primer erfolgte über das Programm BatchPrimer3 (You et al., 2008). Entsprechende Einstellungen wurden ebenfalls dem Protokoll von Sanchez und Endicott (2006) entnommen. Lediglich die GC-Gehalte wichen davon ab. Weiterhin wurden alle Sequenzen auf Selbsthybridisierung, primer-dimer-Bindungen und auf die Ausbildungen von Sekundärstrukturen mit der Analysesoftware Autodimer geprüft (Vallone und Butler, 2004).

Zur Ermittlung signalspezifischer Fragmentlängen wurde vor der Multiplex-Analyse eine Primerfokusreaktion für die neuen Sequenzen durchgeführt. Mit dieser Methodik kann die ungefähre Primerlänge in Verbindung mit der jeweiligen fluoreszenzmarkierten Base (A, T, G oder C) im Profil abgelesen werden. Hierzu wurde das SNaPshot[®] Primer Focus[®] Kit (Applied Biosystems[®]) verwendet. Der Reaktionsansatz erfolgte gemäß den Vorgaben im Protokoll. Die anschließende Kapillarelektrophorese wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Eine Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der GeneMapper[®] ID Software 2.0.

Tabelle 3.13: Eigenschaften der PCR- und SBE-Primer nach Sanchez und Endicott (2006).

Multiplex-PCR Primer	SBE-Primer
GC-Gehalt 35 – 60 %	Länge (min.) 17 – 18 Nukleotide (Nt)
Theoretische Schmelztemperatur 55–65 °C (Salzkonzentration von 180 mM)	Annealingtemperatur 50 – 60 °C
Letzte Base (3'-Ende) G o. C	
Amplifikatgröße 60 – 120 bp	

Multiplexanalyse

Vor dem Schritt einer Haplotypisierung mussten im Voraus diverse Vorversuche zur Etablierung der Y-SNP Systeme unternommen werden. Da das Multiplexsystem nach Kohl et al. (2009) als Ausgangspunkt gewählt wurde, musste auf ein 52plex SNP-Ansatz verzichtet werden, da Fragmentlängenüberschneidungen mit den neuen SBE-Primern resultierten, sodass eine Differenzierung der locuspezifischen Signale nach der Kapillarelektrophorese nicht mehr möglich war. Diverse Testamplifikationen führten zur einer finalen Aufteilung von insgesamt 52 Y-SNPs auf vier Systeme. Die Zusammensetzung der neuen Multiplexsysteme erschloss sich aus dem vorhergegangenen Primerdesign und der Beobachtung von Primer-Hybridisierungen, die Artefakte in der anschließenden Kapillarelektrophorese aufweisen könnten. Des Weiteren mussten die einzusetzenden Primerkonzentrationen für jedes Y-SNP System neu angepasst werden, da die ursprünglich verwendeten Konzentrationen keine ausbalancierten Ergebnisse innerhalb der Elektropherogramme zeigten. Die größten SNP-Set's (SNP-Set 1 und 2) enthalten 16 Loci. Das kleinste Set beinhaltet acht Loci. Die Loci M230 und M207 sind doppelt enthalten. M207 wurde schon in den ursprünglichen Sets sowohl forward als auch reverse verwendet. Die Aufteilung von M230, M269 in zwei Sets ist der schlechten Amplifizierbarkeit der Loci geschuldet (Tabelle 3.14). Die finale Ausrichtung der Systeme erfolgte zu Beginn an einem DNA-Isolat eines Skelettfundes mit einem PMI von ca. 50 – 60 Jahren. Die DNA-Isolation erfolgte hierbei nach dem bereits beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden die vier Multiplexsysteme am historischen Skelettfund getestet.

Im Rahmen erster Vorversuche erfolgte eine Testung angewandter Reaktionsbedingungen für die Multiplex-PCR. Dafür wurden zwei unterschiedliche Ansätze getestet. Zunächst wurde eine kommerziell erhältliche Umgebungschemie für die erste Amplifikation gewählt (Multiplex PCR-Mastermix, Qiagen). Parallel dazu wurden Versuche unter empfohlenen Reaktionsbedingungen nach Paneto et al. (2011) mit dem Ziel einer Verminderung unspezifischer Signale im resultierenden SNP-Profil, vorgenommen (Tabelle 3.15). Das Vorgehen erlaubte darüber hinaus eine Prüfung der Reproduzierbarkeit des spezifischen Profils.

Das Amplifikationsprotokoll nach Paneto et al. (2011) in Tabelle 3.16 konnte für die Multiplex-PCR ohne Modifikationen eingesetzt werden.

Nach der Multiplex-PCR schloss sich eine erste enzymatische Aufreinigung des PCR-Produktes an. Hierfür wurde das PCR-Produkt mit 1 μL SAP und 0,4 μL ExoI versetzt. Die Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen für 1 h bei 37 °C. Die Inaktivierung der Enzyme wurde bei 75 °C für 15 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C herabgekühlt. Für die darauffolgende SBE-Reaktion (SNaPshot-PCR) wurde ein neuer Reaktionsmix erstellt (Tabelle 3.15). Für den SBE-Primer-Mastermix wurden die entsprechenden SBE-Primer pro Set verwendet. Das Amplifikationsprotokoll wurde an dieser Stelle aus der Arbeit von Kohl et al. (2009) entnommen (Tabelle 3.17).

Die zweite enzymatische Aufreinigung erfolgte mit 1 μL SAP ebenfalls unter Standardbedingungen. Für die Postamplifikation wurden 9,0 μL HiDi™ Formamid, 0,25 μL GeneScan™-120LIZ[®] Size Standard sowie 0,75 μL SNaPshot-PCR-Produkt eingesetzt. Der Reaktionsmix wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C gekühlt. Die Fragmentlängen-

Tabelle 3.14: **Verwendete Primerkonzentrationen für Y-SNP Analyse.**

Aufteilung aller 52 Loci in vier Systeme. Zusätzlich verweist die Tabelle auf eingesetzte Endkonzentrationen der PCR- und SBE-Primer.

System 1	PCR [μM]	SBE [μM]	System 2	PCR [μM]	SBE [μM]
M174	0,05	0,2	M11	0,1	0,0125
M69	0,075	0,025	M170	0,1	0,025
P25	0,05	0,2	M201	0,2	0,0075
M38	0,05	0,5	M304	0,1	0,0375
M123	0,1	0,04	M207	0,4	0,0225
M35	0,1	0,2	M128	0,1	0,15
M216	0,05	2	P31	0,05	1
M17	0,05	0,1	M175	0,4	0,025
M173	0,8	0,012	M119	0,05	0,75
M96	0,05	0,25	P177	0,075	0,1
P224	0,075	0,0375	M122	0,1	1
M75	0,1	0,06	M343	0,075	0,025
SRY10831b	0,05	0,0075	M124	0,075	0,225
M81	0,1	0,1	M168	0,05	2
M9	0,8	0,075	P225	0,075	0,06
M33	0,05	0,125	M269	0,3	4
System 3	PCR [μM]	SBE [μM]	System 4	PCR [μM]	SBE [μM]
M70	0,1	0,002	Tat	0,1	4
M2	0,05	0,015	M217	0,1	2
M145	0,075	0,4	M32	0,075	1
M214	0,05	0,08	P2	0,05	0,5
M231	0,2	0,4	M45	0,05	2
M242	0,2	0,01	M269	0,3	4
P125	0,075	1	M213	0,8	2
P143	0,05	0,05	M230	0,15	2
M42	0,08	0,0175			
M181	0,1	1			
M91	0,2	0,25			
M207	0,1	1			
M230	0,15	2			
M215	0,3	4			

Tabelle 3.15: **Reaktionschemie beider Ansatzvarianten nach Paneto et al. (2011).**
Die angegebenen Reaktionsvolumina wurden im Testverlauf leicht modifiziert.

Multiplex-Reaktionsmix	Volumen/Reaktion [μL]
Kommerzielle Variante:	Reaktionsvolumen: 15
Multiplex PCR-Mastermix (QIAGEN)	7,5
PCR-Primer-Mastermix	1,5
Template DNA	6
Variante nach Paneto et al. (2011):	Reaktionsvolumen: 15
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase	0,28
Bovine Serum Albumin (BSA) (20 mg/mL)	0,28
dNTP Mix (10 mM)	0,43
Amplifikationswasser	1,3
GeneAmp [®] 10x PCR Gold Buffer	1,74
MgCl ₂ Solution (25 mM)	3,47
Multiplex-PCR-Primer-Mastermix	1,5
Template-DNA	6 - 7
SBE-Reaktionsmix	Reaktionsvolumen: 7,5
SNaPshot Multiplex Mix (life Technologies)	2,5
SBE-Primer-Mastermix	3,5
Multiplex-PCR-Produkt	1,5

Tabelle 3.16: **Amplifikationsprotokoll mod. nach Paneto et al. (2011).**

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeitschritte	Zyklenzahl
95	10 min	
95	30 s	
55	45 s	3 Zyklen
72	30 s	
95	30 s	
55	45 s (pro Zyklus 0,2 $^{\circ}\text{C}$ erhöhen)	19 Zyklen
72	30 s	
95	30 s	
60	45 s	11 Zyklen
72	30 s	
72	7 min	
-4	∞	

Tabelle 3.17: Amplifikationsprotokoll SBE-Reaktion nach Kohl et al. (2009).

Temperatur [°C]	Zeitschritte	Zyklenzahl
96	10 s	25 Zyklen
58	15 s	
60	30 s	
4°C	∞	

analyse der Amplifikate erfolgte auf dem 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®]) unter Standardbedingungen (POP-4, 36 cm Kapillare). Eine Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der GeneMapper[®] ID Software 2.0.

3.2.8 mtSNP-Analyse: Auswahl, Multiplexanalyse

mtSNP Auswahl

Das für die mitochondriale Haplogruppenklassifikation genutzte Panel aus 42 mtSNPs wurde aus der 2011 publizierte Arbeit von Paneto et al. (2011) entnommen. Das Alleinstellungsmerkmal in der Anwendbarkeit des Systems besteht in der Klassifizierung gemischter Abstammungslinien. Analysiert wurden im Rahmen dieser Studie 160 Brasilianer. Eine mehr als drei Jahrhunderte andauernde Kolonialzeit, in der Personen verschiedenster Herkunft nach Brasilien migrierten, führte zu einer ethnischen Vielfalt des heutigen Staates. Aus diesem Grund ist das System zur Analyse von mutmaßlich unterschiedlichen ethnischen Linien angemessen. Weiterhin ist die vorgesehene Amplifikation aller Loci in lediglich einem einzigen Multiplexansatz, sowohl im Schritt der ersten PCR als auch in der SBE-Reaktion, von Vorteil (Paneto et al., 2011).

Das System erwies sich für die zielgebundene Haplogruppenklassifikation in dieser Arbeit als besonders geeignet, da mit den Loci die wichtigsten mitochondrialen Hauptabstammungslinien und in Verbindung stehende Subgruppen untersucht werden können. Eine hochauflösende Unterteilung hochfrequenter europäischer Sublinien mit den gewählten SNPs machte es weiterhin möglich die dritte und vierte Hypothese (Kapitel 2) für die gegenständliche historische Population zu untersuchen.

Primerfokusreaktion

Analog zur Lauflängenüberprüfung der SBE-Primer für die Y-SNP Analyse wurde für die zum Einsatz kommenden mtSNP SBE-Primer ebenfalls eine Primerfokusreaktion durchgeführt. Hierzu wurde das SNaPshot[®] Primer Focus[®] Kit (Applied Biosystems[®]) verwendet. Der

Reaktionsansatz erfolgte ebenfalls gemäß den Vorgaben im Protokoll. Die anschließende Kapillarelektrophorese wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Eine Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der GeneMapper[®] ID Software 2.0.

Multiplexanalyse

Die Typisierung ausgewählter mtSNPs erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip eines SNaPshot-Assays. Mit der vereinfachten Möglichkeit eines Multiplex Ansatzes sollte eine Zeitersparnis in der Haplotypisierung erreicht werden. Auch hier erfolgte jedoch zunächst die Testung auf Anwendbarkeit beider bereits vorgestellter Ansätze. Jedes probenspezifische Profil wurde somit ebenfalls durch duplizierte PCR-Schritte bestätigt. Zuerst erfolgten mehrere Testamplifikationen mit der kommerziellen Multiplex-Chemie. Erste Versuche mit einem einzelnen Ansatz führten zu einer Reihe von unspezifischen Signalen und Fehlinterpretationen im Profil (Tabelle 3.18). Aus diesem Grund war es notwendig das gesamte Panel auf zwei Multiplexsysteme mit jeweils 21 Loci für diesen Zweck aufzuteilen. Eine Einteilung in entsprechende Systeme

Tabelle 3.18: **Reaktionschemie beider Ansatzvarianten.**

Multiplex-PCR	Volumen/Reaktion [μL]
Kommerzielle Variante:	Reaktionsvolumen: 12,5
Multiplex PCR-Mastermix (QIAGEN)	6,5
PCR-Primer-Mastermix	3
Template DNA	3
Variante nach Paneto et al. (2011):	Reaktionsvolumen: 12,5
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase	0,2
Bovine Serum Albumin (BSA) (20 mg/mL)	0,2
dNTPs (2,5 mM)	1,25
GeneAmp [®] 10x PCR Gold Buffer	1,25
MgCl ₂ Solution (50 mM)	1,25
Multiplex-PCR-Primer-Mastermix	4,35
Template-DNA	4
SBE-Reaktionsmix	Reaktionsvolumen: 8
SNaPshot Multiplex Mix (life Technologies)	2,5
SBE-Primer-Mastermix	4
Multiplex-PCR-Produkt	1,5

Tabelle 3.19: Amplifikationsprotokoll Multiplex-PCR nach Paneto et al. (2011).

Temperatur [°C]	Zeitschritte	Zyklenzahl
95	10 min	
95	30 s	
55	45 s	3 Zyklen
72	30 s	
95	30 s	
55	45 s (pro Zyklus 0,2 °C erhöhen)	19 Zyklen
72	30 s	
95	30 s	
60	45 s	11 Zyklen
72	30 s	
72	7 min	
-4 °C	∞	

erfolgte unter Betrachtung der Fragmentlängen, sodass eine deutliche Trennung der Signale im Elektropherogramm ungehindert möglich war. Beim Einsatz der Reaktionsbedingungen, welche aus der Arbeit von Paneto et al. (2011) im nächsten Schritt übernommen wurden, gelang es alle 42 Loci in einem Ansatz zu amplifizieren (Tabelle 3.18). Deshalb wurde dieser Ansatz zur Typisierung beibehalten.

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Primersequenzen, Konzentrationen und Amplifikationsbedingungen wurden mit dem Ziel einer Haplotypisierung und folgenden Haplogruppenklassifikation übertragen. Eingesetzte Multiplex- und SBE-Primer wurden erneut vor dem Einsatz im Assay auf *primer-dimer* Bindungen und Selbsthybridisierung mit dem Programm Autodimer geprüft (Vallone und Butler, 2004). Die Ausgangskonzentration für jeden Primer nach der Synthese lag bei 50 μM . Diese wurde nachfolgend für die Zielkonzentration im Reaktionsansatz entsprechend angepasst. Des Weiteren erfolgte eine Überprüfung der Bindungsspezifität und des korrekten *Allel callings* mit der rCRS (NC_012920). Resultierende Amplifikatgrößen lagen nach der ersten PCR im Bereich von 55 – 196 bp. Die Amplifikationen erfolgten nach den in der Publikation von Paneto et al. (2011) aufgeführten Bedingungen, wie in Tabelle 3.19 und 3.20 gezeigt.

An die Multiplex-PCR und SBE-Reaktion schloss sich jeweils eine enzymatische Aufreinigung des PCR-Produktes an. Nach der ersten PCR wurde dem PCR-Produkt 1 μL SAP und 0,4 μL ExoI zugegeben. Die Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen für 1 h bei 37 °C. Die Inaktivierung der Enzyme wurde bei 75 °C für 15 min durchgeführt. Im Anschluss an die

Tabelle 3.20: Amplifikationsprotokoll SBE-Reaktion nach Paneto et al. (2011).

Temperatur [°C]	Zeitschritte	Zyklenzahl
96	10 s	
55	5 s	25 Zyklen
60	30 s	
-4°C	∞	

SBE-Reaktion wurde dem Produkt jeweils 1,25 μL SAP zugegeben. Anschließend wurden die Proben auf 4°C herabgekühlt. Die Postamplifikation und Vorbereitungen für die Fragmentlängenanalyse auf dem 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®]) wurden analog den Reaktionsbedingungen der Y-SNP Analyse durchgeführt. Eine Ergebnisanalyse erfolgte ebenfalls mit der GeneMapper[®] ID Software 2.0.

3.2.9 Haplotypisierung und Haplogruppenklassifizierung

mtSNP Analyse

Das Klassifikationssystem - bestehend aus 42 Loci - ermöglicht eine Gruppierung von insgesamt 45 Haplogruppen (inkl. 15 Makrohaplogruppen). Mit Hilfe des vorgestellten Klassifikationskonzeptes nach Paneto et al. (2011) war es zunächst möglich die bestimmbareren Hauptlinien und den Anteil detektierbarer Subgruppen zu sichten (Abbildung 3.3).

Eine Haplogruppenklassifikation anhand entsprechender Profile erfolgte automatisiert mit dem Programm Haplogrep (v.2) (Kloss-Brandstätter et al., 2011). Entsprechende Scoringfunktionen, mit denen eine Hg-Einordnung bei Haplogrep erfolgt, wurden hinterfragt und probenspezifisch bewertet. Die web Applikation basiert auf dem Klassifikationsbaum Phylotree (van Oven und Kayser, 2009). Durch stetige Aktualisierungen des Baumes werden damit auch neue Klassifikatoren (mtSNPs) in die Wichtung des Ergebnisses einbezogen. Für die Ableitung des Haplotypen wurde zunächst für jede Probe das vollständige Panel eingesetzt. Im Nachgang galt es sog. *Keyloci* für den vorliegenden Datensatz zu extrahieren. Dies hatte eine Minimierung des Ausgangssets bis zum minimalen Markerumfang zur finalen Hg-Einordnung

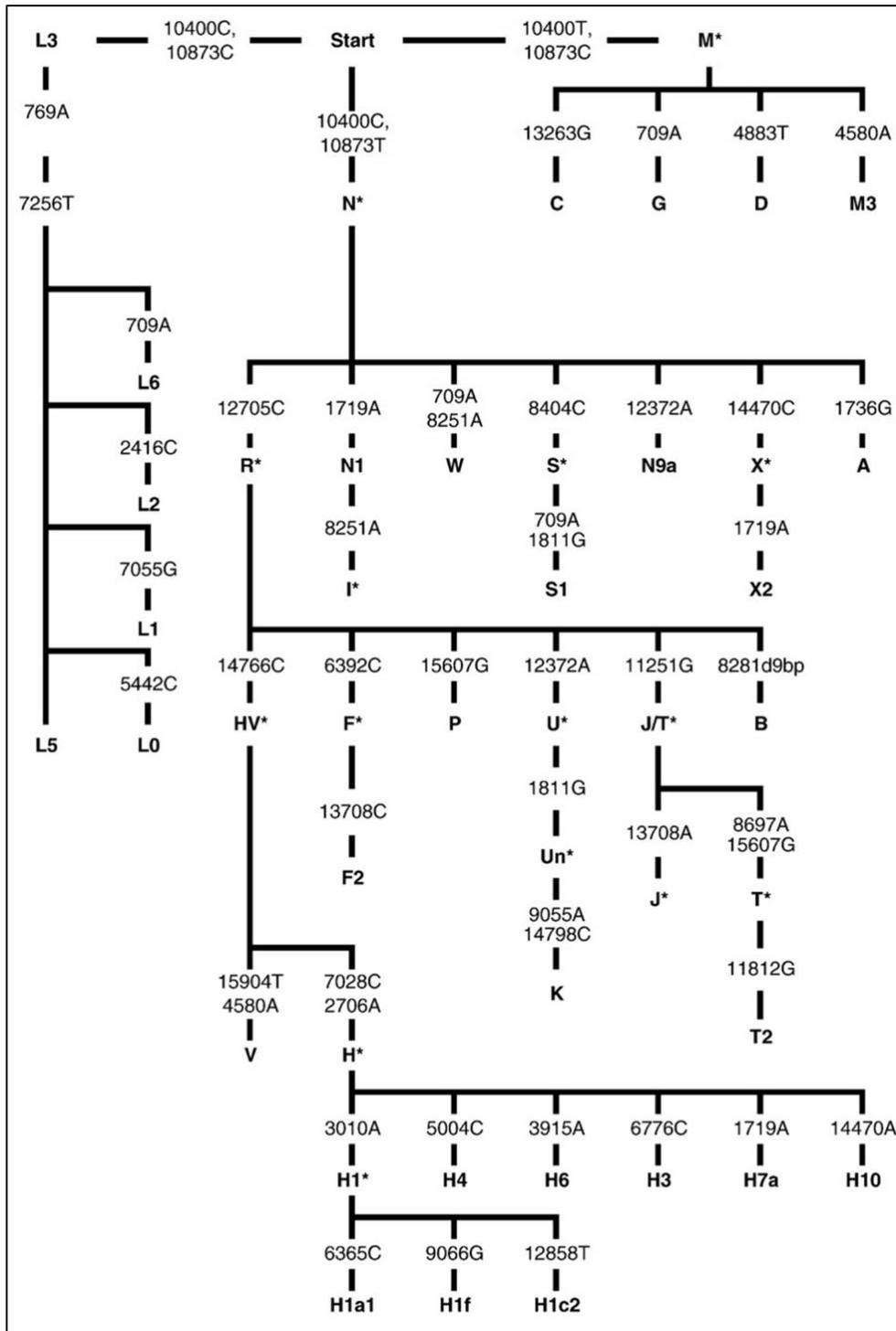


Abbildung 3.3: Klassifikationsbaum nach Paneto et al. (2011).

Der Klassifikationsbaum vereint alle 42 Loci zur Detektion von 45 Haplogruppen. Der Startpunkt wurde an dieser Stelle unabhängig von rCRS gewählt und ist somit als „nicht-Phylogenie-erhaltend“ zu betrachten. Diese Variante der Darstellung dient lediglich der Veranschaulichung generischer Makrohaplogruppen und zugehöriger Subgruppen.

ohne Informationsverlust zum Ziel, um sowohl Kosten als auch Zeit zu sparen. Die Ermittlung des minimalen Haplotypen für das angewandte Klassifikationssystem erfolgte nach folgendem Vorgehen:

- 1) Bestimmung der Haplogruppe mit Haplogrep unter Hinzunahme aller 42 Loci
- 2) Extraktion der von Haplogrep genutzten Keyloci aus dem Phylotree der untersuchten Population
- 3) Bestimmung der Haplogruppen mit Haplogrep (v.2) unter Hinzunahme der Keyloci
- 4) Erweiterung der Menge an Keyloci bis die Unterschiede zwischen Schritt eins und drei eliminiert sind

Aus dem Datenset wurden zudem Informationen über die Diversität ermittelter Haplotypen und Haplogruppen sowie Frequenzen ancestraler und Mutationsevents pro untersuchtem Locus mittels dem Programm Arlequin (v. 3.5.2.2) gewonnen (Excoffier und Lischer, 2010). Im Anschluss wurde der Zusammenhang zwischen ermitteltem Haplotypen und der Eingruppierung in eine Haplogruppe bewertet.

Y-SNP Analyse

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Y-SNPs ist es möglich 42 Haplogruppen unter Einbeziehung des veröffentlichten Haplogruppenbaumes der *The International Society of Genetic Genealogy* (ISOGG) (<http://www.isogg.org/>, v. 9.01, 2014) zu klassifizieren. Berücksichtigt wurde dabei, dass alle Hauptäste bzw. Makrohaplogruppen A bis S mit Hilfe festgelegter Loci repräsentiert werden (Abbildung 3.4). Auf Grund der systematischen Ergänzungen und Korrekturen durch die ISOGG erfolgte auch eine Modifikation der Systematik, die in der Arbeit von Kohl et al. (2009) vorgestellt wurde. Die Haplogruppenbestimmung fand über das *Morley Y-DNA Project* statt, mit dem eine Zuordnung von Haplotypen zu Haplogruppen auf Basis von Y-SNPs möglich ist (Morley, 2013).

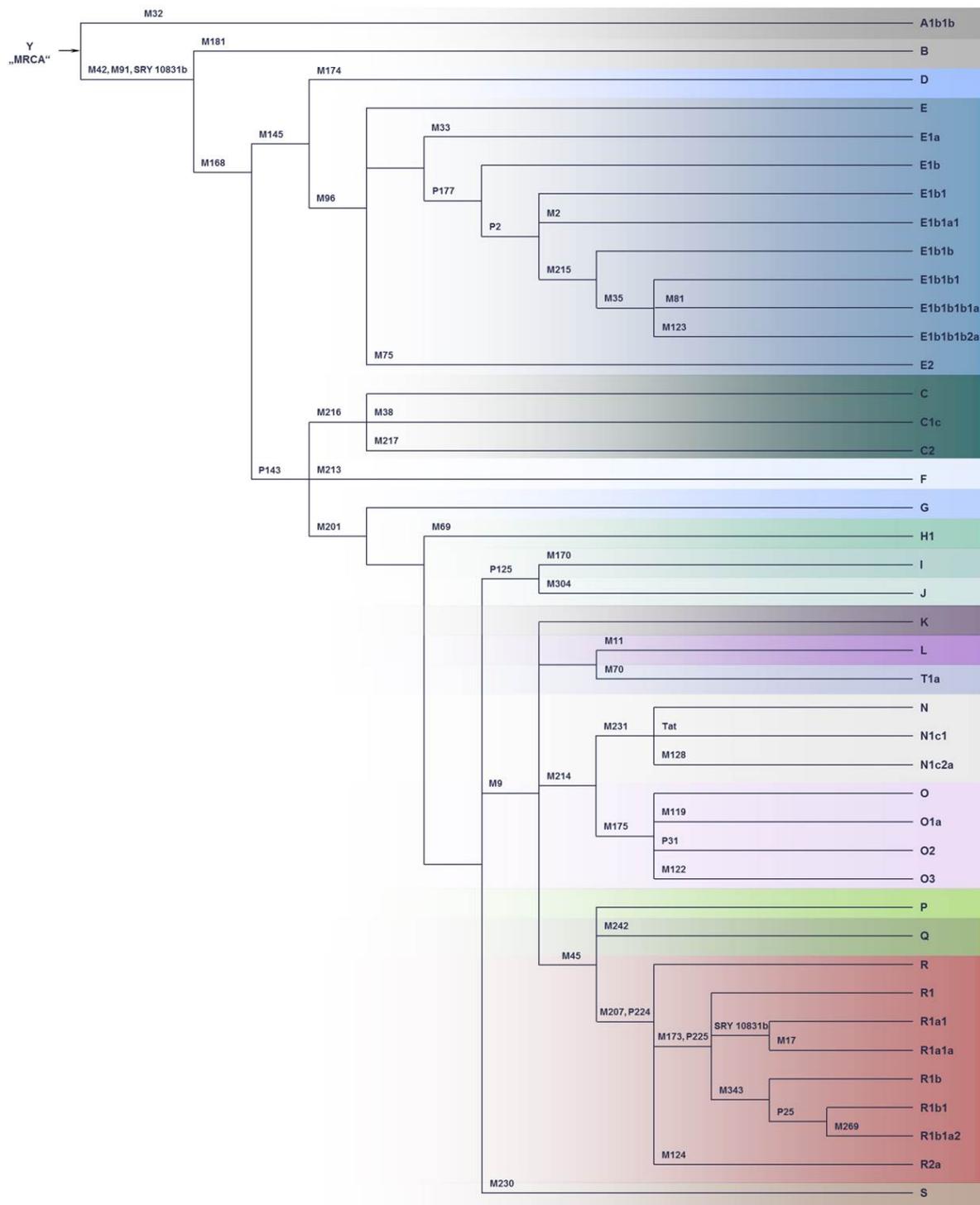


Abbildung 3.4: **Monophyletischer Klassifikationsbaum.**

Der dargestellte Klassifikationsbaum (Parsimonie) vereinigt alle Makrohaplogruppen A bis S und zugehörige Subgruppen, die mit dem vorgestellten Y-SNP Set detektiert werden können.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 aDNA-Quantifizierung

Zur Bestimmung des mengenmäßigen Anteils extrahierter DNA wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, zwei Quantifizierungssysteme eingesetzt. Das Ziel dieser Vergleichsreihe bestand in der Prüfung der Anwendbarkeit beider Systeme durch unterschiedliche Systemkonfigurationen im Bereich der aDNA-Quantifizierung und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine anschließende Downstream STR Analytik. Darüberhinaus erfolgte eine Verlässlichkeitsprüfung für die Indikation möglicher PCR Inhibitoren und der DNA-Degradation. In der Folgenden Ergebniszusammenfassung werden diese vergleichend für beide Systeme gegenübergestellt.

Jedes aDNA-Isolat wurde jeweils einer einmaligen Quantifizierung mit beiden Systemen (Quantifiler[®] und PowerQuant[®]) unterzogen. Mit Hilfe des Quantifiler[®] Systems wurden Ergebnisse von 0,001 – 0,15 ng/ μ L erhalten. Für 26 % der Proben konnte kein Ergebnis ermittelt werden. Hingegen konnte mit dem PowerQuant[®] Kit für jede Probe ein Ergebnis erzielt werden. Hierbei lagen die ermittelten Konzentrationen im Bereich von 0,001 – 0,35 ng/ μ L (Abbildung 4.1).

Aussagen hinsichtlich einer möglichen Degradation des DNA-Templates können lediglich mit dem PowerQuant[®] System abgeleitet werden. Mit einem zusätzlich zum autosomalen Target enthaltenen 294 bp langem Target, soll es möglich werden Degradation in Form des Fragmentierungsgrades zu beurteilen. Hierzu wird ein Degradationsindex ($C_{[Auto]}/C_{[D]}$, Schwellwert > 2) berechnet und beurteilt. Für den Probenumfang wurden Degradationsindizes von 2,02 – 87,54 ermittelt. Zur Beurteilung der Aussagekraft dieser Quotienten wurden resultierende probenspezifische miniSTR-Profile (S5) mit dem Auftreten degradationsbedingter Phänomene (Lokus dropouts) ausgewertet und mit zugehörigen Degradationsindizes korreliert. Im Falle einer miniSTR-Analyse mittels S5 Kit, konnte für 54 Proben mit einem Degradationsindex > 2 ein vollständiges Profil erstellt werden (Abbildung 4.2). In drei Proben wurde ein Lokus dropout in drei von vier Systemen verzeichnet.

Neben der Möglichkeit den Degradationsgrad des jeweiligen DNA-Templates zu bestimmen, ist es mit Hilfe des PowerQuant[®] möglich die Präsenz von inhibitorischen Substanzen, die folgende PCR-Schritte hemmen können, mittels dem IPC-Target zu detektieren. Hierfür wurde

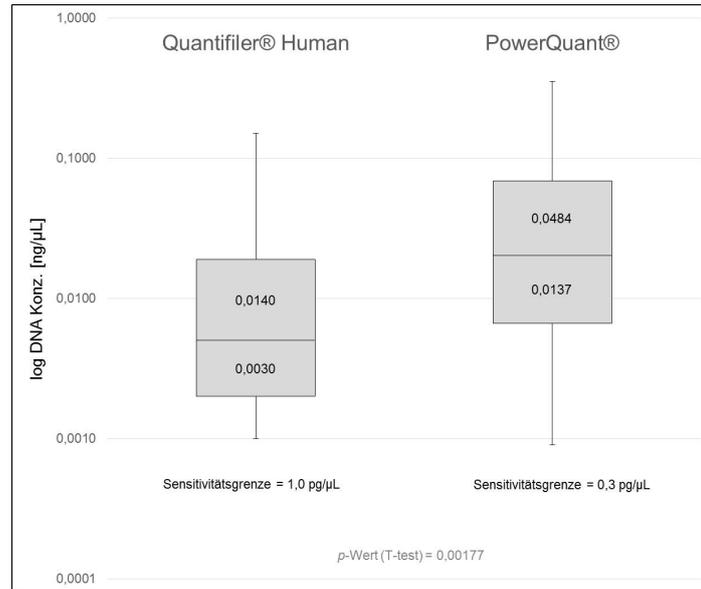


Abbildung 4.1: **Vergleich ermittelter Konzentrationen.**

In der durch Boxplots präsentierte Zusammenfassung der jeweiligen Quantifizierungsergebnisse lassen sich die Unterschiede in der Verteilung ermittelter DNA-Konzentrationen erkennen. Die Streuung um den Median ist beim PowerQuant® Kit mit 0,0137 (Q1) und 0,0484 (Q3) größer als beim Quantifiler® Human mit 0,003 (Q1) und 0,014 (Q3). Die Minima unterscheiden sich mit 0,001 und 0,0009 kaum voneinander. Eine deutliche Trennung hingegen ist bei den Maximalwerten zu erkennen. Der p-Wert (einseitiger t-test) liegt bei $< 0,01$.

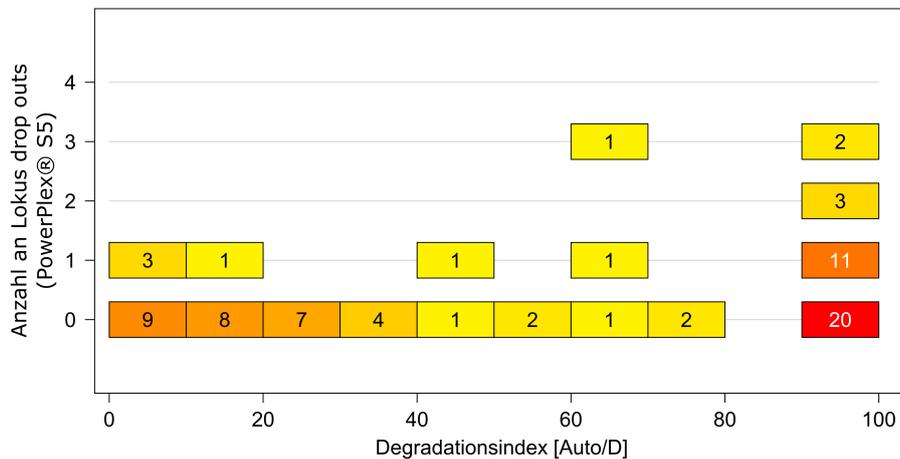


Abbildung 4.2: **Auto/D-Index vs. Lokus dropout.**

Zahlen und Farbcode repräsentieren die Anzahl der Proben in der jeweiligen Indexklasse (x-Achse). Auf der y-Achse aufgetragen ist die absolute Anzahl detektierter Lokus dropouts. In die Darstellung wurden 77 der 82 Zahnproben einbezogen. Zu erkennen ist, dass für einen Großteil der Proben mit einem Index > 2 ein vollständiges S5-Profil generiert werden konnte. Für den Probenanteil, welche in der Grafik im Intervall von 90 bis 100 liegen, konnte kein Index bestimmt werden (20 Proben). Jedoch resultierte für diese ein vollständiges miniSTR-Profil.

ein 435 bp langes Fragment integriert. Dieses Target wurde synthetisch hergestellt und hat somit bei idealen Bedingungen immer den gleichen Ct-Wert (20). Mit der Berechnung eines Quotienten aus theoretischem und ermitteltem Ct-Wert der Probe kann ein sog. IPC-Shift zur Inhibitionskontrolle genutzt werden. Liegt diese Verschiebung über dem empfohlenen Schwellwert (0,3), ist laut Hersteller mit Inhibition zu rechnen. Für die Interpretation der resultierenden IPC-Shifts wurde auch hier das zugehörige miniSTR-Profil gegenübergestellt, da es durch eine Polymerasehemmung ebenfalls zu Lokus dropouts kommen kann. Anhand der Resultate ließ sich erkennen, dass lediglich zwölf Proben einen IPC-Shift $> 0,3$ aufwiesen. 50 % der Proben mit einem IPC-Shift $\geq 0,3$ weisen Lokus dropouts in den Profilen auf, dagegen sind es bei den Proben mit einem kleineren IPC-Shift nur 26 %.

4.2 Molekulargenetische Geschlechtstypisierung

Die molekulargenetische Bestimmung des Geschlechts der Individuen erfolgte vorrangig über den geschlechtsspezifischen Marker Amelogenin, welcher Bestandteil des PowerPlex[®] S5 Systems ist. Für 39 von 82 Zahnproben konnte ein weibliches Geschlecht über AMEL identifiziert werden. Bei Vorliegen von intaktem Zahnmaterial aus Ober- und Unterkiefer für jede Listenummer pro Skelett wurde jeweils eine Doppelbestimmung zum Geschlecht durchgeführt. 31 Proben konnten anhand der Elektropherogramme aus der Fragmentlängenanalyse als eindeutig männlich klassifiziert werden. 12 Proben konnten jedoch aufgrund von einer geringen Signalintensität gegenüber dem X-Peak oder durch Lokus dropout nicht direkt bestimmt werden. Zur Verifizierung der im S5 bestimmten männlichen Individuen und derer, welche über dieses Vorgehen zunächst keinem Geschlecht zugeordnet werden konnten, wurde eine Ychr. Analyse (Powerplex[®] Y23) angeschlossen (Abbildung 4.3).

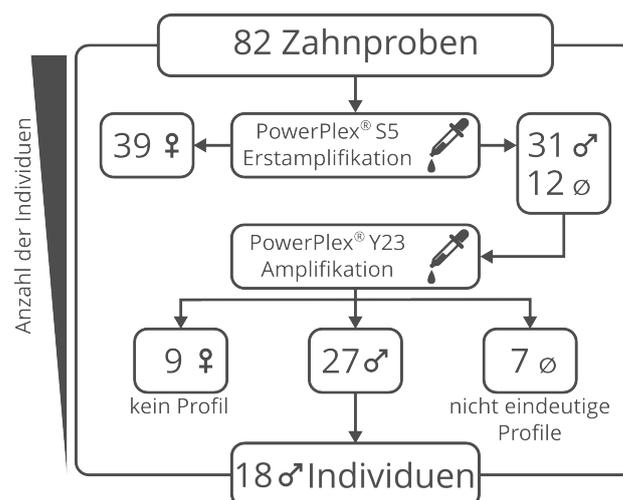


Abbildung 4.3: Aufschlüsselung der Probenanzahl für molekulargenetische Geschlechtsbestimmung nach Harthun et al. (2015).

Aufgliederung des Probenumfangs nach den Resultaten aus der molekulargenetischen Bestimmung des Geschlechts und der Y-chromosomalen Analyse.

Mit Hilfe der im Anschluss an die S5-Typisierung erfolgten Ychr. Analyse (PowerPlex[®] Y23 Kit) konnten nach Auswertung der Profile 18 von 43 unsicheren S5-Profilen als sicher männlich bestimmt werden. Unter Berücksichtigung von Signalstärken < 100 RFU und deutlichen degradationsbedingten Erscheinungen in Systemen mit Fragmentlängen > 250 bp: DYS19, DYS438, DYS437, DYS392, DYS643, DYS456 und YGATAH4, konnten von zu Beginn 27 von 43 männlichen PPIY23-Profilen neun Profile von anschließenden Ychr. STR-Analysen ausgeschlossen werden.

4.3 Mitochondriale Analysen

4.3.1 mtSNP Analyse und Haplogruppenklassifikation

Primerfokusreaktion

Zur Ermittlung allelspezifischer Signale im Elektropherogramm wurde die Lauflänge jedes Locus-abhängigen SBE-Primers durch eine Primerfokusreaktion bestimmt. Hierfür wurden die SBE-Primer um eine fluoreszenzmarkierte Base (A, T, G oder C) verlängert. Dabei konnte für jeden SBE-Primer allelspezifische Positionen ermittelt werden. Bei dem Vergleich der zu erwartenden Positionen mit den praktisch im Elektropherogramm abgelesenen Signalen zeigten sich Längenverschiebungen von zwei bis max. 4 bp. Mit der Ausnahme der Loci R-A1736G und C7028T erschwerten diese Verschiebungen die Auswertung übriger Positionen nicht.

Multiplexanalyse

Die im Voraus durchgeführte Kontrolle der eingesetzten Primersequenzen auf Selbsthybridisierung (Autodimer) oder der Ausbildung von Sekundärstrukturen verlief negativ. Es wurden keine Sequenzanomalien, die eine spätere mtSNP-Analyse stören könnten festgestellt. Auch die Überprüfung der Primerbindungsspezifität, welche über einen BLAST-Lauf durchgeführt wurde, zeigte keine unspezifischen Bindungen. Für eine mtSNP-Analyse wurden 59 Proben analysiert. Die Testung der Reaktionsbedingungen für die Multiplexanalyse, einschließlich der Adaption von Primerkonzentrationen, wurden analog zur Ychr. SNP Analyse an einer Testprobe (Zahnmaterial, PMI: 50 - 60 Y) durchgeführt und später auf den Probensatz übertragen. Zur Prüfung auf Eignung erwähnter Reaktionsbedingungen (kommerzielle Variante und Reaktionsmix nach Paneto et al. (2011)) für beide PCR-Schritte, wurde zunächst versucht 42 mtSNPs in einem Ansatz zu amplifizieren. Bei diesem Vorhaben und unter Applikation der Reaktionsbedingungen des kommerziellen Kits (siehe Tabelle 3.18) traten häufig unspezifische Signale im Bereich von 30 – 50 bp im resultierenden Profil auf. Des Weiteren war die Mehrzahl der Profile mit einer unruhigen Baseline mit Ausschlägen > 50 RFU gekennzeichnet, was die Trennung von locuspezifischen und schwachen Signalen behinderte. Daraufhin wurde das gesamte Set auf zwei Multiplexreihen mit jeweils 21 mtSNPs aufgeteilt, um eine bessere Profilqualität bei Verwendung der kommerziellen Chemie zu erreichen. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine mögliche Fragmentlängenüberschneidung bei Aufteilung der Loci durch

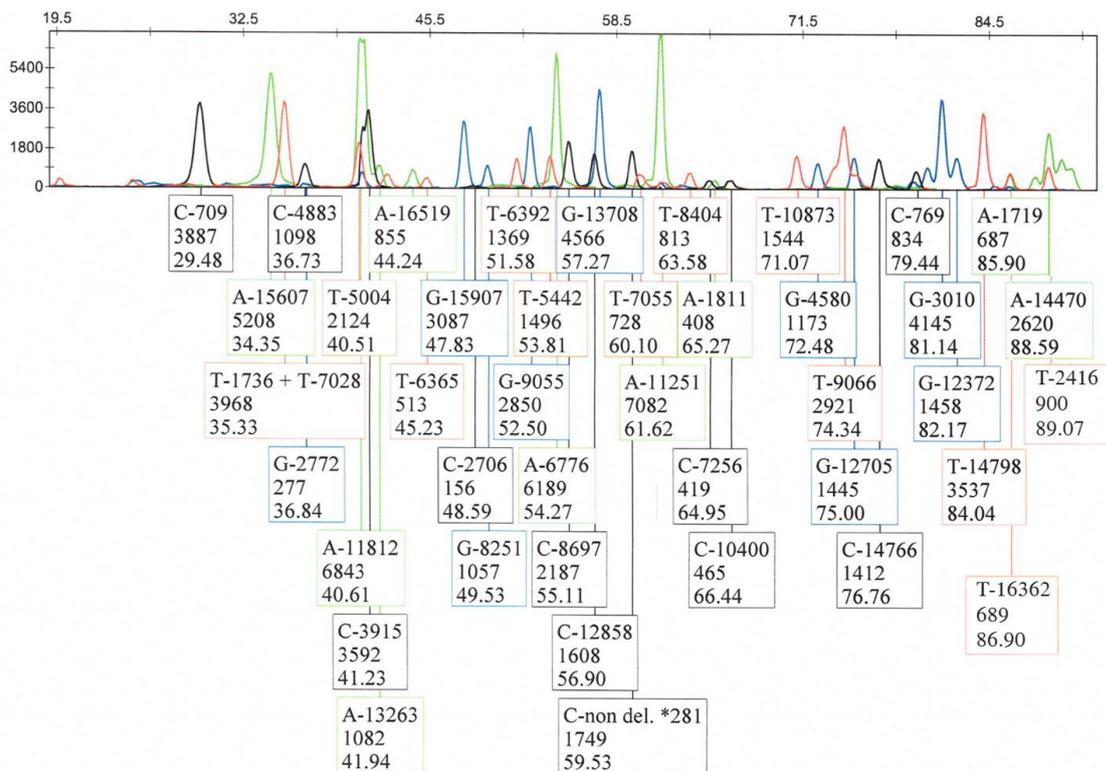


Abbildung 4.4: **42-mtSNP Profil.**

Das dargestellte Elektropherogramm beinhaltet die SNP-Informationen eines probenspezifischen Haplotypen, bestehend aus 41 Loci. Nicht dargestellt werden konnte der Locus 7028. In diesem Fall war auch bei Auftrennung der Kanäle kein spezifisches Signal zu erkennen. Lediglich im Bereich von 20 – 26 bp sind schwach ausgeprägte, unspezifische Signalverläufe zu erkennen, die über Fragmentlängeninformationen vom tatsächlichen Profilverlauf ausgeschlossen werden konnten.

Berücksichtigung eines Mindestabstandes von drei bp vermieden wurde. Unspezifische Signale konnten bei diesem Schritt jedoch nicht reduziert werden. Schließlich erfolgte eine Zusammenlegung beider Multiplexsysteme mit dem Ziel sowohl Zeit als auch Kosten zu sparen. Hierfür wurden die Reaktionsbedingungen nach Paneto et al. (2011) eingesetzt. Hier zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Amplifikationsergebnisse gegenüber der kommerziellen Chemie. In den überwiegenden Fällen gelang es 42 Loci im resultierenden Profil darzustellen und auszuwerten. Schwierigkeiten bei der Ergebnisinterpretation ergaben sich nur für die Loci R-A1736G und C7028T. Bei auftretenden Varianten T-1736 und 7028-T konnte anhand der Lauflängen und Signalstärke oft nur die ancestrale Form für den SNP T-1736 eindeutig bestätigt werden. Der Polymorphismus 7028-T konnte im überwiegenden Fall aufgrund von Signalstärken < 200 RFU nur durch die Einzelbetrachtung des roten Farbkanales beurteilt und erkannt werden. Auch durch Änderungen der entsprechenden Konzentration des SBE-Primers konnten keine Verbesserungen erzielt werden. Für die Kombination T-1736 und C-7028 war es wiederum möglich allelspezifische Signale durch zugehörige Lauflängen deutlich im Profil zu identifizieren (Abbildung 4.4). Für 26 Proben konnte ein vollständiger Haplotyp - bestehend

aus 42 mtSNPs - ermittelt werden. Bei Betrachtung des vollständigen Datensatzes wurden ein bis max. fünf Locus dropouts in einem Profil verzeichnet. Am häufigsten wurde dieses Phänomen an den Positionen G1719A, A1811G, A2706G und T16519C deutlich.

Haplogruppenklassifikation

Die Einordnung resultierender Haplotypen in Haplogruppen erfolgte mit der Web-basierten Applikation Haplogrep (v.2) (Kloss-Brandstätter et al., 2011). In der untersuchten Population wurden 25 unterschiedliche Haplogruppen klassifiziert. Am häufigsten traten hierbei die H-Subline H7a und weiterhin die Hg U2b auf. Die Makrohaplogruppe H, einschließlich ihrer Sublinen, hat in der Population einen Anteil von 26 % (Abbildung 4.5). Die Hg-Klassifikation wurde im ersten Durchlauf unter Einbeziehung der Position 16519 durchgeführt. Im zweiten Klassifikationslauf wurde dieser Mutationshotspot ausgeschlossen. Der Haplogruppenstatus und zugehörige Scores änderten sich hierbei durch Berücksichtigung der Wertung von Mutationshotspots in der Scoringfunktion nicht.

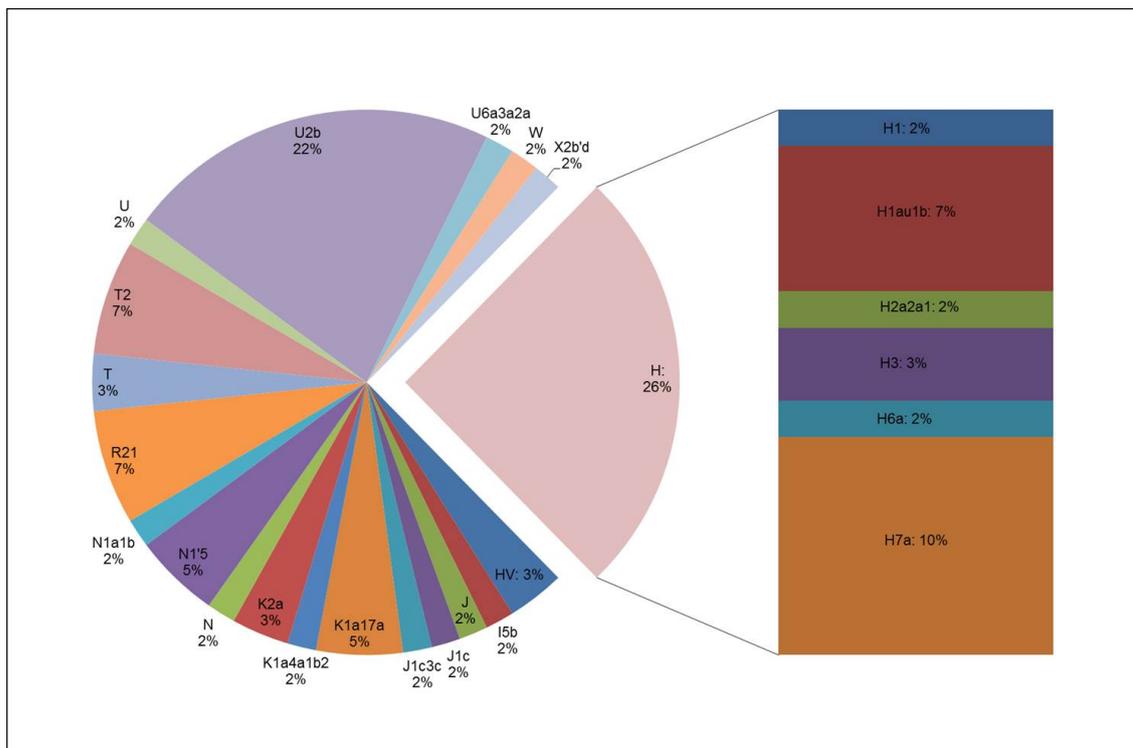


Abbildung 4.5: **Haplogruppenverteilung.**

Dargestellt ist die resultierende Hg-Verteilung für die historische Population basierend auf 42 mtSNPs. Deutlich wird der Anteil an der Makrohaplogruppe H und U, einschließlich zugehöriger Sublinen.

Jede Klassifikation wird dabei mit einem Score bewertet, welcher die Qualität des resultierenden Haplogruppenstatus, anhand von gefundenen haplogruppenspezifischen Varianten im Haplotyp, angibt. Die Berechnung ist der Gleichung 4.1 zu entnehmen (Kloss-Brandstätter et al., 2011).

$$r_{hg} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\sum_{i=1}^k w_i}{\sum_{i=1}^m w_i} + \frac{1}{2} \cdot \frac{\sum_{i=1}^k w_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad (4.1)$$

r_{hg}	Rang der ermittelten Haplogruppe
w_i	phylogenetische Wichtung des i-ten Polymorphismus
k	Anzahl beobachteter Polymorphismen im untersuchten SNP Set bezüglich der getesteten Hg
m	Anzahl erwarteter Polymorphismen im untersuchten SNP Set bezüglich der getesteten Hg
n	Gesamtanzahl an Polymorphismen in der Probe

Die Gruppierung verläuft nach einem Ranking, nach dem die Haplogruppe mit dem höchsten Score als tatsächlich angenommen wird. Ermittelte Scores für die durchgeführte populationsbezogene Hg-Klassifikation lagen zwischen 0,5 und 1 (Abbildung 4.6), wobei eine Probe ein mutationsfreies Profil aufwies und in die Hg H2a2a1 (rCRS) klassifiziert wurde. Diese wurde für die Score-Analyse ausgeschlossen. In der Verteilung ist zu erkennen, dass die Hg-Klassifikation auf Grundlage der jeweiligen Haplotypen für 44 % des Datensatzes mit einem Score $\geq 0,9$ bewertet wurde. Das bedeutet, dass die Hg-Zuordnung bezüglich der probenzugehörigen und annotierten Hg spezifischen Polymorphismen in der Phylogenie als verlässlich angenommen werden kann. 43 % der Proben erhielten einen Score $\geq 0,8$. Daran wird gezeigt, dass die Hg-Zuordnung genau ist, allerdings Sequenzinformationen fehlen können oder detektierte Polymorphismen nicht für die Zuordnung genutzt wurden. Ein geringer Anteil von 13 % der analysierten Haplotypen erhielt einen Score $< 0,8$, was darauf hinweist das die Hg-Zuordnung aufgrund fehlender Sequenzinformationen oder von bisher nicht bekannten Hg unzuverlässig ist. Zur Erklärung von Scores $< 0,8$ wurden die detektierten Haplotypen unter Berücksichtigung o. g. SNP-bezogener Einflussfaktoren auf das Ranking untersucht.

Bezogen auf das zum Einsatz kommende SNP Set konnten drei davon als ausschlaggebend für einen Score $< 0,8$ identifiziert werden. Darunter die haplogruppenspezifischen Polymorphismen 2706G und 1811G (spezifisch für H* und Sublinien von U*), die in den entsprechenden Haplotypen nicht detektiert wurden. Zum anderen der als lokale *private* Mutation gekennzeichnete Polymorphismus 1719A, der im Datensatz deutlich überrepräsentiert ist (siehe Abbildung 4.7). In den meisten Fällen stand dieser Polymorphismus in keinem Zusammenhang mit der zugeordneten Hg. Der entsprechende Hg-Status konnte jedoch durch weitere Hg-spezifische Polymorphismen bestätigt werden.

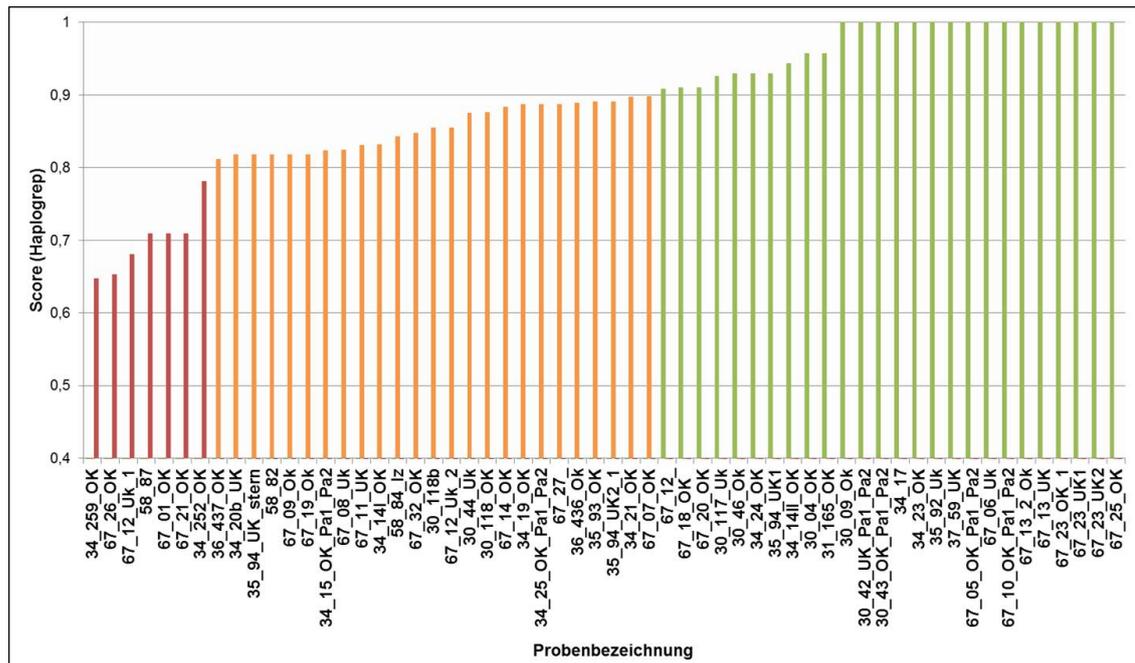


Abbildung 4.6: **Bewertung Hg-Zuordnung.**

Dargestellt ist die Bewertung der Haplogruppengruppenzuordnung für jede Probe anhand resultierender Haplogrep-Scores. Aus dem ursprünglichen Probenumfang (59 Proben) wurde eine Probe aufgrund des ancestralen Haplotypstatus nicht mit einbezogen. Die farbliche Hinterlegung der Balken entspricht den Intervallen so wie diese in den Bewertungsrichtlinien der Scores bei Haplogrep vordefiniert sind (grün $\geq 0,9$; orange $\geq 0,8$; rot $< 0,8$). Die Mehrzahl der Klassifikationen wurde mit einem Score $\geq 0,9$ bewertet.

4.3.2 Statistische Auswertung

Aus den ermittelten Haplotypen, bestehend aus 42 mtSNPs, wurden weiteren statistische Variablen zur Beschreibung des Datensatzes extrahiert. Im Datensatz untersucht wurden: Haplotypdiversität, Haplogruppendiversität, Allelfrequenzen ancestraler Varianten und Mutationen. Alle Haplotypstatistiken wurden mit Arlequin (v. 3.5.2.2) erstellt.

Haplotypdiversität

Aus dem Datensatz wurden 31 verschiedene Haplotypen ermittelt. Die Haplotypdiversität (HD) beträgt für den gesamten Datensatz 0,9404. Die Berechnung der Haplotypdiversität erfolgte nach folgender Berechnungsvorschrift (Gleichung 4.2).

$$HD = \frac{N}{N-1} \left(1 - \sum_i X_i^2 \right) \quad (4.2)$$

- x_i relative Häufigkeit jedes Haplotyps in der Population
- N Anzahl der Individuen in der Population

Haplogruppendiversität

Aus den 31 Haplotypen resultierten 25 verschiedene Haplogruppen. Die Haplogruppendiversität beträgt demnach 0,9293. Die Berechnung erfolgte analog der Vorschrift 4.2. Eine Häufigkeitsverteilung für die populationspezifischen Haplogruppen ist in Tabelle 4.1 zu erkennen.

Tabelle 4.1: Verteilung resultierender Hg für die Population.

In der Tabelle ist die absolute Anzahl N und die relative Häufigkeit für jede klassifizierte Haplogruppe im Datensatz zu erkennen.

Haplogruppe	Anzahl	relative Häufigkeit
H1	1	0,0169
H1au1b	4	0,0678
H2a2a1	1	0,0169
H3	2	0,0339
H6a	1	0,0169
H7a	6	0,1017
HV	2	0,0339
I5b	1	0,0169
J	1	0,0169
J1c	1	0,0169
J1c3c	1	0,0169
K1a17a	3	0,0508
K1a4a1b2	1	0,0169
K2a	2	0,0339
N	1	0,0169
N1'5	3	0,0508
N1a1b	1	0,0169
R21	4	0,0678
T	2	0,0339
T2	4	0,0678
U	1	0,0169
U2b	13	0,2203
U6a3a2a	1	0,0169
W	1	0,0169
X2b'd	1	0,01694

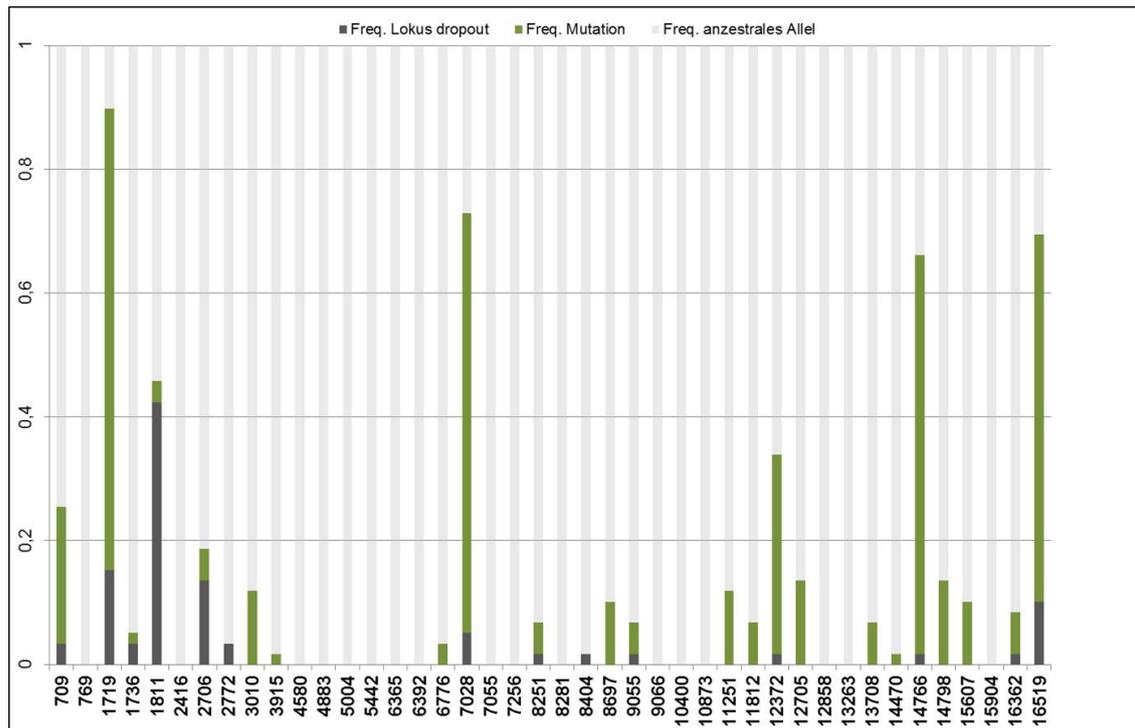


Abbildung 4.7: Allelfrequenzen.

Die Abbildung zeigt berechnete relative Frequenzwerte (Y-Achse) für ancestrale Allele und Mutationen für jeden untersuchten mtSNP Locus (X-Achse). Hellgraue Balken zeigen ancestrale Varianten an. Detektierte Mutationen am jeweiligen Locus werden mit einem grünen Balken verdeutlicht. Dunkelgraue Balken beziehen sich auf Locus dropouts.

Allelfrequenzen ancestraler Varianten und Mutationen

Im Rahmen der Charakterisierung des Datensatzes wurde ein Überblick über die Frequenz von Mutationsereignissen untersuchter mtSNPs in der untersuchten Stichprobe erstellt. Hohe Mutationsraten wurden für die Varianten: 1719-A, 7028-T, 14766-T und 16516-C festgestellt. Verglichen hierzu konnte für jede analysierte Probe an den Positionen: 769, 2416, 4580, 4883, 5004, 5442, 6365, 6392, 7055, 7256, 8281, 9066, 10400, 10873, 12858, 13263, 15904 die jeweilige ancestrale Form detektiert werden (Abbildung 4.7).

4.3.3 minimaler Haplotyp

Die Ableitung eines minimalen Haplotypen erfolgte mit dem Ziel das Ausgangsset, bestehend aus 42 Loci, bis zur minimal notwendigen Information für eine Hg-Klassifikation zu verringern. Dies implizierte, neben einer beabsichtigten Analyse aller SNPs in einem Ansatz, eine Kosten- und Zeitersparnis im Analyseverlauf. Bezogen auf das methodische Vorgehen könnte dadurch eine Verminderung der mtSNP Ausgangszahl zu eindeutigeren Ergebnissen führen und das Maß an unspezifischen Signalverläufen verringert werden. Dabei ist zu bemerken, dass sich die durchgeführte Minimierung anhand der Ergebnisse aus der populationsbezogenen

Hg-Klassifikation ausgerichtet. Durch sukzessive Extraktion notwendiger Klassifikatoren wurden ausgehend von der Gesamtanzahl (42 Positionen) 26 SNPs als sog. Keyloci extrahiert, die für eine Gruppierung in die jeweilig resultierende Hg notwendig waren. Bei der Klassifikation mit Hilfe extrahierter Keyloci änderte sich der probenspezifische Score nicht. Die Klassifikatoren 2706-G und 1811-G traten im probenspezifischen Haplotyp, welcher in die Linien U2b und K1a4a1b2 gruppiert wurde, nicht auf. Jedoch werden diese im Bewertungsprozess bei Haplogrep als haplogruppenspezifisch angegeben. Das Ergebnis ist i. Allg. von zwei wesentlichen Faktoren abhängig. Zum einen vom gewählten Klassifikationsalgorithmus und der damit im Zusammenhang stehenden Ergebnisbewertung und zum anderen von der ursprünglichen SNP-Auswahl. Der publizierte Klassifikationsbaum nach Paneto et al. (2011) wurde daraufhin unter Einbindung der 26 Keyloci neu strukturiert (Abbildung 4.8). Im Vergleich zum publizierten Klassifikationsbaum, der als Orientierung für die Einordnung resultierender Haplotypen dient, wird an wenigen Stellen der Hg-Klassifikation (z. B. 3915-A [H6a], 16362-C [H6], 15607-G + 8697-A + 709-A [T]) deutlich, dass für die Eingruppierung zum einen mehr Loci notwendig gewesen sind und diese zum anderen anders gewichtet wurden als bei Paneto et al. (2011).

4.4 Y-chromosomale Analysen

Die Ergebnisse für die Ychr. STR- und SNP Analysen wurden unterstützend im Rahmen einer Masterarbeit (2014) zur Umsetzung der hier aufgeführten Zielstellung, gemeinsam erhoben. Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden 2015 gemeinsam publiziert (Harthun et al., 2015).

4.4.1 Y-SNP-Analyse und Haplogruppenklassifikation

Primerdesign

Für die panelergänzenden zehn Y-SNPs aus Wei et al. (2013) erfolgte zunächst, wie bereits in Kapitel 3.2.7 beschrieben, ein Design notwendiger Primersequenzen für die Multiplex-PCR und SBE-Reaktion unter Berücksichtigung der Empfehlungen aus dem Protokoll nach Sanchez und Endicott (2006) (Tabelle 3.13). Die Ergebnisse hierzu sind der folgenden tabellarischen Auflistung zu entnehmen (Tabelle 4.2).

Primerfokusreaktion

Zur Ermittlung allelspezifischer Signale im Elektropherogramm, wurde die Lauflänge jedes Locus abhängigen SBE-Primers durch eine Primerfokus Reaktion im Singleplexverfahren bestimmt. Hierfür wurden die SBE-Primer um eine fluoreszenzmarkierte Base (A, T, G oder C) verlängert. Die Ergebnisse zeigen zum einen keine längenspezifischen Signalüberschneidungen. Alle Signale waren im Abstand von zwei bis max sechs bp gut voneinander zu trennen. Zum anderen wurden, unter Berücksichtigung einer matrix- und systemabhängigen Fragmentlängenanalyse, Unterschiede zwischen theoretischer Länge und des Signals im Elektropherogramm für jeden verlängerten SBE-Primer, erkannt. Hierbei wurden tolerierbare Längenverschiebungen im Bereich von zwei bis max. 9 bp (M174) deutlich.

Multiplexanalyse

Bevor eine Multiplexanalyse am Studienmaterial durchgeführt werden konnte, erfolgte eine Reihe von Vorversuchen zur Validierung der vier Systeme anhand der beschriebenen Testprobe (Zahnmaterial, PMI: 50 - 60 Y). Zunächst wurde geprüft, ob es möglich ist unter dem Einsatz beschriebener Amplifikationsumgebungen alle 52 YSNPs in einem Ansatz zu amplifizieren. Innerhalb erster Vorversuche wurde schnell deutlich, dass eine Auftrennung in die vorgesehene 4plex-Variante notwendig war. Dies zeigte sich sowohl im Auftreten einer Reihe von unspezifischen Peaks im Elektropherogramm als auch durch dropout vereinzelter Loci. Daraufhin folgte ein sukzessiver Aufbau des Vorgehens bis hin zur 4plex-Variante. In diesem Zusammenhang erfolgte eine stetige Anpassung der finalen Primerkonzentrationen an das Systemdesign. Im zweiten Versuchsaufbau wurden die drei Systeme aus Kohl et al. (2009) in der bereits aufgeführten Systemeinteilung getestet. An dieser Stelle zeigten sich ebenfalls sog. Artefakte, welche durch das Auftreten von unspezifischen Signalen gekennzeichnet waren. Diese konnten jedoch

von allelspezifischen Signalen eindeutig getrennt werden. Hauptproblem bildeten nicht zu detektierende Y-SNPs, weshalb eine erneute Aufteilung von nicht reproduzierbaren Loci (M230, M269) in andere Systeme durchgeführt werden musste.

Abschließend erfolgte die Einteilung auf vier Systeme mit 52 Loci. Hier fanden sich in den Systemen eins, zwei und vier unspezifische Signale, die sich jedoch auch von allelspezifischen sondieren ließen (Abbildung 4.9). Eine deutliche Verminderung dieser unspezifischen Signale erfolgte bei Verwendung der adaptierten Reaktionsbedingungen nach Paneto et al. (2011). Geräte spezifische Artefakte im roten, blauen und schwarzen Farbkanal schwankten je nach Durchlauf stark in ihrer Intensität und konnten anhand des speziellen Verlaufes ebenfalls klar abgegrenzt werden. Nach den Vorversuchen erfolgte die gezielte YSNP-Analyse am Studienmaterial durch Einsatz der 4plex-Variante. Analysiert wurden 43 Zahnproben (siehe Abbildung 4.3). Von dieser Anzahl konnte von 13 Individuen eine Doppelbestimmung anhand von Zahnmaterial aus Ober- und Unterkiefer durchgeführt werden. Bei der restlichen Anzahl konnte aufgrund des Vorliegens von entweder Ober- oder Unterkieferbesatz lediglich eine einfache Bestimmung durchgeführt werden. Mit Hilfe der Y-SNP Haplotypen sollte im Anschluss der Haplogruppenstatus festgestellt werden. Die Y-SNPs M123, M168 und M230 ließen sich in nahezu jeder Probe entweder gar nicht oder nur schlecht amplifizieren. Vorwiegend konnte der Haplotyp bei gut auswertbaren Profilen aus 48 Loci erstellt werden. Für 23 Proben konnte kein Y-SNP Haplotyp ermittelt werden (Abbildung 4.9). Neben der Bestimmung der Y-SNP Haplotypen gelang es bereits erlangte Ergebnisse aus der genotypischen Geschlechtsbestimmung mittels AMEL (S5 Kit, Promega) zu verifizieren. An dieser Stelle konnten 19 Individuen (18 männl. durch S5, AMEL), im Hinblick auf die genotypische Geschlechtsbestimmung, als eindeutig männlich klassifiziert werden.

Haplogruppenklassifikation

Grundlage für eine gezielte Haplogruppenklassifikation nach *Morley Y-DNA Project* bildeten auswertbare 20 Haplotypen von 16 Individuen. Die Datenanalyse der erhaltenen Informationen belief sich ausschließlich auf die Haplogruppenzuordnung. Eine Individualisierung auf Basis von SNPs wird erst ab einer Verwendung von 50-60 Loci empfohlen, was auf den geringeren Informationsgehalt (geringe Mutationsraten, Bottleneck Effekt) dieser Marker zurückzuführen ist. Von einer Individualisierung auf Basis ermittelter Haplotypen wurde abgesehen, da durch einen regelmäßig zu beobachteten Locus dropout mehrerer Positionen häufig nur 48 Loci bestimmt werden konnten. Die über *Morley Y-DNA Project* ermittelten Ergebnisse berufen sich dabei auf die Haplogruppe mit der höchsten Wahrscheinlichkeit. Klassifiziert wurden i. Allg. die Haplogruppen CF und BT sowie drei Makrohaplogruppen I, R, K einschließlich zugehöriger Sublinien R1 und R1b für die Population. Die Verteilung der Haplogruppen über die Population zeigt, dass mehrheitlich die Makrohaplogruppen I und R in der Population vertreten sind (Abbildung 4.10).

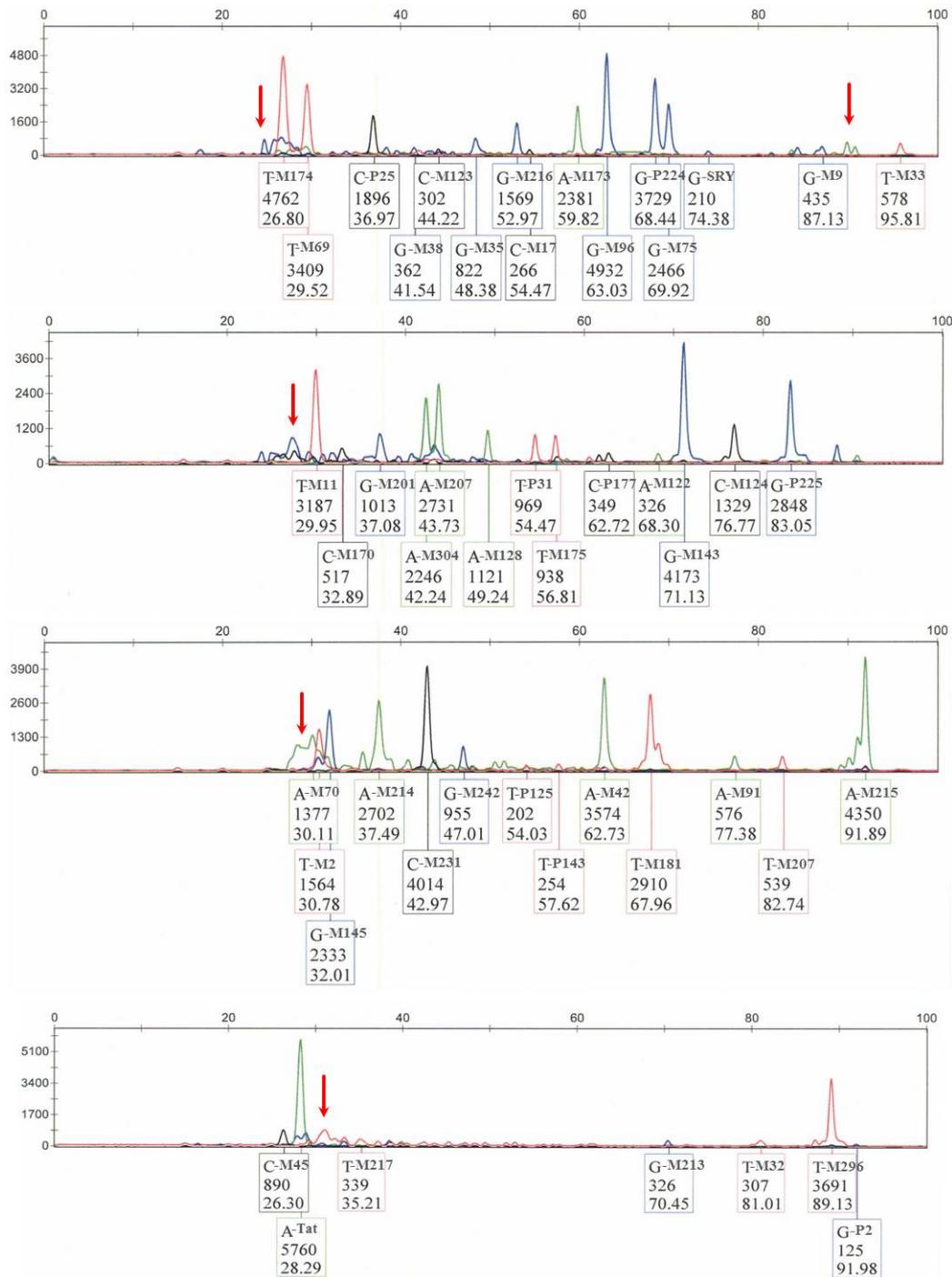


Abbildung 4.9: 4plex Y-SNP Profil.

Dargestellt ist das Ergebnis aus der Fragmentlängenanalyse einer Probe. Die Analyse der 52 Loci erfolgte in vier Multiplexsystemen. Der resultierende Haplotyp wird an dieser Stelle durch 48 signalpositive Loci erklärt. Die YSNPs M207 (System 2+3), M230 (System 3+4), M269 (System 2+4) wurden jeweils in mehreren Systemen zur Erhöhung der Signalintensität reproduziert. Rote Pfeile markieren erwähnte systemspezifische Artefakte, die jedoch unter Zuhilfenahme von Ergebnissen aus der Fokusreaktion ausgeschlossen werden konnten.

Haplogruppenverteilung mittels Y-SNPs

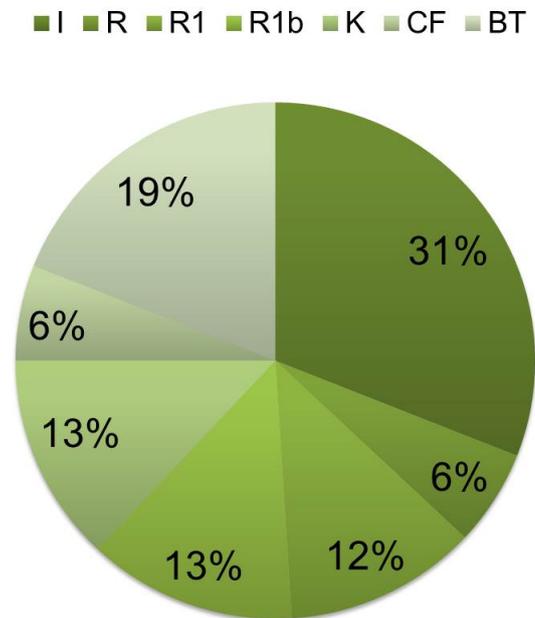


Abbildung 4.10: **Ermittelte Hg-Verteilung auf Basis ermittelter Y-SNP Haplotypen.**

Dargestellt ist die resultierende Hg-Verteilung für die historische Population auf Basis ermittelter Y-SNP Haplotypen. Zugrunde liegen 16 Individuen, für welche ein Haplotyp ermittelt werden konnte. Dabei wurden zwei Makrohaplogruppen I und R sowie zwei Superhaplogruppen CF und BT klassifiziert. Anhand der ancestralen Varianten in Form der Superhaplogruppen CF und BT ist eine genaue Zuordnung zu Makrohaplogruppen nicht möglich.

4.4.2 Statistische Auswertung Ychr. STR-Analyse

Die biostatistische Auswertung erhaltener Ychr. Haplotypen (PPIY23) hatte zum Ziel bedeutende populationsgenetische Kenngrößen für die Population zu beschreiben. Grundlage für eine Erhebung der statistischen Variablen bildete in diesem Fall die Annahme, dass keine Verwandtschaft zwischen den untersuchten männlichen Individuen vorliegt. Hierfür erfolgten Berechnungen zu folgenden Variablen: Gendiversität (GD), Haplotypdiversität (HD), Diskriminationskapazität (DC), Haplotypfrequenz (HF) und Allelfrequenz (AF). Ebenso wurden Aussagen über einen *Unique Haplotype* (UH) im Datensatz getroffen.

Aufgrund degradationsbedingter Phänomene in den Profilen, mussten im Voraus Rahmenbedingungen für die Berechnungen festgelegt werden, damit ein Vergleich der gewonnenen Daten mit dem Referenzdatensatz der YHRD gewährleistet werden konnte. Diese Rahmenbedingungen involvierten den Ausschluss häufig von Locus dropout betroffenen Y-STR Systemen. Dadurch reduzierte sich die Anzahl von ursprünglich 23 analysierten Systemen auf 16 Systeme mit Fragmentlängen < 300 bp (DYS576, DHS389I, DHS448, DHS389II, DHS391, DHS481, DHS549, DHS533, DHS570, DHS635, DHS390, DHS439, DHS393, DHS458, DHS385a und DHS385b) um die zugrundeliegende Qualität des DNA-Templates zu berücksichtigen sowie

einen Informationsverlust von Beginn an aus der Berechnung auszuschließen (Butler, 2011). Eine weitere Eingrenzung implizierte die Auswahl jener Profile mit max. drei Locus dropout Ereignissen, sodass unter Berücksichtigung der Auswahlkriterien jede analysierte Probe einen minimalen Haplotypen von 13 Y-STR Systemen aufwies. Das bedeutete die Minimierung von ursprünglich 18 PPIY23-Profilen auf 12, die anhand der o. g. Kriterien in die biostatistischen Berechnungen einbezogen werden konnten. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe eines erstellten Java-Skriptes, anhand folgender Gleichungen durchgeführt (siehe Gleichungen 4.3 – 4.7):

Allelfrequenz

Zur Bestimmung der Allelfrequenz p_{AF} eines untersuchten Y-STR Locus wird die Häufigkeit eines detektierten Allels pro STR Locus Xi_A durch die Gesamtanzahl aller in der Population auftretenden Allelvarianten des STR Locus Ni_A dividiert (Gleichung 4.3). Die höchste Frequenz konnte für das Allel 10 (rel. Frequenz = 0,75) im Locus DYS391 bestimmt werden.

$$p_{AF} = \frac{Xi_A}{Ni_A} \quad (4.3)$$

p_{AF} Allelfrequenz p

Xi_A gemessene Allelhäufigkeit am STR Locus i

Ni_A Gesamtanzahl aller auftretenden Allelvarianten am STR Locus i

Gendiversität

Diese Variable beschreibt die genetische Vielfalt eines Y-STR Locus und lässt sich anhand ermittelter Allelfrequenzen AF_i für jeden zugehörigen Locus p_i berechnen (Gleichung 4.4).

$$GD = \frac{n(1 - \sum AF_i^2)}{(n - 1)} \quad (4.4)$$

GD Gendiversität am Locus p_i

AF_i Ermittelte Allelfrequenzen am Locus p_i

In Tabelle 4.3 sind die Diversität ermittelter Allele (AD) mit deren absolutem Auftreten und der daraus resultierenden Gendiversität (GD) für jeden YSTR Locus aufgeführt. Die Variable Gendiversität beschreibt in diesem Zusammenhang die genetische Vielfalt bezogen auf den untersuchten Locus. Je höher die GD, desto höher auch die entsprechende Allelvariation am Locus. Die höchste Diversität wurde für das System DYS750 ($GD = 0,967$) und die geringste für DYS393 ($GD = 0$) ermittelt.

Haplotypfrequenz

Die Haplotypfrequenz HF beschreibt das Vorkommen eines bestimmten Haplotypen X_{HT} in der untersuchten Population bezogen auf die Gesamtheit ermittelter Haplotypen N_{HT} (Gleichung 4.5).

$$p_{HF} = \frac{X_{HT}}{N_{HT}} \quad (4.5)$$

p_{HF} populationsspezifische Haplotypfrequenz

X_{HT} ausgewählter Haplotyp

N_{HT} Gesamtheit der Haplotypen

Für die untersuchte Population ($n = 12$) wurden 12 einzigartige (*unique*) Haplotypen ermittelt. Die Frequenz beträgt laut Berechnungsvorschrift 0,083. Zieht man die Möglichkeit in Betracht, dass aufgrund erhaltener PPIY23 Profile zwei Individuen zu einer Patrillinie gehören und damit den gleichen Haplotyp besitzen, so lässt sich für diesen Haplotypen eine Frequenz von 0,12 errechnen. Alle weiteren populationsspezifischen Haplotypen würden

Tabelle 4.3: Ermittelte Alleldiversität (AD) und Gendiversität (GD).

Y-STR Lokus	AD	GD
DYS576	4	0,870
DYS389I	3	0,778
DYS448	2	0,889
DYS389II	3	0,926
DYS391	2	0,750
DYS481	4	0,833
DYS549	4	0,903
DYS533	2	0,938
DYS570	6	0,967
DYS635	3	0,917
DYS390	4	0,764
DYS439	2	0,854
DYS393	1	0
DYS458	5	0,903
DYS385a/b	4	0,928

unter Berücksichtigung dessen mit einer Frequenz von 0,06 auftreten. Da die hier vorgestellte Aussage mit Unsicherheiten behaftet ist, wurden nachfolgende Berechnungen nur auf Basis der ersten angenommenen Hypothese getätigt.

Haplotypdiversität

Die Berechnung der Haplotypdiversität (Gleichung 4.6) beruht auf den Frequenzdaten hinsichtlich ermittelter Haplotypen (Gleichung 4.5). Da alle Haplotypen für diese Berechnung als einzigartig (*unique*) angenommen wurden und Frequenzen sich gleichmäßig über die Population verteilen ergibt sich daraus eine Haplotypdiversität mit dem Wert 1.

$$HD = \frac{n(1 - \sum HF_i^2)}{(n - 1)} \quad (4.6)$$

HD Haplotypdiversität

HF Haplotypfrequenz

Diskriminationskapazität

Die Diskriminationskapazität errechnet sich aus der Anzahl der verschiedenen Haplotypen C_{HT} und der Probenanzahl n (Gleichung 4.7). Bezogen auf die Diversität ermittelter Haplotypen und unter Berücksichtigung o. g. Einschränkungen für den zugrundeliegenden Datensatz entspricht die Diskriminationskapazität dem Wert 1. Dadurch ist jeder Haplotyp einzigartig im Datensatz vertreten. Bei der ergänzend vorgenommenen Betrachtung des minimalen Haplotypen (MHT), der sich aus einem Format bestehend aus acht Y-STR Systemen (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385) zusammensetzt, entspricht die *DC* und *HD* ebenfalls dem Wert 1.

$$DC = \frac{C_{HT}}{n} \quad (4.7)$$

DC Diskriminationskapazität

C_{HT} Anzahl unterschiedlicher Haplotypen

n Probenzahl

Haplotyprecherche mittels YHRD

Die Verwendung des MHT für die Haplotyprecherche lässt sich durch das Vorhandensein einer umfangreichen Datenbasis auf der YHRD (160 693 Haplotypen, release: 18.03.2016) begründen. Mit der Möglichkeit weitere Metainformationen bezüglich hinterlegter populationsspezifischer Ychr. Daten für einen spezifischen Haplotypen zu erhalten, wurde eine datenbankgestützte Recherche für die untersuchte Population durchgeführt. Hierbei wurden Hinweise auf die Klassifizierung eines ermittelten populationsspezifischen MHT in einer modernen Abstammungslinie (*ancestry information*) ermittelt. Über hinterlegte Y-SNP Daten können darüber hinaus Haplogruppeninformationen über den assoziierten Y-STR Haplotypen gewonnen werden (Tabelle 4.4). Mit Hilfe dieser Ergebnisse können ergänzend zu den Ergebnissen aus der Haplogruppenklassifikation mittels den Y-SNPs weitere Abstammungsinformationen erhalten werden. Dabei zeigt sich das die Mehrheit der Haplotypen den Haplogruppen I und R zugeteilt werden. Diese Ergebnisse sind jedoch, anders als die mit dem Y-SNP erzeugten Daten zur Hg-Klassifikation, unter Vorbehalt zu betrachten, da es sich hier um Vergleichsdaten (basierend auf Ychr. STR-Daten) handelt und nicht um den aus der Probe generierten Y-SNP Haplotypen.

Tabelle 4.4: Metainformationen (YHRD) ermittelter MHT nach Harthun et al. (2015). Anzahl analysierter Proben und zugehörige Datenbanktreffer der Suche mit dem MHT. Die Haplogruppenklassifikation basiert auf in der Datenbank hinterlegter *ancestry information*, welche populationsspezifische Daten repräsentieren (Haplogruppe und Metapopulation mit dem höchsten Vorkommen).

Proben Nr.	Match YHRD (MHT)	Hg	Metapopulation
1	128	I	Uralic-Yukaghir
2	2313	R1	Eastern European
3	532	I(1)	Austronesian
4	1002	I(1)	Western European
5	286	R1b	Western European
6	1002	I(1)	Western European
7	1602	R1	Western European
8	798	I(1)	Austronesian
9	798	I(1)	Austronesian
10	1487	R1	Western European
11	66	I(1)	Afro-American
12	798	I(1)	Austronesian

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Bewertung des aDNA Workflows

Bezugnehmend auf die erste Hypothese (siehe Kapitel 2) erfolgt eine Bewertung und Diskussion der methodischen Herangehensweise, ausgehend von der mechanischen Aufarbeitung, über die aDNA-Extraktion und folgender Etappen der Quantifizierung und STR-Analyse. Dabei sollte die Eignung der erprobten methodischen Abläufe für die aDNA-Analyse sowohl für die forensische Fallarbeit als auch für ähnliche Forschungsarbeiten hinterfragt und eingeschätzt werden (siehe 5.2). Ein enorm wichtiger Einflussfaktor ist die Wahl einer geeigneten DNA-Extraktionstechnik (Loreille et al., 2007). Die Erfahrung hierzu hat gezeigt, dass das Gleichgewicht nicht ausschließlich auf der Seite der Extraktionstechnik liegt. Bereits vor dem Schritt der DNA-Extraktion bedingen eine Reihe von Einflussfaktoren die Qualität des resultierenden Extraktes, die unbedingt berücksichtigt werden müssen. Dazu zählen zunächst der eigentliche Feingewebbau und die zum Zeitpunkt vorliegende Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials. Die vorgestellte Reihenfolge nach Alt et al. (2014) in der präferenziellen Wahl des osteologischen Materials, hat sich in dieser Arbeit bezogen auf Zahnmaterial, bestätigt. In einer vorangegangenen Testphase am Görziger Skelettmaterial zeigte sich, dass DNA-Ausbeuten aus eingesetzten Knochenregionen verglichen mit Zahnmaterial weitaus geringer waren. Zu 15 Skeletten wurden neben Zähnen auch jeweils Fragmente von *Humerus* und *Femur* aufgearbeitet und DNA extrahiert. Dabei konnte für lediglich zwei *Humeri*-Fragmente ein Quantifizierungsergebnis im Bereich von 0,008 – 0,009 ng/ μ L ermittelt werden (Quantifiler[®] Human). Auch für DNA-Extrakte aus den *Femora* konnten nur drei Quantifizierungsergebnisse bis max. 0,021 ng/ μ L erhalten werden. Mit Ausnahme eines Probenanteils von 26 % (von insgesamt 82 Zahnproben), für die kein Ergebnis mit dem Human Quantifiler[®] ermittelt werden konnte, resultierten für die übrigen Proben DNA-Konzentrationen von 0,001 – 0,15 ng/ μ L. Von fünf Skeletten wurde in der Testphase eine miniSTR-Analyse (PowerPlex[®] S5) der Extrakte aus *Femora* und *Humeri* angeschlossen. Hier zeigte sich deutlich, dass ein Quantifizierungsergebnis nicht immer richtungsweisend für die Qualität der STR-Profile ist. Für eine Femur-Probe, bei der keine DNA-Konzentration bestimmt wurde, konnte z. B. ein vollständiges S5-Typisierungsmuster erstellt werden. Allerdings mit einer Erhöhung der Standardzyklenzahl auf 34 Zyklen in der

PCR. Für die restlichen DNA-Extrakte aus den Knochen konnten nur Teilprofile im Fragmentlängenbereich < 250 bp und mit RFU < 300 erhalten werden. Für zwei aus zehn analysierten DNA-Extrakten resultierte kein Profil. Bei Betrachtung von ausschließlich Knochenregionen, Zahnmaterial ausgeschlossen, konnte somit eine strikte Rangordnung nach Alt et al. (2014) oder Mundorff und Davoren (2014) nicht bestätigt werden. Dies zeigt ebenfalls, dass eine alleinige Beurteilung des Knochenfeinbaus wie in MacHugh et al. (2000) dargestellt, nicht ausreicht, um eine Korrelation mit möglichen DNA-Ausbeuten herzustellen. Ähnlich verhält es sich mit der Korrelation von PMI mit dem DNA-Erhalt in biologischen Geweben. Auch hier besteht in den meisten Fällen kein eindeutiger Zusammenhang (Herrmann und Henke, 1999). Nur die Einbindung und Beurteilung weiterer Eckdaten, wie z. B. der Erhaltungszustand des Materials, die Dauer der Lagerung und entsprechende physikalische Randbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit und pH-Wert), können im Zusammenhang mit dem methodischen Erfahrungsschatz der Bearbeiter, im Bereich der aDNA Analytik, ein Ergebnis vermuten lassen.

In einer Studie von Herrmann und Henke (1999) wurde dieser Sachverhalt, unter Berücksichtigung verschiedener Umweltfaktoren in historischen Proben untersucht. Beobachtet wurde der Einfluss von Temperatur, Feuchtigkeit, pH, geochemische Besonderheiten der Lagerungsumgebung und der mikrobielle Befall, auf den DNA-Erhaltungszustand. Untersucht wurde prähistorisches Zahnmaterial (38 Zähne von 18 Skeletten) von drei verschiedenen Grabungsstätten (2000 – 1000 v. Chr.). Der Preservationsstatus wurde durch den relativen DNA-Gehalt aus mehrfach reproduzierten Amplifikationen geprüft. Die Beurteilung des Typisierungsergebnisses erfolgte in Abhängigkeit des vorherrschenden Umweltfaktors. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass insbesondere trockene Lagerungsbedingungen, niedrige Temperaturen und eine geringe mikrobielle Aktivität den DNA-Erhalt begünstigen. Darüber hinaus wurde erwähnt, dass das Hydroxylapatit von Knochen und Zähnen, und ebenso DNA, unter neutralen oder leicht alkalischen Bedingungen erhalten bleiben. Kurze Lagerungszeiträume bei Raumtemperatur wirkten sich nicht negativ auf die DNA-Integrität aus, jedoch auf die Reproduzierbarkeit. Lang andauernde, ungekühlte Lagerungen reduzierten sowohl die Menge amplifizierbarer DNA, als auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Herrmann und Henke, 1999).

Des Weiteren spielen neben der Wahl geeigneter aDNA Isolationsprotokolle alle notwendigen Arbeitsschritte, von der mechanischen Zerkleinerung einschließlich der Dekontaminationsmaßnahmen, über die DNA-Quantifizierung bis hin zur Wahl einer sensitiven Typisierungstechnik eine große Rolle (siehe Abschnitt 5.2). Die wichtigsten Faktoren, die eine *Downstream* Analyse beeinflussen und in Folge des methodischen Vorgehens berücksichtigt werden sollten, ist das Vorliegen von inhibierenden Substanzen sowie verfahrensbezogene Einflussfaktoren (z. B. Scherkräfte und Wärmeentwicklung). Diese können den natürlich vorliegenden DNA-Degradationsgrad künstlich erhöhen. Eine verbreitete Technik zur mechanischen Zerkleinerung ist die Verwendung einer sog. Kugelmühle unter dem Einsatz von flüssigem Stickstoff (Rohland und Hofreiter, 2007a). Dieser dient zu einer kontinuierlichen Kühlung der Probe während des Zerkleinerungsvorgangs, um einer induzierten Hitzeentwicklung entgegen zu wirken. In dieser Arbeit wurde auf den Stickstoffeinsatz, aufgrund des aufwendigen Präparationsprozedere

res, verzichtet. Stattdessen wurde durch, eine in Intervallen vollzogene Unterbrechung des Zerkleinerungsprozesses, eine Kühlung der Probe erzeugt, um einer künstlichen Degradation entgegen zu wirken. In einer Studie von Caputo et al. (2013) wird der alternative Einsatz von feinsten Knochenschnitten für die DNA-Extraktion beschrieben. Dies wäre grundsätzlich bei der Analyse von Knochenmaterial möglich. Allerdings sind sehr poröse Knochen, wie bei historischem Skelettmaterial der Fall, durch den Elastizitätsverlust hierfür weniger geeignet. Beide Vorgehensweisen der mechanischen Materialpräparation wurden in der Studie von Caputo et al. (2013) einbezogen und die jeweiligen Typisierungsresultate gegenübergestellt. Für 50 % des Stichprobenumfangs, konnte beim Einsatz von Knochenschnitten in die DNA-Extraktion im Vergleich zu den Knochenmehl-verarbeiteten Proben, vollständige Profile erhalten werden. Dem gegenübergestellt, konnte für 10 % den mit einer Kugelmühle zerkleinerten Probenanteil, ein vollständiges STR-Profil erhalten werden.

Anders als in der vorliegenden Arbeit, wurden 34 junge Knochenproben mit einem PMI von 0,2 – 64 Jahren und mit einem höheren Kollagenanteil, untersucht. Gegen o. g. Aussage spricht eine verbreitete Hypothese, dass eine vergrößerte Probenmatrix, wie diese bei sehr feinem Zahn- oder Knochenmehl entsteht, eine vergrößerte Kontaktfläche für Lösungsmittel im Demineralisierungsprozess (z. B. EDTA) darstellt. Auf der anderen Seite stellt dies in Kombination mit den spezifischen Demineralisierungszeiten ein erhöhtes Risiko für die Anreicherung von Inhibitoren im Substrat dar (Alaeddini et al., 2010), was die Ergebnisse in der Arbeit von Caputo et al. (2013) erklären könnte. Dazu kommt die max. Menge an präpariertem Ausgangsmaterial, die in den Demineralisierungsprozess eingesetzt werden sollte. In dieser Arbeit lag diese Menge bei 0,23 – 2,02 g. Die Differenz in resultierenden Zahnmehlmengen lässt sich durch unterschiedliche Zahnvolumina von *Molaren* oder *prämolarem* Zahnmaterial (je nach Vorhandensein bei den Skelettindividuen) begründen. Des Weiteren wurde auf die Abnahme einer standardisierten Menge verzichtet. Dies hatte zum Ziel, bestmögliche Ausbeuten, ohne ein zusätzliches Kontaminationsrisiko durch ein direktes Überführen in die Lösungsumgebung im Demineralisierungsprozess, zu erzielen. Unterschiede in der STR-Qualität zwischen dem Einsatz von 0,2 – 1,0 g und 1,0 – 2,0 g konnten nicht festgestellt werden. Bei Verfügbarkeit von Knochenmaterial weisen verschiedene Arbeiten auf einen beschränkten Mengeneinsatz hin. Amory et al. (2012) zeigten in ihrer Arbeit, dass mit 0,5 g Knochenmehl vergleichbare, z. T. auch höhere DNA-Ausbeuten als beim Einsatz von 2 g resultierten. Wird durch die Kenntnis über Bodenlagerungsbedingungen und durch Beurteilung des Erscheinungsbildes von Knochen- oder Zahnmaterial von einem Vorhandensein von Störsubstanzen (Inhibitoren) ausgegangen, würde dies das Resultat beim Einsatz von einer Menge > 0,5 g pulverisiertem Material, negativ beeinflussen. Auch in dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die Berücksichtigung entsprechender Faktoren (Knochen- bzw. Zahnbeschaffenheit, Lagerungsbedingungen und etablierte Prozessabläufe) im Aufarbeitungsprozess, negativen Typisierungsresultaten entgegenwirken kann.

Für den Schritt einer Demineralisierung der Knochenmatrix wurde in der vorliegenden Arbeit ein destruktiver Prozess mit EDTA, in Kombination mit dem Enzym Proteinase K und einem mehrmaligen EDTA-Wechsel, über einen Zeitraum von 72 h, gewählt. Die Verwendung

von EDTA in Kombination mit der Serinprotease erhöht die Effizienz im Extraktionsprozess. Zwei wesentliche Aspekte werden beim Einsatz dieser berücksichtigt. Zum einen die Degradation störender Proteine und die Ziel-gebundene Solubilisierung in der aquatischen Phase exogen komplexgebundener DNA. Zum anderen kann im Zusammenspiel mit dem Komplexbildner EDTA die DNase-Aktivität herab gesetzt werden (Fisher et al., 1993). Ein destruktiver Prozess in dieser Form wird bei Hydroxylapatit-reichem osteologischen Material, durch die Affinität exogener DNA zum Apatit, empfohlen. Hohe EDTA-Volumina sollen, wie in einem Standardprotokoll nach Hochmeister et al. (1991) beschrieben, eine gute Verteilung und einen schonenden Inkubationsprozess von Lösungsmittel und Pellet, unter alkalischen Bedingungen und niedrigen Temperaturen, herbei führen. Die Bedeutung des Demineralisierungs- oder Entkalkungsschrittes der Matrix basiert auf der Prämisse, dass DNA durch kristalline Strukturen komplex gebunden vorliegt, und ohne den Einsatz entsprechender Chelatbildner, wie z.B. EDTA, nicht in Lösung gehen würde (Huel et al., 2012). Ausgewählte Arbeiten, wie Wilcox et al. (1993) und Pfeiffer et al. (1999), berichten über eine Reduzierung der DNA-Menge in einem andauernden Prozess der Matrixentkalkung. Im Gegensatz dazu verweist Loreille et al. (2007) auf eine Erhöhung dieses Zeitintervalles. Der hier gewählte Zeitraum von 72 h für die Demineralisierung sollte eine sukzessive Freisetzung eingeschlossener Zellen und endogener DNA berücksichtigen. Auf das Rückhalten von eventuell exogener DNA wurde verzichtet, in dem der Überstand verworfen wurde, da durch ein häufig beobachtetes Phänomen einer bräunlichen Verfärbung des Überstandes, von dem Vorliegen möglicher Inhibitoren ausgegangen wurde, und diese nicht weiter mitgeführt werden sollten.

Häufig wird die organische aDNA-Isolation (Phenol/Choloroform) als Goldstandard definiert. Neben dieser, werden ebenso Silica-Verfahren bei aDNA, bevorzugt (Rohland und Hofreiter, 2007b). Vorteil einer organischen Extraktionsmethodik ist die Trennung von DNA und Proteinen oder anderen Zelltrümmern, die nachfolgende Amplifikationsschritte inhibieren könnten. Im Vergleich zu silica-basierten Verfahren ist dies eine kostengünstige Methode und meist unabhängig von der Menge an Ausgangsmaterial, welches später nach der Demineralisierung in die Isolation überführt wird. Der Vorteil dieser Verfahren liegt in einer Automatisierung des Prozesses, womit eine Kontaminationsgefahr vermindert wird. Des Weiteren bleibt die Konfrontation mit toxischen Substanzen wie Phenol oder Chloroform aus (Pagan et al., 2012). Jedoch ist dieses Prinzip, durch eine begrenzte Bindungskapazität der Trägermatrix, oft nicht sensitiv genug für stark fragmentierte DNA. Silica-Verfahren beruhen auf der Verwendung von chaotropen Salzen (z. B. Guanidiniumthiocyanat) zur Zerstörung von Proteinen. Durch die Ausbildung ionischer Salzbrücken kommt es zur Bindung an die Silica Oberfläche (Davoren et al., 2007). Guanidiniumthiocyanat (GuSCN) verhindert zudem eine Co-Extraktion von Inhibitoren. Allerdings ist das Verfahren stark pH-Wert abhängig, wodurch beim Umgang mit Substanzen wie EDTA mit einem pH > 7,5 eine geringere Ausbeute resultieren kann (Dukes et al., 2012). Die Effizienz des in der Arbeit vorgestellten Protokolls könnte durch den Einsatz von einer Silica-Membran, in Form eines zusätzlichen Aufreinigungsschrittes, verbessert werden. Dadurch könnte die Extraktion längerer DNA-Fragmente (> 200 bp), bei DNA mit qualitativ hohem Konservierungsstatus, ermöglicht werden.

Oft ergeben sich gerade im Interpretationsschritt der STR-Profile mit kommerziellen Systemen Schwierigkeiten, nicht nur durch das Fehlen von Vergleichsmaterial sondern auch durch deutlich erniedrigte Signalstärken und häufig auftretende Phänomene wie allelic- oder sogar Locus dropout. Anhand gewonnener Ergebnisse aus den Profilen konnte festgestellt werden, dass ab einem Fragmentlängenbereich > 200 bp nur noch selten Allelinformationen abzulesen und alle Profile mit dem charakteristischen Merkmal einer „Decay curve“ gekennzeichnet waren, einschließlich deutlich erniedrigter Signalstärken. Diese erreicht unter Umständen nicht mehr den Schwellwert von 50 RFU, weshalb diese Peaks im Profil zwar noch sichtbar, jedoch nicht mehr detektierbar sind. Das Herabsetzen des Schwellwertes für die Peakdetektion würde zwar zur Erkennung relevanter Signale führen, allerdings würden auch häufiger *Stutter-Peaks* detektiert werden. Dies führt folglich zu einer Vielzahl von Signalen, die eine Interpretation von STR-Profilen erheblich erschwert. Niedrige RFU, bei Fragmentlängen < 200 bp, erschweren häufig die Unterscheidung von *Stutter-Peaks* und Peaks mit Allelinformation. Findet lediglich eine Einfachbestimmung mit nur einem STR-Kit statt, wäre zu empfehlen, alle Systeme mit Fragmentlängen > 200 bp bei der Auswertung zu vernachlässigen, da eine eindeutige Allelzuordnung bei manchen Proben kaum möglich ist. Zudem wurden gewonnene Amplifikationsergebnisse nicht reproduziert, was bei aDNA Analysen, wenn möglich, erfolgen sollte. Mit der Verwendung weiterer STR-Kits zum hier eingesetzten miniSTR Kit, können die Ergebnisse zum einen reproduziert, verglichen und mit zusätzlichen Systeminformationen erweitert werden.

5.2 aDNA-Quantifizierung

Mit dem Einsatz beider DNA-Quantifizierungssysteme (Quantifiler[®] Human und PowerQuant[®]) wurde das Ziel, die Anwendbarkeit bei aDNA-Analysen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *Downstream* STR Anwendungen zu prüfen und die Aussagekraft systemspezifischer Komponenten zu beurteilen, verfolgt. Vielzählige Faktoren wie das Vorliegen gelöster inhibitorischer Substanzen oder auch *low quantity*- und *quality*-DNA, können neben dem Einfluss von stochastischen Effekten das Ergebnis gerade bei aDNA Studien bedingen. Lang gelagertes oder historisches Zahnmaterial kann durch z. B. Kontaminationen aus der Umgebung, belastet sein. Auch die, in Folge des methodischen Vorgehens zum Einsatz kommenden Lösungen, können bei der Typisierung eine PCR-hemmende Wirkung hervor rufen. Dazu zählt zum einen die umgebungsbedingte bakterielle Aktivität, Pilze, Huminsäuren und organische Substanzen wie Phenol, Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Gallensalze. Zum anderen können die natürlichen Bestandteile des Zahnes, wie Kollagen und Kalziumionen, ebenfalls inhibierend wirken (Vertucci und Anthony, 1986).

Diese Substanzen können die PCR oder die DNA-Polymerase selbst in deren Aktivität hemmen, wodurch ein Analyseerfolg verhindert wird. Inhibitoren können dabei direkt an einzel- oder doppelsträngige DNA binden und so die erwartete Hybridisierung von Primersequenzen oder der Polymerase verhindern. Infolgedessen kann ein spezifischer DNA-Abschnitt nicht amplifiziert werden. Des Weiteren kann durch die Interaktion mit der DNA-Polymerase und

die Bindung von Co-Faktoren im Überschuss, z. B. Magnesiumionen, die Aktivität im Amplifikationsprozess vermindert werden. Infolge einer Sondeninhibierung kann bei qPCR Verfahren darüber hinaus DNA amplifiziert werden. Allerdings wird kein Signal gerechnet, wodurch ein falsch-negatives Ergebnis gegenüber dem tatsächlichen DNA-Gehalt erzeugt wird (Bessetti, 2007).

Durch das Phänomen einer DNA-Fragmentierung kann, neben dem Einfluss von inhibitorischen Substanzen, die Bindung systemspezifischer Sonden an die Targetregion z. T. ebenfalls nicht mehr erfolgen. Auch wenn der DNA-Strang durch oxidative Prozesse geschädigt ist, kann die Sonde unter Umständen nicht richtig binden und emittiert bei der Detektion kein Licht. Durch oxidative Prozesse hervorgerufene Nukleotid-Modifikationen können die Bindung der Sonde in diesem Bereich ebenfalls hindern. Bei sehr hoher Stringenz bindet die Sonde nicht, weil die DNA-Sequenz nicht zu 100 % mit der komplementären Sequenz der Sonde übereinstimmt. Dies führt dazu, dass weniger DNA-Moleküle detektiert werden, als vorhanden sind. Bei niedriger Stringenz bindet die Sonde unspezifisch. Das bedeutet, dass Kontaminationen in Form von z. B. bakterieller DNA, detektiert wird und mehr DNA angezeigt wird. Folge dieser zu hohen oder zu niedrigen Stringenz sind mögliche Interpretationsfehler bzgl. des DNA-Erhaltungszustandes. Im Folgeschritt einer aDNA-Typisierung mittels herkömmlicher STR-Analyse, können verschiedene Effekte im Elektropherogramm auftreten, welche auf eine Degradation oder auch Inhibierung zurückzuführen sind (lokusspezifische dropout Effekte) und die Authentizität der Profile beeinflussen. Ist die Quantifizierung durch das Vorliegen von Inhibitoren beeinflusst, so kann durch die Berücksichtigung der falsch-positiven oder negativen Ergebnisse die Profilqualität auch bei hoher Sensitivität der Systeme vermindert werden. Wird das Assay, entgegen der Aussage des Quantifizierungsergebnisses, mit DNA „überladen“ treten eine Reihe von Artefakten auf, die durch wiederholte Amplifikationen beseitigt werden müssen. Dies strapaziert Kosten- und Zeit. Ist die Amplifikation durch ein hohes Maß an Inhibitoren gestört, wird der eigentliche *DNA-Input* unterdrückt und die Folge können mehrzahlige Locus dropouts oder sogar ein Profilverlust sein.

Unter besonderer Berücksichtigung o. g. Einflussfaktoren, im Schritt der Quantifizierung und STR-Analyse, galt es als Bestandteil der genannten Fragestellungen ein neuartiges Quantifizierungssystem (PowerQuant[®]), welches 2015 präsentiert wurde, am bestehenden Probenatz zu testen und mit den bereits im Voraus gewonnenen Ergebnissen mit dem Quantifiler[®] Human, gegenüberzustellen. Insbesondere sollten die Besonderheiten in der PowerQuant[®] Systemkonfiguration evaluiert werden. Mit Hilfe eines spezifischen IPC-Targets und der Berechnung eines IPC-Shifts, soll zum einen das Maß an Inhibition abgebildet werden können. Zum anderen kann durch ein weiteres Fragment, das Degradationstarget, der Fragmentierungsgrad bestimmt werden. Beide Faktoren, sowohl Inhibition als auch Degradation können die Ergebnisinterpretation des Typisierungsergebnisses, z. B. eines STR Profils, deutlich erschweren und sollten daher schon im Schritt der Quantifizierung erkannt bzw. voneinander unterschieden werden. Die Möglichkeit einer Bestimmung des männlichen Anteils in der Probe durch ein integriertes Y-chromosomales Target war nicht Bestandteil der hier durchgeführten Analysen, ist jedoch grundsätzlich möglich.

Experimentell betrachtet hängt das Ergebnis einer autosomalen aDNA-Quantifizierung maßgeblich von der Länge des spezifischen Targets ab. Bei den hier im Fokus stehenden Systemen, unterscheiden sich die Targetlängen nur unwesentlich. Beim Quantifiler[®] Human beträgt die Länge des autosomalen Targets 62 bp. Hingegen beim PowerQuant[®] ist dieses 84 bp lang. Somit würden zunächst, bezogen auf die Hypothese des Einflusses der Targetlängen, keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zu erwarten sein. Der mit dem Quantifiler[®] Human nicht bestimmte Anteil von 26 % des untersuchten Probenumfangs kann, stochastische Effekte an dieser Stelle nicht betrachtet, auf die niedrigere Sensitivitätsgrenze, verglichen mit dem PowerQuant[®], zurück geführt werden. Mit diesem komplexen System können, entsprechend des internen Standardwertes, Konzentrationen $< 1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ genomische DNA (gDNA) bestimmt werden. Hingegen liegt die Sensitivitätsgrenze beim Quantifiler[®] Human Kits bei $23 \text{ pg}/\mu\text{L}$ gDNA.

Eine weitere Hypothese, neben dem Einfluss der Targetlängen, ist eine gesteigerte Sensitivität bedingt durch den Einsatz von *multi-copy target* Systemen im Vergleich zu *single-copy* Systemen, zu denen auch der Quantifiler[®] Human zählt. LaSalle et al. (2011) verweisen in ihrer Arbeit auf eine gesteigerte Sensitivität bei Verwendung von *multi-copy targets* zur DNA-Quantifizierung. Eine erhöhte Kopienzahl am Ziellokus erhöht die Chance, dass eine Sonde an noch intakte DNA bindet und *low template* DNA quantifiziert werden kann (Luo et al., 2010). Dies könnte die höheren Ergebnisse mit dem PowerQuant[®] erklären. Zur Darstellung und Prüfung einer Mittelwertdifferenz der jeweiligen Ergebnisse, wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt. Der p-Wert lag hier bei 0,00177. Unter Einbeziehung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ kann die Hypothese über eine Gleichheit jeweiliger Mittelwerte falsifiziert werden. Die höheren Quantifizierungswerte, die mit dem PowerQuant[®] System ermittelt wurden, können somit als signifikant und als nicht zufällig bezeichnet werden.

Weiterhin wurde die Aussagekraft des im PQ integrierten Degradationstargets (295 bp), für die Berechnung eines Degradationsindex $[C_{\text{Auto}}/C_D]$ und die Ableitung von Informationen über den Fragmentierungsgrad, geprüft. Daran folgte die Aufstellung der Hypothese, dass die Einbeziehung des Degradationsindex, als zusätzliches Quantifizierungsfeature und Entscheidungshilfe für nachfolgende Amplifikationschritte sowie zur Korrelation mit der STR Profilqualität bei aDNA sinnvoll sein kann. Der empfohlene Schwellwert für die Bewertung des Fragmentierungsstatus liegt bei dem Wert zwei. Dieser Schwellwert wurde, durch Initiierung einer künstlichen Degradation in den Testreihen, festgelegt. Zum einen wurde eine entsprechende Degradation, durch den Einfluss von UV-Strahlung (0 mJ, 50 mJ, 100 mJ und 300 mJ), induziert. Zum anderen wurde ein zeitlich abhängiger (0 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min) Temperatureinfluss bei 95°C auf die DNA-Degradation untersucht. Auch hier erfolgte die Gegenüberstellung des Quantifizierungsergebnisses mit dem entsprechenden STR-Profil für jede Probe aus der Testreihe (Promega, 2015b). Die gewonnenen Ergebnisse zum Degradationsindex für den historischen Probensatz zeigten, dass die Schwellwertgrenze ungünstig gewählt ist. Wie in Abbildung 4.2 deutlich zu erkennen, konnten für Proben mit einem Index größer 2 vollständige Profile mit dem gewählten miniSTR-Kit generiert werden. Besonders auffällig war dies für einen Anteil von 20 Proben mit einem Degradationsindex > 80 , bei denen kein

Lokus dropout auftrat. Somit ist an dieser Stelle von einer starken Degradation auszugehen. Die Beurteilung des Zusammenhangs von berechnetem Index und der Profilqualität erfolgte ausschließlich anhand ganzheitlicher Systemausfälle, da lediglich ein Amplifikationslauf (S5) durchgeführt werden konnte und die Authentizität homozygoter Signale daher grundsätzlich in Frage gestellt werden muss. Für die Reproduktion entsprechender Merkmalsausprägungen in den STR-Systemen sollten, wie bereits erwähnt, allerdings weitere Kontroll-Amplifikationen durchgeführt werden. Eine Korrelation von Degradationsindex und Profilqualität kann hier nur anhand max. Amplikonlängen des S5 Kits erreicht werden. Mit einer Länge von 294 bp weicht das Degradationstarget nicht wesentlich von max. Fragmentlängen in der Systemkonfiguration des PowerPlex[®] S5 Kits ab. Dadurch können Fragmentlängeninformationen > 400 bp, wie bei standardisierten forensischen STR-Kits, nicht beurteilt werden. Wodurch die Vollständigkeit, zumindest der miniSTR-Profile für diesen Probensatz, erklärt werden kann. Dieser Aspekt sollte deshalb durch den Einsatz eines standardisierten STR-Kits mit systemspezifischen Fragmentlängen > 400 bp weiter untersucht werden (z.B. PowerPlex[®] ESI 17 Pro System). Hinzu kommt, dass bei Standard STR-Kits die Fragmentlängen erzeugter Amplikone zwischen 100 bp und 400 bp liegen, sodass Quantifizierungssysteme mit Fragmentlängen < 100 bp den Anteil enthaltener DNA überbestimmen (LaSalle et al., 2011).

Eine Inhibitionskontrolle mittels integriertem IPC-Target im PowerQuant[®] bietet eine weitere Bewertungsmöglichkeit einer Korrelation von Quantifizierungsergebnis und STR-Profilqualität bei Vorliegen von inhibitorischen Substanzen. Bezogen auf den zugrundeliegenden Datensatz kann der vorgegebene Schwellwert für den IPC-Shift als richtungsweisend für die Qualität der miniSTR Profile, im Gegensatz zum Degradationsindex, bezeichnet werden. Bei Shifts > 0,3 sind deutliche Systemausfälle zu erkennen. Dennoch sei an dieser Stelle erwähnt, dass beobachtete Systemausfälle nicht ausschließlich auf das Vorliegen von Inhibitoren in der Probe zurückzuführen sind. Alle Proben, die einen IPC-Shift > 0,3 und Lokus dropouts aufweisen, besitzen einen Degradationsindex > 80. Die entsprechenden Phänomene können daher auch durch die Degradation verursacht worden sein. Ergänzend hierzu sollte deshalb, im Rahmen einer Inhibitionskontrolle, auffällige Peak-Imbalancen bei heterozygoten Signalen, in die Beurteilung einbezogen werden. Dies konnte jedoch nicht am vorliegenden Datensatz erfolgen.

Aus diesem Grund erfolgte aufbauend auf den dargestellten, ersten Ergebnissen eine weitere Testung mit künstlich inhibierten Proben, mit dem Ziel ergänzende Informationen über die Verwertbarkeit des IPC-Shifts als Kriterium zu erlangen. Zusätzlich zum IPC-Shift als Indikator wurde dabei ein ebenfalls neues STR-Kit getestet. Ziel war es, beide unabhängige Indikatoren auf deren Potential für die Inhibitionskontrolle zu prüfen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Kombination beider Indikatoren (IPC-Shift, QS-Ratio) eine zielgerichtete Ergebnisinterpretation für aDNA Analysen und auch für forensisch relevante Spuren, ermöglicht. Das Investigator[®] ESSplex SE QS Kit ist ein neuartiges System zur STR-Analyse. Amplifiziert werden 17 Loci, davon 16 autosomale STR-Loci und Amelogenin. Verglichen mit anderen STR-Kits zeichnet sich dieses, neben einer kurzen PCR-Laufzeit (ca. 60 min.), durch eine Resistenz gegenüber Inhibitoren und besonders durch den Einsatz interner Qualitätssen-

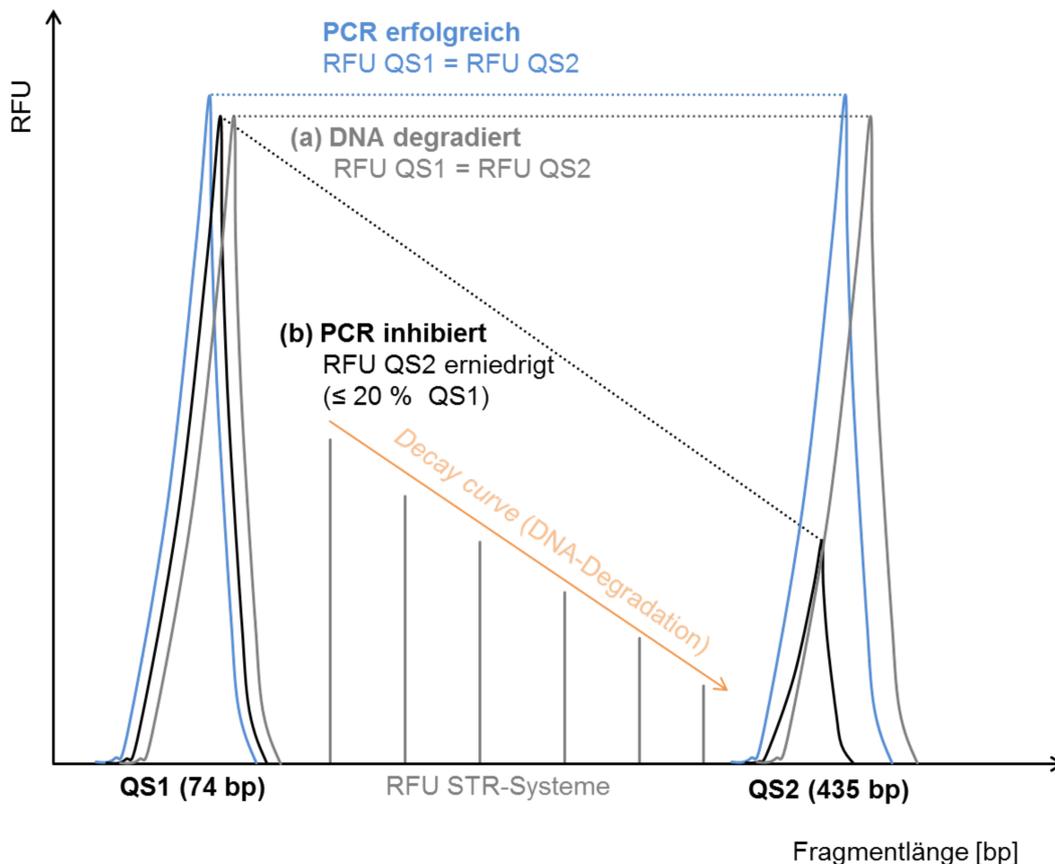


Abbildung 5.1: **Ableitung spezifischer Szenarien bei Beurteilung der Qualitätssensoren.** Als blaue Peaks dargestellt sind QS1 und QS2 bei erfolgreicher PCR. Beide Peaks haben in etwa ein gleiches Flächen- und Höhenverhältnis. In Grau dargestellt sind QS1 und QS2 bei der Amplifikation degradierter DNA. Die Qualitätssensoren haben ca. die gleiche Fläche. Die Signalstärken in den STR-Systemen (graue Balken) nehmen jedoch in Form einer charakteristischen *Decay curve* ab. In schwarz zu erkennen sind die Qualitätssensoren bei einer inhibierten DNA-Probe. Die Fläche des QS2 ist im Gegensatz zum QS1 um mindestens 20 % kleiner ($QS2 < 80\%$ des QS1).

soren aus. Diese wurden in Form von zwei künstlichen Plasmid Templates (74 bp und 435 bp) in den Mastermix, einschließlich zugehöriger Primersequenzen, integriert. Beide gelten als Amplifikationskontrollen und werden simultan mit den übrigen Markern amplifiziert. Mithilfe dieser Qualitätssensoren sollen Erkenntnisse über die Qualität der DNA Probe direkt im STR Profil gewonnen werden. Genauer, können so Aussagen über den DNA-Degradationsgrad, PCR Inhibition und die Quantität des DNA-Templates, getroffen werden. Der beschriebene Vorteil gegenüber anderen systeminbegriffenen Indikatoren liegt in der Möglichkeit die Phänomene Degradation und Inhibition direkt im STR-Profil voneinander zu unterscheiden. In Abbildung 5.1 sind die zu beurteilenden Szenarien zusammenfassend dargestellt. Entsprechende Rückschlüsse darüber können über die Berechnung eines Quotienten aus den Peakflächen beider Sensoren $[QS2/QS1]$ gezogen werden.

Die künstlich inhibierten Proben wurden durch die Abteilung für Forensische Genetik des rechtsmedizinischen Institutes der Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Diese wurden zur Inhibitionssimulation mit unterschiedlichen Mengen an Huminsäure ($0 \mu\text{g}$, $50 \mu\text{g}$, $250 \mu\text{g}$, $500 \mu\text{g}$, $2500 \mu\text{g}$, $5000 \mu\text{g}$) versetzt. Die DNA Extraktion erfolgte mit zwei unabhängigen Silica-Verfahren. Neben den zwölf mit Huminsäure versetzten Proben, wurden weiterhin 23 aus dem aDNA Datensatz einbezogen, um ergänzend zu den bereits erlangten Aussagen im Schritt der Quantifizierung, Informationen über das Degradationslevel und Inhibition zu erlangen. Bezugnehmend auf die präparierten Huminsäure-Proben, konnte festgestellt werden, dass bei steigender Konzentration auch der Wert für den IPC-Shift in der Quantifizierung anstieg, und Peak-Areale der QS-Peaks in den STR-Profilen abnahmen. Im Rahmen der Auswertung beider Sensoren zeigte sich, dass inhibitorische Effekte bei Huminsäuremengen von $500 - 5000 \mu\text{g}$ zuverlässig angezeigt wurden. Des Weiteren konnten in diesem Zusammenhang Phänomene einer Degradation und Inhibition durch die Quotienten beider *peak areas* der Sensoren voneinander unterschieden werden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass STR Profile mit einem $[\text{QS2}/\text{QS1}] < 0,8$ inhibitorische Effekte im Profil aufwiesen. Bei diesen zeigten sich darüber hinaus leichte Peak-Imbalancen heterozygoter Signale. Profile mit einem $[\text{QS2}/\text{QS1}] > 0,8$ wiesen hingegen lediglich Degradationserscheinungen auf (Abbildung 5.2).

Unter Berücksichtigung der zentralen Fragestellung kann zusammenfassend geschlossen werden, dass bezogen auf den untersuchten Probenumfang, eine Korrelation von IPC-Shift und $[\text{QS2}/\text{QS1}]$ beobachtet werden konnte und die Anwendung beider Variablen für die DNA-Analyse an *low quality* und *low template* Proben empfohlen werden kann (Abbildung 5.3). Insbesondere überzeugte die direkte Amplifikationskontrolle über die Qualitätssensoren. Eine alleinige Beurteilung des Degradationsgrades durch einen Degradationsindex $[\text{Auto}/\text{D}]$ bei aDNA-Analysen sollte lediglich bei größeren STR-Kits mit Fragmentlängen $> 400 \text{ bp}$ Anwendung finden. Dieser reflektiert nicht in jedem Falle die Profilqualität. Der Schwellwert sollte gerade bei aDNA-Analysen erhöht werden (> 10). Im Allgemeinen ist zu erwähnen, dass die Schwellwertsignifikanz bei Quantifizierungsergebnissen $< 10 \text{ pg}/\mu\text{L}$ vorsichtig zu evaluieren ist. Gerade bei der Übertragbarkeit von Quantifizierungsergebnissen auf das STR-Resultat sollte bei Konzentrationen $< 3 \text{ pg}/\mu\text{L}$ mit einem Qualitätsverlust und einhergehenden Phänomenen (Lokus oder Allel dropout), wie in den Arbeiten von Wallin et al. (2002) und Wang et al. (2012) beschrieben, gerechnet werden. Diese Feldstudie wurde 2015 gemeinsam mit der Arbeitsgruppe für Forensische Genetik des rechtsmedizinischen Institutes der Charité Berlin, publiziert (Pflugbeil et al., 2015).

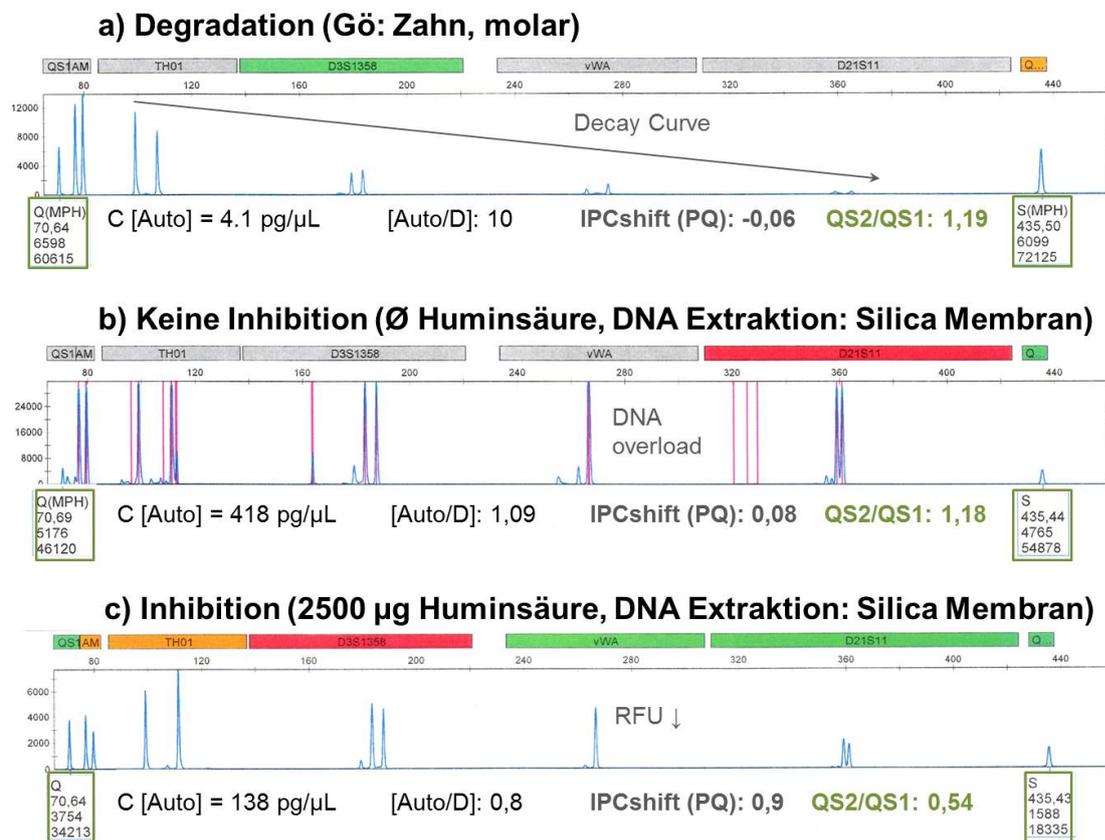


Abbildung 5.2: Investigator[®] ESSplex SE QS Ergebnisse Degradation und Inhibition. In der Abbildung sind beispielhaft drei Szenarios dargestellt, welche mit dem QS-System, anhand der hier vorgestellten Bewertungskriterien, voneinander differenziert werden können. Des Weiteren wurde der IPC-Shift des PowerQuant[®] Systems als ergänzende Variable für die Beurteilung der QS Profile in die Darstellung aufgenommen. In a) ist die das Profil einer deutlich degradierten Probe (historischer Datensatz) dargestellt. Zu erkennen ist eine typische *Decay curve* mit der RFU-Abnahme in Richtung langer Amplikone. Der Quotient aus den Peakflächen beider Sensoren beträgt in diesem Beispiel $> 0,8$. In b) ist ein Profil ohne Inhibition dargestellt. Der IPC-Shift liegt hier unter dem empfohlenen Schwellwert von 0,3. In Verbindung dazu weist der $[QS2/QS1]$ Wert auf keine Inhibition hin. Deutlich zu erkennen sind hier, durch einen erhöhten DNA-Input verursachte, Artefakte. Im Gegensatz hierzu wird im Profil c) eine Inhibition durch einen IPC-Shift $< 0,3$ und einem $[QS2/QS1]$ Wert $< 0,8$ angenommen.

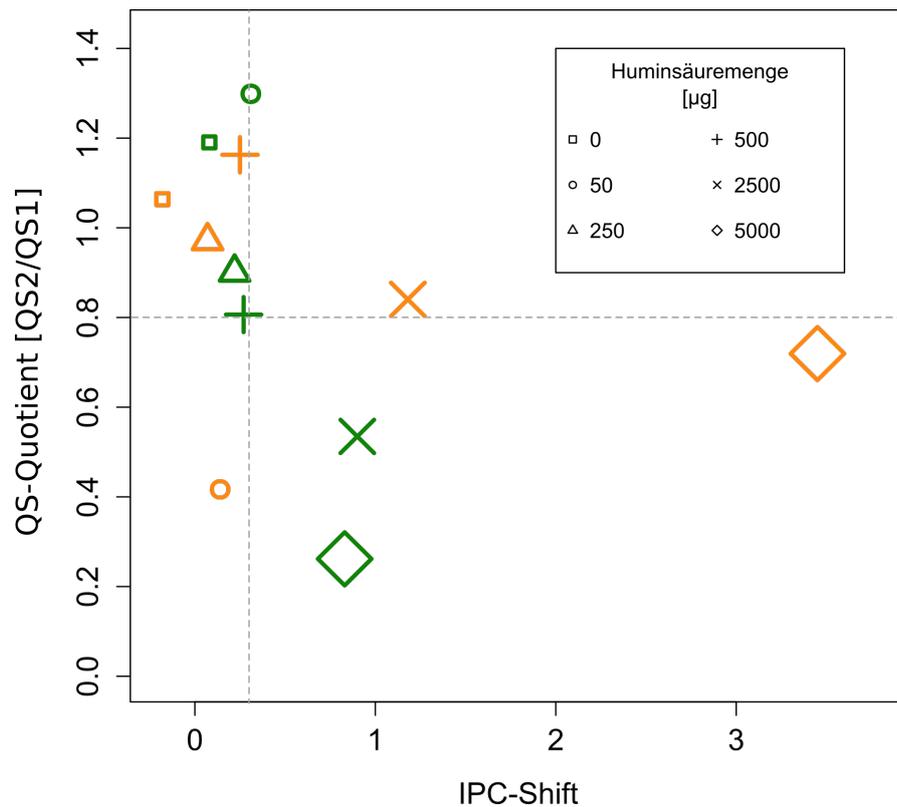


Abbildung 5.3: QS2/QS1-Ratio vs. IPC-Shift.

Die Abbildung verdeutlicht eine Interaktion der systemunabhängigen Features, IPC-Shift und den Qualitätssensoren (QS1 und QS2). Auf der Y-Achse aufgetragen sind die ermittelten Werte für den Quotienten aus QS2 und QS1 bezogen auf den Satz inhibierter Proben ($n = 12$). Unterbrochene Linien repräsentieren die entsprechenden Schwellwerte für beide Indikatoren. Grün und orange Symbole zeigen einen duplizierten Ansatz an. Die Größe der Symbole korreliert mit der steigenden Menge an eingesetzter Huminsäure pro Probe.

5.3 Molekulargenetische Geschlechtsbestimmung

In Anlehnung an die präsentierte zweite Hypothese (Kapitel 2) über die Bestimmbarkeit des Geschlechts der Skelette auf molekulargenetischer Ebene, sollte zunächst die Frage zur Signifikanz der erlangten Ergebnisse beantwortet werden. Darauf aufbauend sollte ein Vergleich mit voraus erlangten Ergebnissen aus der morphognostischen und osteometrischen Geschlechterbestimmung anhand des *Craniums* nach Jeraufke (2013) erfolgen. Im Folgenden soll die von Kleinecke angesprochene Aussage bzw. Hypothese einer Geschlechtergleichverteilung im Grabungsfeld aufgegriffen und mit den Ergebnissen aus der erwähnten Morphologischen Studie sowie den vorliegenden DNA Resultaten diskutiert werden.

Im Allgemeinen kann bei der Geschlechtsbestimmung über das Amelogenin-Gen AMG ein männliches Individuum ausschließlich durch ein zum X-Peak sicher zugehöriges Y-Signal im Elektropherogramm bestätigt werden. Gerade bei aDNA ist diese grundlegende Bedingung oft an Einflussfaktoren wie den Degradationsgrad und an mögliche Sequenzanomalien geknüpft.

Zahlreiche Autoren haben das häufige Auftreten von Deletionen in der SRY-Genregion, die zu einem Allel dropout oder Verschiebungen des zugehörigen Signals im Elektropherogramm führen können beschrieben (Roffey et al., 2000; Thangaraj et al., 2002; Ma et al., 2012) (Abbildung 5.4). Dieses Phänomen wurde weniger in kaukasischen Populationen beschrieben, kann jedoch in anderen Bevölkerungsgruppen ein beträchtliches Level erreichen (Steinlechner et al., 2002).

Weiterhin können Mutationen in den AMEL Primer-Bindungsstellen Ursache für einen entsprechenden Ausfall des Amplifikationsprodukts sein (Roffey et al., 2000; Shadrach et al., 2004). Durch das Vorliegen von Mutationen können ebenfalls Veränderungen in der Fragmentlänge des Amplifikationsproduktes entstehen, sodass wie auch hier, beobachtete Verschiebungen zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen können. Als Bestandteil herkömmlicher STR-Kits, erfolgt die PCR-basierte Amplifikation der X/Y homologen Regionen des AMG in der Regel nach dem Prinzip von Sullivan et al. (1993). Nach diesem wird eine 6 bp Deletion der X-homologen Region flankiert und es resultieren Amplifikate mit einer Länge von 106 bp (X-Chromosom) und 112 bp (Y-Chromosom). Bei DNA guter Qualität sollten diese Amplikonlängen problemlos reproduzierbar sein. Hingegen kann es bei aDNA aufgrund von massiven Degradationserscheinungen zu Ausfällen spezifischer Peaks kommen.

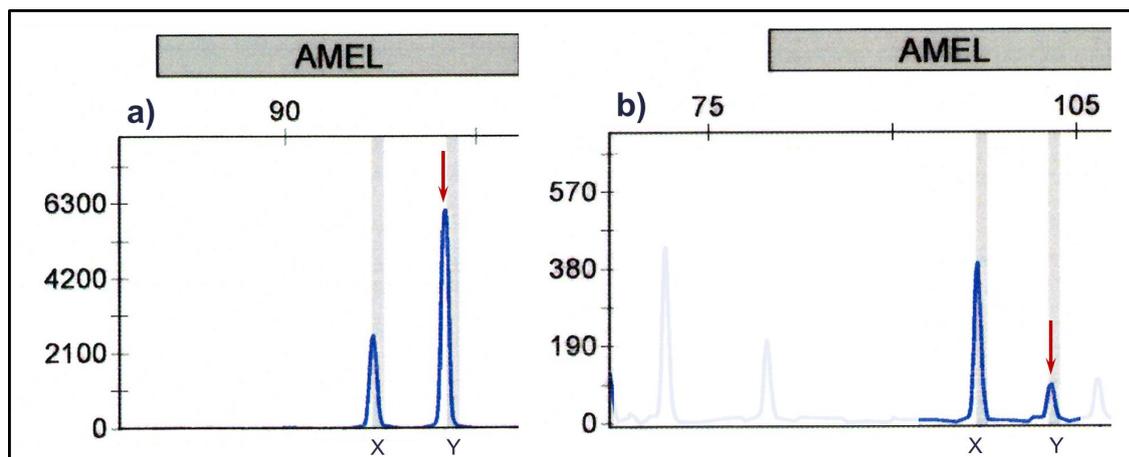


Abbildung 5.4: **Interpretationskonflikt AMEL-Lokus aDNA.**

Die dargestellten Profilausschnitte von zwei aDNA Proben aus dem untersuchten Datensatz zeigen die Schwierigkeit in der Interpretation des AMEL-Lokus durch Verschiebungen und starke Imbalancen der X/Y Peaks zueinander. Für jede hier dargestellte Probe erfolgte eine dreifache Wiederholung der Amplifikationen. In a) ist deutlich eine starke Imbalance zwischen AMELX und AMELY zu erkennen (roter Pfeil). Hinzu kommt eine Einbasenpaarverschiebung im AMELY Peak, die sich in jeder Ergebnisreproduktion bestätigte. Hier wäre eine Basendeletion in der SRY Region denkbar. Im Ausschnitt b) ist, verglichen zum AMELX Peak, ein deutlich höherer AMELY Peak (roter Pfeil) zu sehen. Verschiebungen bzw. Artefakte im gesamten Profil der Probe konnten auch nach wiederholter Amplifikation nicht beseitigt werden (ausgegrauter Bereich). Aus diesem Grund wurde auf eine Festlegung des Geschlechts verzichtet (indifferent). Kreuzkontaminationen oder Verunreinigungen der Probe mit moderner DNA konnten ausgeschlossen werden.

Aus den oben genannten Gründen sollten in besonderen Fällen, wie bei der Charakterisierung des molekularen Geschlechts bei historischen Funden, AMG-ergänzende Marker genutzt werden. Neue kommerzielle STR-Kits zur DNA-Analyse von biologischem Spurenmaterial beinhalten neben dem Amelogeninsystem ein Ychr. STR-System zur Geschlechtsbestimmung. Im besonderen Fall einer aDNA Typisierung wäre die Anwendung des System *Genderplex*, welches etwaige Faktoren wie das Vorliegen von *low quality* und *low quantity* DNA berücksichtigt, denkbar. Im Jahr 2013 stellten Bauer et al. (2013) eine Studie vor, in der eine alternative Methode zur konventionellen AMG-Typisierung vorgestellt wurde. Für diesen Zweck wurde das Multiplexsystem *Genderplex* angewandt, mit dem zwei unabhängige Systeme für den AMG-Lokus (AMELshort: 55/58 bp und AMELlong: 106/112 bp), ein SRY spezifisches PCR Produkt (93 bp) und zudem vier X-STR Loci amplifiziert werden können. Vom Ausgangsset konnten 88 Proben geschlechtsspezifisch bestimmt werden. Aufgrund des guten Erhaltungszustandes des Materials, sollte ein Vergleich der molekular erhobenen Daten mit denen aus einer parallel dazu durchgeführten morphologischen Geschlechterdifferenzierung erfolgen. Das Studienmaterial umfasste 141 Skelette eines frühmittelalterlichen Fundes. Die DNA-Extraktion wurde mit verschiedenen Silica-basierten Verfahren und PCI durchgeführt. Daraufhin erfolgte eine DNA-Quantifizierung. Für 141 Extrakte resultierten DNA Konzentrationen von 0,24 – 1695 pg/ μ L. Bei den übrigen Proben beeinflussten die enorm niedrigen DNA-Quantitäten die Amplifikation der Marker. Im Vergleich zu der bereits erwähnten standardisierten Bestimmung über AMG, ermöglicht dieses System eine Absicherung der Ergebnisse durch die Amplifikation multipler Marker. Mit dieser Methodik kann ein negativer Effekt durch mögliche Mutationen in Primerbindungsstellen minimiert werden. Durch das SRY Amplifikationsprodukt kann dazu ein männliches Geschlecht bestätigt werden. Durch die kurzen Amplikonlängen wird zusätzlich die Natur von aDNA berücksichtigt und die Sensitivität ist vergleichbar mit anderen Multiplexsystemen.

Ein vergleichbares Vorgehen ergab sich durch Einbeziehung der Y-SNP Ergebnisse im vorliegenden Datensatz und führte zur Aufstellung einer weiteren Hypothese für diesen Fall. Die Geschlechtsbestimmung der Individuen über AMG im S5 System gestaltete sich in Ausnahmefällen als äußerst schwierig. Bei einer Anzahl von sieben Einzelproben (von gesamt 89 DNA Isolaten, Doppelbestimmung durch Vorliegen von Ober- und Unterkiefer) konnte, anhand des zugehörigen Amplifikationsresultates, keine sichere Aussage getroffen werden (siehe Abbildung 4.3). Auch nach Einbindung der Ychr. Resultate aus der Amplifikation mittels Powerplex[®] Y23, welche zur Absicherung der autosomalen Profile angeschlossen wurde, konnte die Anzahl uneindeutiger Profile nicht minimiert werden. Gründe hierfür waren z. B. außerhalb des Ladders gelegene Y-Peaks, die durch wiederholte Amplifikationen und durch Überprüfung der Laufmatrix nicht beseitigt werden konnten. Dazu traten z. T. Farbdurchschläge in Form von allelspezifischen Signalen STR-zugehöriger Amplikone im AMELY auf, die aufgrund der niedrigen RFU des gesamten Profils nicht eindeutig auszugrenzen waren. Natürlich beeinflusste die z. T. starke aDNA-Degradation die Bewertung grundlegend. Auf-

grund dieser unsicher bewerteten AMELY Signale und unter Berücksichtigung der vorliegenden aDNA-Qualität, erfolgte die Überprüfung der AMEL Ergebnisse für die betroffenen sieben Proben durch Anwendung des etablierten Y-SNP Systems.

Zuvor wurde das System an einer eindeutig weiblichen Probe getestet, um Kreuzhybridisierungen eingesetzter Primer an X-chromosmalen Regionen, auszuschließen. Im zugehörigen Y-SNP Profil tauchte, entgegen der Erwartung, ein allelspezifisches Signal für den Y-SNP M174 auf. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde ein zweiter BLAST Lauf mit den spezifischen Primersequenzen für M174 durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass der entsprechende SBE-Primer nicht nur Sequenzidentität mit dem Y-Chromosom sondern auch mit dem X-Chromosom aufweist. Ebenso weist der PCR-Primer (*forward*) eine Sequenzidentität mit beiden Gonosomen auf. Der *reverse*-Primer besitzt eine Sequenzidentität von 95 % mit dem X-chromosomalen Strang. Bei näherer Betrachtung der kritischen Sequenzregionen (HuRef) wurde ersichtlich, dass PCR-Primer an den Sequenzpositionen 38808291 – 38808314 (*forward*) und 38808384 – 38808365 (*reverse*) binden und damit ein Amplikon der Länge 74 bp resultiert. Für die folgende SBE-Reaktion bedeutet dies eine 100 % Hybridisierung des entsprechenden SBE-Primers ab Position elf an das so amplifizierte DNA Template des X-Chromosoms und die gleichzeitige Repräsentation an entsprechender Position 38808319 des X-Chromosoms. Anhand dieser Ergebnisse ließ sich eine weitere Hypothese innerhalb der hier vorgenommenen Geschlechtsdifferenzierung aufstellen. Diese beabsichtigte eine geeignete Verwendung des Y-SNPs M174 als Indikator für eine, zur AMG ergänzenden, molekularen Geschlechtsbestimmung. Die physikalische Gliederung des Y-Chromosoms bestätigt diese Hypothese. Im Bereich von etwa 2,75 – 5,75 Mb des Y-Chromosoms findet sich ein homologer Abschnitt zum X-Chromosom. Allerdings konnte auch bei zusätzlicher Verwendung des Y-SNP Systems nicht alle, von Beginn an unsicheren Ergebnisse zum Geschlecht, eindeutig bestimmt werden. Aufgrund der geringen Robustheit gegenüber PCR-Inhibitoren, können negativ Befunde mit dem Y-SNP System nicht automatisch als weibliche Proben angesehen werden. Für eine genaue Bestimmung des Geschlechts sowie Individualisierung der Proben, sollten zum einen mehrere Amplifikationen erfolgen und alternative bzw. unabhängiger Marker für eine Geschlechtsbestimmung, herangezogen werden.

5.4 Geschlechterverteilung im Grabungsfeld

Gegenüberstellung molekularer mit morphognostischen Ergebnissen am Schädel

Für den Vergleich zwischen der morphognostischen und der genotypischen Geschlechtsbestimmung wurden sichere AMG Ergebnisse für jede untersuchte Probe aus dem aDNA Datensatz sowie erlangte Ergebnisse aus der Studie von Jeraufke (2013) herangezogen. Auf weitere Studien zur Geschlechtsbestimmung und Altersschätzung am *Femur* und *Humerus* von Becker (2013) und Seidel (2013) wurde an dieser Stelle verzichtet, um den Aspekt einer eventuellen Fehlzuordnung von *craniellen* und *post-craniellen* Regionen zu berücksichtigen. Zusätzlich erfolgte eine Bestätigung der AMG Resultate mit der zuvor beschriebenen Ychr. Analyse männlicher Individuen. Voraussetzung für eine Gegenüberstellung bildete i. Allg. die gute Qualität

des historischen Skelettmaterials. Für die vorangegangene morphologische Studie von Jeraufke (2013) am Skelettmaterial, mit dem verfolgten Ziel einer Geschlechterbestimmung anhand morphognostischer Merkmale und osteometrischer Maße, standen 67 Schädel mit unterschiedlichem Erhaltungszustand zur Verfügung. Die Geschlechtsbestimmung erfolgte nach den Empfehlungen aus Ferembach et al. (1979); Sjøvold (1988) sowie Bruchhaus und Neubert (2000). In Jeraufke (2013) wurden 23 geschlechtsdifferenzierende Merkmale am Schädel betrachtet. Anhand dieser Auswahl konnte für 52 gelistete Individuen ein Geschlecht bestimmt werden. Davon konnten die Ergebnisse für 50 Individuen mit den Ergebnissen aus der genotypischen AMEL Bestimmung verglichen werden. Darunter sieben Individuen für die über morphologische Merkmale kein Geschlecht bestimmt werden konnte aufgrund des schlechten Erhaltungszustandes. Für 16 dieser Individuen erfolgte anhand der Merkmale keine exakte Zuordnung zu einem Geschlecht. Im Rahmen metrischer Untersuchungen wurden 23 Höhen-, Breiten- und Längenmaße am *Calvarium* Unterkiefermaße nach Martin (1928) genutzt. Mit Hilfe dieser Gesamtanzahl an Merkmalsstrecken, konnte für fünf der in Morphognostik indifferenten Individuen, ein Geschlecht genauer bestimmt werden. Somit konnten diese ausschließlich durch Kombination beider Prinzipien ermittelt werden.

Die Morphognostik ist stark von der Erfahrung des Untersuchers geprägt und einer damit im Zusammenhang stehenden Subjektivität bei der Beurteilung ausgewählter Merkmale. So ist eine gewisse Fehlertoleranz bei unerfahrenen WissenschaftlerInnen gegeben. Die Osteometrie lässt sich im Bezug auf die gewählten Maße häufig nur über Vergleichsreihen und deskriptiv, mittels Standardabweichung und Mittelwert, beschreiben. Das Auffinden von spezifischen Strukturen in den Daten ist nicht möglich. Desweiteren existiert eine Auswahl an Diskriminanzfunktionen in der Morphognostik, abgeleitet an modernen Populationen unterschiedlicher Herkunft. Bei historischen Funden mit unbekannter Herkunft, sollten daher mehrere solcher Funktionen bei der Hypothesenformulierung einbezogen werden. In solchen Fällen ist es nur durch Heranziehen deskriptiver Kenngrößen möglich, sich einer Population in Bezug auf das Geschlecht, anzunähern. Zusätzlich dazu sollten Informationen über die ethnische Herkunft, z. B. über eine Haplogruppenbestimmung, eruiert werden. Mit Ausnahme eines Skelettes, konnte für alle in der Morphognostik und Metrik unbestimmten bzw. indifferenten Fälle, ein Geschlecht über den AMEL-Marker festgestellt werden.

Zur Absicherung der Geschlechter müssen die Resultate, mit Ausnahme der bereits reproduzierten Ergebnisse, durch wiederholte Amplifikationen bestätigt werden. Insbesondere bei Vorliegen von stark fragmentierter DNA bleibt die Bestimmung über entsprechende Marker das Mittel der Wahl. Unter Einbeziehung aller ermittelten Ergebnisse aus den drei Verfahren ergab sich eine Gesamtübereinstimmung von 43 %. Bei 12 % der Ergebnisse traten Unterschiede zwischen Morphologie und DNA-Analyse auf. Für 27 % des Datensatzes konnte ausschließlich molekulargenetisch ein Geschlecht bestimmt werden.

Bezugnehmend auf die Verteilung der Geschlechter kann gesagt werden, dass unter Einbeziehung einer anhand der Ergebnisse aus Morphognostik, Osteometrie und DNA-Analyse, formulierten Gesamtaussage ein Anteil von 50 % als weiblich und 29 % als männlich bestimmt wurden. Bei 21 % der Proben blieb bei Einbeziehung aller drei Verfahren ein unsicheres

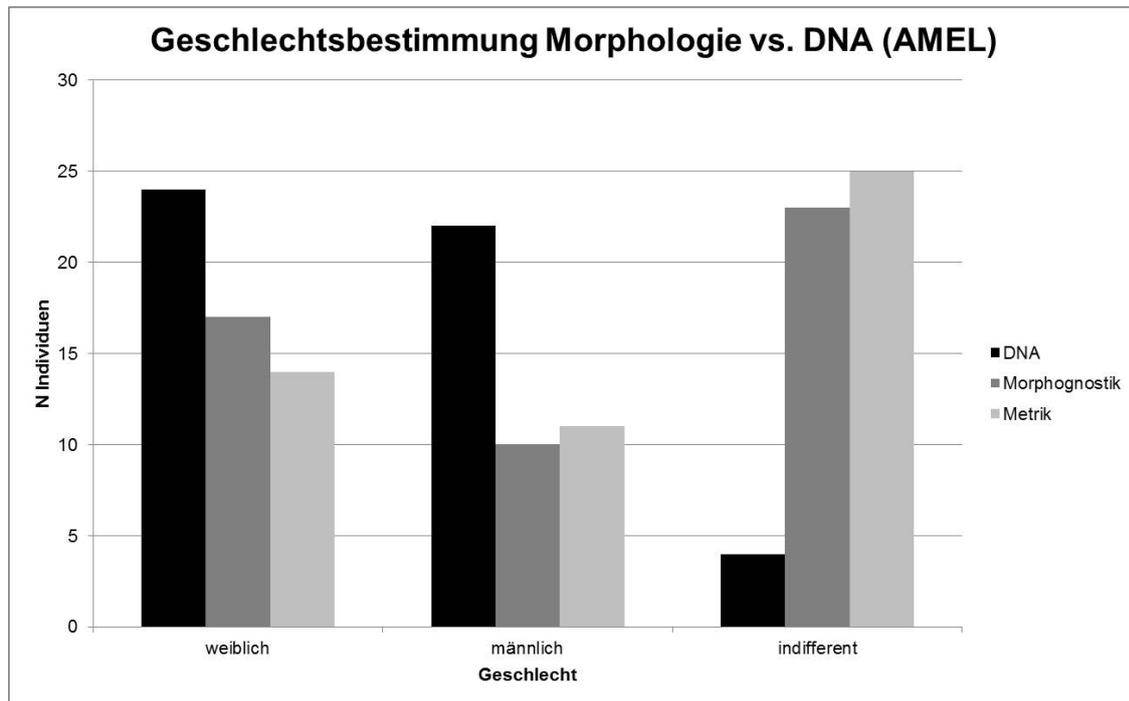


Abbildung 5.5: Gegenüberstellung Geschlechterbestimmung aus Morphognostik, Osteometrie und DNA-Analyse.

In der Abbildung sind die Ergebnisse aus der Geschlechterbestimmung, zusammenfassend für 50 Individuen, dargestellt. Mit Hilfe der Bestimmung des AMEL Markers konnte der größte Teil bestimmt werden. Der Anteil indifferenter Geschlechter ist sowohl bei denen durch das morphognostische und osteometrische Verfahren erhobene Ergebnissen am höchsten. Eine annähernde Gleichverteilung der Geschlechter im Grabungsfeld kann besonders bei der DNA-basierten Herangehensweise erkannt werden (schwarze Balken).

Ergebnis. Der relativ große Anteil an unsicher bestimmten Individuen lässt sich durch die Berücksichtigung einer gestellten Bedingung erklären. Diese involvierte den Ausschluss für ein Individuum, wenn ein verfahrenbezogenes Ergebnis von den anderen beiden abwich bzw. nicht bestimmt werden konnte. Danach konnte die Hypothese einer annähernden Geschlechtergleichverteilung nach Kleinecke (2011) nicht bestätigt werden. Bei getrennter Bewertung der Ergebnisse aus den einzelnen Verfahren, kann sich dieser Hypothese jedoch weiter angenähert werden, da der methodische Fehler bei Einzelbetrachtung selektiv gewertet wird. So lässt sich beispielhaft anhand der DNA-Ergebnisse wiederum eine annähernde Gleichverteilung erkennen (Abbildung 5.5). Weitere Einflussfaktoren können sowohl der unterschiedliche Stichprobenumfang in den Arbeiten von Kleinecke (2011) und der hier vorliegenden, als auch die Bewertung von unterschiedlichen Knochenregionen, sein.

5.5 Haplogruppenklassifikation und Haplotypstatistik

Im Weiteren sollte die dritte und vierte Hypothese (siehe Kapitel 2) über die Abstammungslinien der untersuchten historischen Population diskutiert werden. Mit den Ergebnissen sollte das biologische Profil des Fundes hinsichtlich der geografischen Herkunft mit Hilfe Hg-spezifischer SNPs erweitert werden. Zu Beginn galt es, die Robustheit beider am Stichprobenumfang etablierter uniparentaler SNP-Systeme, zu hinterfragen und Möglichkeiten sowie Grenzen der Systeme aufzugreifen. Zur näheren Charakterisierung beider Datensätze auf Seite der mitochondrialen und Ychr. Analyse, wurden zudem biostatistische Variablen berechnet, welche populationspezifisch diskutiert werden. Unter der gesamtheitlichen Betrachtung erhobener Ergebnisse mit Hilfe der uniparentalen Systeme (mtDNA und Y-Chromosom) kann anhand der eingesetzten SNP-Multiplexsysteme von Paneto et al. (2011) und den vorgenommenen Erweiterungen der Systeme nach Wei et al. (2013); Kohl et al. (2009) eine Klassifizierung probenzugehöriger Haplogruppen sowie eine grobe Vorhersage der geografischen Herkunft mit Hilfe resultierender Verteilungsmuster erfolgen. Jedes Mutationsereignis kann sowohl auf Ychr. als auch auf mitochondrialer Ebene mit dem Ursprung ihres Entstehens und der kontinentalen Verbreitung in Einklang gebracht werden.

Das Eingrenzungspotential, dass mit entsprechenden Analysesystemen erreicht werden kann, hängt vorrangig von dem Untersuchungsziel, vom untersuchten Material, dem Alter der Population und der Locispezifität ab. Je mehr Marker in eine entsprechende Analyse einbezogen werden, umso hochauflösender ist das Ergebnis, ausgehend von einer Makrohaplogruppenbestimmung bis hin zur tieferen Subhaplogruppenaufgliederung. Weiterhin hängt die Zuordnung ebenfalls von regionalen Hg-Frequenzen ab. Selten vorkommende Abstammungslinien lassen sich demnach in Verbindung mit einem ausreichend großen populationsgenetischen Datengrundlage genauer zuordnen. Mit der Voraussetzung von möglichst gut erhaltener aDNA und einem etablierten Arbeitsablauf im Labor, der den Zustand des zugrundeliegenden biologischen Materials berücksichtigt, kann die kontinentale Herkunft einer aDNA Probe in den meisten Fällen zweifelsfrei bestimmt werden.

Herausforderung stellt jedoch immer noch die geringe Datenbasis auf diesem Sektor, die einen Vergleich von z. B. Frequenzwerten mit Funden aus ähnlichen Zeitstellungen ermöglicht, dar. Gilt es bei forensisch relevanten Fällen den Herkunftsort einer Spur mit der Bestimmung des Haplotypen und der einhergehenden Haplogruppe einzugrenzen, so besteht das Ziel beim Auffinden von historischen Skeletten in der Erweiterung des biologischen Profils durch DNA basierte Herkunftsdaten. Im Gegensatz zu ähnlichen Studien aus dem Feld einer uniparentalen SNP-Haplotypisierung, verfolgt die hier vorliegende eine Rekonstruktion der geografischen Herkunft, basierend auf der Kombination ermittelter SNP-Daten beider unabhängiger Systeme - mtDNA und Y-Chromosom. Zwei Studien von van Oven et al. (2011a,b) zeigen das Potential dieser Überlegung und verweisen auf eine Steigerung des Informationsgewinnes durch eine Verknüpfung von autosomalen AISNPs, mtSNPs und Y-SNPs für phylogeografische Studien. Auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass unter Berücksichtigung einer divergenten genetischen

Variabilität der Marker, einschließlich geografischer Distanzen wie in (Jobling, 2012) beschrieben, der gewonnene Informationsgehalt mit beiden Systemen kompakte phylogeografische Aspekte für hisotrische Populationen liefern kann.

Aktuelle Studien wie von Rogalla et al. (2015); Phillips (2015) und Onofri et al. (2006) zeigen, dass die Analyse ausgewählter AIMSNTs mittels SNaPshot Assays in der Routinearbeit immer noch Bestand hat. Modernste Techniken wie NGS müssen sich hingegen insbesondere für aDNA-Analysen in der Routine weiter beweisen. Die Aufbereitung von aDNA Templates ist aufgrund der *low quality* und *low quantity* Charakteristik bei NGS Verfahren gegenwärtig noch sehr zeitaufwendig. Dem gegenüber steht ein im Vergleich kostengünstiges und schnelles Verfahren mit einer zwei-Schritt PCR und der fragmentbasierten, kapillarelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate.

Da es nach eigenem Stand keine vergleichbaren Populationsdaten aus der römischen Kaiserzeit und beginnenden Völkerwanderungszeit existieren, muss auf eine fundierte Datengrundlage von Skelettfunden aus dem Neolithikum, über das Mesolithikum und Paläolithikum bis hin in die heutige Zeit zurückgegriffen werden. Diese können hilfreich sein, um den zentralen Fund bzw. erlangte Hg-Frequenzwerte mit entsprechend publizierten Daten zu vergleichen.

5.5.1 Mitochondriale Analyse

Anwendung des mtSNP Multiplexsystems zur Haplogruppenklassifikation

Die hier angewandte Methodik für die Analyse der mtSNPs, in Form eines einzelnen Multiplexansatzes und der anschließenden Minisequenzierung, hat sich auch in diesem Fall genauso wie in o. g. aktuellen Arbeiten auf dem Gebiet bewährt. Nur wenige Forschungslabore im anthropologischen Bereich haben die Möglichkeit neuartige Technologien wie NGS für ähnliche Fragestellungen anzuwenden, wodurch die SNaPshot-Multiplexanalyse immer noch eine weitverbreitete Alternative für die Labore darstellt. Im Vergleich zur durchgeführten Y-SNP Analyse konnten alle 42 mtSNPs innerhalb eines Ansatzes amplifiziert werden. Dabei konnten für das aDNA Template im Schnitt 40 von ursprünglich 42 Loci ausgewertet werden. Das Verfahren der Multiplex-Analyse ermöglicht die Kombination einer gewählten Anzahl von SNPs. Es ist schnell, effizient und durch einen geringen gerätetechnischen Aufwand gut in die Routinearbeit entsprechender Labore zu integrieren. Allgemein lässt sich sagen, dass durch die Variation eines einzelnen Nukleotids die Amplifikatlänge in der Analyse, verglichen zu anderen Polymorphismen, sehr kurz gehalten werden kann.

Bei der hier vorgestellten Methodik wurden zwei verschiedene Ansätze, sowohl für die Amplifikation der mtSNPs als auch für die Y-SNPs, in der ersten PCR verfolgt. Dabei hat sich gezeigt, dass durch Anpassung einzelner Mastermixbestandteile und dem Absehen von kommerziellen Amplifikationschemien, eine Verbesserung der Profilqualität erreicht werden kann und das Phänomen des Konkurrierens involvierter Primersequenzen minimiert wird. Mit Ausnahme der mt-Varianten T-1736 und C-7028 konnten alle weiteren allelspezifischen Signale im Elektropherogramm, dropout Ereignisse nicht eingeschlossen, bewertet werden. Eine Erhöhung von Primerkonzentrationen in der Mutliplexamplifikation und SBE-Reaktion

führte zu keiner Ergebnisverbesserung. Sequenzunspezifische Hybridisierungen konnten zudem ausgeschlossen werden. Schlussfolgernd sollten ein Neudesign zugehöriger Sequenzen für diese Positionen (1736 und 7028) erfolgen. Der in der Arbeit von Paneto et al. (2011) angegebene Polymorphismus A8251G konnte im Hinblick auf dessen Spezifität für die Hg-Klassifikation nicht nachvollzogen werden. Aufgrund dieser Unstimmigkeiten und einer anschließenden Recherche, wurde die nach *PhyloTree* inverse Form G/A verwendet, die zur Einordnung in die Makrohaplogruppe I* notwendig und zudem nachvollziehbar ist. Die Variante A/G im Haplotypen führte zu einer Einordnung in die Hg N1'5, anstelle in die Sublinie N1a1b (Variante G/A). Ein ähnliches Bild trat bei der Einordnung von Haplotypen in die Haplogruppe I5b auf. Die Haplotypen konnten bei der Variante A/G nur in die übergeordnete Linie N10b gruppiert werden.

Häufig zu beobachtende Locus dropouts der SNPs G1719A, A1811G und A2706G können auf die (verglichen zu den anderen Positionen) großen Amplifikatlängen von 157 – 196 bp zurückgeführt werden. Mit Hilfe des angewandten Multiplexsystems ist es möglich die Hauptlinien entlang der mitochondrialen Phylogenie abzubilden und komplexe Abstammungsmischungen aufzulösen. Die Mehrheit von 40 Loci ermöglicht die Aufgliederung der Hauptäste europäischer, afrikanischer und asiatischer Linien sowie zugehöriger Sublinien. Für das Ziel einer initialen Hg-Klassifikation für die Population stellt das komplexe System eine ausreichende Basis dar, sodass eine für die forensische Praxis oftmals praktizierte Variante der hierarchischen SNP-Analyse, wie in der Arbeit von Brion et al. (2005) beschrieben, an dieser Stelle nicht zwingend nachgegangen werden musste.

Neben einem ähnlich komplexen System von de la Puente et al. (2016) ist das hier etablierte eines der wenigen Systeme mit hoher SNP-Dichte, welches eine Koamplifikation von 42 Positionen in einem Ansatz ermöglicht. Die Verwendung von zwei SNPs aus dem nicht-kodierenden Bereich (16519 und 16362) sollte, laut dem Verfasser der Publikation, die Diskriminationskraft zwischen Individuen erhöhen (Paneto et al., 2011). Bei näherer Betrachtung der Haplotypen zeigte sich, dass insbesondere der Locus 16519 zu 59 % in mutierter Variante im Datensatz vorlag. Da in diesem Fall jedoch nicht das Maß der Unterscheidbarkeit von mind. zwei Sequenzen verfolgt wurde, musste dieser SNP im Fall einer Hg-Zuordnung relativiert betrachtet werden. In der aktuellen Version des phylogenetischen Baumes (PhyloTree.org - mtDNA tree Build 17, release 18 Feb 2016) wird der SNP 16519 nicht eingebunden. Anhand der hohen Mutationsfrequenz würde dieser Position ohne weitere Wichtung eine übergeordnete Rolle in der Hg-Klassifikation zugeteilt werden, die jedoch nicht gewünscht ist. Mit Haplogrep wird diese Wahrscheinlichkeit im Algorithmus minimiert indem Mutationshotspots, welche häufig mit krankheitsassoziiierenden Informationen gekoppelt sind, mit dem Wert 0 gewichtet werden.

Auch für die Ableitung eines *minimal Hg-tree* wurde dieser Locus ausgeschlossen. Die in Folge der Minimierung des Ausgangssets - bestehend aus 42 Positionen - auf ca. die Hälfte an notwendigen Loci zeigte, dass durch die verringerte Anzahl der gleiche Informationsgehalt für die Hg-Klassifikation resultierte. Dadurch kann eine zusätzliche Minimierung der Kosten mit gleichzeitiger Zeiteinsparung erreicht werden. Allerdings muss diese Aussage an weiteren Datensätzen auf Plausibilität geprüft werden. Weiterhin ist an dieses Ergebnis die vorangestellte

Bewertung der *Keyloci* im Klassifikationsprozess geknüpft. Bei Anwendung eines abweichenden Algorithmus, kann dieser minimal abweichende Ergebnisse liefern und der essentielle minimale Umfang anders charakterisiert sein. Zusammenfassend kann bezugnehmend auf die Robustheit gesagt werden, dass sich das Mutliplexsystem für aDNA-Analysen insbesondere durch die überwiegend kurzen Fragmentlängen, sehr gut eignet.

Bei weiterer Betrachtung der Resultate zur Einordnung eines Haplotypen in die zugehörige Haplogruppe und deren Wichtung in der genutzten Applikation Haplogrep, wurde der Zusammenhang von Haplotyp und Haplogruppe untersucht. An dieser Stelle werden zwei grundlegende Fragestellungen zur zielgerichteten Hg-Zuordnung von Haplotypen betrachtet. Interessant war zum einen die Beantwortung der Frage über eine Zuordnung unterschiedlicher Haplotypen in dieselbe Haplogruppe und nach Faktoren (Loci), die dies bedingen (Fragestellung im Folgenden als F1 bezeichnet). Dazu wurde im Analogon untersucht wie viele ähnliche Haplotypen verschiedenen Haplogruppen zugeordnet wurden (Fragestellung im Folgenden als F2 bezeichnet). Die Verwendung des Begriffes Ähnlichkeit wird an dieser Stelle mit einem Fehlen von Sequenzinformationen durch die max. detektierte Anzahl an Locus dropouts impliziert, sodass eine vollständige Übereinstimmung von zwei Haplotypen nicht mehr gegeben ist. Alle weiteren Loci stimmen bei diesem Sachverhalt jedoch überein.

In Anlehnung an die Bewertung der Hg-Zuordnung wurden im Ergebnis nur unterschiedliche Haplotypen in dieselbe Hg klassifiziert, wenn der betroffene Polymorphismus nicht entscheidend war (F1). Zeigten die Daten Ungenauigkeiten bzw. Locus dropouts auf, wurden diese Stellen als unbekannt gekennzeichnet und für die Hg-Klassifikation ausgeschlossen. Bei der Ht-Klassifikation werden unbekannte Stellen als gleich gewertet. Kann bei einer Probe ein für die Hg-Klassifikation wichtiger Locus (z. B. 1719) nicht erkannt werden, kommt es zu einer unterschiedlichen Haplogruppenzuordnung (F2). Der Zusammenhang von Haplotyp und Haplogruppe wird in Abbildung 5.6 dargestellt.

Unterschiedliche Haplotypen werden in dieselbe Haplogruppe klassifiziert (F1)

Betroffene Loci: 1811 und 14766

Ht	GGAAATACGGGCTTTTCCACGCTGGACTAAGCCAGTCTACTC	H3
Ht	GGAA?TACGGGCTTTTCCACGCTGGACTAAGCCAGTTTACTC	H3
Anzahl in Population: 9		

Haplotyp wird unterschiedlichen Haplogruppen zugeordnet (F2)

Betroffene Loci: 1719, 2772, 8404 und 12372

Ht	GGAA?TACGGGCTTTTTTACGCTGGACTAAGCCAGTTTACTT	R21
Ht	GG?A?TA?GGGCTTTTTTACGC?GGACTAA?CCAGTTTACTT	U2b
Anzahl in Population: 6		

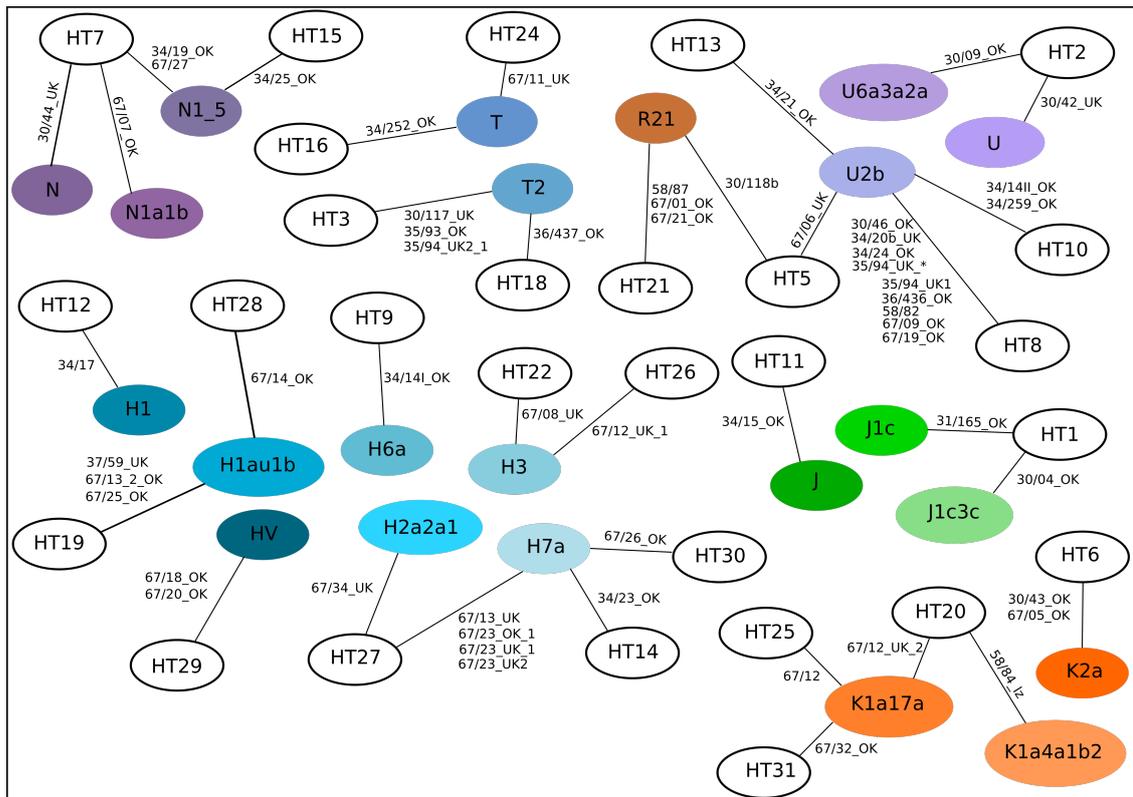


Abbildung 5.6: Zusammenhang von Haplotyp und Haplogruppe.

In der Abbildung ist die Zusammenfassung o. g. Fragestellungen (F1 + F2) über die Zuordnung von Haplotypen (Kanten: Probenbezeichnung) zu einer Haplogruppe (Knoten) zu erkennen. Eine mehrfache Bezeichnung der Kanten weist auf eine bestehende sequenzielle Ähnlichkeit entsprechender Haplotypen untereinander hin, welche in dieselbe Hg klassifiziert wurden. Gehen von einem Hg-Knoten mehrere Kanten ab deutet dies auf die Zuordnung von unterschiedlichen Haplotypen in eine Hg hin.

5.5.2 Y-chromosomale Analysen

Anwendung des YSNP Multiplexsystems zur Haplogruppenklassifikation

Bei der Anwendung des Y-SNP Multiplexsystems, welches in der Amplifikation auf vier Systeme aufgeteilt wurde, konnten nur für ca. die Hälfte der Proben ein Y-SNP Haplotyp erstellt werden. An den bereits beschriebenen Vorteil einer parallelen Amplifikation mehrerer SNPs ist allerdings auch die Qualität des zugrundeliegenden DNA Templates geknüpft. Bei Vorliegen von aDNA ist die Qualität als auch die Quantität stark erniedrigt. Ein negatives Ergebnis in der Amplifikation kann mitunter auf eine Art konkurrieren eingesetzter Primerpaare um die DNA, zurückzuführen sein. Deswegen wird auch bei kommerziellen Produkten wie bei dem hier verwendeten Kit von QIAGEN drauf hingewiesen, dass die Anzahl von 12 Loci in der Amplifikation nicht überschritten werden sollte. Zudem kann das abgestimmte Verhältnis

von Kitbausteinen im Mastermix (DNA-Polymerase, dNTPs usw.) durch ein Überbeladen von z. B. DNA gestört werden. So sind Multiplex-Ansätze zwar mit einem geringeren Zeitaufwand verbunden, benötigen aber auch eine höhere Ausgangskonzentration an DNA.

Neben den Amplifikationsbedingungen wurde nach weiteren Einflussfaktoren auf die zum Teil z. T. unerwarteten Ergebnisse gesucht. Dabei fiel insbesondere auf, dass die eingesetzten SBE-Primer nach Kohl et al. (2009) für die Positionen M128 und M91 Unstimmigkeiten aufwiesen. Der Y-SNP M128 beschreibt eine 2 bp Deletion. In der ancestralen Form sind die Basen TG an Position 21767930-21767931 (GRCh37) zu finden. In der Variante (Mutation) fehlen diese beiden Basen. Der Y-SNP M128 charakterisiert gemäß ISOGG die Haplogruppe N1c2a. Eine Sequenzübereinstimmung in *forward*- und *reverse*-Orientierung lieferte jedoch keine entsprechende Sequenzübereinstimmung mit der Referenzsequenz. Mit dem durchgeführten BLAST-Lauf konnte jedoch eine 100 %ige Sequenzidentität zwischen der Primersequenz und dem Y-Chromosom in den sequenziellen Abschnitten: 15477863 – 15477889 (Y-Chromosom HuRef) und 19606202 – 19606228 (Y-Chromosom GRCh38) festgestellt werden. Eine Suche nach dem mit diesem SBE-Primer detektierten Y-SNP war somit nicht möglich.

Der Y-SNP M91 beschreibt eine Insertion eines Thymins an Position 21907538 (GRCh37). Mit Hilfe dieser Information ist eine Klassifikation in die Superhaplogruppe BT des monophyletischen Stammbaumes möglich. Zur Detektion dieses Lokus wurde ein SBE-Primer in *reverse* Orientierung verwendet. Bei Betrachtung der sequenziellen Umgebung fällt auf, dass die Position von einem Thymin-8mer (5'– 3') gefolgt ist. Wird nun der entsprechende reverse-Primer verwendet so wird immer, egal ob ancestrales oder erworbenes Allel, ein Adenin detektiert. Aus den bezeichneten Gründen war somit auf diese Y-SNPs bei der Zuordnung der Probe zu einer Hg zu verzichten. Diese Konsequenz hatte jedoch keine Auswirkung auf die Klassifizierung in eine Hg, da sie Superhaplogruppe BT durch die Y-SNPs M42 und SRY10831 klassifiziert werden konnte. Die tiefere Einordnung in N1c2a konnte nicht erfolgen. In einem entsprechenden Fall wäre nur eine Bestimmung der Makrohaplogruppe N durch M231 theoretisch möglich gewesen. Bei Betrachtung der Fragmentlängen zugehöriger Amplifikate wird deutlich, dass ein Ausfall häufig betroffener Positionen M123, M168 und M230 infolge der Degradation möglich ist. Die Längen der PCR-Produkte dieser drei Y-SNPs betragen 145 – 175 bp. Daher besteht die Möglichkeit, dass eine Amplifikation dieser Bereiche in ausgewählten Proben mit einem hohen Degradationsindex nicht mehr möglich war. Des Weiteren ist bekannt, dass DNA mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen Chromatinstrukturen ausbildet, welche zum Teil eine Schutzwirkung während des Abbaus der DNA haben. Nach Nagata (2000) geht hervor dass DNA, die keine Interaktionen mit Proteinen eingeht, leichter abgebaut werden kann.

Durch eine Konzentrationserhöhung der PCR- und SBE-Primer und der duplizierten Amplifikation von M230 in zwei Systemen (System 3 und 4) war es in dem Fall möglich, diesen zu detektieren. Damit konnte eine verbesserte Amplifikation im Vergleich zu Kohl et al. (2009) erreicht werden. Trotz der beschriebenen unspezifischen Signale in System eins, zwei und vier konnte eine allelspezifische Zuordnung der Signale im Elektropherogramm erfolgen,

womit der Einsatz dieser Systeme für die Analyse von historischem Probematerial befürwortet wird. Ebenso ließ sich mit den durch Minisequenzierung erhaltenen Ergebnissen eine Haplogruppenklassifikation durchführen.

Bewertung populationsgenetischer Variablen der Ychr. STR-Analyse

Die Einbeziehung der PPIY23 Ergebnisse sollten in Verbindung mit der dargestellten Haplotyprecherche auf der YHRD ergänzende Hinweise zum Vorkommen der ermittelten Abstammungslinien in heutigen Metapopulationen liefern. Dieses Vorgehen konnte aufgrund der mangelnden historischen Datenbasis nur basierend auf aktuell hinterlegten Haplotypen erfolgen. Im Allgemeinen können Ychr. Haplotypdaten in Verbindung mit der Aussagekraft binärer Polymorphismen auf genealogischer Ebene hilfreich sein, um lokale Populationsstrukturen und demografische Prozesse nachzuvollziehen. Eine Festlegung auf die generische Haplogruppe basiert in diesem Fall jedoch vorwiegend auf den konsistenten binären SNPs. Desweiteren wurden populationsgenetische Variablen als Grundlage für den Vergleich mit heutigen Frequenzwerten einiger Y-STR Systeme aus dem Y-STR Datensatz erhoben.

Vorab erfolgte in Anlehnung an den DNA-Degradationsgrad eine Bewertung der resultierenden Qualität der Y-STR Profile. Bei der Gegenüberstellung von Y-STR- und Y-SNP Profilen fiel auf, dass in überwiegenden Fällen bezogen auf die Signale in Fragmentlängenbereichen bis 300 bp, die der PPIY23 besser als in den Y-SNPs war. Vermutungen hinsichtlich der Ursache liegen hauptsächlich in der unterschiedlichen Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen der Reaktionsmische und dem Maß an max. einzusetzendem DNA-Volumen in die PCR. Für die Y-STR Analyse wurden meist 17,5 μL DNA-Isolat eingesetzt. In Abhängigkeit vom Y-SNP Reaktionsansatz können jedoch nur max. 6 μL DNA-Isolat eingesetzt werden. Aufgrund von stochastischen Effekten wäre es bei einer sehr geringen DNA-Konzentration möglich, dass kein DNA-Template in den Reaktionsansatz übertragen wurde.

Die biostatistischen Berechnungen beruhen auf der in Kapitel 4.4.2 zum *Unique Haplotype* formulierten Annahme, dass alle Peaks, bei denen die Möglichkeit besteht, dass diese auch als Duplikationen interpretiert werden können, als „echt“ angesehen wurden. Die Ergebnisse lassen auch den Schluss zu, dass im Falle einer angenommenen Dopplung in den erhaltenen Y-chromosomalen Profilen zweier unterschiedlicher Individuen diese dann zu einer Patrillinie zu zählen sind. Damit würden sich die Haplotypfrequenzen und einhergehende biostatistische Parameter wie *Unique Haplotype*, Haplotypdiversität und Diskriminationskapazität verändern. Von einer weiterführenden Analyse möglicher verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen den untersuchten Funden wurde aufgrund des für die Zielstellung vorgesehenen zeitlichen Rahmens, einer zum Schluss nicht mehr ausreichenden Menge an DNA-Isolat und dem hohen Degradationsgrad, abgesehen. Die resultierende Einzigartigkeit in den Variablen: Haplotypdiversität, Diskriminationskapazität und Haplotypfrequenz des Datensatzes ($n = 12$, Y-STR Profile) sollte unter Vorbehalt infolge der schlechten Qualität der PPIY23 Profile und des geringen Datensatzes, bewertet werden. Inwiefern sich die Resultate mit einer steigenden Probenanzahl verändern, kann zu diesem Zeitpunkt nicht abgeschätzt werden. Da es sich bei der Population eher um eine Art „Randgruppe“ handelt können die erhobenen Daten als Ergänzung zum

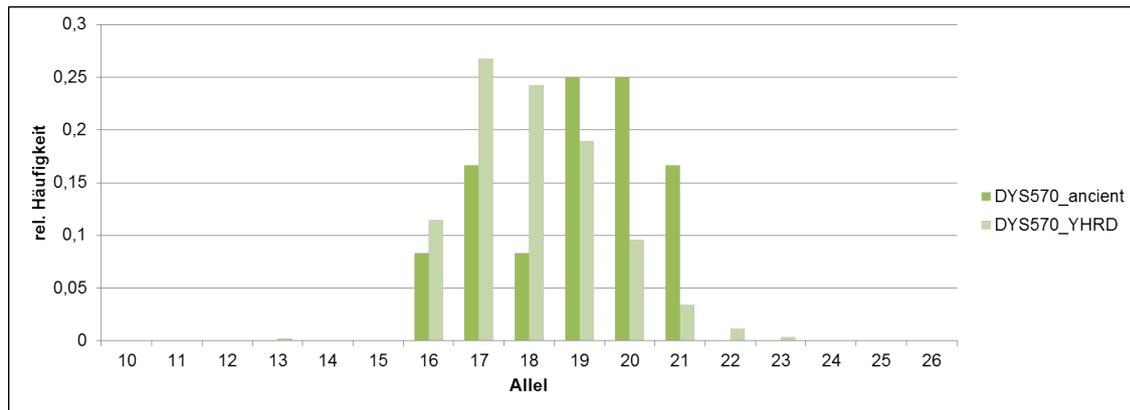


Abbildung 5.7: **Moderne und historische Allelverteilung für den Lokus DYS570.**

Dargestellt ist die Allelverteilung für das System DYS570 anhand der lokusspezifischen Information auf der YHRD (hellgrün) und der ermittelten relativen Frequenzen für den aDNA Datensatz (dunkelgrün). Die Frequenzen häufig auftretender Allele unterscheiden sich z. T. bedingt durch die schlechte Qualität der Y-STR Profile. Besonderheiten in Form von unbekanntem Varianten konnten nicht festgestellt werden.

biologischen Profil herangezogen werden. Es wäre jedoch wünschenswert, wenn die Aussagen durch weitere Populationen aus dieser Zeit und Region ergänzt bzw. erweitert werden. Durch ein hohes Maß an Systemausfällen erniedrigt sich der Informationsgehalt aus den Systemen, sodass auch die Diskriminationskraft im Fall eines 1:n Vergleiches, unabhängig vom aDNA Datensatz, herab gesetzt ist. Für die Berechnung der Variable Gendiversität für den Datensatz ergab sich die höchste genetische Vielfalt und damit das höchste Maß an beobachteter Allelvariation für den Lokus DYS750 ($GD = 0,967$). Die Ergebnisse aus der GD-Berechnung können u. a. mit den theoretischen Mutationsraten einzelner Y-STR Systeme in der heutigen Zeit in Zusammenhang gebracht werden. So werden die Y-STR Systeme DYS448 und DYS393 als langsam mutierende Marker bezeichnet. Als schnell mutierende Marker werden die STR-Systeme DYS576, DYS481, DYS549, DYS533, DYS570, DYS439 und DYS458 klassifiziert. Mit einer Mutationsrate von $1,79e^{-2}$ ist DYS750 das am schnellsten mutierende System im PowerPlex[®] Y23 Kit (Roewer et al., 2001, 2013). Anhand der zum System DYS570 zugehörigen Allelverteilung ist zu erkennen, dass bei Gegenüberstellung von aktuellen Allelfrequenzen mit den ermittelten aus dem aDNA Datensatz keine Besonderheiten hinsichtlich des Auftretens zu vermerken sind (Abbildung 5.7). Faktoren wie der zugrundeliegende kleine Datensatz und der Einfluss von degradationsbedingten Allel dropouts beeinflussen die Allelhäufigkeiten im einzelnen. Besonderheiten in Form von bisher unbekanntem Allelvarianten für dieses System traten nicht auf.

Die erhaltenen Informationen über das Vorkommen des Haplotypen, einschließlich der über die YSNP-Informationen abgeleitete Hg, deutete auf regionalen Ursprung in West-Europa hin. Diese Information kann als Basis für eine vertiefte Analyse mit einem spezifischen Y-SNPs Assay weiter verwendet werden. Allerdings ist die Aussagekraft relativ gering, da an dieser Stelle nur Metapopulationsabfragen eruiert werden konnten. Das Ergebnis zeigt, dass der überwiegende

Anteil der Haplotypen einem westeuropäischen Ursprung zugewiesen werden. Dieses Ergebnis stellt ein richtungsweisenden Anhaltspunkt unter Einbeziehung der Zeitstellung und Fundstelle mit der Verteilungsentwicklung hochfrequenter Hg für die Population, dar.

5.6 Phylogeografische Einordnung und Haplogruppenentwicklung

Ychr. Haplogruppenverteilung

Bei Beurteilung der dargestellten Hg-Verteilung zeigt sich für den aDNA Datensatz, dass sowohl die Makrohaplogruppen I als auch R, einschließlich entsprechender Sublinien, mit einer Frequenz von jeweils 31 % am häufigsten klassifiziert wurden (siehe Abbildung 4.10). Für einen Teil der Hg R zugehörigen Haplotypen erfolgte lediglich eine Gruppierung in die Sublinie R1b, nicht in R1a bzw I1. Häufig konnte eine tiefere Gruppierung, die grundsätzlich mit der SNP-Auswahl möglich gewesen wäre, über die Superhaplogruppe heraus nicht erfolgen. Gründe hierfür liegen in einer hohen dropout-Frequenz spezifischer Loci und in einem hohen Auftreten der ancestralen Form im Datensatz.

Ein Vergleich mit Verteilungsmustern von rezenten Populationen erlaubt die Annahme, dass es sich bei der untersuchten Population um eine europäische Bevölkerungsgruppe handeln muss, da die Haplogruppen I und R als charakteristisch für Europa gelten. Eine detailliertere Aussage, im Hinblick auf den geografischen Herkunftsort, kann darüber hinaus aufgrund fehlender Haplotypinformationen nicht getroffen werden. Die Manifestierung und folgende Expansion der Haplogruppe R, einschließlich der Linien R1a und R1b, wird in Verbindung mit der paläolithischen Besiedelung Europas vor 40.000 Jahren beschrieben (Roewer, 2008). Es ist davon auszugehen, dass zentraleuropäische Völker und auch die untersuchte historische Population aufgrund ihrer Zeitstellung vorrangig durch die Haplogruppe I sowie die Subhaplogruppe R1a und R1b dominiert wurden. Als Einflussfaktor auf diese Entwicklung ist ein stark wirkender genetischer Drift auf das Y-Chromosom einzubeziehen (Jobling und Tyler-Smith, 2003). Der Grabungsort und Daten aus archäologischen- und anthropologischen Vorarbeiten unterstreichen diese Vermutung. Vor allem im deutschsprachigen Raum sind heutzutage hohe Frequenzcluster der Hg R und I zu erkennen. Besonders Nord- und Ostdeutschland ähneln in der Gesamtverteilung der ermittelten Haplogruppenverteilungen der historischen Population (Abbildung 5.8).

Diese Aussage fungiert zusätzlich, in Anlehnung an die dritte Hypothese über die regionale Herkunft der untersuchten Population, als Hinweis auf den Westeuropäischen Ursprung. Mit Hilfe dieser Ychr. Marker kann ergänzend zur Ychr. STR-Analyse eine nähere Eingrenzung auf einen möglichen Ursprung im heutigen Deutschland vermutet werden.

mtDNA Haplogruppenverteilung

Unter Zuhilfenahme heutiger Verteilungsmuster ergab sich bei der Ergebnisanalyse eine eindeutige Einordnung detektierter mitochondrialer Haplotypen in charakteristische Haplogruppen des europäischen Raumes. Die Haplotypdiversität betrug 0,9404. Besonders dominant im

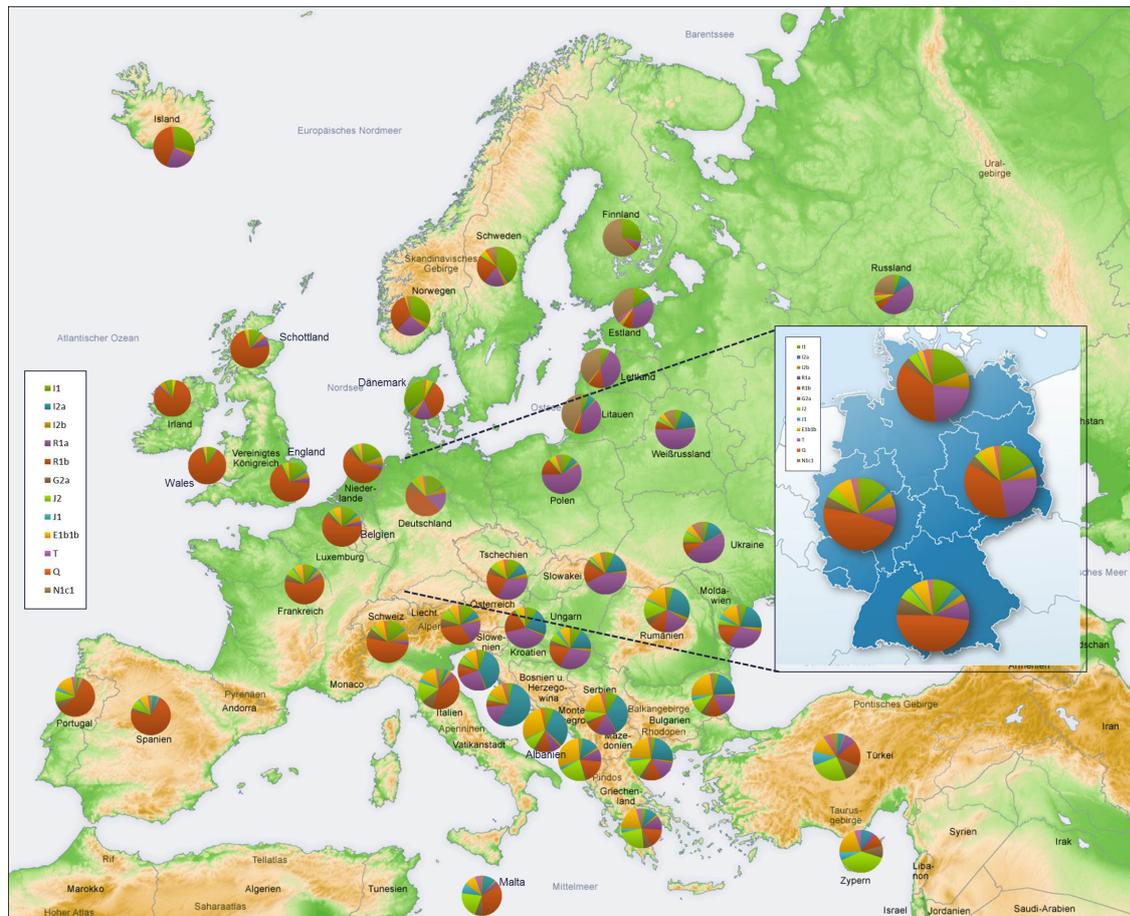


Abbildung 5.8: Verteilung Ychr. Hg in Europa und Deutschland.

Gegenwärtige Verteilungsmuster der Haplogruppen in europäischen Populationen und Deutschland (Ausschnitt). Die Verteilung unterscheidet sich regional zwischen West- und Osteuropa sowie Nord- und Südeuropa.

Datensatz vertreten sind die Haplogruppe H und U mit jeweils 26 %, einschließlich zugehöriger Subgruppen. Darauf folgt prozentual die Haplogruppe K (10 %) sowie die Hg T (10 %). Verglichen mit der Diskriminationskraft des Y-SNP Sets, konnte eine tiefere Klassifikation der Haplotypen in Sublinien durch das robuste 42-SNP Set erfolgen. Am geringsten vertreten in der Population sind die Hg X, W, und HV mit 2 – 3 %. Verglichen mit den Arbeiten von Paneto et al. (2011); Turchi et al. (2008); Roostalu et al. (2007); Poetsch et al. (2003) zeigt sich eine Annäherung an die Hg-Gesamtverteilung von modernen zentraleuropäischen Populationsgruppen. Eine detaillierte geografische Eingruppierung des Fundes anhand der ermittelten Frequenzwerte, so wie es mit dem Ychr. Pendant vorgenommen wurde, kann an dieser Stelle nicht erfolgen. Hier bleibt unterstützend zur bereits diskutierten Ychr. Hg-Verteilung lediglich die Aussage bestehen, dass sich die Hg-Gesamtverteilung des Görziger Fundes der heutiger westeuropäischer Populationen annähert. Anders als bei Ychr. Analysen kann eine hochauflösende regionale Unterscheidung bei mtDNA-Analysen ausschließlich anhand umfangreicher Sequenzdaten und der Abbildung tiefer Äste in der mt-Phylogenie erfolgen. Zeitlich auseinander

entwickelte Hg-Cluster besitzen in Abhängigkeit ihrer Lage auf der basalen phylogenetischen Entwicklungsstufe auch regional ähnliche Frequenzwerte. Maternal sind diese Grenzen im Vergleich zum paternalen Gegenstück, begründet durch differentielle Evolvierungszeiten und Substitutionsraten von Mutationen und unterschiedlich starkem Genfluss auf beiden Seiten, größer gefasst. So besitzen z. B. die Haplogruppen H2a und H3 vergleichbare Frequenzen in Ost- und Westeuropa (Achilli et al., 2004; Loogväli et al., 2004). Dies hat zur Annahme geführt, dass mtDNA entweder selektionssensitiv- oder der maternale Genfluss in Europa besonders hoch ist (Simoni et al., 2000a).

Auffällig ist jedoch der ausgeglichene Anteil der Hg U sowie Hg H (Sublinien inbegriffen) im vorliegenden Datensatz. Verglichen mit heutigen Frequenzen ist dieser U-Anteil relativ hoch. Eine Erklärung für das starke Auftreten kann eine untersuchte Hypothese nach Briggs et al. (2009) sein, in der argumentiert wird, dass die Hg U5 die älteste Sublinie der Makrohaplogruppe U ist, welche sich in der modernen Menschheitsgeschichte vor ca. 26,6 Kya entwickelte. Hierbei konnten alle untersuchten mesolithischen und prä-neolithischen Proben der HG U zugeordnet werden, was die Annahme bestätigt, dass diese Hg vorherrschend war. Damit kann gleichermaßen angenommen werden, dass zum Zeitpunkt der römischen Kaiserzeit und beginnenden Völkerwanderungszeit der Anteil an der Hg U auch entsprechend hoch war. Entgegengesetzt verhält sich dieser Aspekt bei der Häufigkeit des Auftretens für die Hg H in der Population. In heutigen Populationen beträgt der Anteil der Linie H, besonders in Westurasien, meist über 40 % mit geringen Frequenzänderungen von $\sim 10 - 30$ % in Richtung des nahen Ostens und dem Kaukasus (Richards et al., 2000). Nicht wirklich klar ist jedoch zu welchem Zeitpunkt sich die Hg H in Europa manifestiert hat. Erkenntnisse aus thematisch nahen Studien, die sich mit der phylogeografischen Verteilung der generischen Linie H und zugehöriger Sublinie beschäftigt haben, beruhen hauptsächlich auf Sequenzierungsdaten der mitochondrialen Kontrollregion (Richards et al., 2000; Torroni et al., 2006). Einige wenige Arbeiten wie Pereira et al. (2005); Roostalu et al. (2007); Alvarez-Iglesias et al. (2009) enthüllten auf Basis des vollständigen mt-Genoms die evolutionäre Komplexität der Hg H. Dabei zeigte sich eine ~ 70 % Diversität außerhalb der Kontrollregion. Diese Aussage bildete die Grundlage für eine detaillierte Betrachtung der Heterogenität auf dem populationsgenetischem Level, z. B. in einer Arbeit von Brotherton et al. (2013). In dieser wurde die Entwicklung der Hg H über die Zeit hinweg zwischen heute vorzufindenden Richtwerten und denen von historischen Funden der Mittel-Elbe-Saale Region (Sachsen-Anhalt) aus den Zeitstellungen des Neolithikums über das Paläolithikum bis hin in die Bronzezeit (Zeitfenster: > 3500 Jahre) betrachtet. Insgesamt wurden 39 *ancient* mt-Genome vollständig sequenziert. Das starke Interesse für diese Hg liegt in einem fast linearen Frequenzanstieg und dem breiten Spektrum an diversen Sublinien (> 100) in der maternalen Phylogenie begründet. Mit den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der zentraleuropäische mtDNA Pool während des Neolithikums geformt wurde. Genauer ließen die Erkenntnisse den Schluss zu, dass sich die Verteilung der Hg H im Übergang zwischen dem mittleren Neolithikum (~ 4000 v. Chr.) und dem späten Neolithikum etabliert hat (2800 v. Chr.). Bei Gegenüberstellung mit den heutigen Frequenzwerten ($> 40\%$) lag diese zu Zeiten

des frühen Neolithikums (~ 5450 v. Chr.) mit ca. 19 %. Desweiteren konnten Hinweise auf einer 45 % gesteigerten Mutationsrate ($2,4 \times 10^{-8}$) im Zeitraum des Neolithikums und der Bronzezeit gegenüber der heutiger mt-Genome ($1,66 \times 10^{-8}$) gefunden werden.

Die populationspezifische Frequenzverteilung ließ die Überlegung zu, ermittelte Frequenzwerte für die Hg H mit denen aus vorangegangenen Zeitstellungen gegenüberzustellen und so eine Einordnung der Funde in die Entwicklungsgeschichte der Hg H, vorzunehmen (siehe Fragestellung 4.2). Mit einer Häufigkeit von 26 % ist ein Anstieg, ausgehend vom Neolithikum und der Bronzezeit in Richtung der gegenwärtig vorzufindenden mittleren Frequenz von > 40 %, für die Population aus der römischen Kaiserzeit und beginnenden Völkerwanderungszeit (~ 700 n. Chr.) zu verzeichnen. Diese Tatsache unterstützt somit die Hypothese von Brotherton et al. (2013). Zu berücksichtigen ist jedoch das geringe Maß an Sequenzinformation, die mit dem SNP-System generiert werden konnte.

Durch Zusammenführung der genannten Aussagen und Annahmen (siehe Hypothese drei und vier) kann gesagt werden, dass es sich bei dem Grabungsfund aus der römischen Kaiserzeit und beginnenden Völkerwanderungszeit wahrscheinlich um eine ansässige Bevölkerungsgruppe handelt. Die ermittelte Hg-Verteilung auf mtDNA Ebene ähnelt der des heutigen Westeuropas. Mit Hilfe der durchgeführten Ychr. Analysen kann diese Aussage in Richtung einer spezifischen Bevölkerungsgruppe aus dem Ost- oder Norddeutschen Raum erweitert werden. Ein Vorliegen von nicht-europäischen Abstammungslinien kann mit den angewandten Systemen nicht bestätigt werden.

Rekonstruktion evolutionärer Prozesse durch die gemeinsame Betrachtung von mtDNA und Y-Chromosom

An dieser Stelle soll ergänzend zur Hypothesen-basierten Diskussion erlangter Ergebnisse die Kontinuität, beider in dieser Arbeit untersuchten uniparentalen Systeme, dargestellt werden. Immerhin werden z. B. bei der Extraktion von Informationen über die ethnische Herkunft zwei unterschiedlich vererbte Genflüsse betrachtet. Demnach sollte das Potential einer beidseitigen Betrachtung und Verknüpfung der Ergebnisse in Demografiestudien oder Populationsgenetischen Studien hinterfragt werden. Im Folgenden werden grundlegende Merkmale bezüglich der Konsistenz zwischen der Phylogenie von mtDNA und Y-Chromosom dargestellt:

1. Die ursprünglichen Abstammungslinien und damit erste Verzweigungen ausgehend von der Wurzel der mitochondrialen (die ersten fünf Abzweigungen) und Ychr. Phylogenie (die ersten beiden Verzweigungen) sind nur in afrikanischen Bevölkerung widerzufinden.
2. Nur eine kleine Teilmenge beider phylogenetischer Bäume dispergiert außerhalb Afrikas. Darunter die drei Ychr. Makrohaplogruppen: C, D und F sowie die mitochondrialen Markohaplogruppen M, N und R.
3. Geografisch dezentrale Regionen wie Europa oder Australien zeigen ein limitiertes Vorkommen der Makrohaplogruppen im Vergleich zum asiatischen Raum, bei dem diese außerafrikanischen Ursprungsgruppen heutzutage nahezu noch konserviert vorliegen.

4. Ausgewählte Beispiele der Historie, wie z. B. die Bantu Expansion in Afrika, haben auffällige genetische *Fingerprints* beider uniparentaler Systeme in afrikanischen Bevölkerungen hinterlassen (Cruciani et al., 2002; Luis et al., 2004).
5. Veränderungen in der Vermischung vereinzelter Linien über ethnische Grenzen hinaus können in Regionen wie Nordafrika oder Zentral- und Westasien, welche innerhalb von zwei oder mehr unterschiedlichen pools an mtDNA und Ychr. Varianten liegen, vorkommen (Arredi et al., 2004; Comas et al., 2004; Salas et al., 2002).

Zusätzlich zu den generelle Aussagen über beide Marker, können ergänzend regionale Unterschiede festgehalten werden:

1. Verglichen zur begrenzten Aussagekraft von mtDNA Varianten in benachbarten Regionen kann hingegen eine spezifische regionaler Unterscheidung zwischen den Ychr. Haplogruppenfrequenzen in West- und Osteuropa, z. B. bei den Haplogruppen R1b, I1a, und I1b festgestellt werden (Rootsi et al., 2004; Rosser et al., 2000).
2. Bevölkerungsgruppen aus dem osteuropäischen- sowie zentral- oder ostasiatischen Raum teilen einen hohen Anteil genetischer Ychr. Komponenten wie die Linien N und R1a, welche allerdings in der mitochondrialen Phylogenie nicht vorzufinden sind (Rootsi et al., 2007).
3. Populationen aus der Zeit der Jäger und Sammler, ebenso wie agrikulturelle Gruppen in Afrika, weisen einen asymmetrischen Genfluss auf (Destro-Bisol et al., 2004).
4. Ychr. Daten weisen auf eine separate Migration, ausgehend vom späten Pleistozän, von Afrika nach Europa über die Sinai-Halbinsel. Dieser Aspekt wird durch die Frequenz der Linie E3b, die wiederum nicht in der mitochondrialen Haplogruppenverteilung zu finden ist, begründet (Cruciani et al., 2004; Luis et al., 2004).

Unter Einbeziehung o. g. Aussagen kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die mitochondriale und Ychr. Phylogenie an dieser Stelle mit Informationen aus der Analyse autosomaler Marker, in Einklang zu bringen sind. Beide phylogenetischen Bäume verschmelzen relativ zeitig. Jedoch spiegeln diese Strukturen keine genauen Zeitpunkte von globalen Spezifikationsereignissen des modernen Menschen wider. Stattdessen können mtDNA und Y-Chromosom, als nahezu rekombinationsfreie Systeme, detaillierte Informationen sowohl über die *Out-of-Afrika* Hypothese als auch über Differenzierungsabläufe von Populationen aufzeigen.

Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades:
Dr. rer. med.

Molekulargenetische Untersuchungen zur Ergänzung des biologischen Profils eines historischen Grabungsfundes auf der Grundlage autosomaler und uniparentaler aDNA-Marker

eingereicht von:
M.Sc. Anne-Marie Pflugbeil

angefertigt am :
Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig

betreut von:
Prof. Dr. med. J. Dreßler
Prof. Dr. rer. nat. D. Labudde

August 2016

Die vorliegende Arbeit lässt sich thematisch an der Schnittstelle zwischen klassischer Anthropologie und moderner aDNA-Analytik einordnen. Erstmals durchgeführte aDNA-Analysen am historischen Skelettfund aus der römischen Kaiserzeit und beginnenden Völkerwanderungszeit sollten sowohl zur Ergänzung als auch zur Beantwortung bisher unbeantworteter Fragestellungen zum biologischen Profil des Kollektivs beitragen. Aufgrund der eingeschränkten Qualität und Quantität extrahierbarer aDNA wurde zunächst versucht einen geeigneten Laborworkflow für die forensische Laborpraxis und Forschung zu etablieren. Dies erforderte mitunter die Testung neuartiger Analysesysteme. Für den Schritt der aDNA-Quantifizierung erfolgte die Anwendung eines neuartigen DNA-Quantifizierungskits und die Gegenüberstellung mit einem in der Praxis bereits etablierten System. Es konnte festgestellt werden, dass es i. Allg. gerade

bei Material mit einem PMI > 100 Jahre sowohl Zeit als auch Fachkenntnis bedarf, um eine gesicherte Aussage zur jeweiligen Fragestellung zu erhalten. Unterschiedliche Lagerungsbedingungen, der Einfluss von physiko-chemischen Faktoren und letztlich die Wahl der Skelettregion, bedingen den Erfolg der Analysen. Um solche Einflussfaktoren für Labore besser zugänglich zu machen, wäre die Umsetzung einer datenbankorganisierten Sammlung von sowohl DNA-basierten sowie nicht-DNA-basierten Informationen, Methoden und fallbezogenen Ergebnissen, wünschenswert. Damit kann in diesem Zusammenhang auch der Austausch zwischen den Laboren in Form einer frei zugänglichen Web-Applikation ermöglicht werden. Dies könnte zu einer Verringerung des sog. „Blackbox“-Charakter's im Rahmen von molekulargenetischen Analysen an Skelettmaterial in der forensischen- oder anthropologischen Praxis, führen. Eine optimierte Prozesskaskade ermöglicht darüber hinaus eine beschleunigte Analyse und eine Reduktion der Kosten.

Des Weiteren wurde zugunsten einer Erweiterung des biologischen Profils der Individuen eine erstmalige Bestimmung des Geschlechts, auf molekularer Ebene, durchgeführt. Eine Typisierung des Geschlechts erfolgte mit dem genetischen Marker Amelogenin. Die erlangten Ergebnisse und Aussagen zur Gesamtgeschlechterverteilung wurden mit zum Zeitpunkt vorliegenden Resultaten aus Morphognostik und Osteometrie am Schädel gegenübergestellt. Dadurch sollten Informationslücken geschlossen und Ergänzungen zur Gesamtaussage über die Geschlechterverteilung im Grabungsfeld erlangt werden.

Über das Ziel einer genotypischen Geschlechtercharakterisierung hinaus, konnte mit einer erstmalig durchgeführten Haplogruppenspezifikation mittels mitochondrialer und Y-chromosomaler SNPs das biologische Profil, hinsichtlich der phylogeografischen Einordnung der Skelettfunde, weiter ergänzt werden. Hierfür wurde zum einen das publizierte mtSNP System von Paneto et al. (2011), mit dem eine Klassifizierung generischer Abstammungslinien, einschließlich ausgewählter Sublinien, möglich ist, verwendet. Das Multiplexsystem zeichnete sich besonders durch eine hohe SNP-Dichte aus. Resultierend gelang es die enthaltenen 42 mtSNPs in einem Multiplexansatz zu amplifizieren. Für die Ychr. SNP-Analyse wurden zum anderen bereits publizierte Positionen aus Kohl et al. (2009) verwendet. Diese wurden zielgerichtet durch weitere zehn Positionen aus Wei et al. (2013) ergänzt und notwendige Primersequenzen für die Amplifikationsschritte designt. Eine Analyse der 52 Y-SNPs erfolgte in vier spezifisch zusammengestellten Multiplexsystemen. Verglichen zum mtDNA SNP-System konnte lediglich für ca. die Hälfte des Datensatzes ein aussagekräftiger Y-SNP Haplotyp erstellt werden. Grundsätzlich ist es mit diesem System möglich alle im aktuellen *Y-tree* vertretenen Makrohaplogruppen und eine Vielzahl von Sublinien zu detektieren, was dem System im Hinblick auf die phylogeografische Analyse eine hohe Aussagekraft verleiht. Parallel dazu erfolgte eine Ychr. STR-Analyse und eine Haplotyprecherche auf der YHRD-Datenbank. Dies beabsichtigte einen Zugewinn an Informationen zum Vorkommen ermittelter Abstammungslinien in heutigen Metapopulationen und die Extraktion populationsgenetischer Variablen. Im Allgemeinen kann für den Zweck der hier angewandten SNP-Analyse gesagt werden, dass das angewandte Analyseverfahren der Multiplexanalyse und anschließenden Minisequenzierung schnell, effizient und durch einen geringen gerätetechnischen Aufwand gut in die Routinearbeit zu integrieren ist. Basierend auf

den neuen Ergebnissen aus der uniparentalen SNP-Analyse kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei dem Grabungsfund wahrscheinlich um eine ansässige Bevölkerungsgruppe handelt, deren Hg-Verteilung auf mtDNA Ebene des heutigen Westeuropas ähnelt. Zusammen mit den Y-Chr. Analysen kann diese Aussage in Richtung einer spezifischen Bevölkerungsgruppe des heutigen Ost- oder Norddeutschen Raumes erweitert werden. Mit den Ergebnissen konnte ein Beitrag in Richtung einer synchronen Betrachtung von mtDNA und Y-Chromosom, mit Berücksichtigung der Besonderheiten im Vererbungsmechanismus, für evolutionsgenetische Studien geleistet werden.

Kapitel 6

Danksagung

Die zuletzt geschriebene Seite dieser Arbeit möchte ich nutzen, um all den Personen zu danken, die an dem guten Gelingen der Dissertation beteiligt waren. Es liegt mir am Herzen jedem einzelnen einen kurzen Dank zu widmen. Falls ich doch jemanden vergessen habe, möge er oder sie es mir verzeihen.

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. J. Dreßler für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Arbeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig und der Prosektur Chemnitz, durchführen konnte. Ein ganz besonderer Dank gilt weiterhin Prof. Dr. rer. nat. D. Labudde, der mir zu jedem Zeitpunkt zur Seite stand und die Arbeit intensiv, professionell und warmherzig, begleitet hat. Danke für all die hilfreichen Ideen und Vorschläge, deren Wert in manchen Situationen vielleicht erst später bewusst wurde. Dr. med. K. Thiele möchte ich als Mentor und für all die Freiheiten sowie für das Vertrauen, was er mir während der Bearbeitung entgegenbrachte und was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug, bedanken. Der Stadt Köthen, insbesondere der Kultur und Marketing GmbH, danke ich für die vertrauensvolle Bereitstellung des Skelettmaterials.

Bei Frau Dr. J. Edelmann und dem Team der forensischen Molekulargenetik der Rechtsmedizin Leipzig, insbesondere Herrn M. Kohl, möchte ich mich für die Unterstützung im Labor und bei der Beantwortung methodischer Fragen, bedanken. Für die Unterstützung und besonders herzliche Zeit möchte ich mich bei Frau S. Schulz, Herrn B. Grobitzsch, Frau M. Schmidt und bei Frau H. Grohmann, der Prosektur in Chemnitz, bedanken. Herrn Dr. rer. nat. H. Bruchhaus möchte ich für die zahlreichen Anregungen, für sein Vertrauen und die Bereitstellung des Skelettmaterials, danken. Des Weiteren danke ich ihm insbesondere für die Ausdauer und Mühen während der Korrekturzyklen.

Ebenfalls möchte ich einen großen Dank gegenüber Frau M.Sc. M. Harthun für die angenehme Zusammenarbeit, der Hilfe bei der Betreuung studentischer Arbeiten, die zahlreichen konstruktiven Ideen und die Freundschaft, die sich in dieser Zeit entwickelt hat, aussprechen. Ein großen Anteil an dieser besonderen Zeit hatten die Arbeitsgruppen FoSIL und bigM der Hochschule Mittweida. Ich möchte mich bei Euch für diese tolle Zeit, euer Zureden und die gemeinsamen Aufgaben, die wir bewältigt haben, bedanken. In dieser Zeit durfte ich nicht nur großartige Wissenschaftler sondern vielmehr gute Freunde kennen lernen. Frau Dr. rer. nat. J.

Rothe danke ich für den kurzen und wirkungsvollen Aufenthalt im rechtsmedizinischen Institut der Charité Berlin. Ich hoffe, dass wir weiterhin gemeinsam an den angestrebten Projektideen arbeiten können.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen lieben Freunden für all die herzliche Unterstützung und Motivation danken. Besonders für euer offenes Ohr und gutes Zureden, in schweren Phasen nicht aufzugeben. Eure Hilfe bedeutet mir mehr, als es sich in Worte fassen lässt. Das war schon immer so und beschränkt sich nicht nur auf die Dissertation. Dafür bin ich euch auf ewig dankbar.

Kapitel 7

Publikationsliste

Begutachtete Journal-Beiträge

1. Pflugbeil, A.-M., Harthun, M., Labudde, D., Edelmann, J., Dreßler, J., Thiele, K. (2015). Optimization strategies for DNA investigations of highly degraded corpses. *Rechtsmedizin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/s00194-015-0042-5. (*Impact Factor*: 0.324)
2. Harthun, M., Pflugbeil, A.-M., Friedewald, N., Labudde, D., Edelmann, J., Bruchhaus, H., Dreßler, J., Thiele, K. (2015). Geschlechterverteilung eines Grabungsfunds aus der römischen Kaiser- und Völkerwanderungszeit. *Rechtsmedizin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/s00194-015-0043-4.
3. Pflugbeil, A.M, Groß, S., Rothe, J, Heinke, F, Labudde, D., Edelmann, J., Bruchhaus, H., Dreßler, J., Thiele, K. (2015). Initial experience in the application of the PowerQuant™ system and the ESSplex SE QS kit for aDNA analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. DOI 10.1016/j.fsigss.2015.09.167. (*Impact Factor*: 4.604)
4. Pflugbeil, A.M., Labudde, D. (2012). Verraten unsere Gene wer wir sind? Die Rolle der Bioinformatik in der Forensik und Populationsgenetik. *BioS* 2/61.

Konferenzbeiträge

1. Jeraufke, S., Pflugbeil, A.M., Becker, S., Schildbach, S., Labudde, D., Bruchhaus, H., Thiele, K., Dreßler, J (2016) Analysis of X-ray Images of Femora for Age at Death Estimation of Skeletal Individuals. *15th International Conference of the Biometrics Special Interest Group (BIOSIG)*, Darmstadt - eingereicht.
2. Pflugbeil, A.M., Thiele, K., Harthun, M., Labudde, D., Dreßler, J. (2014) Establishment of mitochondrial SNPs for aDNA analysis in forensic anthropology and molecular genetics. *15. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz ost- und mitteldeutscher Fachhochschulen*, Magdeburg. ISBN: 978-3-935831-58-1.

3. Thiele, K., Pflugbeil, A.M., Bruchhaus H., Becker, S., Jeraufke, S., Seidel, E., Edelmann, J., Labudde, D., Dreßler, J. (2013). Know-how im Katastrophenfall: Molekulargenetische Analysen an Knochenmaterial hochgradig postmortal veränderter Leichen. *DGRM, Saarbrücken*. conference proceedings.

Posterbeiträge

1. Pflugbeil, A.M., Groß, S., Rothe, J., Heinke, F., Labudde, D., Edelmann, J., Bruchhaus, H., Dreßler, J., Thiele, K. (2015). Initial experience in the application of the PowerQuantTM and the Investigator[®] ESSplex SE QS Kit for ancient DNA analysis. *ISFG, Krakow*.
2. Pflugbeil, A.M., Harthun, M., Bruchhaus, H., Edelmann, J., Labudde, D., Dreßler, J., Thiele, K. (2015). Genotyping of 52 Y-chromosomal haplogroup specific SNPs for skeletal remains from an excavation find from the migration period. *ISFG, Krakow*.
3. Rothe, J., Cemper-Kiesslich, J., Pflugbeil, A.M., Nagy, M. (2015). Development of an Evaluation Form for Improved Data Exchange in DNA Extraction and Analysis from (Human) Osseous Remains. *ISFG, Krakow*.
4. Jeraufke, S., Becker, S., Birkeneder, L., Weise, A., Kleinecke, J., Pflugbeil, A.-M., Bruchhaus, H., Labudde, D., Dreßler, J., Thiele, K. (2015) Anthropologische Analyse der Ossa membri inferiores von bodengelagertem Skelettmaterial. *DGRM 2015, Leipzig*.
5. Pflugbeil, A.M., Thiele, K., Harthun, M., Labudde, D. (2014). Process optimisation for DNA investigations of highly post-mortem modified skeletons. *Saxon Biotechnology Symposium 2014 – Center for Regenerative Therapies, Dresden*.
6. Pflugbeil, A.M., Thiele, K., Harthun, M., Labudde, D. (2014) Molekulargenetische Knochenanalysen hochgradig postmortal veränderter Leichen im Katastrophenfall – Teilautomatisierte Verfahrensabläufe zur Verkürzung der Analysezeit. 2. *Forschungs- und Technologiesymposium der Polizei, Deutsche Hochschule der Polizei Münster*.
7. Thiele, K., Pflugbeil, A.M., Bruchhaus H., Dressler, J. (2012). Establishment of mitochondrial SNPs for the investigation of skeletal material buried in the ground. *DNA in Forensics, Exploring the Phylogenies, conference proceedings, Innsbruck*.

Vorträge

1. Pflugbeil, A.M. (2015) Next Generation Forensics – Novel perspectives in ancient DNA (aDNA) analysis. *ISFG World congress – Qualitytype meeting, Krakow*.
2. Pflugbeil, A.M. und Rothe, J. (2015) Feldstudie Investigator[®] ESSplex SE QS Kit - Erfahrungsberichte Workshop zur Molekularen Osteologie. *DGRM 2015, Leipzig*.

3. Pflugbeil, A.M. (2014) Expertise in disaster victim identification - Process optimization to minimize the analysis time for DNA investigations of highly post-mortem modified skeletons. *Investigator User Forum QIAGEN*, Düsseldorf.
4. Pflugbeil, A.M. (2014) Anwendungsbeispiele aus der molekularen Osteologie in der Forensik. *Frühjahrstagung der sächsischen Institute für Rechtsmedizin und des LKA Sachsen*.

Kapitel 8

Literaturverzeichnis

Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J.-M., Roostalu, U., Loogväli, E.-L., Kivisild, T., Bandelt, H.-J., Richards, M., Villems, R., Santachiara-Benerecetti, A. S., Semino, O., and Torroni, A. (2004). The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the franco-cantabrian glacial refuge was a major source for the european gene pool. *Am J Hum Genet*, 75(5):910–918.

Acsádi, G. and Nemeskéri, J. (1970). History of human life span and mortality. Budapest Akadémiai Kiadó.

Adler, C., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A., Consortium, G., et al. (2011). Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science*, 38(5):956–964.

Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., and Meyer, R. B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*, 25(13):2657–2660.

Al-Soud, W. A. and Rådström, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*, 39(2):485–493.

Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—a review. *Forensic Sci Int Genet*, 6(3):297–305.

Alaeddini, R., Walsh, S. J., and Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic Sci Int Genet*, 4(3):148–157.

Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G., and LeDoux, S. (2013). The maintenance of mitochondrial DNA integrity—critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(5):a012641.

- Alonso, A., Andelinović, S., Martín, P., Sutlović, D., Erceg, I., Huffine, E., de Simón, L. F., Albarrán, C., Definis-Gojanović, M., Fernández-Rodríguez, A., García, P., Drmić, I., Rezić, B., Kuret, S., Sancho, M., and Primorac, D. (2001). DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J*, 42(3):260–266.
- Alt, K., Brandt, G., Knipper, C., and Lehn, C. (2014). Empfehlungen für die Probenentnahme in der forensischen Anthropologie. *Rechtsmedizin*, 24(3):179–185.
- Alvarez-Iglesias, V., Mosquera-Miguel, A., Cerezo, M., Quintáns, B., Zarrabeitia, M. T., Cuscó, I., Lareu, M. V., García, O., Pérez-Jurado, L., Carracedo, A., and Salas, A. (2009). New population and phylogenetic features of the internal variation within mitochondrial DNA macro-haplogroup R0. *PLoS One*, 4(4):e5112.
- Alves-Silva, J., da Silva Santos, M., Guimaraes, P. E., Ferreira, A. C., Bandelt, H. J., Pena, S. D., and Prado, V. F. (2000). The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*, 67(2):444–461.
- Ambers, A., Gill-King, H., Dirkmaat, D., Benjamin, R., King, J., and Budowle, B. (2014). Autosomal and y-STR analysis of degraded DNA from the 120-year-old skeletal remains of ezeziel harper. *Forensic Sci Int Genet*, 9:33–41.
- Amory, S., Huel, R., Bilić, A., Loreille, O., and Parsons, T. J. (2012). Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet*, 6(3):398–406.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I., Nierlich, D., Roe, B. A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*.
- Aretz, S., Ganten, D., and Ruckpaul, K. (2008). *Grundlagen der molekularen Medizin*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 3 edition.
- Arredi, B., Poloni, E. S., Paracchini, S., Zerjal, T., Fathallah, D. M., Makrelouf, M., Pascali, V. L., Novelletto, A., and Tyler-Smith, C. (2004). A predominantly neolithic origin for Y-chromosomal DNA variation in North Africa. *Am J Hum Genet*, 75(2):338–345.
- Aşıcıoğlu, F., Oguz-Savran, F., and Ozbek, U. (2004). Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis Markers*, 20(6):313–315.
- Ballard, J. W. O. and Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol*, 13(4):729–744.
- Bandelt, H.-J., Achilli, A., Kong, Q.-P., Salas, A., Lutz-Bonengel, S., Sun, C., Zhang, Y.-P., Torroni, A., and Yao, Y.-G. (2005). Low "penetrance" of phylogenetic knowledge in mitochondrial disease studies. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(1):122–130.

- Bandelt, H.-J., Kloss-Brandstätter, A., Richards, M. B., Yao, Y.-G., and Logan, I. (2014). The case for the continuing use of the revised cambridge reference sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies. *J Hum Genet*, 59(2):66–77.
- Bandelt, H.-J., Kong, Q.-P., Richards, M., and Macaulay, V. (2006). Estimation of mutation rates and coalescence times: some caveats. In *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*, pages 47–90. Springer.
- Bauer, C. M., Niederstätter, H., McGlynn, G., Stadler, H., and Parson, W. (2013). Comparison of morphological and molecular genetic sex-typing on mediaeval human skeletal remains. *Forensic Science International: Genetics*, 7(6):581–586.
- Becker, S. (2013). Morphognostische, osteometrische und molekulargenetische Untersuchungen an den unteren Extremitäten, speziell am Femur, von bodengelagertem, historischen Skelettmaterial. Bachelorarbeit, Hochschule Mittweida - University of Applied Sciences Durchgeführt am Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig.
- Behar, D. M., van Oven, M., Rosset, S., Metspalu, M., Loogväli, E.-L., Silva, N. M., Kivisild, T., Torroni, A., and Villems, R. (2012). A "copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *Am J Hum Genet*, 90(4):675–684.
- Bemmann, J. (2000a). *Mitteldeutschland in der jüngeren Römischen Kaiserzeit und Völkerwanderungszeit. Eine von den Körperbestattungen ausgehende Studie*. Habilitationsschrift, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Bemmann, J. (2000b). Zur Frage der Kontinuität von der jüngeren römischen Kaiserzeit zur Völkerwanderungszeit in Mitteldeutschland. In: M. Macynska (Hrsg.).
- Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Goodfellow, P. N., and Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348(6300):448–450.
- Bessetti, J. (2007). An introduction to PCR inhibitors. *J. Microbiol. Meth*, 28:159–67.
- Biosystems, A. (2000). Quantifiler human DNA quantification Kit - User's Manual.
- Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowers, R. N., and Dietrich, A. (2011). DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1813(1):186–200.
- Boles, T. C., Snow, C. C., and Stover, E. (1995). Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci*, 40(3):349–355.
- Børsting, C., Sanchez, J. J., and Morling, N. (2007). Application of SNPs in forensic casework. *Molecular Forensics*, page 91.

- Briggs, A. W., Good, J. M., Green, R. E., Krause, J., Maricic, T., Stenzel, U., Lalueza-Fox, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Schmitz, R., Doronichev, V. B., Golovanova, L. V., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., and Pääbo, S. (2009). Targeted retrieval and analysis of five neandertal mtDNA genomes. *Science*, 325(5938):318–321.
- Brinkmann, B., Klitschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J., and Rolf, B. (1998). Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet*, 62(6):1408–1415.
- Brion, M., Blanco-Verea, A., Lareu, V., and Carracedo, A. (2004). 29 Y-chromosome SNP analysis in European populations. In *International Congress Series*, volume 1261, pages 73–75. Elsevier.
- Brion, M., Sobrino, B., Blanco-Verea, A., Lareu, M. V., and Carracedo, A. (2005). Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. *Int J Legal Med*, 119(1):10–15.
- Brotherton, P., Haak, W., Templeton, J., Brandt, G., Soubrier, J., Jane Adler, C., Richards, S. M., Sarkissian, C. D., Ganslmeier, R., Friederich, S., Dresely, V., van Oven, M., Kenyon, R., Van der Hoek, M. B., Korfach, J., Luong, K., Ho, S. Y. W., Quintana-Murci, L., Behar, D. M., Meller, H., Alt, K. W., Cooper, A., G. C., Adhikarla, S., Ganesh Prasad, A. K., Pitchappan, R., Varatharajan Santhakumari, A., Balanovska, E., Balanovsky, O., Bertranpetit, J., Comas, D., Martínez-Cruz, B., Melé, M., Clarke, A. C., Matisoo-Smith, E. A., Dulik, M. C., Gaieski, J. B., Owings, A. C., Schurr, T. G., Vilar, M. G., Hobbs, A., Soodyall, H., Javed, A., Parida, L., Platt, D. E., Royyuru, A. K., Jin, L., Li, S., Kaplan, M. E., Merchant, N. C., John Mitchell, R., Renfrew, C., Lacerda, D. R., Santos, F. R., Soria Hernanz, D. F., Spencer Wells, R., Swamikrishnan, P., Tyler-Smith, C., Paulo Vieira, P., and Ziegler, J. S. (2013). Neolithic mitochondrial haplogroup H genomes and the genetic origins of europeans. *Nat Commun*, 4:1764.
- Brown, W. M. (1980). Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(6):3605–3609.
- Bruchhaus, H. and Neubert, A. (2000). Zur Rekonstruktion der Glockenbecherbevölkerung im Mittelelbe-Saale-Gebiet. Ergebnisse einer ersten Bestandsaufnahme. Beiträge zur Ur- und Frühgeschichte Mitteleuropas. *Varia Neolithica I*, 22:177 – 193.
- Budowle, B. and van Daal, A. (2008). Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*, 44(5):603–8, 610.
- Butler, J. M. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques*, 43(4):ii–iv.
- Butler, J. M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology: Methodology*. Academic Press.
- Butler, J. M., Coble, M. D., and Vallone, P. M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci Med Pathol*, 3(3):200–205.

- Butler, J. M., Shen, Y., and McCord, B. R. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci*, 48(5):1054–1064.
- Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., and Gilbert, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat*, 194(1):7–16.
- Caputo, M., Irisarri, M., Alechine, E., and Corach, D. (2013). A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping. *Forensic Sci Int Genet*, 7(5):488–493.
- Chen, Y.-S., Torroni, A., Excoffier, L., Santachiara-Benerecetti, A. S., and Wallace, D. C. (1995). Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *American journal of human genetics*, 57(1):133.
- Coble, M. D., Just, R. S., O'Callaghan, J. E., Letmanyi, I. H., Peterson, C. T., Irwin, J. A., and Parsons, T. J. (2004). Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med*, 118(3):137–146.
- Collins, J. R., Stephens, R. M., Gold, B., Long, B., Dean, M., and Burt, S. K. (2003). An exhaustive DNA micro-satellite map of the human genome using high performance computing. *Genomics*, 82(1):10–19.
- Comas, D., Plaza, S., Wells, R. S., Yuldaseva, N., Lao, O., Calafell, F., and Bertranpetit, J. (2004). Admixture, migrations, and dispersals in Central Asia: evidence from maternal DNA lineages. *Eur J Hum Genet*, 12(6):495–504.
- Consortium, Y. C. et al. (2002). A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome research*, 12(2):339–348.
- Cooper, A. and Poinar, H. N. (2000). Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*, 289(5482):1139.
- Cruciani, F., La Fratta, R., Santolamazza, P., Sellitto, D., Pascone, R., Moral, P., Watson, E., Guida, V., Colomb, E. B., Zaharova, B., et al. (2004). Phylogeographic analysis of haplogroup E3b (E-M215) Y chromosomes reveals multiple migratory events within and out of Africa. *The American Journal of Human Genetics*, 74(5):1014–1022.
- Cruciani, F., Santolamazza, P., Shen, P., Macaulay, V., Moral, P., Olckers, A., Modiano, D., Holmes, S., Destro-Bisol, G., Coia, V., Wallace, D. C., Oefner, P. J., Torroni, A., Cavalli-Sforza, L. L., Scozzari, R., and Underhill, P. A. (2002). A back migration from Asia to sub-Saharan Africa is supported by high-resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Am J Hum Genet*, 70(5):1197–1214.
- Dansgaard, W., Johnsen, S., Clausen, H., Dahl-Jensen, D., Gundestrup, N., Hammer, C., Hvidberg, C., Steffensen, J., Sveinbjörnsdóttir, A., Jouzel, J., et al. (1993). Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record. *Nature*, 364(6434):218–220.

- Davoren, J., Vanek, D., Konjhodžić, R., Crews, J., Huffine, E., and Parsons, T. J. (2007). Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J*, 48(4):478–485.
- de la Puente, M., Santos, C., Fondevila, M., Manzo, L., , E. U. R. O. F. O. R. G. E. N.-N. C., Carracedo, Á., Lareu, M. V., and Phillips, C. (2016). The Global AIMs Nano set: A 31-plex SNPshot assay of ancestry-informative SNPs. *Forensic Sci Int Genet*, 22:81–88.
- De Leo, D., Turrina, S., and Marigo, M. (2000). Effects of individual dental factors on genomic DNA analysis. *Am J Forensic Med Pathol*, 21(4):411–415.
- Destro-Bisol, G., Donati, F., Coia, V., Boschi, I., Verginelli, F., Caglià, A., Tofanelli, S., Spedini, G., and Capelli, C. (2004). Variation of female and male lineages in sub-Saharan populations: the importance of sociocultural factors. *Mol Biol Evol*, 21(9):1673–1682.
- Dukes, M. J., Williams, A. L., Massey, C. M., and Wojtkiewicz, P. W. (2012). Technical note: Bone DNA extraction and purification using silica-coated paramagnetic beads. *American journal of physical anthropology*, 148(3):473–482.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., and Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 49(4):746–756.
- Excoffier, L. and Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, 10(3):564–567.
- Ferembach, D., Schwidetzky, I., and Stloukal, M. (1979). Empfehlungen für die Alters-und Geschlechtsdiagnose am Skelett.(Recommandations pour le diagnostic de l'âge et du sexe sur les squelettes). *Homo Gottingen*, 30(2):1–32.
- Fischer, O.; Wolf, F. (1984). Zu altersspezifischen Veränderungen am proximalen Humerus- und Femurende des erwachsenen Menschen. Master's thesis, Medizinische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Diplomarbeit.
- Fischer, O. (1991). Zu altersspezifischen Veränderungen am proximalen Femurende des erwachsenen Menschen an mittelalterlichen und neuzeitlichen Skelettmaterial. Dissertation, Medizinische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Fisher, D. L., Holland, M. M., Mitchell, L., Sledzik, P. S., Wilcox, A. W., Wadhams, M., and Weedn, V. W. (1993). Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. *J Forensic Sci*, 38(1):60–68.
- Fondevila, M., Phillips, C., Santos, C., Freire Aradas, A., Vallone, P. M., Butler, J. M., Lareu, M. V., and Carracedo, A. (2013). Revision of the SNPforID 34-plex forensic ancestry test: Assay enhancements, standard reference sample genotypes and extended population studies. *Forensic Sci Int Genet*, 7(1):63–74.

- Forster, P., Röhl, A., Lünemann, P., Brinkmann, C., Zerjal, T., Tyler-Smith, C., and Brinkmann, B. (2000). A short tandem repeat-based phylogeny for the human Y chromosome. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1):182–196.
- Forster, P., Torroni, A., Renfrew, C., and Röhl, A. (2001). Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol Evol*, 18(10):1864–1881.
- Franklin, D. (2010). Forensic age estimation in human skeletal remains: current concepts and future directions. *Leg Med (Tokyo)*, 12(1):1–7.
- GEN-IAL (2000). *First-DNA all-tissue Kit*.
- Gettings, K. B., Lai, R., Johnson, J. L., Peck, M. A., Hart, J. A., Gordish-Dressman, H., Schanfield, M. S., and Podini, D. S. (2014). A 50-SNP assay for biogeographic ancestry and phenotype prediction in the U.S. population. *Forensic Sci Int Genet*, 8(1):101–108.
- Gibbs, R. A., Belmont, J. W., Hardenbol, P., Willis, T. D., Yu, F., Yang, H., Ch'ang, L.-Y., Huang, W., Liu, B., Shen, Y., et al. (2003). The international HapMap project. *Nature*, 426(6968):789–796.
- Gilbert, M. T. P., Bandelt, H.-J., Hofreiter, M., and Barnes, I. (2005). Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(10):541–544.
- Gill, P., Brinkmann, B., d'Aloja, E., Andersen, J., Bar, W., Carracedo, A., Dupuy, B., Eriksen, B., Jangblad, M., Johnsson, V., Kloosterman, A. D., Lincoln, P., Morling, N., Rand, S., Sabatier, M., Scheithauer, R., Schneider, P., and Vide, M. C. (1997). Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci Int*, 87(3):185–192.
- Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., and Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*, 6(2):130–135.
- Götze, W. (1938). Fundberichte zur Vorgeschichte. Anhaltische Geschichtsblätter 13. 104-131.
- Green, R. L., Roinestad, I. C., Boland, C., and Hennessy, L. K. (2005). Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples. *J Forensic Sci*, 50(4):809–825.
- Grignani, P., Turchi, C., Achilli, A., Peloso, G., Alù, M., Ricci, U., Robino, C., Pelotti, S., Carnevali, E., Boschi, I., et al. (2009). Multiplex mtDNA coding region SNP assays for molecular dissection of haplogroups U/K and J/T. *Forensic Science International: Genetics*, 4(1):21–25.
- Hallast, P., Batini, C., Zadik, D., Maisano Delser, P., Wetton, J. H., Arroyo-Pardo, E., Cavalleri, G. L., de Knijff, P., Destro Bisol, G., Dupuy, B. M., Eriksen, H. A., Jorde, L. B., King, T. E., Larmuseau, M. H., López de Munain, A., López-Parra, A. M., Loutradis, A., Milasin, J., Novelletto, A., Pamjav, H., Sajantila, A., Schempp, W., Sears, M., Tolun, A., Tyler-Smith, C.,

- Van Geystelen, A., Watkins, S., Winney, B., and Jobling, M. A. (2015). The Y-chromosome tree bursts into leaf: 13,000 high-confidence SNPs covering the majority of known clades. *Mol Biol Evol*, 32(3):661–673.
- Harthun, M., Pflugbeil, A.-M., Friedewald, N., Labudde, D., Edelman, J., Bruchhaus, H., Dressler, J., and Thiele, K. (2015). Geschlechterverteilung eines Grabungsfunds aus der römischen Kaiser- und Völkerwanderungszeit. *Rechtsmedizin*, 25(4):287–293.
- Herrmann, B. and Henke, W. (1999). DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*, 20:1722–1728.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A., and Wilson, A. C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature Publishing Group*.
- Hochmeister, M. N., Budowle, B., Borer, U. V., Eggmann, U., Comey, C. T., and Dirnhofer, R. (1991). Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci*, 36(6):1649–1661.
- Hoff-Olsen, P., Mevåg, B., Staalstrøm, E., Hovde, B., Egeland, T., and Olaisen, B. (1999). Extraction of DNA from decomposed human tissue. an evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci Int*, 105(3):171–183.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., and Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5):353–359.
- Holland, M. M. and Parsons, T. J. (1999). Mitochondrial DNA Sequence Analysis - Validation and Use for Forensic Casework. *Forensic Sci Rev*, 11(1):21–50.
- Hollund, H., Arts, N., Jans, M. M. E., and Kars, H. (2013). Are Teeth Better? Historical Characterization of Diagenesis in Archaeological Bone -Tooth Pairs and a Discussion of the Consequences for Archaeometric Sample Selection and Analyses. *International Journal of Osteoarchaeology*, 25(6):901 – 911.
- Huel, R., Amory, S., Bilić, A., Vidović, S., Jasaragić, E., and Parsons, T. J. (2012). DNA extraction from aged skeletal samples for STR typing by capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 830:185–198.
- Jeraufke, S. (2013). Morphognostische, morphometrische und molekulargenetische Untersuchungen von bodengelagertem, historischen Knochenmaterial des Schädels - Ein Beitrag zur Rekonstruktion der Bevölkerung von Görzig (Sachsen-Anhalt). Bachelorarbeit, Hochschule Mittweida - University of Applied Sciences, Durchgeführt am Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig.
- Jobling, M., Hurles, M., and Tyler-Smith, C. (2013). *Human evolutionary genetics: origins, peoples & disease*. Garland Science, 2 edition.

- Jobling, M. A. (2012). The impact of recent events on human genetic diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1590):793–799.
- Jobling, M. A., Heyer, E., Dieltjes, P., and de Knijff, P. (1999). Y-chromosome-specific microsatellite mutation rates re-examined using a minisatellite, MSY1. *Hum Mol Genet*, 8(11):2117–2120.
- Jobling, M. A. and Tyler-Smith, C. (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet*, 4(8):598–612.
- Jorde, L. B., Bamshad, M., and Rogers, A. R. (1998). Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. *Bioessays*, 20(2):126–136.
- Karafet, T. M., Mendez, F. L., Meilerman, M. B., Underhill, P. A., Zegura, S. L., and Hammer, M. F. (2008). New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome research*, 18(5):830–838.
- Karmin, M., Saag, L., Vicente, M., Wilson Sayres, M. A., Järve, M., Talas, U. G., Rootsi, S., Ilumäe, A.-M., Mägi, R., Mitt, M., Pagani, L., Puurand, T., Faltyskova, Z., Clemente, F., Cardona, A., Metspalu, E., Sahakyan, H., Yunusbayev, B., Hudjashov, G., DeGiorgio, M., Loogväli, E.-L., Eichstaedt, C., Eelmets, M., Chaubey, G., Tambets, K., Litvinov, S., Mormina, M., Xue, Y., Ayub, Q., Zoraqi, G., Korneliussen, T. S., Akhatova, F., Lachance, J., Tishkoff, S., Momynaliev, K., Ricaut, F.-X., Kusuma, P., Razafindrazaka, H., Pierron, D., Cox, M. P., Sultana, G. N. N., Willerslev, R., Muller, C., Westaway, M., Lambert, D., Skaro, V., Kovačević, L., Turdikulova, S., Dalimova, D., Khusainova, R., Trofimova, N., Akhmetova, V., Khidiyatova, I., Lichman, D. V., Isakova, J., Pocheshkhova, E., Sabitov, Z., Barashkov, N. A., Nymadawa, P., Mihailov, E., Seng, J. W. T., Evseeva, I., Migliano, A. B., Abdullah, S., Andriadze, G., Primorac, D., Atramentova, L., Utevska, O., Yepiskoposyan, L., Marjanovic, D., Kushniarevich, A., Behar, D. M., Gilissen, C., Vissers, L., Veltman, J. A., Balanovska, E., Derenko, M., Malyarchuk, B., Metspalu, A., Fedorova, S., Eriksson, A., Manica, A., Mendez, F. L., Karafet, T. M., Veeramah, K. R., Bradman, N., Hammer, M. F., Osipova, L. P., Balanovsky, O., Khusnutdinova, E. K., Johnsen, K., Remm, M., Thomas, M. G., Tyler-Smith, C., Underhill, P. A., Willerslev, E., Nielsen, R., Metspalu, M., Villems, R., and Kivisild, T. (2015). A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture. *Genome Res*, 25(4):459–466.
- Kayser, M. and Schneider, P. M. (2009). DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet*, 3(3):154–161.
- Kettner, M., Graw, M., and Schmidt, P. (2013). Moderne Technologien in der forensischen Anthropologie. *Rechtsmedizin*, 23(2):92–96.
- Kivisild, T., Metspalu, M., Bandelt, H.-J., Richards, M., and Villems, R. (2006). The world mtDNA phylogeny. In *Human mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*, pages 149–179. Springer.

- Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, E., Rosa, A., Brehm, A., Pennarun, E., Parik, J., Geberhiwot, T., Usanga, E., and Villems, R. (2004). Ethiopian mitochondrial DNA heritage: tracking gene flow across and around the gate of tears. *Am J Hum Genet*, 75(5):752–770.
- Kleinecke, J. (2011). *Das Gräberfeld Görzig Eine archäologische und anthropologische Untersuchung*. Magistra artium (m.a.), Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophische Fakultät, Bereich für Ur- und Frühgeschichte.
- Kloss-Brandstätter, A., Pacher, D., Schönherr, S., Weissensteiner, H., Binna, R., Specht, G., and Kronenberg, F. (2011). Haplogrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum Mutat*, 32(1):25–32.
- Köchl, S., Niederstätter, H., and Parson, W. (2005). DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol*, 297:13–30.
- Kohl, M., Lessig, R., Edelmann, J., Dressler, J., and Thiele, K. (2009). Distribution of Y-chromosomal SNP-haplogroups between males from Ethiopia. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1):435–436.
- Köhnemann, S., Sibbing, U., Pfeiffer, H., and Hohoff, C. (2008). A rapid mtDNA assay of 22 SNPs in one multiplex reaction increases the power of forensic testing in European Caucasians. *Int J Legal Med*, 122(6):517–523.
- Kolman, C. J. and Tuross, N. (2000). Ancient DNA analysis of human populations. *American Journal of Physical Anthropology*, 111(1):5–23.
- Kong, Q.-P., Bandelt, H.-J., Sun, C., Yao, Y.-G., Salas, A., Achilli, A., Wang, C.-Y., Zhong, L., Zhu, C.-L., Wu, S.-F., Torroni, A., and Zhang, Y.-P. (2006). Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum Mol Genet*, 15(13):2076–2086.
- Kong, Q.-P., Yao, Y.-G., Sun, C., Bandelt, H.-J., Zhu, C.-L., and Zhang, Y.-P. (2003). Phylogeny of east asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *Am J Hum Genet*, 73(3):671–676.
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10):1289–1291.
- Krawczak, M., Schmidtke, J., et al. (1998). *DNA fingerprinting*. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Laberke, P., Jegge, L., Kübler, E., et al. (2014). Geschlechtsbestimmung mit dem Amelogenin-system. *Rechtsmedizin*, 24(1):30–36.
- LaSalle, H. E., Duncan, G., and McCord, B. (2011). An analysis of single and multi-copy methods for DNA quantitation by real-time polymerase chain reaction. *Forensic Sci Int Genet*, 5(3):185–193.

- Lee, S. B., McCord, B., and Buel, E. (2014). Advances in forensic DNA quantification: a review. *Electrophoresis*, 35(21-22):3044–3052.
- Liu, P and Demple, B. (2010). DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environ Mol Mutagen*, 51(5):417–426.
- Loogväli, E.-L., Roostalu, U., Malyarchuk, B. A., Derenko, M. V., Kivisild, T., Metspalu, E., Tambets, K., Reidla, M., Tolk, H.-V., Parik, J., Pennarun, E., Laos, S., Lunkina, A., Golubenko, M., Barac, L., Pericic, M., Balanovsky, O. P., Gusar, V., Khusnutdinova, E. K., Stepanov, V., Puzryev, V., Rudan, P., Balanovska, E. V., Grechanina, E., Richard, C., Moisan, J.-P., Chaventré, A., Anagnou, N. P., Pappa, K. I., Michalodimitrakis, E. N., Claustres, M., Gölge, M., Mikerezi, I., Usanga, E., and Villems, R. (2004). Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Mol Biol Evol*, 21(11):2012–2021.
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., and Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet*, 1(2):191–195.
- Luis, J. R., Rowold, D. J., Regueiro, M., Caeiro, B., Cinnio?lu, C., Roseman, C., Underhill, P. A., Cavalli-Sforza, L. L., and Herrera, R. J. (2004). The levant versus the Horn of Africa: evidence for bidirectional corridors of human migrations. *Am J Hum Genet*, 74(3):532–544.
- Luo, R. F., Scahill, M. D., and Banaei, N. (2010). Comparison of single-copy and multicopy real-time PCR targets for detection of Mycobacterium tuberculosis in paraffin-embedded tissue. *J Clin Microbiol*, 48(7):2569–2570.
- Ma, Y., Kuang, J.-Z., Zhang, J., Wang, G.-M., Wang, Y.-J., Jin, W.-M., and Hou, Y.-P. (2012). Y chromosome interstitial deletion induced y-STR allele dropout in AMELY-negative individuals. *Int J Legal Med*, 126(5):713–724.
- Macaulay, V., Hill, C., Achilli, A., Rengo, C., Clarke, D., Meehan, W., Blackburn, J., Semino, O., Scozzari, R., Cruciani, F., Taha, A., Shaari, N. K., Raja, J. M., Ismail, P., Zainuddin, Z., Goodwin, W., Bulbeck, D., Bandelt, H.-J., Oppenheimer, S., Torroni, A., and Richards, M. (2005). Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science*, 308(5724):1034–1036.
- MacHugh, D. E., Edwards, C. J., Bailey, J., Bancroft, D. R., and Bradley, D. G. (2000). The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies. *Ancient Biomolecules*, 3:81–102.
- Madea, B. (2007). *Praxis Rechtsmedizin. Befunderhebung, Rekonstruktion, Beguachtung. Auflage, Heidelberg.*
- Merriwether, D. A., Rothhammer, F., and Ferrell, R. E. (1994). Genetic variation in the new world: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia*, 50(6):592–601.
- Michael, A. and Brauner, P. (2004). Erroneous gender identification by the amelogenin sex test. *J Forensic Sci*, 49(2):258–259.

- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A. G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M. D., et al. (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1):171–176.
- Morley, C. (2013). An experimental computer-generated Y-chromosomal phylogeny, leveraging public geno 2.0 results and the current ISOGG tree.
- Müllhardt, C. (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 6 edition.
- MULLER, H. J. (1964). THE RELATION OF RECOMBINATION TO MUTATIONAL ADVANCE. *Mutat Res*, 106:2–9.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155:335.
- Mundorff, A. and Davoren, J. M. (2014). Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals. *Forensic Sci Int Genet*, 8(1):55–63.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256(1):12–18.
- Navascués, M., Depaulis, F., and Emerson, B. C. (2010). Combining contemporary and ancient DNA in population genetic and phylogeographical studies. *Mol Ecol Resour*, 10(5):760–772.
- Nohira, C., Maruyama, S., and Minaguchi, K. (2010). Phylogenetic classification of japanese mtDNA assisted by complete mitochondrial DNA sequences. *Int J Legal Med*, 124(1):7–12.
- Onofri, V., Alessandrini, F., Turchi, C., Pesaresi, M., Buscemi, L., and Tagliabracci, A. (2006). Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int*, 157(1):23–35.
- Pääbo, S. (1985). Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314(6012):644–645.
- Pääbo, S. (1986). Molecular genetic investigations of ancient human remains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:441–446.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., and Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*, 38:645–679.
- Pagan, F., Lim, C., Keglovic, M., and McNevin, D. (2012). Comparison of DNA extraction methods for identification of human remains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 44(2):117–127.
- Palanichamy, M. G., Sun, C., Agrawal, S., Bandelt, H.-J., Kong, Q.-P., Khan, F., Wang, C.-Y., Chaudhuri, T. K., Palla, V., and Zhang, Y.-P. (2004). Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in india, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia. *Am J Hum Genet*, 75(6):966–978.

- Paneto, G. G., Köhnemann, S., Martins, J. A., Cicarelli, R. M. B., and Pfeiffer, H. (2011). A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. *Mitochondrion*, 11(2):296–302.
- Parson, M. W. (2009). Bedeutung der mtDNA-Analyse für forensische Fragestellungen. *Rechtsmedizin*, 19(3):183–194.
- Parson, W., Gusmao, L., Hares, D., Irwin, J., Mayr, W., Morling, N., Pokorak, E., Prinz, M., Salas, A., Schneider, P., et al. (2014). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International: Genetics*, 13:134–142.
- Pereira, L., Richards, M., Goios, A., Alonso, A., Albarrán, C., Garcia, O., Behar, D. M., Gölge, M., Hatina, J., Al-Gazali, L., Bradley, D. G., Macaulay, V., and Amorim, A. (2005). High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium. *Genome Res*, 15(1):19–24.
- Perry 3rd, W., Bass, W., Riggsby, W., and Sirotkin, K. (1988). The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *Journal of forensic sciences*, 33(1):144–153.
- Pfeiffer, H., Hühne, J., Seitz, B., and Brinkmann, B. (1999). Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med*, 112(2):142–144.
- Pflugbeil, A., Groß, S., Rothe, J., Heinke, F., Bruchhaus, H., Edelmann, J., Labudde, D., Dreßler, J., and Thiele, K. (2015). Initial experience in the application of the PowerQuant™ system and the investigator® ESSplex SE QS kit for aDNA analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5:e420–e421.
- Phillips, C. (2015). Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. *Forensic Sci Int Genet*, 18:49–65.
- Poetsch, M., Wittig, H., Krause, D., and Lignitz, E. (2003). Mitochondrial diversity of a northeast German population sample. *Forensic Sci Int*, 137(2-3):125–132.
- Promega (2015a). PowerQuant System - Technical Manual.
- Promega, C. (2015b). *Internal Validation Guide of qPCR Systems for Forensic Laboratories*.
- Pruvost, M., Schwarz, R., Correia, V. B., Champlot, S., Braguier, S., Morel, N., Fernandez-Jalvo, Y., Grange, T., and Geigl, E.-M. (2007). Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3):739–744.
- Putkonen, M. T., Palo, J. U., Cano, J. M., Hedman, M., and Sajantila, A. (2010). Factors affecting the STR amplification success in poorly preserved bone samples. *Investig Genet*, 1(1):9.

- Quintana-Murci, L., Krausz, C., and McElreavey, K. (2001). The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic science international*, 118(2):169–181.
- Quintana-Murci, L., Semino, O., Bandelt, H. J., Passarino, G., McElreavey, K., and Santachiara-Benerecetti, A. S. (1999). Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa. *Nat Genet*, 23(4):437–441.
- Richards, M. (2004). The mitochondrial DNA tree and forensic science. In *International Congress Series*, volume 1261, pages 91–93. Elsevier.
- Richards, M., Macaulay, V., Hickey, E., Vega, E., Sykes, B., Guida, V., Rengo, C., Sellitto, D., Cruciani, F., Kivisild, T., Villems, R., Thomas, M., Rychkov, S., Rychkov, O., Rychkov, Y., Gölge, M., Dimitrov, D., Hill, E., Bradley, D., Romano, V., Cali, F., Vona, G., Demaine, A., Papiha, S., Triantaphyllidis, C., Stefanescu, G., Hatina, J., Belledi, M., Di Rienzo, A., Novelletto, A., Oppenheim, A., Nørby, S., Al-Zaheri, N., Santachiara-Benerecetti, S., Scozari, R., Torroni, A., and Bandelt, H. J. (2000). Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet*, 67(5):1251–1276.
- Richards, M., Macaulay, V., Torroni, A., and Bandelt, H.-J. (2002). In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet*, 71(5):1168–1174.
- Richards, M. B., Macaulay, V. A., Bandelt, H.-J., and Sykes, B. C. (1998). Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Annals of human genetics*, 62(3):241–260.
- Roewer, L. (2008). Populationsgenetik des Y-Chromosoms. *medizinische genetik*, 20(3):288–292.
- Roewer, L. (2009). Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol*, 5(2):77–84.
- Roewer, L., Krawczak, M., Willuweit, S., Nagy, M., Alves, C., Amorim, A., Anslinger, K., Augustin, C., Betz, A., Bosch, E., Cagliá, A., Carracedo, A., Corach, D., Dekairelle, A. F., Dobosz, T., Dupuy, B. M., Füredi, S., Gehrig, C., Gusmao, L., Henke, J., Henke, L., Hidding, M., Hohoff, C., Hoste, B., Jobling, M. A., Kärger, H. J., de Knijff, P., Lessig, R., Liebeherr, E., Lorente, M., Martínez-Jarreta, B., Nievas, P., Nowak, M., Parson, W., Pascali, V. L., Penacino, G., Ploski, R., Rolf, B., Sala, A., Schmidt, U., Schmitt, C., Schneider, P. M., Szibor, R., Teifel-Greding, J., and Kayser, M. (2001). Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci Int*, 118(2-3):106–113.
- Roewer, L., Nothnagel, M., Gusmao, L., Gomes, V., González, M., Corach, D., Sala, A., Alechine, E., Palha, T., Santos, N., Ribeiro-Dos-Santos, A., Geppert, M., Willuweit, S., Nagy, M., Zweynert, S., Baeta, M., Núñez, C., Martínez-Jarreta, B., González-Andrade, F., Fagundes de Carvalho, E., da Silva, D. A., Builes, J. J., Turbón, D., Lopez Parra, A. M., Arroyo-Pardo, E., Toscanini, U., Borjas, L., Barletta, C., Ewart, E., Santos, S., and Krawczak, M. (2013). Continent-wide decoupling of Y-chromosomal genetic variation from language and geography in native South Americans. *PLoS Genet*, 9(4):e1003460.

- Roffey, P. E., Eckhoff, C. I., and Kuhl, J. L. (2000). A rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications. *J Forensic Sci*, 45(5):1016–1019.
- Rogalla, U., Rychlicka, E., Derenko, M. V., Malyarchuk, B. A., and Grzybowski, T. (2015). Simple and cost-effective 14-loci SNP assay designed for differentiation of European, East Asian and African samples. *Forensic Sci Int Genet*, 14:42–49.
- Rohland, N. and Hofreiter, M. (2007a). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc*, 2(7):1756–1762.
- Rohland, N. and Hofreiter, M. (2007b). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques*, 42(3):343–352.
- Roostalu, U., Kutuev, I., Loogväli, E.-L., Metspalu, E., Tambets, K., Reidla, M., Khusnutdinova, E. K., Usanga, E., Kivisild, T., and Villems, R. (2007). Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Mol Biol Evol*, 24(2):436–448.
- Rootsi, S., Magri, C., Kivisild, T., Benuzzi, G., Help, H., Bermisheva, M., Kutuev, I., Barac, L., Pericic, M., Balanovsky, O., Pshenichnov, A., Dion, D., Grobei, M., Zhivotovsky, L. A., Battaglia, V., Achilli, A., Al-Zahery, N., Parik, J., King, R., Cinnio?lu, C., Khusnutdinova, E., Rudan, P., Balanovska, E., Scheffrahn, W., Simonescu, M., Brehm, A., Goncalves, R., Rosa, A., Moisan, J.-P., Chaventre, A., Ferak, V., Füredi, S., Oefner, P. J., Shen, P., Beckman, L., Mikerezi, I., Terzić, R., Primorac, D., Cambon-Thomsen, A., Krumina, A., Torroni, A., Underhill, P. A., Santachiara-Benerecetti, A. S., Villems, R., and Semino, O. (2004). Phylogeography of Y-chromosome haplogroup i reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am J Hum Genet*, 75(1):128–137.
- Rootsi, S., Zhivotovsky, L. A., Baldovič, M., Kayser, M., Kutuev, I. A., Khusainova, R., Bermisheva, M. A., Gubina, M., Fedorova, S. A., Ilumäe, A.-M., et al. (2007). A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *European Journal of Human Genetics*, 15(2):204–211.
- Rosser, Z. H., Zerjal, T., Hurles, M. E., Adojaan, M., Alavantic, D., Amorim, A., Amos, W., Armenteros, M., Arroyo, E., Barbujani, G., Beckman, G., Beckman, L., Bertranpetit, J., Bosch, E., Bradley, D. G., Brede, G., Cooper, G., Côrte-Real, H. B., de Knijff, P., Decorte, R., Dubrova, Y. E., Evgrafov, O., Gilissen, A., Glisic, S., Gölge, M., Hill, E. W., Jeziorowska, A., Kalaydjieva, L., Kayser, M., Kivisild, T., Kravchenko, S. A., Krumina, A., Kucinskas, V., Lavinha, J., Livshits, L. A., Malaspina, P., Maria, S., McElreavey, K., Meitinger, T. A., Mikelsaar, A. V., Mitchell, R. J., Nafa, K., Nicholson, J., Nørby, S., Pandya, A., Parik, J., Patsalis, P. C., Pereira, L., Peterlin, B., Pielberg, G., Prata, M. J., Previderé, C., Roewer, L., Rootsi, S., Rubinsztein, D. C., Saillard, J., Santos, F. R., Stefanescu, G., Sykes, B. C., Tolun, A., Villems, R., Tyler-Smith, C., and Jobling, M. A. (2000). Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am J Hum Genet*, 67(6):1526–1543.

- Rothe, J., Melisch, C., Powers, N., Geppert, M., Zander, J., Purps, J., Spors, B., and Nagy, M. (2015). Genetic research at a fivefold children's burial from medieval Berlin. *Forensic Science International: Genetics*, 15:90–97.
- Rudbeck, L., Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Hansen, A. J., Lynnerup, N., Christensen, T., and Dissing, J. (2005). mtDNA analysis of human remains from an early Danish Christian cemetery. *Am J Phys Anthropol*, 128(2):424–429.
- Salas, A., Bandelt, H.-J., Macaulay, V., and Richards, M. B. (2007). Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int*, 168(1):1–13.
- Salas, A., Richards, M., De la Fe, T., Lareu, M.-V., Sobrino, B., Sánchez-Diz, P., Macaulay, V., and Carracedo, A. (2002). The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet*, 71(5):1082–1111.
- Salas, A., Richards, M., Lareu, M.-V., Scozzari, R., Coppa, A., Torroni, A., Macaulay, V., and Carracedo, A. (2004). The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet*, 74(3):454–465.
- Sanchez, J. J. and Endicott, P. (2006). Developing multiplexed SNP assays with special reference to degraded DNA templates. *Nat Protoc*, 1(3):1370–1378.
- Sanchez, J. J., Phillips, C., Børsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., Harrison, C. D., Musgrave-Brown, E., Salas, A., Syndercombe-Court, D., Schneider, P. M., Carracedo, A., and Morling, N. (2006). A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*, 27(9):1713–1724.
- Sankararaman, S., Patterson, N., Li, H., Pääbo, S., and Reich, D. (2012). The date of interbreeding between Neandertals and modern humans. *PLoS Genet*, 8(10):e1002947.
- Scelza, M. F. Z., Teixeira, A. M., and Scelza, P. (2003). Decalcifying effect of EDTA-T, 10root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95(2):234–236.
- Scheffler, I. E. (2002). *MITOCHONDRIA*. John Wiley & Sons, Inc.
- Schiebler, Theodor H und Korf, H.-W. (2007). *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 10 edition.
- Schmidt, B. (1963). Neue völkerwanderungszeitliche Funde zwischen Unstrut und Ohre. *Jahresschrift für mitteldeutsche Vorgeschichte* 47, pages 347–369.
- Schneider, P. M. (2009). Expansion of the European standard set of DNA database loci—the current situation. *Profiles in DNA*, 12(1):6–7.
- Schultes, T., Hummel, S., and Herrmann, B. (2000). Ancient DNA-typing approaches for the determination of kinship in a disturbed collective burial site. *Anthropologischer Anzeiger*, pages 37–44.

- Schulz, H., von Rad, U., and Erlenkeuser, H. (1998). Correlation between Arabian Sea and Greenland climate oscillations of the past 110,000 years. *Nature*, 393(6680):54–57.
- Seidel, E. (2013). Morphognostische, morphometrische und molekulargenetische Untersuchungen an der freien oberen Extremität von historischem, bodengelagerten Knochenmaterial. Ein Beitrag zur Rekonstruktion der Bevölkerung von Görzig. Bachelorarbeit, Hochschule Mittweida - University of Applied Sciences, Durchgeführt am Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig.
- Seielstad, M. T., Minch, E., and Cavalli-Sforza, L. L. (1998). Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nat Genet*, 20(3):278–280.
- Sella, N. (2014). Der Beitrag der Wirbelsäule zu der Individualanalyse von Skelettfunden und der Rekonstruktion von Skelettpopulationen am Beispiel eines Gräberfeldes aus der Völkerwanderungszeit. Bachelorarbeit, Hochschule Mittweida - University of Applied Sciences, Durchgeführt am Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig.
- Shadrach, B., Commane, M., Hren, C., and Warshawsky, I. (2004). A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification. *J Mol Diagn*, 6(4):401–405.
- Sherry, S., Ward, M., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E., and Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 1.
- Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G. L., and Alexeyev, M. F. (2009). Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 37(8):2539–2548.
- Simoni, L., Calafell, F., Pettener, D., Bertranpetit, J., and Barbujani, G. (2000a). Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe. *The American Journal of Human Genetics*, 66(1):262–278.
- Simoni, L., Calafell, F., Pettener, D., Bertranpetit, J., and Barbujani, G. (2000b). Reconstruction of prehistory on the basis of genetic data. *Am J Hum Genet*, 66(3):1177–1179.
- Sjøvold, T. (1988). Geschlechtssdiagnose am Skelett. I Knussmann, R.(red) Anthropologie. Handbuch der Vergleichenden Biologie des Menschen. Band 1. Teil.
- Sobrino, B., Brión, M., and Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int*, 154(2-3):181–194.
- Stanojevich, V. (2012). The Role of a Forensic Anthropologist in a Death Investigation. *Journal of Forensic Research*, 2012.
- Steinlechner, M., Berger, B., Niederstätter, H., and Parson, W. (2002). Rare failures in the amelogenin sex test. *Int J Legal Med*, 116(2):117–120.

- Subramanian, S., Mishra, R. K., and Singh, L. (2003). Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol*, 4(2):R13.
- Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton, C. P., and Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*, 15(4):636–8, 640–1.
- Tambets, K., Rootsi, S., Kivisild, T., Help, H., Serk, P., Loogväli, E.-L., Tolk, H.-V., Reidla, M., Metspalu, E., Pliss, L., Balanovsky, O., Pshenichnov, A., Balanovska, E., Gubina, M., Zhadanov, S., Osipova, L., Damba, L., Voevoda, M., Kutuev, I., Bermisheva, M., Khusnutdinova, E., Gusar, V., Grechanina, E., Parik, J., Pennarun, E., Richard, C., Chaventre, A., Moisan, J.-P., Barác, L., Perić, M., Rudan, P., Terzić, R., Mikerezi, I., Krumina, A., Baumanis, V., Koziel, S., Rickards, O., De Stefano, G. F., Anagnou, N., Pappa, K. I., Michalodimitrakis, E., Ferák, V., Füredi, S., Komel, R., Beckman, L., and Villems, R. (2004). The western and eastern roots of the saami—the story of genetic outliers"told by mitochondrial DNA and Y chromosomes. *Am J Hum Genet*, 74(4):661–682.
- Taylor, D. and Buckleton, J. (2015). Do low template DNA profiles have useful quantitative data? *Forensic Sci Int Genet*, 16:13–16.
- Thangaraj, K., Reddy, A. G., and Singh, L. (2002). Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int J Legal Med*, 116(2):121–123.
- Thorisson, G. A. and Stein, L. D. (2003). The SNP Consortium website: past, present and future. *Nucleic Acids Res*, 31(1):124–127.
- Thorslund, T., Sunesen, M., Bohr, V. A., and Stevnsner, T. (2002). Repair of 8-oxoG is slower in endogenous nuclear genes than in mitochondrial DNA and is without strand bias. *DNA Repair (Amst)*, 1(4):261–273.
- Torroni, A., Achilli, A., Macaulay, V., Richards, M., and Bandelt, H.-J. (2006). Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet*, 22(6):339–345.
- Torroni, A., Bandelt, H.-J., D'urbano, L., Lahermo, P., Moral, P., Sellitto, D., Rengo, C., Forster, P., Savontaus, M.-L., Bonn -Tamir, B., et al. (1998). mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *The American Journal of Human Genetics*, 62(5):1137–1152.
- Torroni, A., Bandelt, H. J., Macaulay, V., Richards, M., Cruciani, F., Rengo, C., Martinez-Cabrera, V., Villems, R., Kivisild, T., Metspalu, E., Parik, J., Tolk, H. V., Tambets, K., Forster, P., Karger, B., Francalacci, P., Rudan, P., Janicijevic, B., Rickards, O., Savontaus, M. L., Huoponen, K., Laitinen, V., Koivumäki, S., Sykes, B., Hickey, E., Novelletto, A., Moral, P., Sellitto, D., Coppa, A., Al-Zaheri, N., Santachiara-Benerecetti, A. S., Semino, O., and Scozzari, R. (2001). A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am J Hum Genet*, 69(4):844–852.

- Torrioni, A., Lott, M. T., Cabell, M. F., Chen, Y. S., Lavergne, L., and Wallace, D. C. (1994a). mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet*, 55(4):760–776.
- Torrioni, A., Miller, J. A., Moore, L. G., Zamudio, S., Zhuang, J., Droma, T., and Wallace, D. C. (1994b). Mitochondrial DNA analysis in Tibet: implications for the origin of the Tibetan population and its adaptation to high altitude. *Am J Phys Anthropol*, 93(2):189–199.
- Turchi, C., Buscemi, L., Previderè, C., Grignani, P., Brandstätter, A., Achilli, A., Parson, W., Tagliabracci, A., and , G. G. (2008). Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing. *Int J Legal Med*, 122(3):199–204.
- Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Shen, P., Mirazón Lahr, M., Foley, R. A., Oefner, P. J., and Cavalli-Sforza, L. L. (2001). The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann Hum Genet*, 65(Pt 1):43–62.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. (2012). Primer3–new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40(15):e115.
- Vallone, P. M. and Butler, J. M. (2004). AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, 37(2):226–231.
- Van Geystelen, A., Decorte, R., and Larmuseau, M. H. D. (2013). Updating the Y-chromosomal phylogenetic tree for forensic applications based on whole genome SNPs. *Forensic Sci Int Genet*, 7(6):573–580.
- van Oven, M. and Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*, 30(2):E386–E394.
- van Oven, M., Ralf, A., and Kayser, M. (2011a). An efficient multiplex genotyping approach for detecting the major worldwide human Y-chromosome haplogroups. *Int J Legal Med*, 125(6):879–885.
- van Oven, M., Vermeulen, M., and Kayser, M. (2011b). Multiplex genotyping system for efficient inference of matrilineal genetic ancestry with continental resolution. *Investig Genet*, 2:6.
- Verhoff, M. and Kreutz, K. (2004). Forensische Osteologie. *Rechtsmedizin*, 14:417–430.
- Verhoff, M., Kreutz, K., Jopp, E., and Kettner, M. (2013). Forensische Anthropologie im 21. Jahrhundert. *Rechtsmedizin*, 23(2):79–84.
- Vertucci, F. J. and Anthony, R. L. (1986). A scanning electron microscopic investigation of accessory foramina in the furcation and pulp chamber floor of molar teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 62(3):319–326.

- Wagner, G. (2007). *Einführung in die Archäometrie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1 edition.
- Wallin, J. M., Holt, C. L., Lazaruk, K. D., Nguyen, T. H., and Walsh, P. S. (2002). Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping. *J Forensic Sci*, 47(1):52–65.
- Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., van Oven, M., Lao, O., and Kayser, M. (2011). IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3):170–180.
- Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-Kamysz, A., Branicki, W., and Kayser, M. (2013). The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet*, 7(1):98–115.
- Wang, D. Y., Chang, C.-W., Lagacé, R. E., Calandro, L. M., and Hennessy, L. K. (2012). Developmental validation of the AmpFlSTR® identifier® plus PCR amplification kit: an established multiplex assay with improved performance. *Journal of forensic sciences*, 57(2):453–465.
- Weedon, M. N., Lango, H., Lindgren, C. M., Wallace, C., Evans, D. M., Mangino, M., Freathy, R. M., Perry, J. R., Stevens, S., Hall, A. S., et al. (2008). Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nature genetics*, 40(5):575–583.
- Wei, W., Ayub, Q., Xue, Y., and Tyler-Smith, C. (2013). A comparison of Y-chromosomal lineage dating using either resequencing or Y-SNP plus Y-STR genotyping. *Forensic Sci Int Genet*, 7(6):568–572.
- Wiegand, P. and Kleiber, M. (2001). Less is more—length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int J Legal Med*, 114(4-5):285–287.
- Wilcox, A. W., Fisher, D. L., Mitchell, L., Wadhams, M., Holland, M. M., Sledzik, P. S., and Weedn, V. W. (1993). Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. *Journal of Forensic Science*, 38(1):60–68.
- Willuweit, S., Roewer, L., and , I. F. Y. C. U. G. (2007). Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Sci Int Genet*, 1(2):83–87.
- Wirth, R. (2002). *Dentalanthropologische Untersuchungen zur Abrasion an neolithischem Skelettmaterials des Mittelbe-Saale-Gebietes*. Dissertation, Universität Jena.
- Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C., and Saunders, S. R. (1998). Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol*, 105(4):539–543.
- You, F. M., Huo, N., Gu, Y. Q., Luo, M.-c., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G. R., Dvorak, J., and Anderson, O. D. (2008). BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC bioinformatics*, 9(1):253.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 6. November 2017

M.Sc. Anne-Marie Pflugbeil

Anhang A

Primersequenzen Y-SNPs

Auf den folgenden Seiten befinden sich die eingesetzten Primersequenzen sowohl für die mitochondriale als auch für die Y-Chromosomale SNP-Analyse. Die Tabelle A.1 umfasst die forward (Fwd) und reverse (Rev) Primersequenzen nach Wei et al. (2013); Kohl et al. (2009). Mit einem * markierten zehn Loci stammen aus Wei et al. (2013). Die Y-SNPs M269 und M230 wurden, aufgrund unzureichender Amplifikationsresultate in den beiden ursprünglichen Systemen, weiterhin in System 4 reproduziert.

Die in Tabelle A.2 gezeigten Sequenzen für die SBE-Reaktion repräsentieren ausschließlich den spezifischen Bereich, ohne den unspezifischen 5' Überhang. Die Y-SNPs M269 und M230 wurden auch hier innerhalb von System 4 reproduziert.

Tabelle A.1: Verwendete Primersequenzen für die Multiplex-PCR der Y-SNPs.

System	Y-SNP	Sequenz Fwd (5' - 3')	Länge	Sequenz Rev (5' - 3')	Länge	
1	M174	gcttctctgaataccttctggagt	24	tcttgcaaggaaaagtgtgc	20	
	M69*	tcaggaggctgtttacactc	20	ccccttagctctctgtttt	20	
	P25	tggaccatcacctgggtaaagt	22	ggcagtataaggtgtcacatcacat	26	
	M38	agatctgttgactactgttaccta	25	gagctggcacatctgtcataata	23	
	M123	gttgccttttgaaatgaataaatc	25	gaattgcatttctaggtattcagg	25	
	M35	agggcatggtccctttctat	20	tccatgcagacttccggagt	20	
	M216	ccaatggaaatttataaccaca	23	tgacactgctagttatgtatactgttg	28	
	M17	cctggtcataaactggaaatc	22	agctgaccacaaactgatgtaga	23	
	M173	tttcttaacaattcaaggcatttag	26	ctgaaaaacaaactggcttatca	25	
	M96	tgccctctcacagagcactt	20	ccaccactttgtgtctttg	20	
	P224*	tcagaaatgagtgtgacatct	21	aggtgacgaggtgtaaatgc	20	
	M75	cttgtcaaaagccaaaacagatttc	25	ttgaacagaggcatttgtgaat	22	
	SRY10831b	tcaccagtccttagcaaccatta	24	ccacataggtgaaccttgaatg	24	
	M81	catctcttaacaaaagagtaaatgttgc	31	cattgtgtacatggcctataatattcagt	30	
	M9	aggaccctgaatacagaactg	22	aaatattcaacatttcacaaaggaa	26	
M33	tgaccgtcataggctgagaca	21	ttgaagccccaagagagac	20		
2	M11	tcctctctcctgtattcta	21	ctgaatccccagtaagtcc	20	
	M170	cagctctattaagttatgtttcatattctgtg	34	gtcctcattttacagtgtgacacaaac	26	
	M201	tcagatctaataatccagttatcaactgag	29	gttcaaatcccatatccagca	21	
	M304	caaagaaaagcaggagagttgttaa	25	aaacgtcttataccaaaatattaccag	27	
	M207	ggggcaaatgtaagtcaagc	20	tcaactcaacctctgttgtaa	22	
	M128	tttcaagacttctgtagatttgggt	27	tacacagaggctactatataaccattatct	33	
	P31	aacagtaggtggtatttgggttaca	25	gaccgatctgtgctcatt	19	
	M175	gatttaaactctctgaatcaggcacat	27	ttctactgatacctttgttctgttcattc	30	
	M119	gatgtagaaaaatgttatgggtattcc	28	gaaatgccaaaggtaaatgactcac	24	
	P177*	caccatgccaggccaaaa	18	gggtctacttctgaggaatca	21	
	M122	gttgccttttgaaatgaataaatc	25	gaatttgcatttctaggtattcagg	25	
	M343*	gccaccctagccttttaaat	20	acctttgtcctctgtctctt	20	
	M124*	acaccagaatctaacaagca	21	caaagttgaggtgtgcacaaa	20	
	M168	gtggagtatgttggaggtga	22	cctctatcagaccatggtaatctca	25	
	P225*	aatgctgctgtcaatgttgg	20	aatagaccgtaaaagagcgt	20	
	M269*	gaaggggaatgatcagggtt	20	acttctttgtgtccttctg	21	
	3	M70	catgtaaaagttatcatagcc	22	ggactatagggtattctgttgg	22
M2		acggaaggagttctaaaattcagg	24	aaaatacagctccccctttatctt	24	
M145		atagcggcatacttgcctcc	20	cctttttgatcatgttctctg	22	
M214		actactggttacttctgttcg	21	gtggtgagccatggaaatgc	20	
M231		atacctaaaaaacacatttactg	24	acagaaattacaggtatgaattc	23	
M242		tagaaagttgtgcaaaaagggtg	23	ggctttcagcataatacccttac	22	
P125*		aagggtcaactacatgcaca	20	ctcagtgagtggaaatgtga	20	
P143		gateccaactcggtttttgg	21	gcaaatttctgtgtagccatg	22	
M42		gataactgtgtcagtgcaac	21	ttagcaagttaagtcaccagc	21	
M181		tgtacatgatctgctagcaaaag	22	actttactattcaagctactacc	23	
M91		tacaatattttacaccgttaagc	24	tgccctccaataaaaatctac	22	
M207		tcagaagtatccctgaagaag	21	ttaggtcacttcaaccttctgtt	23	
M230		catggccatacttaactataag	23	attattagtatgtaaatcttctattgc	26	
M215*		acttctgctgcatgaagcaaac	22	ggaacaactcgcgagcaata	20	
4		Tat	tatatggactctgagtgtgactctgtga	28	ggtgccgtaaaagtgtgaaataatc	25
		M217	tctgtttcgagatcattctaattactg	27	ctgctgtggctttcatcaaaata	23
		P2	agccatcttttcttaagagaggt	24	gcttgagtctcttaggttttggga	24
	M32*	tcataggctgagacaagatc	20	tcttacaatgggagctactc	21	
	M45	gagagaggatatcaaaaattggcagt	26	tgacagtggcaccaaaagggtc	20	
	M213	gcattgtagtagaagtagacc	21	gtaatatatggtaaaaattcagaac	26	

Tabelle A.2: Verwendete Primersequenzen für die SBE-Reaktion der Y-SNPs.

System	Y-SNP	Primersequenz (5' - 3')	Orientierung	Länge	
1	M174	taccttctggagtgcc	Fwd	17	
	M69	gaggctgtttacactcctgaaa	Fwd	22	
	P25	tgctgaaacctgcctg	Fwd	34	
	M38	cagtacttattatgaaaaccaact	Fwd	38	
	M123	atttctaggtattcaggcgatg	Fwd	42	
	M35	cccaattttccttgggacactg	Fwd	46	
	M216	gctagttatgtatacctgttgaat	Rev	50	
	M17	ccaaaattcacttaaaaaaccc	Rev	54	
	M173	tacaattcaaggcatttagaac	Fwd	58	
	M96	ggaaaacaggtctctcataata	Rev	62	
	P224	agtggtttcagtcagcaggg	Rev	66	
	M75	aaagacaattatcaaacacatcc	Fwd	70	
	SRY10831b	ttgtatctgacttttcacacagt	Rev	74	
	M81	cttggtttgtgtgagtatactctatgac	Rev	82	
	M9	catgtctaaattaaagaaaaataaagag	Rev	86	
	M33	cagttacaaaagtataatatgtctgagat	Rev	94	
2	M11	attatgcaagttctaaacctttc	Rev	25	
	M170	ctattttattacttaaaaatcattgttc	Fwd	30	
	M201	taataatccagtatcaactgagg	Fwd	34	
	M304	tgttcaatttgaaagtaactgtga	Fwd	38	
	M207	caaatgtaagtcaagcaagaaattta	Fwd	42	
	M128	ttacctaatgtgaatcttattttatct	-	46	
	P31	tacataaataaggtttttttgggtg	Fwd	50	
	M175	cacatgccttctcacttctc	Fwd	54	
	M119	tattccaattcagcatacaggc	Fwd	58	
	P177	tgaaaaaataactcagattcc	Fwd	62	
	M122	tcagattttccctgagagc	Fwd	66	
	M343	ccccacatatctccaggtgt	Rev	70	
	M124	tatggggggaacaggggaagt	Rev	74	
	M168	ctattgttttaattcttcagctagc	Rev	78	
	P225	taataagcaacatgaagctacg	Fwd	82	
	M269	ggaatgatcagggtttggtaat	Fwd	86	
	3	M70	ggactcatgtctccatgaga	Fwd	20
		M2	ctttatctctccagatctca	Rev	26
M145		tagacaccagaaagaaaggc	Rev	30	
M214		gagacactgtctgaaaacaac	Rev	35	
M231		ttgacgatctttcccccaatt	Rev	40	
M242		acacgttaagaccaatgcaa	Rev	45	
P125		gagtggaaatgtgaatttat	Rev	50	
P143		aacacagtgttcagctcttca	Rev	55	
M42		gctctcttttcattatgtagt	Rev	60	
M181		gacaacttgatcatcttttga	Fwd	65	
M91		atactacagtagtgaactgatt	Rev	75	
M207		caaaaggtattgttattctctt	Rev	80	
M230		aatacgtaatgatgaatattaaaa	Fwd	85	
M215		acttgctgcattaagacaaaactg	Fwd	90	
4		Tat	gctctgaaatattaaattaaacaac	Rev	26
	M217	ttatgtatcttctctgaagagtt	Rev	30	
	P2	gtgcccttaggaggagaa	Fwd	90	
	M32	gatctgttcactttatctca	Fwd	78	
	M45	ctcagaaggagcttttgc	Rev	22	
	M213	agaacttaaacatctcgttac	Rev	70	

Anhang B

Primersequenzen mtSNPs

In Tabelle B.1 sind *forward* (Fwd) und *reverse* (Rev) Primersequenzen für die Amplifikation relevanter mtSNPs entsprechend der Literaturstelle Paneto et al. (2011), dargestellt. Primer (Fwd, Rev), die Sequenzbereiche, in denen mehrere Loci lokalisiert sind, simultan amplifizieren, sind mit einer (+)-Listung aufgeführt. Die angegebene Notation entspricht den Empfehlungen der ISFG und impliziert die sequenzspezifische Position des mtSNPs. Vor dieser Angabe folgt vorangestellt die ancestrale Variante und nachgestellt die Mutation (Parson et al., 2014).

Genutzte Primersequenzen für die SNaPshot-PCR (Paneto et al., 2011) befinden sich in Tabelle B.2. Die Notation berücksichtigt den Polymorphismus analog rCRS. Multiallelische Varianten innerhalb der Sequenzen sind mit dem Buchstaben „R“ (A und G) und „Y“ (C und T) gekennzeichnet (Parson et al., 2014).

Tabelle B.1: Verwendete Primersequenzen für die Multiplex-PCR der mtSNPs.

mtSNP		Primersequenz Fwd (5' - 3')	Länge	Primersequenz Rev (5' - 3')	Länge
G709A	+	AAGATTACACATGCAAGCATCC	22	CTAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG	22
G769A					
G1719A	+	CTTGACCGCTCTGAGCTAAA	20	GCAGAAGGTATAGGGGTTAGTCC	23
A1811G	+				
A1736G					
T2416C		CAGCCCAATATCTACAATCAACC	23	GTAAGATTTGCCGAGTTCCT	20
A2706G	+	ACTTTTAACCCAGTGAAATTGACCT	24	GCCCAACCGAAATTTTAA	19
C2772T					
G3010A		ACCTCGATGTTGGATCAGGACA	22	CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	26
G3915A		TAGCAGAGACCAACCGAACC	20	GGCGTATTCGATGTTGAAGC	20
G4580A		CGCTAAGCTCGCACTGATTT	20	TTTTGGTTAGAAGTGAATAAAAAGC	25
C4883T		CCTTTCACCTCTGAGTCCCA	20	GCTTACGTYTAGTGAGGGAG	20
T5004C		TCCATCATAGCAGGCAGTTG	20	TGGTTATGTTAGGGTTGTACGG	22
T5442C		AATCTACTCCACCTCAATCAC	21	GTAGGAGTAGCGTGGTRAGG	20
T6365C	+	TGGAGCCTCCGTAGACCTAA	20	TGGCAGGGGGTTTTATATTG	20
T6392C					
T6776C		TGGCTTCCTAGGGTTTATCG	20	CGGAGGTGAAATATGCTCGT	20
C7028T	+	AGCAAATCATCACTAGACATCG	23	GATGGCAAATACAGCTCCTATTGA	24
A7055G					
C7256T		TCTTCCCACAACACTTTCTC	20	GAGAAATGAATGAGCCTACAG	21
G8251A	+	CATGCCCATCGTCCTAGAAT	20	TGCTAAGTTAGCTTTACAGTGG	22
8281del9bp					
T8404C		CAGTGAAATGCCCAACTAAA	21	TTTGGTGAGGGAGGTAGGTG	20
G8697A		CCAACAATGACTAATCAAATAACC	25	GTATAAGAGATCAGGTTTCGTCCTTT	25
G9055A	+	CGCCTAACCGCTAACATTAAT	21	TGATAAGTGTAGAGGGAAGGTTAATG	26
A9066G					
C10400T		GCCCTAAGTCTGGCCTATGA	20	TGAGTCGAAATCATTTCGTTTTG	22
T10873C		AATCAACACAACCACCCACA	20	GGGGAACAGCTAAATAGGTTG	21
A11251G		CGCAGGCACATACTTCCTATTC	22	AGTGAGCCTAGGGTGTGTGAG	22
A11812G		TCCTCTCTCAAGACTTCAAAC	23	GGCTTGCTAGAAGTCATCAAAAA	23
G12372A		AAAAATTTTGGTGCAACTCCA	21	AACGAGGGTGGTAAGGATGG	20
C12705T		CCCAAACATTAATCAGTTCTTCAA	24	GAACAGTTGGAATAGGTTGTTAGC	24
C12858T		ATGATACGCCGAGCAGA	18	TGTGGGTCTCATGAGTTGGA	20
A13263G		CCCACTAATCCAACTCTAACAC	23	GCCGATGTAACTATTATGAGTCC	24
G13708A		CGCTTCCCCACCCTTACTA	19	GCGGGGAAATGTTGTTAG	19
T14470A		CCCCATGCCTCAGGATACTC	20	TTTAGGGGGAATGATGGTTG	20
C14766T	+	CAACTACAAGAACACCAATG	20	ATCATGCGGAGATGTTGGAT	20
T14798C					
A15607G		TCTCCGATCCGTCCCTAAC	19	GATAGTAATAGGGCAAGGAC	20
C15904T		TACTCAAATGGGCCTGTCCT	20	TGATTTGTCCTTGAAAAAGGT	22
T16362C		TAGCACATTACAGTCAAATCCC	22	GGATATTGATTTACCGGAGGA	21
T16519C		CCATAACACTTGGGGGTAGC	20	TTATTTAAGGGGAACGTGTGG	21

Tabelle B.2: Verwendete Primersequenzen für die SBE-Reaktion der mtsSNPs.

mtSNP	Primersequenz (5' - 3')	[F/R]	Länge
G709A	TTTAGAGGTGAACACTCACTGGAA	R	23
G1719A	AACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACCACCTTACTACCAGACAAACCTTA	F	84
A1811G	AACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAGCAAGGAAAAGATGAAAAATATA	F	64
A2706G	GCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAGGCTCTCTGGCTTGTCTGTGT	R	44
C2772T	GTCCTGACAAAGGTTTGGTAGTTAGGACCTGT	R	31
G3010A	CGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACTCGATGTTGGATCAGGACATCCC	F	80
G3915A	GTAATTCGATGTTGAAAGCTGAGACTAGTTCGGACTC	R	36
G4580A	ACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAATACCTGAGTAGGGCTGAAAATAAAGAT	F	72
T5004C	CGTGAAAAGTCTGACAAACCAACCCAGCTAGCAAAATC	F	38
T6365C	ACGTTCGTGAAAAGTCTGACAAAATCTCTCCACACCTAGCAGG	F	42
T6392C	GTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACCTCTATCTTAGGGGCCATCAA	F	47
T6776C	TGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAGTCTAGCGTCTAATTCCTACTGTAAATAT	R	51
C7028T	ACTACACGCACAGTACTAGTGTAGG	F	27
G8251A	CCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAATTCCTCCCTAAAATCTTTGAAAATAGG	F	47
T8404C	ACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACTACCTGATGGCCCAACCATAT	F	61
G8697A	GTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACGCTCTTAGTGTGTGTGATGGTAT	F	51
G9055A	TAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACTCATGCACCTAATTTGGAAGC	R	50
A9066G	GACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAATAGGGAAGGTTAATGGTTGATAT	R	70
C10400T	ACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAATAGTACAAAAGGATTAGACTGARC	F	65
T10873C	GACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACGCTAATTTAGCATCATCCC	F	69
A11251G	TGAAAAGTCTGACAACTCTCTCAAGGACTTCAAACTCT	F	60
C12705T	CGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGATAAACCCTAACCCCT	F	82
G12372A	CAAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAGTAACTAGATAGTATGGTAAATAGGAA	R	73
C12858T	AAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAGCATTCAAGCAATCCTATA	F	55
G13708A	GACTAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAATAAACCCCAATTAACCGCCTG	F	56
T14470A	TCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGATAAACCCTAACCCCT	R	81
C14766T	GAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAATTTAATTTAGGGGGAAATGATGGTTGTTCTTTGG	R	81
T14798C	CGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCAATGACCCCAATACGCCAAA	F	75
A15607G	AGTCTGACAACTCCGATCCGTCCTAACAA	F	83
C15904T	ACGTTCGTGAAAAGTCTGACAAACCGGTTTACAAAGACTGGTGTATTA	F	30
T16519C	CGTGAAAAGTCTGACAAATGTGGGCTAATTTAGGCTTTATG	R	44
G769A	CGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAAGCGGTTTTGAGCTGCAATG	R	38
A1736G	CAATTTCAATTTCTATCGCTAATCTTAT	R	30
T2416C	TGGCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACCAACCAAGTCAATTAACCC	R	78
C4883T	GTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACAAAACCTAGCCTCC	F	87
T5442C	TAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTAGCCTCC	F	35
A7055G	CTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACTAGTGGCAATATACAGC	F	52
C7256T	CAAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAGGATGCAATACACCAATGAAA	R	57
A13263G	GTCCGTGAAAAGTCTGACAAAGCCTCTCCACTTCAAGTCA	F	64
T16362C	CCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAATTTACAGTCAAATCCCTTCTYG	F	38
8281del9bp	CTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACCTATARCACCCCTCTA	F	84

MEMENTO MORI