New Evidence of Neandertal Man in Northern Germany: A Fragment of an *Os parietale* from Late Pleistocene Sediments at Warendorf-Neuwarendorf

Michael Scholz, Alfred Czarnetzki and Carsten M. Pusch

Abstract

At Warendorf-Neuwarendorf (North-Rhine Westfalia, Germany) the fossil fragment of a right *Os parietale* was recovered from the so called „Tiefentsandung". The layer is stratigraphically set into the early or high glaciation phase of the last glaciation (Weichsel/Würm) in view of the faun remains from the bone gravels belonging to it. These are in accordance with an absolute dating of about 70-30 ky BP. The fragment is within its preserved part completely identical with the same part of the naming calvaria of the Neandertal from 1856. The course of the *Impressiones arteriosae* at the *Tabula interna* is in accordance with an archaic pattern which cannot be observed with *Homo sapiens sapiens*. After weighing all available morphologic criteria and due to the ^{14}C-dating of a bone sample out of the sediment layer 1 m above the skull fragment (>31 ky BP) this *Os parietale* clearly belongs to a late representative of the species *Homo sapiens neanderthalensis*. Due to the fact that the Neandertals have to be regarded as a secondary line of the *H.s.s.* these finds must correctly be classified in the category of a species *Homo neanderthalensis* again in the future.

Zusammenfassung

In Warendorf-Neuwarendorf (Nordrhein-Westfalen/Germany) wurde aus der sogenannten „Tiefentsandung" das fossile Fragment eines rechten *Os parietale* geborgen. Die Fundschichten werden aufgrund der Faunenreste aus den zugehörigen "Knochenkiesen" stratigraphisch in das Hochglazial der letzten Vereisung des Pleistozäns (Weichsel/Würm) eingeordnet. Diese entsprechen einer absoluten Zeitstellung von etwa 70 - 30 ky BP. Das Fragment des *Os parietale* ist in seinem erhaltenen Teil vollständig identisch mit dem gleichen Teil aus der Kalotte aus dem Neandertal von 1856. Der Verlauf der *Impressiones arteriosae* an der *Tabula interna* entspricht einem archaischen Muster, welches bei *H.s.s.* nicht mehr zu beobachten ist. Nach Abwägung aller verfügbaren morphologischen Kriterien und aufgrund der ^{14}C-Datierung einer Knochenprobe aus der Sedimentschicht 1 m über der Fundschicht des *Os parietale* (>31 ky BP) gehört dieses Schädelfragment eindeutig zu einem späten Vertreter der Species *Homo sapiens neanderthalensis*. Aufgrund der Erkenntnis, dass es sich bei den Neandertalern um eine Nebenlinie des *H.s.s.* handelt, sollten diese Funde korrekter Weise künftig wieder in den Rang einer Species *Homo neanderthalensis* eingestuft werden.

Introduction

The discovery of fossil remains of human ancestors mainly by coincident is always a very exciting event. With each new find one adds a further piece to the phylogenetic puzzle around human evolution, existing theories are consolidated, questioned or dismissed. Especially the question on the origin of the anatomically modern man has been moved into the centre of scientific discussion within the recent past (Stringer 1984, Ward/Stringer 1997, Wolpoff 1992). During the latest interglacial period (≥ 130 ky BP) the Neandertal man represented a typical

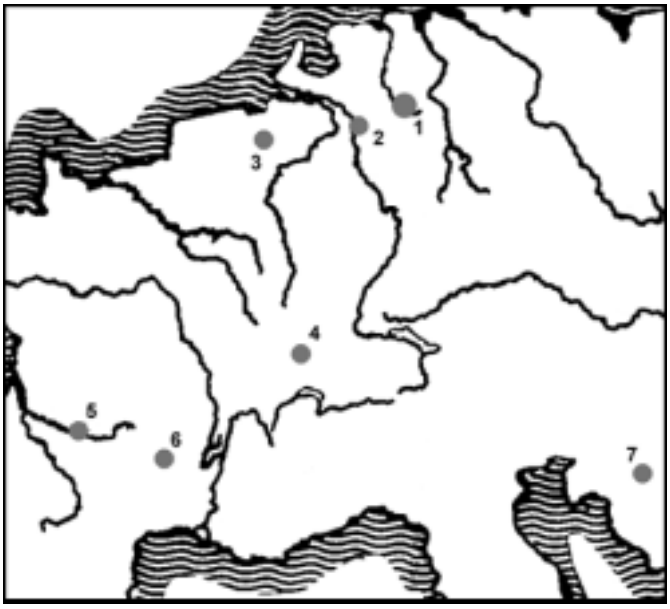


Fig. 1: Map showing the location of Neuwarendorf in comparison to some important finds of the classic Neandertal man in Central Europe.
1 = Neuwarendorf (D), 2 = Neandertal (D), 3) Spy (B), 4 = St. Brais (CH), 5 = Le Moustier (F), 6 = La Chapelle (F), 7 = Krapina (CRO).

middle Palaeolithic hominid form in Europe and the Middle East. Besides making and using specific flake tools out of flintstone he was also a skilled and successful hunter of the large mammals of the ice age, such as the woolly rhinoceros and the woolly mammoth. The oldest find complex so far of this hominide (Pre-neandertal man) are the skeletal remains from Weimar-Ehringsdorf (D) (Pa/Th-dating of the Travertin layers to about 60 - 120 ky BP; Vlcek 1993), and the skull calotte of Ochtendung (D), which is TL-dated to about 160 ky BP (personal comment v. Berg 1997); one of the youngest fossils (late or classic Neandertal man) were found in Zafarraya (E), ^{14}C-dated to about 30 ky BP (Hublin et al. 1995) (Fig. 1).

The fossil skull fragment of Warendorf-Neuwarendorf

For the examination a right *Os parietale*, partially preserved is available (Fig. 2a-c) which was found in autumn 1996 in the late pleistocene sands of Warendorf-Neuwarendorf (Czarnetzki/Trellisó 1999). The *pars inferior* is only preserved a few millimeters (17.9 mm) inferior of the *Linea temporalis* which causes the lack of the *Sutura (S.) squamosa*. The bow size of the skull fragment measured from the *Lambda* to the *Pars S. coronalis*, is 147.8 mm. The bone thickness with normally developed diploe is within a range of 9.6 mm and 5.4 mm. The destruction within the occipital area can very probably be attributed to the salvage procedure. Due to this defect the whole length of the *S. lambdoidea* cannot be given but only the length of the fractured edge (68.8 mm). Further information is not possible since the course of the *S. lambdoidea* can be very variable. This applies especially when considering the development of the *Ossicula lambdoidea* (Czarnetzki in press), an ontogenetic phenomenon which can also be observed with fossil representatives of the species *Homo*.

Fig. 2a: External view of the *Os parietale* from Neuwarendorf.

Fig. 2b: Internal view with *Impressiones arteriosae*.

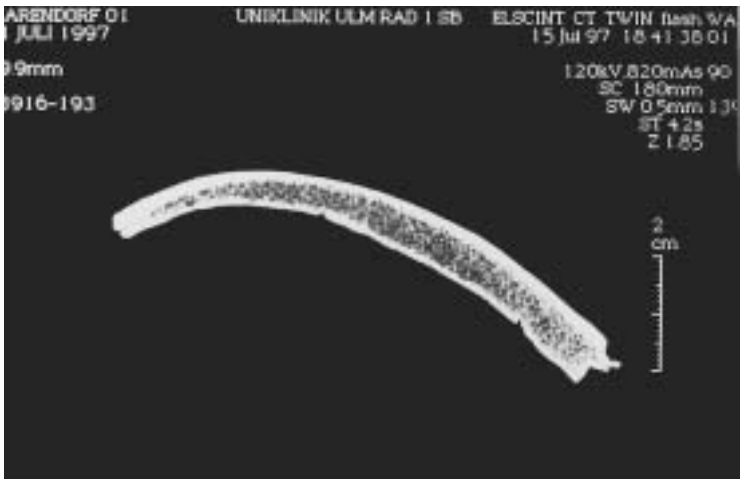


Fig. 2c: CT-picture of a cut, running from medial to lateral in the range of the minimum distance to the *L. temporalis*.

Results and Discussion

For a systematic determination and the comparison with other similar finds the first priority was to achieve a morphologic descriptive comparison. Here, the very weak development of the *Linea temporalis* stands out (Fig. 2a). The *S. coronalis* shows the typical hominoid link in its small preserved part. The overlapping region of the *Os parietale* with the *Os frontale* cannot be reconstructed anymore since the suture at the *Tabula interna* is obliterated (Fig. 2b). The morphology of this fragment is characterized above all by the continuous curve laterally and distally over the *Linea temporalis* and above. Macroscopic observations enlarged by 100 times under the magnifying glass show the definite indication that a deformation post mortem with its typical hair line cracks can be excluded. This is also confirmed by the CT- picture (Elskint™, Twin-Spiraltomograph) (Fig. 2c). While the surface around the origin of the *Musculus temporalis* is very smooth the other areas of the *Tabula externa* are erupted by fine pores (Fig. 2a). This vascularisation is possibly to be interpreted as a follow-up to a slight Osteomyelitis which could have occured due to an injury of the skin of the head with a following infection. Looking at the *Tabula interna* (Fig. 2b) more closely, one must notice above all the impressions of various *Rami* of the *Arteria meningea media* regarding the fragments systematic categorizing (Saban 1986). In the distal area already the *Ramus anterior* of the *Arteria meningea media* has a distance of 17.9 mm from the *S. coronalis*. From there it turns further occipital with its stronger branch. The *Ramus posterior* of this artery reaches a similar size as the *Ramus anterior*. In addition further *Rami* split off it which are clearly pointing anterior. This way the *Ramus posterior* supplies a bigger part of the surface of the *Lobus parietalis* than the *Ramus anterior*.

To exclude pathologic processes which could make the systematic judging of the skull fragment more difficult caused by a possible change of the skull morphology, an additional x-ray (Kodak) was prepared (data not shown). The computer data of the CT-examination (Fig. 2c) were used also to produce a stereo lithographic copy of the find. A bone sample from the occipital area was taken for the examination of the preserved fDNA (fossil DNA). After successful extraction of the fDNA (Scholz/Pusch 1997) continuing genetic analyses for phylogenetically categorizing of the find are now under preparation, and initial results appear to be promising (Scholz et al. 1999a-d). The ^{14}C-dating showed, as mentioned above, an age for the skull fragment of > 31.000 BP. The assumed individual age can be determined by regarding the status of closure of the sections of the skull sutures (Perizonius 1984). While the preserved part of the *S. coronalis* is internally completely obliterated, as already stated earlier, one can observe the opposite for the *S. sagittalis*. Of the 85.8 mm which are preserved 56.5 mm are externally obliterated but not internally. The status of the obliteration is in accordance with that of an early adult (20-30 years) individual. A morphologic sex determination was not possible.

In a direct comparison it becomes obvious that there is a complete identity of the curve and the dimensions within the same region of the calvaria of the Neandertal find and the one from Neuwarendorf, in contrast to *Homo sapiens sapiens* (Fig. 3). The identical morphology to the type specimen of the Neandertal as well as the deviation to the other finds from the range of the late european *Homo erectus* and the archaic *Homo sapiens* added into the analysis (data not shown), demand morphologically seen the clear categorizing of the find from Neuwarendorf to the generally still recognized subspecies *Homo sapiens neanderthalensis*.

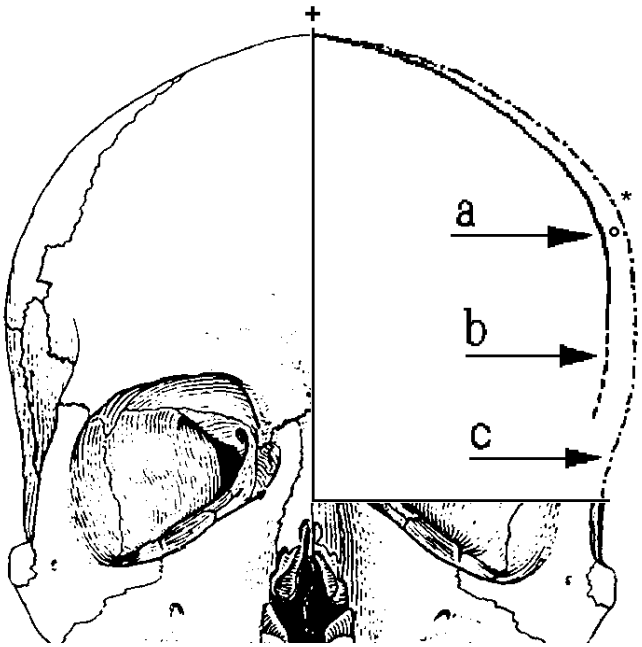


Fig. 3: Outline comparison of the CT-scannings of the skulls from Neuwarendorf, Neandertal and anatomically modern man. The CT pictures from the original calvaria from Neandertal and from the the *Os parietale* from Neuwarendorf were compared with the lateral skull outline of a modern human.

Neuwarendorf (*H. neand.*); b) Neandertal (*H. neand.*); c) recent European (*H.s.s.*); o = lateral vertex of a/b, * = lateral vertex of c.

Regarding the morphologic deviation between *Homo sapiens* and the Neandertals on one side as well as the *H.s.s.* anticipated morphology e.g. of the Steinheim skull on the other side the Neandertal man cannot be - in view of the conformity to evolutionary biological laws (Law of irreversibility) - a direct ancestor of the modern man (Czarnetzki 1987). This fact has lately been confirmed on the part of molecular genetics (Krings et al. 1997, 1999). According to the international rules of nomenclature can and must the Neandertal man again receive the systematic description Homo neanderthalensis (King 1864) and thus take again the range of a species within systematics.

Literature

Czarnetzki A., Trellisó C.L. 1999
Le Fragment d'un Os pariétal du Neanderthalien Classique de Warendorf-Neuwarendorf. L'Anthropologie 103(2), p. 237-248.

Czarnetzki A. in press
Epigenetic variants of the human skeleton. Yearbook of Physical Anthropology.

Czarnetzki A. 1987
Homo erectus - Neandertaler - Homo sapiens. Die Entwicklung aus evolutionsgenetischer Sicht. XIème Congrès de l'Union International des Sciences Préhistoriques et Protohistoriques. Mayence, 31.08.1987-05.09.1987.

Hublin J.J., Ruiz C.B., Lara P.M., Fontugne M., Reyss J.-L. 1995
The Mousterian site of Zafarraya (Andalucia, Spain): dating and implications on the palaeolithic peopling processes of Western Europe. C.R. Acad. Sci. Paris, 321, série IIa, p. 931-937.

King W. 1864
The rupted fossil man of the Neanderthal. Quart. J. Science 1, p. 273-338.

Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S. 1997
Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. Cell 90, p. 19-30.

Krings M., Geisert H., Schmitz R.W., Krainitzki H., Pääbo S. 1999
DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the neandertal type specimen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, p. 5581-5585.

Perizonius W.R.K. 1984
Closing and Non-closing Sutures in 256 Crania of Known Age and Sex from Amsterdam (A.D. 1883-1909). J. Hum. Evol. 13, p. 201-216.

Saban R. 1986
Veines meningées et hominisation. Fossil man - new facts, new ideas. Anthropos (Brno) 23, p. 15-33.

Scholz M., Pusch C. 1997
An efficient isolation method for high-quality DNA from ancient bones. Trends Genet. 13, p. 249. Technical Tips Online, TTO. (http://www.biomednet.com/db/tto) T01045.

Scholz M., Trellisó C.L., Pusch C.M. 1999a
Application modifiée de l'Analyse Dot Blot pour la Détermination de l'Os pariétal fossile de Warendorf-Neuwarendorf. L'Anthropologie 103(2), p. 307-311.

Scholz M., Bachmann L., Nicholson G.J., Bachmann J., Hengst S., Giddings I., Rüschoff-Thale B., Klostermann J., Protsch v. Zieten R.R., Czarnetzki A., Pusch C.M. 1999b
Fossil-DNA based classification of the most northern Neanderthal man. International workshop at the Neanderthal museum: Central and Eastern Europe from 50,000-30,000 BP. Mettmann, 18.03.1999-21.03.1999.

Scholz M., Bachmann L., Rüschoff-Thale B., Czarnetzki A., Pusch C.M. 1999c
Fossil-DNA based taxonomic determination of both *Homo sapiens* and *Homo neanderthalensis.* Krapina Centennial 1899-1999, International Conference „The Krapina Neandertals and human evolution in Central Europe". Zagreb-Krapina, 23.08.1999-26.08.1999.

Scholz M., Bachmann L., Pusch C.M. 1999d
Genomic differentiation of Neandertals and anatomically modern man allow a fossil-DNA based classification of hominid bones. Gordon Research Conference on Molecular Evolution. Hayama/Japan, 24.10.1999-29.10.1999.

Stringer C., Hublin J.J., Vandermeersch B. 1984
The origin of anatomically modern humans in Western Europe. In: Smith/Spencer (eds.), The origins of modern humans. A world survey of the fossil evidence, p. 51-135.

Vlcek E. 1993
Fossile Menschenfunde von Weimar-Ehringsdorf. Weimarer Monographien zur Ur- und Frühgeschichte 30. Theiss. Stuttgart.

v. Berg A. 1997
Ein Hominidenrest aus dem Wannenvulkan bei Ochtendung, Kreis Mayen-Koblenz. Archäologisches Korrespondenzblatt 27(4), p. 531-538.

Ward R., Stringer C. 1997
A molecular handle on the Neanderthals. Nature 388, p. 225-226.

Wolpoff M.H. 1992
Theories of modern human origins. In: Bräuer/Smith (eds.), Continuity or Replacement. Controversies in Homo sapiens Evolution. p. 25-63. Balkema. Rotterdam.

Acknowledgment

We are grateful to Mrs. Rüschoff-Thale M.A. and to the Westfalian Museum of Archaeology, the Office for the Preservation of Soil, for the providing of the find for taxonomic determination. Further to Dr. Claus P. Jakob for the high-quality drawings, Dr. Ian Giddings, Elke Lathan and Antje Kähler for their help with the english manuscript.

Anschriften

Michael Scholz
Osteologic Collection
University of Tuebingen
Wilhelmstrasse 27
D - 72074 Tuebingen

und

Institute of Proto- and Prehistory
Dpt. of Archaeobiology
University of Tuebingen
Eugenstrasse 40
D - 72072 Tuebingen
e-mail: michael.Scholz@uni-tuebingen.de

Alfred Czarnetzki
Osteologic Collection
University of Tuebingen
Wilhelmstrasse 27
D - 72074 Tuebingen

Carsten M. Pusch
Laboratory of Molecular Genetics
University of Tuebingen
Auf der Morgenstelle 15
D - 72076 Tuebingen

Eingang: 20.03.00

Impressum

Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie
Bulletin de la Société Suisse d'Anthropologie
herausgegeben von der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie (SGA/SSA)
mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften (SANW)

Redaktion:
Susi Ulrich-Bochsler, Bern

Korreferentin (textes français):
Isabelle Gemmerich, Brugg

Layout:
Andreas Cueni, Aesch

Bezugsort:
Redaktion: S. Ulrich-Bochsler, Historische Anthropologie, Medizinhistorisches Institut der Universität Bern, Fabrikstrasse 29d, CH - 3012 Bern
Telefon 031/631 84 92. Fax 031/631 37 82. E-mail susi.ulrich-bochsler@mhi.unibe.ch.

Herstellung: Atelier d'Impression de l'Université de Genève
Couverture: Montage Isabelle Gemmerich d'après un dessin original de Lucrezia Bieler-Beerli (Zürich) pour l'exposition du Musée d'Anthropologie de l'Université de Zürich

Erscheinungsweise: Vom Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie erscheinen in der Regel zwei Hefte pro Jahr (Frühjahr, Herbst), die zusammen einen Band bilden.

ISSN 1420 - 4835

Bull. Soc. Suisse d'Anthrop. 6(2), 2000, 9-21.

Neolithische Trepanationen als Beispiel für Medizin und Kult in der Prähistorie[1]

Rolf Heudorfer

1. Einleitung

Das Thema meiner Magisterarbeit an der kulturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen lautete: „Neolithische Trepanationen in West- und Mitteleuropa".

Die Phase des Neolithikums entspricht an den meisten Orten der Sesshaftwerdung. Die Aufgabe der umherziehenden Lebensweise bedingt auch zentrale Bestattungsplätze, die über einen längeren Zeitraum genutzt werden. Dadurch erhöht sich die Anzahl anthropologisch auswertbarer Skelette im Vergleich zu früheren Epochen (Wahl 1988). Es ist daher nicht überraschend, dass wir aus dem Neolithikum als erster Epoche eine relativ hohe Anzahl von Trepanationen am menschlichen Schädel vorliegen haben.

Trepanationen sind im Neolithikum seit der Linearbandkeramik, also der ersten Kulturstufe des Neolithikums in Mitteleuropa, nachgewiesen. Als sichere Trepanationen aus der Bandkeramik können der trepanierte Schädel aus Hoenheim-Suffelweyersheim im Elsass (Rieth/Ulrich 1942), das Schädelrondell aus Sommerein in Österreich (Winkler 1984) und abhängig von der Trepanationsdefinition eventuell der Schädel aus Ensisheim ebenfalls im Elsass gelten (Jeunesse 1997).

2. Trepanationstechniken

Trepanationen werden nach Art der angewandten Technik in Schabe-, Schnitt- (bzw. Säge-) und Bohrtrepanationen unterschieden (Geldhauser et al. 1996, Czarnetzki 1982, Lisowski 1967).

Bei einer Schnitttrepanation wird eine Knochenscheibe durch Schnitte aus dem Schädelknochen herausgetrennt. Es kann sich dabei um mehrere aufeinander treffende gerade Schnitte handeln oder um einen runden Schnitt. Das aus dem Schädelknochen herausgelöste Stück wird meist als Rondell bezeichnet, unabhängig davon, welche Form es hat. So spricht Prunière (1885) beispielsweise von einem „rondelle rectangulaire", also einem viereckigen Rondell. Daneben existieren noch die Bezeichnungen Knochenscheibe bzw. Schädelamulett. Allerdings ist der Ausdruck Knochenscheibe nicht sehr verbreitet. Die Bezeichnung Amulett beinhaltet eine ganz spezielle Bedeutung, die für die neolithischen Schädelrondelle insgesamt so noch keineswegs nachgewiesen ist. Die Frage, ob ein Gegenstand als Amulett anzusehen ist, kann auch für einzelne Populationen oder Kulturgruppen unterschiedlich zu beantworten sein (Röhrer-Ertl 1993). Insofern wird im folgenden die Bezeichnung Schädelrondell für alle

[1] Vortrag gehalten an der Jahrestagung der AGHAS, 6. Mai 2000 in Zürich.

von Trepanationen stammenden Knochenstücke verwendet.

Bei der Schabetechnik wird durch flächiges Schaben ein Loch im Schädelknochen erzeugt. Dabei fällt natürlich kein Rondell an.

Bei den Bohrtrepanationen gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Varianten. Man kann entweder mehrere kleine mit einem Kernbohrer aneinander anstossende Löcher bohren und dann das Knochenstück aus der Mitte entfernen oder mit einem Hohlbohrer auf einmal ein grösseres Stück aus dem Knochen herausbohren.

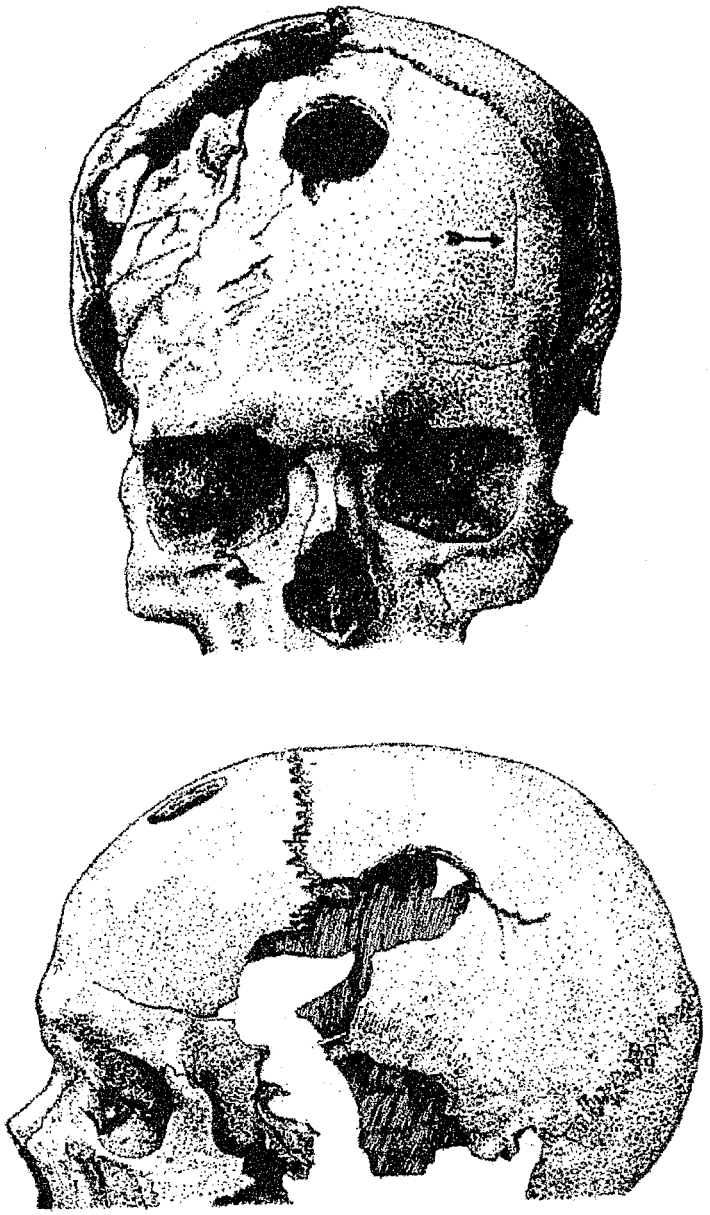


Abb. 1: Trepanierter Schädel aus Nebel auf Amrum (Zeichnung).

Von diesen drei möglichen Techniken sind für das Neolithikum Schaben und Schneiden nachgewiesen. Einzig an einem Schädel aus einem Grosssteingrab von Nebel auf Amrum liegt ein nahezu kreisförmiger Schädeldachdefekt vor, der in der Literatur als Bohrtrepanation beschrieben wird (Schäfer 1958, Kühl 1988). An dem original erhaltenen Rand des Defekts ist jedoch zu erkennen, dass sich in der Aufsicht zwei Ecken im Rand befinden (Abb. 1). Solche Ecken können sich allgemein nicht bei einer bohrenden Tätigkeit ergeben. Von daher ist davon auszugehen, dass es sich trotz der nahezu runden Form und der steilen Böschungskante um eine Schnitttrepanation handelt.

3. Beispiele von Trepanationen aus der Jungsteinzeit

Trepanationen sind aus dem gesamten Neolithikum nachgewiesen. Es sollen nun einige trepanierte Schädel und einige von Trepanationen stammende Rondelle in chronologischer Reihenfolge vorgestellt werden. Die in Klammern angegebenen Datierungen stammen alle aus Raetzel-Fabian (1986). Die dort angegebenen kalibrierten C-14 Daten können auch heute noch als gültig angesehen werden, auch wenn für einzelne neolithische Kulturgruppen inzwischen mehr Daten vorliegen. Dies spielt im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle.

3.1. Linearbandkeramik (ca. 5500 bis ca. 4900 v. Chr.)

Schädelrondell aus Sommerein

Wie bereits angesprochen liegen aus der Linearbandkeramik mehrere Fälle von Trepanationen vor. In die jüngere Phase der Linearbandkeramik, genauer gesagt in die Phase der Notenkopfkeramik, ist das Schädelrondell aus Sommerein/Niederösterreich zu datieren. Es stammt aus einer Siedlungsgrube, in der darüber hinaus Keramikscherben mit Notenkopfverzierung gefunden wurden (Melzer 1984). Das Rondell (Abb. 2) ist annähernd rund. Es ist weder durchlocht noch verziert. Die Ränder sind nicht geglättet (Winkler 1984). Das Rondell wurde am Stirnbein entnommen. Nach Winkler (1984) wurde das Rondell postmortal entnommen. Zwar überzeugt ihre Argumentation in diesem Punkt nicht so ganz, jedoch befindet sich an der Tabula interna des Rondells (Abb. 2A) eine Schnittspur. Dieser Schnitt muss an der Schädelinnenseite vorgenommen worden sein, da an dieser Stelle der Durchmesser des Rondells an der Tabula externa grösser ist. Dies bedeutet, dass das Rondell in der Tat postmortal entnommen wurde.

3.2. Chasséen/Epichasséen (ca. 4500 bis ca. 3100 v. Chr.)

Schädelrondelle und trepanierte Schädel aus Südfrankreich (Lozère)

Aus einigen Bestattungshöhlen und Dolmen in Südfrankreich, die entweder noch in die als Chasséen bezeichnete Kulturstufe gehören oder nur wenig später datieren, stammen einige trepanierte Schädel und Schädelrondelle. Auffällig ist nicht nur, dass die Schabetrepanationen eigentlich durchwegs verheilt sind und die Schnitttrepanationen nicht, sondern auch, dass an einigen Schädeln wie dem einen aus der Höhle von l'Homme-Mort sowie an mehreren Schädeln aus verschiedenen Dolmen (Abb. 3) jeweils eine verheilte Schabetrepanation vorliegt, die von einer grösseren nicht verheilten Schnitttrepanation überlagert wird (Broca 1877;

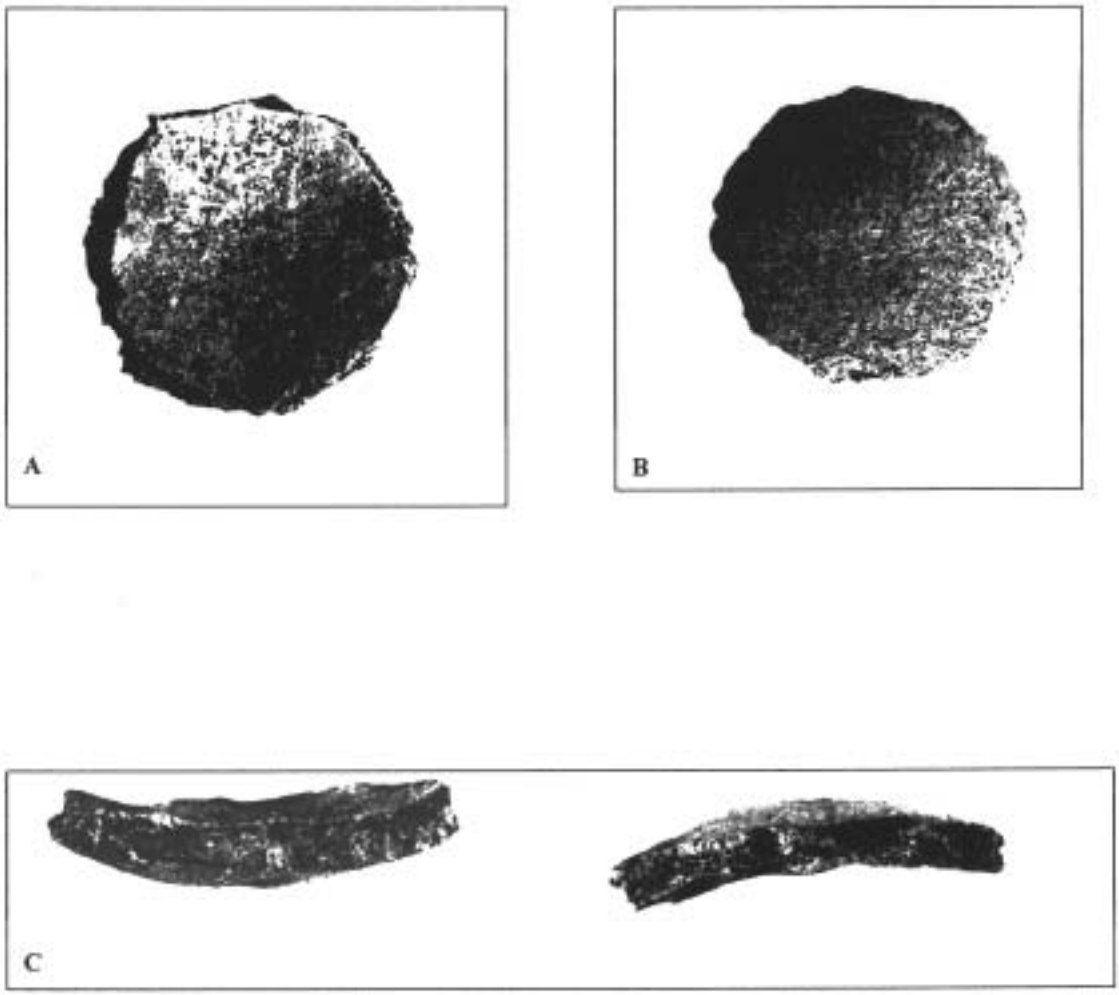


Abb. 2: Schädelrondell aus Sommerein. A: Tabula interna. B: Tabula externa. C: Seitenansicht.

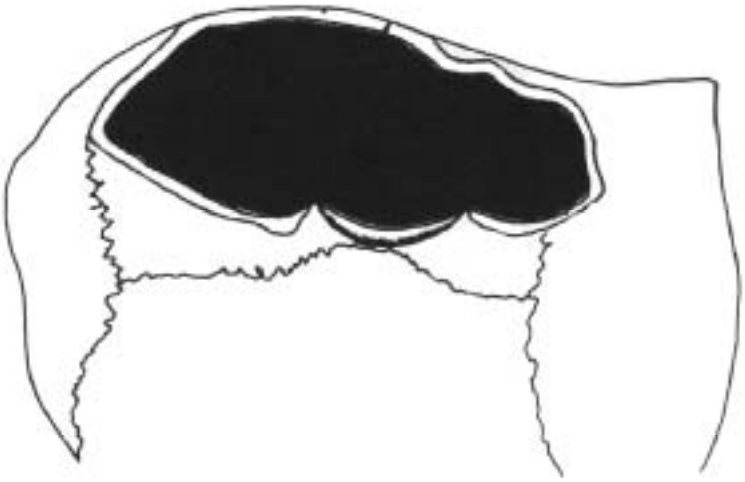
Prunière 1876, 1878, 1885). Aus denselben Dolmen stammen einige von Schnitttrepanationen stammende Schädelrondelle, die ebenfalls an einer Kante jeweils Spuren einer früheren, verheilten Schabetrepanation aufweisen (Broca 1877; Prunière 1876, 1878, 1885). Eines dieser Rondelle aus dem Dolmen de l'Aumède passt sogar an der Kante mit der verheilten Schabetrepanation Bruch an Bruch an einen im selben Dolmen gefundenen Schädel (Prunière 1876).

3.3. Baalberger Gruppe (ca. 4300 bis ca. 3400 v. Chr.)

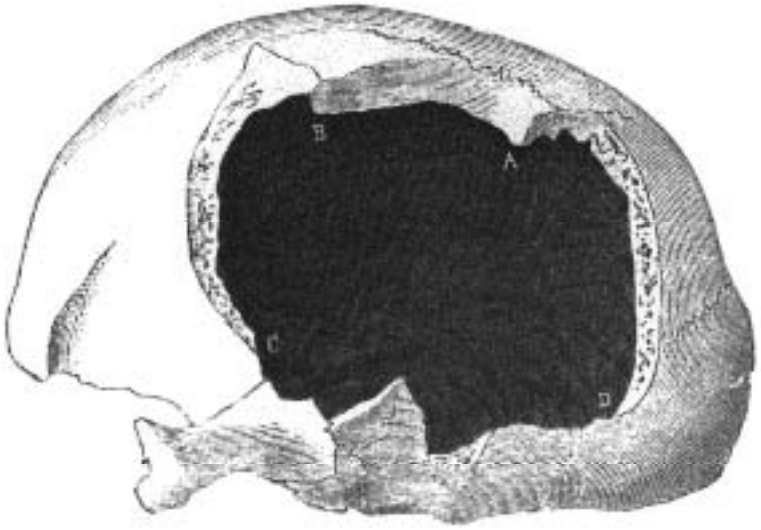
Stirnbeinfragment mit Trepanation Zauschwitz

Aus Zauschwitz, Kreis Borna, stammt von einem Gräberfeld der Baalberger Gruppe eine Bestattung, an deren Kalotte eine zweifache Schnitttrepanation vorliegt (Abb. 4B). Beide Schädeldachdefekte liegen auf dem Stirnbein und sind unverheilt. Bei einer der beiden Trepanationen ist es offensichtlich misslungen, die komplette Knochenscheibe aus dem Knochen herauszulösen. Daraus schliesst H. Grimm, dass hier erstens eine postmortale Trepanation vorliegt und dass zweitens ein ungeübter Trepaneur am Werk war. Grimm erwähnt darüber hin-

aus, dass an dem Schädelfragment Schnittspuren an der Schädelinnenseite vorliegen (Grimm 1965).



A



B

Abb. 3: A: Trepanierter Schädel aus dem Dolmen von Cibournios. B: Trepanierter Schädel aus einem südfranzösischen Dolmen (Cibournios oder Tombeaux des Poulacres).

3.4. Wartberg-Kultur (ca. 3700 bis ca. 2900 v. Chr.)

Trepanierter Schädel aus Warburg

Bei Warburg, Kreis Höxter, wurden mehrere Steinkammergräber gefunden, die der Wartberg-Kultur zuzuordnen sind. Aus dem Grosssteingrab Warburg IV stammen zwei trepanierte Schädel. Am Schädel eines männlichen, adulten Individuums befindet sich eine viereckig (trapezförmig) geschnittene Trepanation im Scheitelpunkt des Schädels (auf beiden Scheitel-

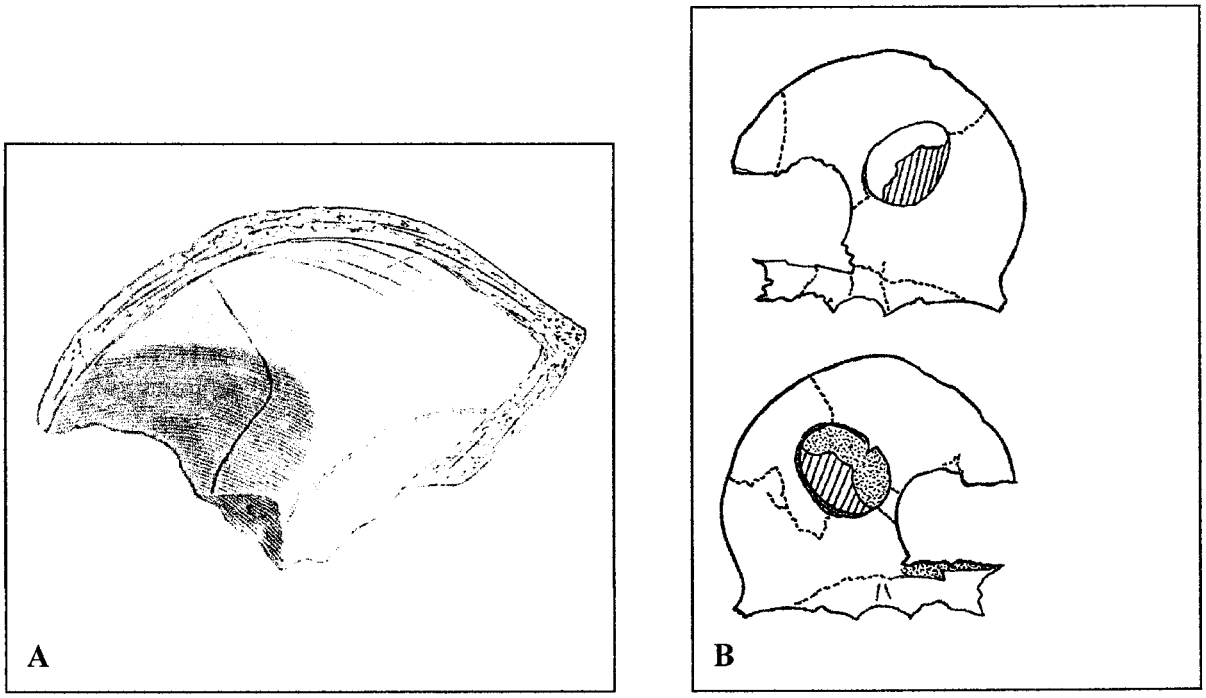


Abb. 4: A: Schädelrondell aus einem südfranzösischen Dolmen (Cibournios oder Tombeaux des Poulacres). B: Zeichnung eines trepanierten Stirnbeinfragments von Zauschwitz (oben Tabula externa, unten Tabula interna).

beinen). An dieser Stelle des Schädels liegt ein Tumor an der Schädelinnenseite (Meningeom)vor, der eine Aufwölbung des Schädeldaches verursacht. Die Trepanation ist vollständig verheilt (Löwen 1996).

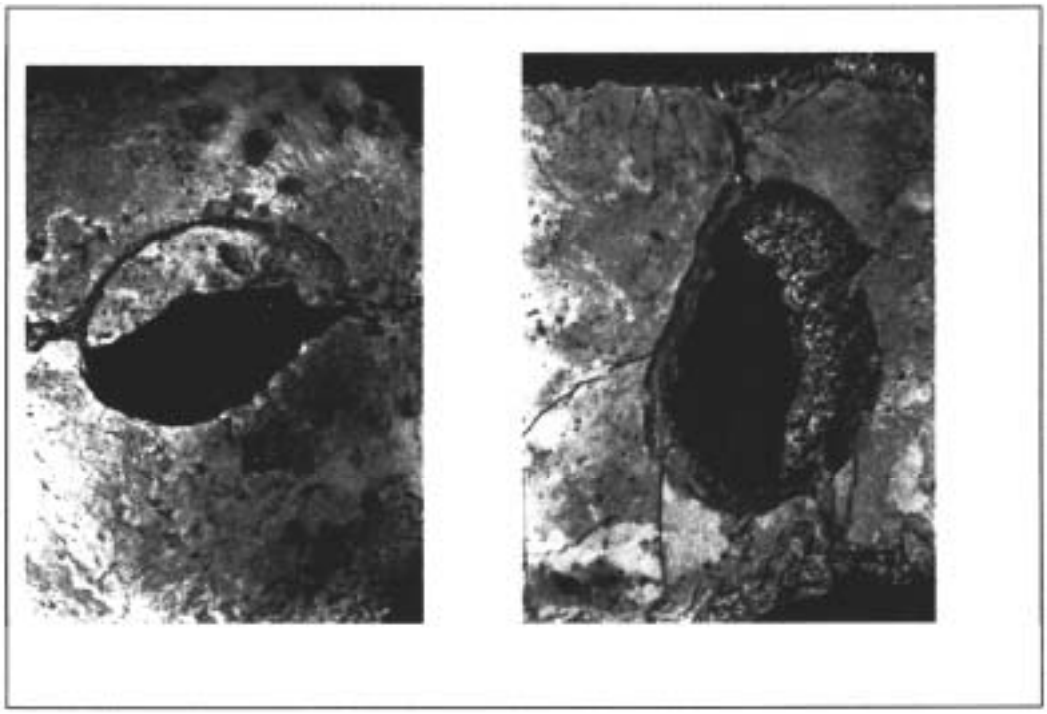


Abb. 5: Stirnbeinfragment mit Trepanation aus Zauschwitz (rechts Tabula externa, links Tabula interna).

3.5. SOM-Kultur (ca. 3500 bis ca. 1800 v. Chr.)

Rondelle und trepanierte Schädel aus dem Vallée du Petit-Morin

Aus mehreren Felskammergräbern der SOM-Kultur im Vallée du Petit-Morin stammen sechs trepanierte Schädel und mehrere Rondelle. Die Trepanationen scheinen in Schneidetechnik durchgeführt worden zu sein und sind teilweise verheilt. Die Rondelle, alle mit Randglättung, sind teilweise zweifach gelocht (Baye 1877, Dastugue/de Lumley 1976). Eines der Rondelle weist eine pathologische Oberflächenveränderung auf, die nach Dastugue/de Lumley möglicherweise durch Tuberkulose verursacht wurde (Dastugue/de Lumley 1976).

4. Diskussion - Motivation des Eingriffs

4.1. Kult oder Medizin – ein Gegensatz?

Als erstes wurden die neolithischen Trepanationen aus der Lozère von Broca und Prunière in den 70er Jahren des 19. Jahrhunderts als solche erkannt und beschrieben (Prunière 1876, 1878; Broca 1874, 1877). Broca (1877) unterschied dabei bereits zwischen kultischen und medizinisch induzierten Trepanationen („trépanation posthume“ und „trépanation chirurgical“). Diese Unterscheidung ist anhand der von Broca vorgelegten Befunde, bei denen sich die bei den überlebten Trepanationen angewandte Schabetechnik und die für die höchstwahrscheinlich postmortal durchgeführte Schneidetechnik als grundsätzlich verschiedene Handlungen begreifen lassen, durchaus logisch (Broca 1877). Die meisten Bearbeiter versuchen jedoch bis heute mehr oder weniger diese Unterscheidung in rein medizinisch-therapeutische Eingriffe oder rein kultisch-magische Handlungen auch auf andere Befunde anzuwenden. Zwar hat bereits 1970 Kunter eingewandt, dass sich medizinische Handlung einerseits und kultisches Ritual andererseits nicht ausschliessen müssen, da in früheren Zeiten die Heilkunde vielfach von magisch-rituellen Vorstellungen geprägt gewesen sei (Kunter 1970). Zu dieser meines Erachtens durchaus schlüssigen Folgerung kommt Kunter aufgrund der Analyse von ethnologischen und historischen Trepanationspraktiken. Die Sicht, dass sich Medizin und Magie nicht unbedingt ausschliessen müssen, hat sich jedoch nicht durchgesetzt. Und so findet man auch in der Literatur Bemerkungen wie „Schädelöffnung ... aus rein kultischen Gründen“ (Bruchhaus/Holtfreter 1985) oder „und ausschliesslich magisch-rituell motivierten Schädelöffnungen (falls es solche überhaupt gibt?)“ (Wahl et al. 1984). Auch Röhrer-Ertl (1993) versucht im Prinzip noch zwischen rein kultischen und rein medizinischen Trepanationen zu trennen. Hierin kommt immer noch die westlich moderne Auffassung von der strikten Trennung Medizin und Kult zum Ausdruck. Eine solche Trennung, die für uns heute selbstverständlich ist, konnte sich jedoch nur in unserem Kulturkreis mit seinem sehr eigenen Verhältnis von monotheistischer Religion und Medizin/Naturwissenschaften andererseits entwic??keln. Nur vor diesem Hintergrund konnte die Emanzipation der Naturwissenschaften und Medizin von Religion bzw. Kult stattfinden.

Im Gegensatz dazu zeigen rezente ethnologische Vergleiche, dass diese moderne Sichtweise nicht automatisch auf andere Kulturen übertragen werden kann. Im Gegenteil greifen im kulturellen Verständnis anderer Gesellschaften Kult und (empirische) Medizin in ihrer Wirkung Hand in Hand. So steht beispielsweise in dem „Illustrierten Lexikon der Medizingeschichte” aus dem Jahr 1979 wörtlich zur traditionell afrikanischen Medizin: „Die Unfähigkeit der Afrikaner, in den gewöhnlichen Handlungen des Lebens das Natürliche vom Übernatürlichen

abzugrenzen, hat den ernsthaften Beobachter schon immer überrascht“ (Kerharo 1979). Auch zeigen die Untersuchungen von Meschigg zu medizinisch induzierten operativen Eingriffen am Schädel bei den Kisii in Westkenia, wie sehr sich solche Vorstellungen mischen können. Bei einem der Fälle, die Meschigg selbst beobachtete, wurde nach abgeschlossener Operation ein Stab über dem Kopf des Patienten zerbrochen, um den für den Heilungsverlauf negativen Mächten die Kraft zu nehmen (Meschigg 1983). Andererseits können auch primär kultisch oder kulturell motivierte Eingriffe mit einem heilbringenden, also im weitesten Sinne präventiv medizinischen Aspekt einhergehen. So schildert zum Beispiel Margetts (1967) einen Fall von Trepanationen von den Bismarckinseln. Hierbei handelt es sich um Trepanationen, die in erster Linie dazu dienen, Schädelrondelle zu gewinnen. Diesen werden allgemeine Schutzfunktion und speziell die Hilfe zu einem längeren Leben zugesprochen. Die Rondelle stellen hier echte Amulette dar. Auch wenn es sich dabei quasi um eine „prophylaktische“ Operation handelt, so ist sie für die betreffende Population doch mit einem praktischen „medizinischen“ Nutzen verbunden.

Auch in prähistorischen Kulturen wird man von einem ähnlichen Verständnis von Medizin und Magie ausgehen können. Überträgt man ein derartiges Verständnis von Medizin und Kult auf die archäologischen Befunde, so bedeutet dies, dass im Regelfall eine Mischung von empirisch-medizinischen und kultisch-magischen Motiven zum Eingriff am Schädel geführt haben dürften. Eine andere Frage ist natürlich, was davon für den Archäologen fassbar wird. Hierfür gilt es Kriterien zu finden bzw. konsequent anzuwenden, dabei jedoch nicht zu vergessen, dass die eventuell fassbare Motivation nicht die ausschliessliche gewesen sein muss.

4.2. Archäologisch fassbare Kriterien zur Beurteilung der Motivation

4.2.1. Trepanierter Schädel

Am trepanierten Schädel sind hauptsächlich zwei Kriterien zu berücksichtigen:

1. Sind in der Nähe des Eingriffs Spuren krankhafter Veränderungen erkennbar, die einen solchen Eingriff rechtfertigen, wie dies teilweise auch schon versucht wurde (beispielsweise Bruchhaus /Holtfreter 1985)?
2. Ist der Eingriff sicher oder höchstwahrscheinlich postmortal ausgeführt worden (Grimm 1965, Broca 1877)?

Kriterium Nummer eins würde eher für einen primär medizinisch induzierten Eingriff, Kriterium Nummer zwei eher für einen primär kultisch/kulturell induzierten Eingriff sprechen.

4.2.2. Schädelrondell

An einem Schädelrondell ist zu berücksichtigen:

1. Ob es Bearbeitungsspuren aufweist oder nicht (Röhrer-Ertl 1993). Solche Bearbeitungsspuren wären beispielsweise Randglättung, gebohrte Löcher, Verzierungen etc.
2. Ob es in sakralem oder profanem Fundzusammenhang gefunden wurde.
3. In seltenen Fällen, wie beispielsweise bei dem Rondell aus Sommerein, ist auch am Rondell selbst beurteilbar, ob es postmortal angefertigt wurde oder nicht. In anderen Fällen kann der Schädel identifiziert werden, von dem das Rondell entnommen wurde, und es

kann so eine intravitale oder höchstwahrscheinlich postmortal vorgenommene Trepanation diagnostiziert werden. Ist dies beides nicht möglich, so ist jedoch nicht automatisch bei jedem gefundenen Rondell davon auszugehen, dass es postmortal entnommen wurde, da aus dem Neolithikum sowohl verheilte wie unverheilte Schnitttrepanationen vorliegen.

4.3. Interpretationsversuch der Motivation für die oben genannten Beispiele

4.3.1. Linearbandkeramik

Schädelrondell aus Sommerein

Das in einer Abfallgrube mit Notenkopfkeramik gefundene Rondell von Sommerein zeigt keinerlei Anzeichen einer nachträglichen Bearbeitung. Der Fundzusammenhang ist sicher nicht kultisch interpretierbar. Jedoch spricht die Tatsache, dass das Rondell offensichtlich postmortal vom Schädel entfernt wurde, dagegen, es als „Chirurgenabfall" (Röhrer-Ertl 1993) zu interpretieren. Ob es sich möglicherweise um ein nicht fertiggestelltes Amulett handelt, wie Winkler (Winkler 1984) vermutet, muss beim derzeitigen Forschungsstand offen bleiben.

4.3.2. Chasséen/Epichasseén

Schädelrondelle und trepanierte Schädel aus Südfrankreich (Lozère)

Hier lassen sich zwei verschiedene Varianten von Trepanationen unterscheiden, die sich deutlich voneinander trennen lassen, die Schabe- und Schnitttrepanation. Hier kann man durchaus der Interpretation von Broca folgen, da die Schnitttrepanationen mit hoher Wahrscheinlichkeit nach dem Tod durchgeführt wurden, die Rondelle im Unterschied zu den obengenannten Fällen in Bestattungszusammenhang gefunden wurden. Bei den wohl postmortal durchgeführten Eingriffen überwiegt also eher der kultische Aspekt bei der Motivation. Interessant ist jedoch, dass offensichtlich gerade einige der intravital trepanierten Schädel einen solchen postmortalen Eingriff aufweisen, wenn auch die Anzahl der insgesamt trepanierten Schädel aus dieser Kulturgruppe nicht ausreichen dürfte, um zu klären, ob hier ein Zusammenhang zwischen intravitaler Operation und postmortalem Eingriff besteht.

4.3.3. Baalberger Gruppe

Stirnbeinfragment mit Trepanation Zauschwitz

An dem Schädelfragment von Zauschwitz kann man aufgrund der Schnittspuren an der Schädelinnenseite folgern, dass die Trepanation durchgeführt wurde, um Rondelle zu gewinnen. Die Motivation hierfür dürfte primär im kultisch/kulturellen Bereich zu suchen sein.

4.3.4. Wartberg-Kultur

Trepanierter Schädel aus Warburg

Im Unterschied zu den bisherigen Beispielen drängt sich an dem Schädel aus dem Grosssteingrab von Warburg ein Zusammenhang zwischen krankhaftem Befund und Trepanation auf, da

sich diese nicht nur durch Schmerzen äussert, sondern durch die Verformung des Schädels auch von aussen gut lokalisierbar ist.

4.3.5. SOM-Kultur

Rondelle und trepanierte Schädel aus dem Vallée du Petit-Morin

An den Rondellen aus dem Vallée de Petit-Morin, die in Bestattungszusammenhang gefunden wurden, sind eindeutige Nachbearbeitungsspuren festzustellen. Die Motivation hierfür dürfte wiederum im kultisch/kulturellen Bereich zu suchen sein, auch wenn in diesem Fall nicht automatisch davon ausgegangen werden kann, dass die Rondelle postmortal angefertigt wurden, da sowohl verheilte wie unverheilte Schnitttrepanationen nachgewiesen sind. Andererseits lässt das eine Rondell, das eindeutig Spuren einer krankhaften Erscheinung trägt, jedoch die Möglichkeit offen, dass die Trepanation ursprünglich aus medizinischen Gründen durchgeführt wurde, auch wenn die mit der Trepanation verbundenen Handlungen offensichtlich nicht rein auf die medizinische Operation beschränkt blieben, da das Rondell nach dem Eingriff bearbeitet wurde.

5. Zusammenfassung

Wie gezeigt wurde, können während des gesamten Neolithikums Trepanationen bei einzelnen Kulturgruppen beobachtet werden. Von den drei möglichen Techniken von prähistorischen Trepanationen kommen die Schabe- und die Schnittechnik in Frage. Bei der Beurteilung der Motivation, die zu einer Trepanation führte, sollte man sich nicht von unseren modernen Auffassungen leiten lassen, nach der es sich bei Religion einerseits und Medizin andererseits um völlig verschiedene Lebensbereiche handelt, die strikt voneinander zu trennen sind. Darüber hinaus scheint es mir anhand der vorgelegten Fälle klar, dass diesbezüglich auch keine generellen für das gesamte Neolithikum gültigen Massstäbe aufgestellt werden können, da sich die Trepanationspraktiken der einzelnen Kulturgruppen, so wie sie sich im archäologischen Befund widerspiegeln, deutlich voneinander unterscheiden. Es sollten vielmehr zuerst die Trepanationsfälle innerhalb einer Kulturgruppe gesondert betrachtet und anhand der genannten Kriterien analysiert werden, bevor eine für diese Kulturgruppe gültige Aussage getroffen wird.

Abbildungsnachweis

Abb. 1: A: Kühl 1988.
Abb. 2: Winkler 1984, Tafel 1.
Abb. 3: A: Dastugue/Gervais 1992, Abb. 33. B: Broca 1877, Abb. 26.
Abb. 4: A: Broca 1877, Abb. 27. B: Grimm 1965, Abb. 1.
Abb. 5: Grimm 1965, Abb. 3.

Literaturverzeichnis

Baye M. de 1877
Communication relative aux crânes perforées et aux rondelles crâniennes trouvées dans les stations néolithiques du Petit-Morin. Congrès International d'Anthropologie et d'Archéologie Préhistorique. Compte-rendu de la Huitième Session à Budapest 1876, S. 196-199.

Broca P. 1877
Sur la Trépanation du Crâne et les Amulettes Crâniennes à l'Époque Néolithique. Congrès International d'Anthropologie et d'Archéologie Préhistorique. Compte-rendu de la Huitième Session à Budapest 1876, S. 101-195.

Bruchhaus H., Holtfreter J. 1985
Zwei trepanierte Schädel aus der Schnurkeramik des Mittelelbe-Saale-Gebietes von Braunsdorf, Kr. Merseburg, und von Laucha-Dorndorf, Kr. Nebra. Ausgrabungen und Funde 30, S. 167-171.

Czarnetzki A. 1982
Menschen des frühen Mittelalters im Spiegel von Anthropologie und Medizin. Stuttgart.

Dastugue J., Gervais V. 1992
Paléopathologie du squelette humain. Paris.

Dastugue J., de Lumley M.-A. 1976
Les maladies des hommes préhistoriques. In: Guilaine J. (Hg.), La préhistoire française II, S. 153-164.

Geldhauser B., Guckenhan S., Heudorfer R. 1996
Hiebverletzungen und Trepanationen. In: Czarnetzki A. (Hg.), Stumme Zeugen ihrer Leiden. Attempto. Tübingen, S. 188-205.

Grimm H. 1965
Ein neuer Beleg für die Herstellung von Knochenscheiben aus menschlichen Hirnschädelknochen durch postmortale Trepanation. Z. Morph. Anthrop. 56, S. 60-62.

Jeunesse Ch. 1997
Pratiques funéraires au néolithique ancien. Paris.

Kerharo J. 1979
Die traditionelle Medizin in Schwarzafrika. In: Vie J., Baruk H., Besombes A., Bourlière F., Dustin P., Sournia J.-C., Lalanne C., Coussement A., Proux C., Micoud M., Martiny M., d'Eshougues J.R., Kerharo J., Illustrierte Geschichte der Medizin, 6. Paris, S. 2362.

Kühl I. 1988
Ein zweiter trepanierter Schädel aus Schleswig-Holstein. Anthrop. Anz. 46, S. 335-347.

Kunter M. 1970
Die Schädeltrepanation in vor- und frühgeschichtlicher Zeit und bei aussereuropäischen Völkern. Bericht der oberhessischen Gesellschaft für Natur- und Heilkunde zu Giessen 37, S. 149-159.

Lisowski F.P. 1967
Prehistoric and early historic Trepanation. In: Brothwell D./Sandison A. (eds.), Diseases in Antiquity. Charles C Thomas Publisher. Springfield. USA, S. 651-672.

Löwen H. 1996
Menschen der Jungsteinzeit. Warburg.

Meschigg R. 1983
Zur Geschichte der Trepanation unter besonderer Berücksichtigung der Schädeloperationen bei den Kisii im Hochland Westkenias. Düsseldorfer Arbeiten zur Geschichte der Medizin. Düsseldorf.

Margetts E.L. 1967
Trepanation of the Skull by the medicine-men of Primitive Cultures, with Particular Reference to Present-day Native East African Practice. In: Brothwell D./Sandison A. (eds.), Diseases in Antiquity. Charles C Thomas Publisher. Springfield. USA, S. 673-701.

Melzer G. 1984
Zwei Schädelrondelle aus Sommerein. NÖ. Fundberichte aus Österreich 23, S. 87-93.

Probst E. 1991
Deutschland in der Steinzeit. München.

Prunière M. 1876
Fouilles du dolmen de l'Aumède sur le chaussée de chanac (Lozère). B.S.A 2/11, S. 551-552.

Prunière M. 1878
Sur les cavernes de Beaumes Chaudes (Lozère). B.S.A. 3/1, S. 206-220.

Prunière M. 1885
Le dolmen de Dévèzes, crâne à lésions pathologiques multiples et rondelles crâniennes. Assoc. Franc. Avance. Science, S. 412-419.

Rieth A., Ulrich H. 1942
Eine bandkeramische Männerbestattung mit Schädeltrepanation aus Suffelweyersheim, Kr. Strassburg. Germania 26, S. 177-181.

Raetzel-Fabian D. 1986
Phasenkartierung des Neolithikums. Kassel.

Röhrer-Ertl O. 1993
Über urnenfelderzeitliche Schädel-Rondelle aus Bayern. Versuch einer Interpretation auf interdisziplinärem Weg. In: Kokabi M./Wahl J. (Hg.), Beiträge zur Archäzoologie und prähistorischen Anthropologie, S. 269-294.

Schäfer U. 1958
Eine neolithische Schädeltrepanation aus Nebel/Amrum. Schriften des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein 29, S. 27-33.

Wahl J. 1988
Prähistorische Anthropologie. In: Planck D. (Hg.), Archäologie in Württemberg. Stuttgart, S. 439-464.

Wahl J., Dehn R., Kokabi M. 1984
Eine Bestattung der Schnurkeramik aus Stetten a.d. Donau. Fundberichte aus Baden-Württemberg 15, S. 175-211.

Winkler E.M. 1984
Urzeitliche Schädelamulette aus Sommerein, N. Ö. Fundberichte aus Österreich 23, S. 93-96.

Anschrift

Rolf Heudorfer, M.A.
Osteologische Sammlung
Universität Tübingen
Wilhelmstrasse 72
D – 72074 Tübingen

Eingang: 19.5.00

Impressum

Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie
Bulletin de la Société Suisse d'Anthropologie
herausgegeben von der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie (SGA/SSA)
mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften (SANW)

Redaktion:
Susi Ulrich-Bochsler, Bern

Korreferentin (textes français):
Isabelle Gemmerich, Brugg

Layout:
Andreas Cueni, Aesch

Bezugsort:
Redaktion: S. Ulrich-Bochsler, Historische Anthropologie, Medizinhistorisches Institut der Universität Bern, Fabrikstrasse 29d, CH - 3012 Bern
Telefon 031/631 84 92. Fax 031/631 37 82. E-mail susi.ulrich-bochsler@mhi.unibe.ch.

Herstellung: Atelier d'Impression de l'Université de Genève
Couverture: Montage Isabelle Gemmerich d'après un dessin original de Lucrezia Bieler-Beerli (Zürich) pour l'exposition du Musée d'Anthropologie de l'Université de Zürich

Erscheinungsweise: Vom Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie erscheinen in der Regel zwei Hefte pro Jahr (Frühjahr, Herbst), die zusammen einen Band bilden.

ISSN 1420 - 4835

Darstellung schweizerischer mittelalterlicher Knochenläsionen mittels Multislice - CT

Frank J. Rühli, Christian Lanz und Susi Ulrich-Bochsler

Abstract
The aim of this paper is to present for the very first time the visualization of multiple Swiss medieval bone lesions of various etiologies by multislice computed tomography (MS-CT). Indications and limitations of this technique are discussed. MS-CT images show in general a very high axial resolution and improved possibilities of post-processing. These results are preliminary and more research including larger series of paleopathological bone lesions continues.

Einleitung

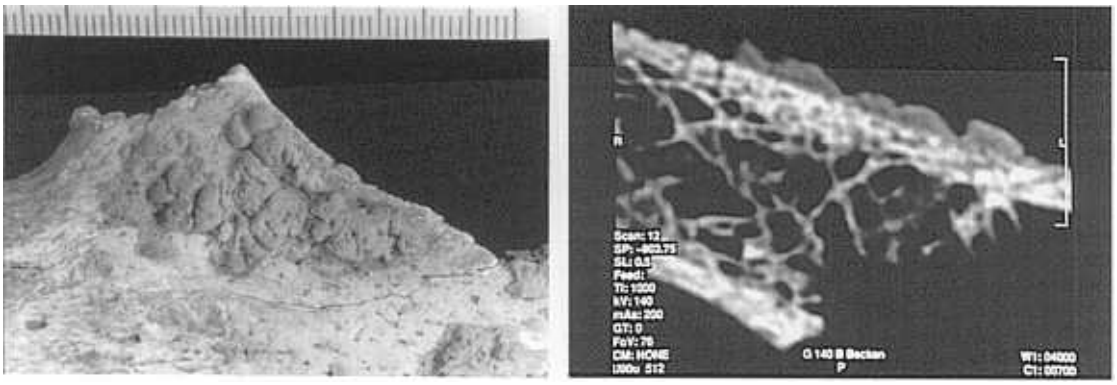
In der anthropologisch-paläopathologischen Forschung sind nicht-invasive Untersuchungsmethoden zunehmend gefragt. Dabei hat sich vor allem die Computertomografie (CT) mitsamt ihren verschiedenen virtuellen Nachverarbeitungsverfahren für solch spezielle Fragestellungen als geeignetes Verfahren etabliert (Recheis et al. 1999, Spoor et al. 2000). Seit kurzem ist die sogenannte Multislice-CT (MS-CT) für die klinische Diagnostik verfügbar (Hu 1999). Sie stellt eine Weiterentwichklung der herkömmlichen Spiral-CT-Technik dar und basiert im Wesentlichen auf der Verwendung von neu vier rotierenden Detektoren. Dies ermöglicht unter anderem - als besonders relevant für anthropologische und paläopathologische Fragestellungen - eine verbesserte axiale Auflösung. Dies verspricht zukünftig eine vertiefte Analyse paläopathologischer Befunde, insbesondere für Objekte, in denen nur nicht-invasive Methoden zur Anwendung gelangen können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, erstmals diese neue Untersuchungstechnik bei der Analyse paläopathologischer Knochenläsionen aus einer Schweizer Fundstätte vorzustellen.

Material und Methoden

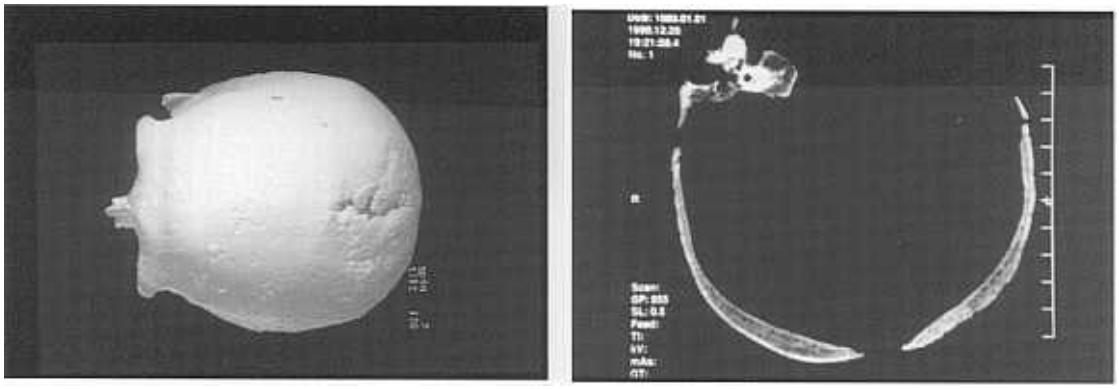
Insgesamt fünf Knochenfragmente aus dem frühmittelalterlichen Gräberfeld von Kallnach (Kanton Bern, Publikation der Fundstätte: Ulrich-Bochsler/Rüttimann in Vorb.) mit Pathologica unterschiedlichster Aetiologien wurden am Institut für Diagnostische Radiologie, Universitätsspital Zürich computertomografisch untersucht (Somatom Plus 4 Volume Zoom, Siemens, Erlangen, Deutschland; technische Einstellungen je nach Präparat leicht variierend: Schichtdicke 1 mm, Tischvorschub 1 mm, 140 kV, 200 - 220 mAs; Leitung der Untersuchung: A. von Smekal).

Anschliessend wurden als 2D- respektive 3D- Nachverarbeitung multiplanare (MPR) - und "shaded surface display" (SSD) - Rekonstruktionen durchgeführt (Magic View Workstation, Siemens; Rekonstruktionsschichtdicke 1 mm, Rekonstruktionstischvorschub 1 mm).



a b

Abb. 1: Multifokale periostale Hyperostose, Beckenschaufel:
a) Makroskopie: tropfenförmig konfluierende, feinporöse spröde Auflagerung an der Aussenseite.
b) Axiale MPR: periostale, scharf begrenzte, im Vergleich zur regulären Corticalis relativ hypodense Strukturvermehrung.
Befund insgesamt am ehesten vereinbar mit Periostreaktion auf entzündlichen oder neoplastischen Reiz.
30-50j. Individuum, Geschlecht indet., Grab 140b Kallnach.



a b

Abb. 2: Knochenläsion unklarer Aetiologie, Schädelkalotte:
a) SSD-Darstellung, Ansicht von antero-caudal: hoch parietal in der Sagittallinie gelegener linearer Substanzdefekt des Schädeldaches (ca. 6.5 x 0.5 cm messend) mit umgebender poröser Vertiefung und ossärer Ausdünnung.
b) Coronare MPR: glatt begrenzte ossäre Läsion mit enostaler Hyperdensität.
Befund insgesamt am ehesten vereinbar mit posttraumatischer oder subcutaner postinfektiöser Reaktion.
60-70jährige Frau, Grab 135 Kallnach.

Resultate und Diskussion

Die abgebildeten Beispiele erlauben einen ersten Eindruck der Möglichkeiten und Grenzen der MS-CT bei der Darstellung paläopathologischer Knochenläsionen. Ein direkter Vergleich von MS-CT zur herkömmlichen seit 1989 bekannten Spiral-CT wurde im vorliegenden Fall nicht gemacht; aus klinischer Erfahrung ist jedoch die Überlegenheit der MS-CT nicht zuletzt auch für die virtuellen Nachverarbeitungsmöglichkeiten bekannt (Ohnesorge et al. 1999).

Die Aussagekraft des radiologischen Bildmaterials entspricht generell ungefähr derjenigen von Lupenvergrösserungen. Die aktuelle technische Auflösungsgrenze liegt bei 0.2 x 0.2 x 0.5 mm. Die schnelle primäre Datenakquisition erlaubt nachträglich verschiedene Nachverarbeitungsarten - welche besonders in anthropologischen Fragestellungen wichtig sind - in individuell wählbaren Projektionsebenen. Damit ist eine exakte Planung histologischer Entnahmestellen - zum Beispiel bei schwieriger Lokalisation oder ausgesprochen wertvollem Probenmaterial - sehr leicht möglich. Die Nachverarbeitung der Daten braucht jedoch erfahrene Anwender (radiologisch geschulte Fachleute) und kann in Einzelfallen sehr zeitaufwendig (bis zu ca. 30 min pro Objekt) sein. Dünne Knochenpartien können zudem in den 3D-Rekonstruktionen ausgelöscht erscheinen und damit zu Fehlinterpretationen führen. Leider ist die Anzahl MS-CT-Geräte auch in der Schweiz aktuell noch gering und daher die Verfügbarkeit für anthropologische oder paläopathologische Fragestellungen beschränkt. Dennoch scheint die Anwendung dieser neusten CT-Technik für solch spezielle Indikationen - ableitend aus unseren bisherigen limitierten Studien aber auch aus bekannten klinischen Erfahrungen (Klingenbeck-Regn et al. 1999) - gerechtfertigt.

Weitere fortlaufende MS-CT- Studien unter Mitbeteiligung einzelner Autoren dieses Artikels umfassen unklare Fällen von historischen Schädeltrepanationen (Rühli et al. in Vorbereitung) oder die zusätzliche Analyse paläopathologischer Knochenpathologien mittels CT-Dichtebestimmung, welche eine bessere Differenzierung gegenüber allenfalls vorliegenden postmortalen Artefakten erlauben sollte.

Die Visualisierung paläopathologischer Knochenläsionen mittels MS-CT - welche den neusten Entwicklungsstand der CT-Technik darstellt - trägt wesentlich zur differentialdiagnostischen Eingrenzung bei und sollte primär vor der Anwendung invasiver Methoden durchgeführt werden. Sie eignet sich zur Selektion der Untersuchungsobjekte und zur Planung histologischer Analysen. Zur detaillierteren Evaluation sind zusätzliche methodische Vergleichsstudien mit rezentem und historischem pathologischem Knochenmaterial nötig (siehe auch Lanz/Rühli, Artikel im gleichen Heft).

Literaturverzeichnis

Hu H. 1999
Multi-slice helical CT: scan and reconstruction. Med. Phys. 26(1), S. 5-18.

Klingenbeck-Regn K., Schaller S., Flohr T., Ohnesorge B., Kopp A.F., Baum U. 1999
Subsecond multi-slice computed tomography: basics and applications. Eur. J. Radiol. 31(2), S. 10-124.

Ohnesorge B., Flohr T., Schaller S., Klingenbeck-Regn K., Becker C., Schöpf U.J., Brünig R., Reiser M.F. 1999
Technische Grundlagen und Anwendungen der Mehrschicht-CT. Radiologe 39(11), S. 923-931.

Recheis W., Weber G.W., Schäfer K., Prossinger H., Knapp R., Seidler H., Zur Nedden D. 1999
New methods and techniques in anthropology. Coll. Antropol. 23(2), S. 495-509.

Rühli F.J., Lanz C., Alt K.W. (in Vorb.)
Darstellung und differentiadiagnostische Evaluierung unklarer neolithischer und post-neolithischer Schädelläsionen mittels Multislice-CT.

Spoor F., Jeffery N., Zonneveld F. 2000
Using diagnostic radiology in human evolutionary studies. J. Anat. 197(1), S. 61-76.

Anschrift

Dr. med. Frank J. Rühli
Biological Anthropology and Comparative Anatomy Research Unit
Department of Anatomical Sciences
The University of Adelaide
SA 5005 Adelaide
Australien
E-mail: ruehli@hotmail.com

Eingang: 28.11.00

Impressum

Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie
Bulletin de la Société Suisse d'Anthropologie
herausgegeben von der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie (SGA/SSA)
mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften (SANW)

Redaktion:
Susi Ulrich-Bochsler, Bern

Korreferentin (textes français):
Isabelle Gemmerich, Brugg

Layout:
Andreas Cueni, Aesch

Bezugsort:
Redaktion: S. Ulrich-Bochsler, Historische Anthropologie, Medizinhistorisches Institut der Universität Bern, Fabrikstrasse 29d, CH - 3012 Bern
Telefon 031/631 84 92. Fax 031/631 37 82. E-mail susi.ulrich-bochsler@mhi.unibe.ch.

Herstellung: Atelier d'Impression de l'Université de Genève
Couverture: Montage Isabelle Gemmerich d'après un dessin original de Lucrezia Bieler-Beerli (Zürich) pour l'exposition du Musée d'Anthropologie de l'Université de Zürich

Erscheinungsweise: Vom Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie erscheinen in der Regel zwei Hefte pro Jahr (Frühjahr, Herbst), die zusammen einen Band bilden.

ISSN 1420 - 4835

Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Diagnostik von metastatischen Knochenläsionen an archäologischem Skelettmaterial: Ein Beispiel

Christian Lanz und Frank J. Rühli

Abstract

Metastatic osseous lesions represent a diagnostic challenge in paleopathology. Since bone tissue reacts to malignant neoplastic tissue only in a limited number of ways, it is of great interest to compare contemporate histological pathology specimens of metastatic bone lesions to lesions in historical osseous samples. The authors illustrate this comparative study project with an example of endostal and periostal new bone formation in a medieval rib fragment, illustrating the possibilities and limits of such a comparative diagnoses. Further studies in this field are required.

Metastatisch bedingte Knochenläsionen stellen in der Paläopathologie eine Knacknuss dar; Knochengewebe reagiert auf malignes Tumorgewebe nur in einer beschränkten Anzahl von morphologisch fassbaren Reaktionsweisen (Adler 1997, Dorfman/Czerniak 1997). Ziel des vorliegenden Artikels ist es, anhand eines Beispiels zu zeigen, wie mit vergleichenden morphologischen Untersuchungen (Rühli et al. 2000) das diagnostische Problem "Metastasen" angegangen werden könnte.

Material und Methoden

Knochengewebe mit metastatischen Läsionen wurde bei Autopsien im Rahmen der Routineentnahmen von Gewebe zur histologischen Untersuchung entnommen, in Paraffin eingebettet, und im Paraffinblock - vor dem Schneiden - dekalzifiziert (Institut Neuchâtelois d'Anatomie Pathologique, Neuenburg). Damit wurde der Zusammenhang von Knochen- und Weichteilgewebe durch den Dünnschnitt nicht gestört. Diese Schnitte stehen nun, anonymisiert, zum morphologischen Vergleich mit historischem Material zur Verfügung. Vom historischen Knochenmaterial wurden nach dem Biodur®-Verfahren Dünnschliffe hergestellt (Labor am Zentrum für Anatomie der Universität Göttingen).

Resultate - ein Beispiel

Bei der anthropologischen Untersuchung eines Skelettes eines ca. 35-45jährigen Mannes aus dem frühmittelalterlichen Gräberfeld von Kallnach (Kanton Bern) wurden an verschiedenen Rippenfragmenten feinporöse hyperostotische Periostauflagerungen beobachtet (Abb. 1. Grabungspublikation: Ulrich-Bochsler/Rüttimann in Vorb.).

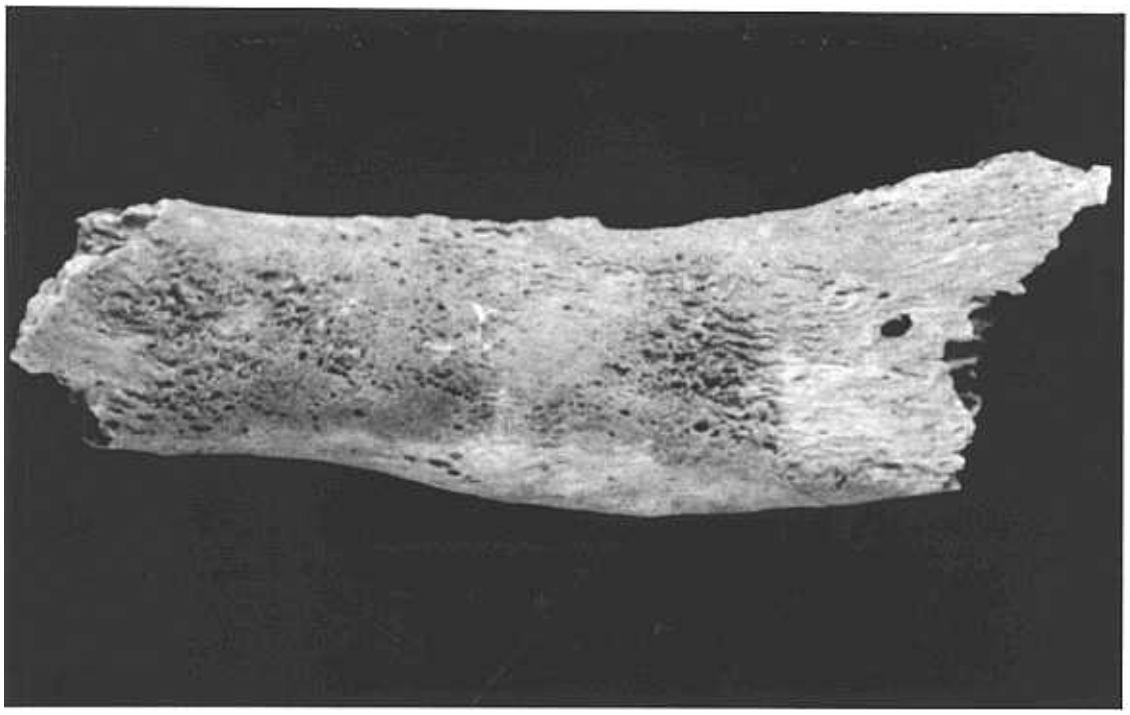


Abb. 1: Rippenfragment eines ca. 35-45jährigen Mannes aus dem Gräberfeld von Kallnach (Grab 33): Feine, spröde periostale Hyperostose. (Foto: Historische Anthropologie der Universität Bern).

Im Knochendünnschliff lässt sich eine endostale Geflechtknochenbildung nachweisen (Abb. 2); die periostale Hyperostose weist bereits Osteone auf. Als Ursache für eine solche periostale und endostale Hyperostose, die sich über mehrere Rippen erstreckt, kommt in erster Linie ein chronischer entzündlicher Infekt der Thoraxwand in Frage (ausgehend z.B. von einer phlegmonösen Entzündung der äusseren Thoraxwand oder von einer auf die Thoraxwand übergreifenden Entzündung des Brustfells oder Mediastinums), oder aber eine diffuse Metastasierung eines malignen Tumors. Ein rezentes Vergleichspräparat zeigt nun die endostale Knochenneubildung an der Rippe eines mit 60 Jahren verstorbenen Mannes, der an einem diffus metastasierenden Siegelringzellkarzinom des Magens erkrankt und an krebsbedingtem Lungenversagen verstorben war. Der Dünnschnitt lässt eine Geflechtknochenbildung, die sich aus einem von den Karzinomzellen induzierten Bindegewebe heraus entwickelt, erkennen (Abb. 3). Das normalerweise im Rippenmarkraum enthaltene blutbildende Knochenmark ist hierbei völlig verdrängt. Osteolytische Veränderungen fehlen.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Die morphologische Ähnlichkeit der Läsionen am historischen und am rezenten Präparat ist diagnostisch nicht beweisend, lässt aber dieselbe Aetiologie wahrscheinlicher erscheinen. Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass die Geflechtknochenbildung keine spezifische Eigenleistung eines bestimmten Tumors darstellt, sondern eine indirekte Antwort des Knochengewebes auf das eingedrungene maligne Gewebe ist: Die Krebszellen stimulieren die Bildung von Bindegewebe (desmoplastische Reaktion), aus dem sich Geflechtknochen herausdifferenziert. Das Fehlen jeglicher hyperostotischer Reaktion am vorliegenden rezenten Präparat kann entweder durch einen sogenannten „sampling error" (nur ein kleines untersuchtes Rippenstück) oder – eher unwahrscheinlich – durch eine im Vergleich zum historischen Präparat unter-

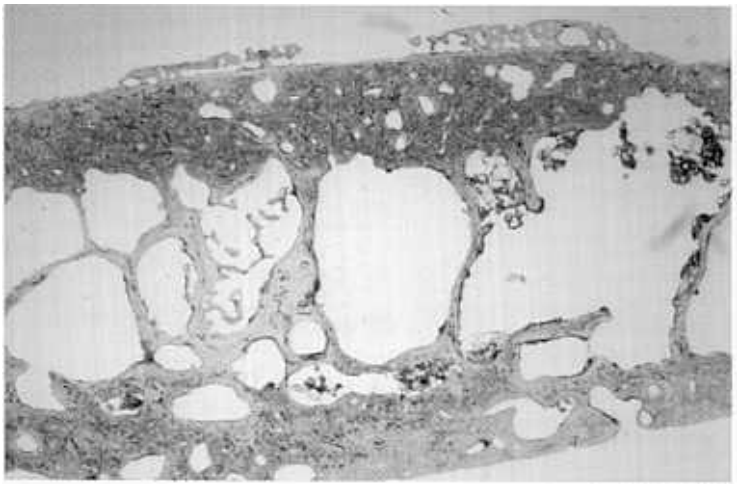


Abb. 2: Dünnschliff der Rippe aus Kallnach: Diskreter Saum periostaler Knochenneubildung, beginnende Spongiosierung der Corticalis sowie lokalisierte Geflechtknochenbildung in der Spongiosa. Fremdmaterial in Form von Sand.

Abb. 3: Dünnschnitt des rezenten Präparats (Alzanfärbung): Diffus ossär metastasierendes Siegelringzellkarzinom des Magens: Ausgeprägte Fibrosierung im Markbinnenraum mit Geflechtknochenbildung.

schiedliche Krankheitsaetiologie erklärt werden. Das rezente Präparat eignet sich gut als Vergleichsmaterial, weil beim Patienten das Krebsleiden zu Lebzeiten unerkannt geblieben und die biologischen Eigenschaften des Tumors also nicht durch eine zytostatische Therapie beeinflusst worden war.

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, wie möglicherweise mit breiter angelegten, auf verschiedenen Methoden beruhenden vergleichenden Untersuchungen insbesondere diejenigen Läsio-

nen in der Paläopathologie angegangen werden können, bei denen der Verdacht auf einen malignen Tumor als Grunderkrankung besteht. Es braucht jedoch weitere Studien, um die morphologischen Reaktionsweisen von Knochengewebe auf malignes Tumorgewebe zu charakterisieren und die Läsionen allenfalls einem Krebsgewebetyp zuordnen zu können.

Von Seiten der Autoren besteht daher ein grosses Interesse, Kenntnis von möglicherweise neoplastisch bedingten Knochenveränderungen an historischem Material zu erhalten, um sie nach Rücksprache mit dem Verantwortlichen gegebenenfalls in die vorliegende Studie einzuschliessen.

Literaturverzeichnis

Adler C.-P. 1997
Knochenkrankheiten. 2. Auflage. Springer. Berlin, Heidelberg, New York. S. 396-406.

Dorfman H.D., Czerniak B. 1997
Bone Tumors. Mosby. St. Louis, Baltimore, Toronto. S. 1009–1040.

Rühli F.J., Lanz C., Ulrich S., Hesse H., Schultz M., von Smekal A. 2000
Vergleichende Morphologie von Knochenpathologien im Multislice-CT und in der Histologie. Homo 51, suppl., S. 105.

Anschriften

Dr. med. Christian Lanz
Bettlachstrasse 82
Postfach 707
CH - 2540 Grenchen
E-mail: chrlanz@yahoo.com

Dr. med. Frank J. Rühli
Arbeitsgruppe für klinische Paläopathologie
Orthopädische Universitätsklinik Balgrist
CH - 8008 Zürich
E-mail: ruehli@hotmail.com

Eingang: 24.11.00

Impressum

Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie
Bulletin de la Société Suisse d'Anthropologie
herausgegeben von der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie (SGA/SSA)
mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften (SANW)

Redaktion:
Susi Ulrich-Bochsler, Bern

Korreferentin (textes français):
Isabelle Gemmerich, Brugg

Layout:
Andreas Cueni, Aesch

Bezugsort:
Redaktion: S. Ulrich-Bochsler, Historische Anthropologie, Medizinhistorisches Institut der Universität Bern, Fabrikstrasse 29d, CH - 3012 Bern
Telefon 031/631 84 92. Fax 031/631 37 82. E-mail susi.ulrich-bochsler@mhi.unibe.ch.

Herstellung: Atelier d'Impression de l'Université de Genève
Couverture: Montage Isabelle Gemmerich d'après un dessin original de Lucrezia Bieler-Beerli (Zürich) pour l'exposition du Musée d'Anthropologie de l'Université de Zürich

Erscheinungsweise: Vom Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie erscheinen in der Regel zwei Hefte pro Jahr (Frühjahr, Herbst), die zusammen einen Band bilden.

ISSN 1420 - 4835

Leitfaden paläogenetischer Methodik
Current Protocols in Molecular Palaeobiology

Carsten M. Pusch und Michael Scholz

Zusammenfassung

Wir sind auf dem Weg, in altem Probenmaterial oder Fossilien mehr als nur Vermächtnisse vergangener Epochen in Form von Gesteinsbrocken zu sehen. Dies belegen intensive Bemühungen der letzten Jahre, sowohl Nukleinsäuren als auch Residuen ehemals intakter Proteine aus alten Hart- und Weichgewebsüberresten zu isolieren und zu interpretieren. Dieser Ansatz erregt nicht nur in der wissenschaftlichen Gemeinde Aufsehen, sondern ist auch - erkennbar am Feedback in den Medien - für die Öffentlichkeit von grossem Interesse. Obwohl die Palette an molekulargenetischen Techniken verfeinert bzw. neue Methoden etabliert wurden, bleibt es dennoch fraglich, ob derartige Biomoleküle tatsächlich auch aus voll-fossilem Material zu isolieren sind. Um auch weiterhin den Bereich der Paläogenetik erfolgreich auszubauen, ist es notwendig, dass Molekularbiologen und Paläontologen eng zusammenarbeiten. Nur in einer quasi konzertierten Aktion können gewonnene Daten effektiv und sinnvoll interpretiert werden. Ein Beispiel soll dies unterstreichen: Kontaminationspräventiv durchgeführte PCR Experimente sind das oberste Gebot um authentische DNA Sequenzen von artifiziellen oder Kontaminationsprodukten abgrenzen zu können. Auf der anderen Seite ist es notwendig, dass ein Fund phylogenetisch durch taxonomische Bestimmung und morphologische Untersuchung korrekt klassifiziert ist. Beide Ansätze - sowohl genetisch als auch paläontologisch orientiert - sind miteinander verzahnt und können nur so in der Authentizitätsfindung erfolgreich sein. Da diese interdisziplinäre Kooperation bisher eher die Ausnahme als die Regel war, muss der Dialog zwischen den involvierten Disziplinen verbessert werden. Um in diesem Sinne einen ersten Anstoss zu geben, stellen wir hier einen Katalog gängiger paläogenetischer Techniken vor, damit sowohl Anthropologen als auch Archäologen die Möglichkeit haben, das Spektrum molekularer Untersuchungen besser verstehen zu können.

Summary

The view that ancient specimens and fossils are little more than only „dead" material is changing. Intense activity is aimed at recovering purported DNA and protein residues from old sample material, and is generating much interest not only among scientists but also in the public. Although recent advances in technology have revolutionized modern molecular biology, some doubt, however, still exists as to whether fossils will generally be an effective repository of biomolecules. For successful future palaeogenetics, molecular biologists and palaeontologists need each other, and much remains to be learnt by both. For example, carefully controlled PCR experiments are a foremost and necessarily important aspect of verification of ancient nucleic acid sequences, but point out that the phylogenetic method and taxonomic determination of a find by morphology is also important in this verification process. Thus, a need to develop a better dialogue is required. We here start this communication between disciplines by providing a catalogue of genetic research techniques such that anthropologists as well as archaeologists gain appreciation for what is and what is not possible in molecular palaeobiology.

Einleitung

Sowohl Archäologen als auch Anthropologen werden zunehmend mit der Tatsache konfrontiert, dass unter bestimmten Voraussetzungen auch die Molekulare Genetik Fragestellungen lösen kann, die vor 15 Jahren ausschliesslich Domäne erstgenannter Disziplinen war. Die Genetik hat sich in den letzten Jahren zu einem sehr potenten Werkzeug entwickeln können und wird trotzdem mit sehr viel Argwohn und Skepsis betrachtet. Ist es doch fast unmöglich für einen rein archäologisch geschulten Wissenschaftler zu beurteilen, was genetisch alles an Informationen erarbeitet und in Folge interpretiert werden kann, wenn man das Methodenspektrum und die Aussagekraft diverser Methodik in der Paläogenetik nicht vollends einzuschätzen vermag. Um diese Problematik zu beseitigen, haben wir im folgenden einen Ansatz gewählt, der es ermöglichen soll, die Methoden und Techniken der molekularen Genetik besser zu verstehen und so ein Gefühl dafür entwickeln zu können, was im Bereich der Paläogenetik machbar ist oder was trotz rasanter Entwicklung methodischer Fortschritte (vorerst) dennoch utopisch bleibt.

Die Methoden, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, stellen eine Mischung aus Techniken dar, die einerseits klassisches Methodenrepertoire beinhalten, anderseits methodisches Neuland aufzeigen und drittens speziell für Fragestellungen auf dem Gebiet der Paläogenetik adaptiert wurden. Die einzelnen Schritte, die jeder Paläogenetiker sein eigen nennt, sollen hier nun kurz vorgestellt werden. Jede Analyse prähistorischer DNA beginnt mit der Einhaltung steriler Kautelen, was einerseits einem „*Overkill*" gleichkommt, andererseits jedem Paläogenetiker als logisches Verständnis mit ins Blut gegeben ist. Der zweite Schritt beschäftigt sich mit der Extraktion authentischer Nukleinsäuren aus diversem Gewebepulver. Verschiedene Autoren schwören auf verschiedene Protokolle, wobei die Wahl doch immer auf ein Rezept fällt, das sich bereits mehrfach bei Proben vergleichbaren Alters als erfolgreich herausgestellt hat. Der nächste Schritt stellt die Visualisierung, Quantifizierung und Interpretation jeglicher Probe dar. Auch hier werden mannigfaltige Rezepte angewendet. Die darauf folgenden Analysen lassen sich - je nach Fragestellung - in diverse Schritte unterteilen: weitergehende Aufreinigung des Isolats, Modifikation (d.h. Verbesserung der Doppelstrangqualität gereinigter Nukleinsäuren, Amplifikation eines bestimmten (d.h. informativen) DNA-Segmentes und schlussendlich die Klonierung und Prozessierung dieser Fragmente in geeignete Vektorsysteme. Die Visualisierung und Interpretation der erhaltenen Ergebnisse wird in der Regel über die Methode der DNA-Sequenzierung bewerkstelligt. Wie auch immer Experimente geplant und durchgeführt werden, sollte man stets daran denken, dass nicht-authentische Ergebnisse produziert werden können. Diese rühren von Kontaminationen mit rezenten Biomolekülen her und sind nur dann erfolgreich als solche zu detektieren, wenn der grösstmögliche Aufwand an Kontrollen auf jeder experimentellen Stufe betrieben wird. Leider war dies im letzten Jahrzehnt nicht immer der Fall. Von unserer Arbeitsgruppe wird daher ein neuer Standard für paläogenetische Analysen angestrebt und im folgenden ausführlich dargestellt.

Prävention im Umgang mit paläontologischen Proben und aDNA

Um mögliche Kontaminationen bei der Entnahme der Proben zu verhindern, sind folgende Sicherheitsmassnahmen zu befolgen: Alle Arbeitsvorgänge werden unter sterilen Kautelen durchgeführt und durch das Tragen von Latexhandschuhen, Mundschutz und Gesichtsmaske gewährleistet. Geräte und Behältnisse, die der Bearbeitung oder Aufbewahrung des Knochenmaterials dienen, werden vor und nach Benutzung in mehreren Reinigungsschritten

(Steinmehl, Azeton, Propan-2-ol) von Resten des Knochenmehls befreit. Durch Bestrahlung mit UVC-Licht über einen Zeitraum von ca. 2 Stunden wird der Arbeitsplatzbereich von DNA-Rudimenten jeglicher Herkunft befreit. Die Dekontamination der benutzten Gefässe und Instrumente geschieht durch zwei Waschgänge mit DNA- und DNase-zerstörenden Substanzen (Scholz/Pusch 1997).

Entnahme und Vorbereitung von Knochenproben

Für DNA-Extraktionen aus vorgeschichtlichen Skelettresten sind nur bestimmte Bereiche des Knochens geeignet (Scholz/Pusch 1997, Pusch/Scholz 1997). Vornehmlich werden Proben aus dem Diaphysenbereich der langen Extremitätenknochen wie *Femur*, *Tibia* oder *Humerus* genommen. Diese bestehen neben dem für die folgende Extraktion ungeeigneten spongiösen Anteil aus fester Knochensubstanz, der *Compacta*. In ihr befinden sich aufgrund der dichten Struktur und unter günstigen Erhaltungsbedingungen organische Bestandteile (hyalines Kollagen), aus denen DNA isoliert werden kann. Die zu entnehmende Gesamtprobe setzt sich aus 2-3 ca. 1-2 cm^2 grossen Knochenstücken zusammen, um erhaltungsbedingte lokale Unterschiede in ausbeutbaren DNA-Mengen auszugleichen. Die Proben werden mittels einer Handfräse entnommen, die ansonsten in der Zahntechnik verwendet wird. Um möglichst exakt arbeiten zu können, muss die Fräse mit einer aufsetzbaren Diamanttrennscheibe bestückt werden. Nach Entnahme wird von allen Seiten etwa 3 mm Knochensubstanz abgeschliffen, um anhaftende Verunreinigungen und anteilige *Spongiosa* aus dem Bereich der *Cavitas medullaris* zu entfernen. Für diesen Zweck muss die Fräse mit einem neuen Aufsatz versehen werden. Die Knochenstücke werden dann mittels einer Schüttelmühle und sterilen Achatmörsern mechanisch zu feinem Mehl zerrieben, um so die grösstmögliche Oberfläche für weitere Lyse- und Extraktionsschritte zu schaffen. Anschliessend wird das Knochenmehl in einem verschraubbaren Gefäss gesammelt. Aus der beschriebenen Probengrösse lassen sich etwa 6-8 g Knochenmehl gewinnen. Alternativ werden die Knochenstücke nach 5-minütiger Inkubation in flüssigem Stickstoff manuell zermörsert und das Mehl in Portionen von ca. 0.1-0.2 g in Eppendorf-Reaktionsgefässe aliquotiert.

Aminosäurerazemisierung

Bevor Funde genetisch bearbeitet werden, sollte zunächst einmal durch Bestimmung der Razemisierung der Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Alanin (Ala) und Leucin (Leu) abgeschätzt werden, ob überhaupt zu erwarten ist, dass noch authentische DNA isoliert werden kann (Poinar et al. 1996). Wenn die eruierten D/L Asp Werte unter 80 x 10^{-3} sind und grösser als die zugehörigen D/L Werte von Ala und Leu sind, so kann einerseits davon ausgegangen werden, dass keinerlei Kontamination mit exogener DNA vorliegt und dass die zu extrahierende DNA für PCR-gestützte Analysen zugänglich sein sollte.

Für die Methode wird ungefähr 1 mg des pulverisierten und getrockneten Knochens bzw. der Weichgewebeprobe in 200 µl 6 N DCl in D_2O (24h/110°C) hydrolisiert, mit 200 µl 1.5 N DCl in CH_3OD (15 min/110°C) und anschliessend mit 100 µl TFAA behandelt (10 min/110°C). Unlösliche Salze anorganischer Herkunft werden weitestgehend durch Eliminieren der TFAA-Lösung entfernt. Die Aminosäurederivate werden in ca. 10 µl Toluol gelöst und werden danach per GCMS analysiert (m/z 156 für Asparaginsäure, m/z 140 für Alanin, m/z 182 für Leucin). Die D/L Verhältniswerte von Asparaginsäure werden direkt von den jeweiligen

Probenpeaks abgelesen. Diese allgemeine Methode der Razemisierungskontrolle ist detailliert beschrieben in Hodges/Smith (1994).

aDNA Extraktionstechniken

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Protokollen für die Isolation von Nukleinsäuren aus vorgeschichtlichen Proben bereitgestellt. Man kann keine der Methoden grundsätzlich favorisieren, da sich deren Erfolg oder Misserfolg an jeder einzelnen Probe messen lassen muss. Abhängig vom Erhaltungszustand der Probe und vor allem von der physikalisch-chemischen Beschaffenheit des umgebenden Substrates werden sich bestimmte Techniken als erfolgreicher herausstellen als andere. Vorhersagbar ist die Erfolgsprognostik einzelner Rezepte nicht; man sollte sie grundsätzlich alle in initialen Testserien testen, bevor man sich für eine bestimmte entscheidet.

Zum besseren Verständnis der im Labor durchgeführten Abläufe wurde auf die Auflistung der einzelnen Komponenten für die Zusammensetzung von Puffern, Medien und Lösungen sowie auf die Angabe von Herstellern von Geräten und Biochemikalien verzichtet. Wir bitten daher den geneigten Leser, die hierfür nötigen Informationen aus dem Appendix zu entnehmen.

Silika/PCI-Technik

Ein etabliertes Rezept für die Extraktion von DNA aus prähistorischen Knochenproben wurde bereits 1993 (Höss/Pääbo 1993) entwickelt und für den aktuellen Gebrauch modifiziert. Hierfür werden 0.5 g Knochenmehl mit 1 ml aDNA-Extraktionspuffer bei 60°C für 1-5 h unter stetigem Schütteln versetzt. Der Ansatz wird bei 4,000 g für 5 min sedimentiert. Vom Überstand werden 500 µl abgezogen, mit 500 µl aDNA-Extraktionspuffer, 40 µl SiO_2-Suspension vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Die darauf folgende PCI-Extraktion wird 3x wiederholt und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Die zuletzt Chloroform-gereinigte wässrige Phase wird mit 0.7 Vol. Propan-2-ol präzipitiert. Der Überstand wird abgegossen und das Pellet 2-mal in 1 ml aDNA-Waschpuffer, 2-mal in 70%igem EtOH, einmal in Azeton gewaschen, bei 56°C getrocknet und in 80 µl TE (pH 8.0)-Aliquots gelöst.

MCM

Ein hocheffizientes und vor allem schnelles Rezept für die Isolierung vorgeschichtlicher DNA bietet die *Mix and Clean*-Methode (MCM) (Scholz/Pusch 1997). In einem Eppendorf-Reaktionsgefäss werden 0.2 g Knochenmehl mit 500 µl Mix I-Puffer, 100 µl Sephadex G-50 und 1 Vol. Phenol versetzt und für 2 min stark gevortext. Um eine effiziente Durchmengung aller Komponenten zu gewährleisten, wird das Reaktionsgefäss für mindestens 2-10 h bei 40°C auf einem Schüttler bei 200 rpm belassen. Die Phasentrennung erfolgt für 5 min bei 12,500 g. Die wässrige Phase wird abgenommen und in neues 1.5 ml-Gefäss überführt. Es folgte ein PCI-Schritt, die wässrige Phase wird mit Propan-2-ol und 20 µg Glykogen präzipitiert. Das DNA-Pellet wird luftgetrocknet und anschliessend in 500 µl Mix I-Puffer resuspendiert. Um anwesende Huminsäuren, Zuckerreste und kollagene Strukturen hinreichend zu beseitigen, werden die PCI-Extraktionen ohne erneute Zugabe von Glykogen - je nach Herkunft der Probe - mehrmals wiederholt. Das DNA-Pellet wird für 15 min in 70%igem EtOH gewaschen, kurz gevortext und erneut für 10 min zentrifugiert. Das Trocknen des Pellets erfolgte langsam bei

RT; anschliessend wird die DNA in 10-15 µl TE (pH 7.5) aufgenommen oder bei -20°C für weitere Anwendungen aufbewahrt.

Kollagenase-Behandlung von Knochenproben

Alternativ zu etablierten Extraktionsmethoden für aDNA existiert eine Methode, die ohne gesundheitsgefährdende PCI-Schritte auskommt (Scholz et al. 1998). Hierfür werden 0.2 U Kollagenase und 1.5 U Dispase in 100 µl PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gelöst und zusammen mit 0.05 g Knochenmehl in einem 1.5 ml-Reaktionsgefäss vermengt. Nach einer 1.5-stündigen Verweildauer bei 37°C auf dem Vortexer werden 20 µl 0.5 M EDTA zugegeben, um die Enzymreaktion zu stoppen. Nach Zugabe von 500 µl Efflux-Puffer wird der Ansatz horizontal auf einem Schüttler fixiert und bei 200 rpm und RT über Nacht belassen. Das Gefäss wird für 30 min bei -80°C eingefroren, bei 50°C im Wasserbad sofort wieder aufgetaut, 40 µl Lysozymlösung zugegeben, kurz gemischt und 5 min bei RT stehengelassen. Es folgt ein 1-2-minütiger Kochschritt, Zentrifugation bei 5,000 g für 30 sec und die Applikation von ca. 1 cm^3 steriler Polymerwatte als Blocker. Nach erneuter Zentrifugation bei 12,500 g und RT für 5 min und Präzipitation des Pellets wird die gewaschene und getrocknete DNA in 10-20 µl TE (pH 8.0) resuspendiert. Im Falle starker Verunreinigung des Pellets kann die gelöste DNA mehrmals über Sephadex G50/Glaswatte-Säulen dekontaminiert werden.

Die Kombination von den eben beschriebenen Methoden (d.h. MCM plus Applikation von Kollagenase Enzym) wurde bereits an einer Vielzahl von Proben mit Erfolg angewendet. Der beeindruckendste Beweis für die Effizienz dieser Protokolle lässt sich durch die erst kürzliche Isolierung fossiler Nukleinsäuren aus dem *Homo neanderthalensis* von Warendorf-Neuwarendorf belegen (Scholz et al. 2000) (Abb. 1).

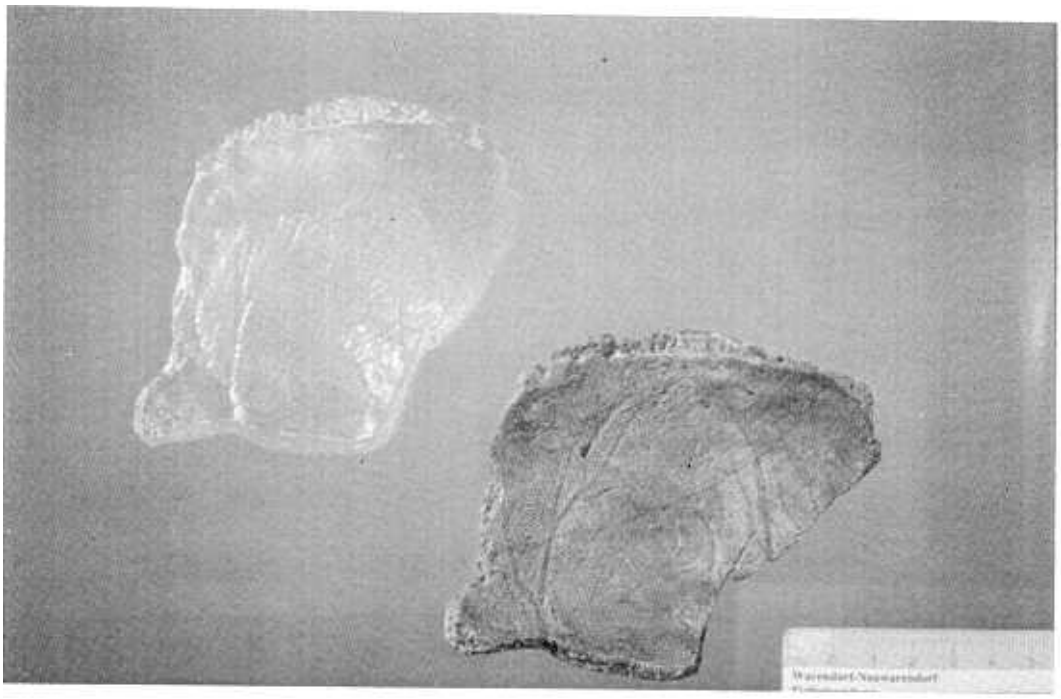


Abb. 1: Sicht auf die Tabula interna des rechten *Os parietale* von Warendorf-Neuwarendorf (Deutschland). Neben dem Original befindet sich eine stereolithograpisch erstellte Kopie des Schädelfragments im Verhältnis 1:1.

SOTA-Preparation

Die Lysis der Knochen-DNA erfolgt bei dieser kostengünstigen Technik in einer Mixtur aus 300 µl Coca-Cola™, 100 µl 0.4 N NaOH, 15 µl flüssiger Gallseife™ und 5 µl 1 M NaCl für 1-14 h bei 45°C auf einem Schüttler (Stufe 4). Nach Zugabe von 1 cm^3 steriler Polymerwatte wird für 15 sec in einer Mikrofuge zentrifugiert, der Überstand durch die Watte hindurch abgenommen und in ein neues 1.5 ml-Gefäss überführt. Das Entfernen der Proteine und Salze erfolgte mit 1 Vol. Chloroform bei 5-minütiger RT-Inkubation auf einem Schüttler. Anschliessend wird für 5 min bei 12,500 g zentrifugiert, um die beiden Phasen voneinander zu trennen. Um eventuelle Kontamination mit der opulenten Interphase zu vermeiden, empfiehlt es sich, erneut Polymerwatte zum Reaktionsgefäss hinzuzugeben und anschliessend für weitere 2 min auf höchster Stufe zu zentrifugieren. Die obere Phase wird in ein neues Gefäss transferiert, für 10 min präzipitiert und bei 12,500 g für 15 min und 4°C pelletiert, gewaschen und in 10-20 µl H_20_{dd} bei 40°C im Brutschrank unter zeitweiligem Fingertippen resuspendiert. Das Verbleiben eines unlöslichen Pelletrestes ist in Einzelfällen möglich. In der Mehrzahl der Ansätze kann auf die Chloroform-Extraktion verzichten werden, was auf den individualspezifischen, z.T. stark variierenden Grad an Verunreinigung zurückführen ist (Scholz/Pusch 1998).

Isolierung von hochgradig degradierten Nukleinsäuren mit hohem Einzelstranganteil

Für die Isolierung von Nukleinsäuren mit hohem Einzelstranganteil hat sich eine Technik etabliert, die ursprünglich für die Extraktion von RNA aus Vollblut oder aus Zellkulturen entwickelt wird (Chomczynski/Sacchii 1987).

In sieben Milliliter suspendiertes Knochenpulver (ca. 2 g) werden mit 3 Vol. Lysispuffer versetzt. Nach einer Ruhephase von 15 min auf Eis und zeitweiligem Konvertieren des Gefässes wird der Ansatz für 12 min bei 1,000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die aDNA-Extraktion wird das Pellet mit 400 µl GITC-Lösung, 400 µl Phenol, 80 µl Chloroform und 40 µl 2 M NaOAc (pH 4.0) versetzt und für eine Minute leicht gevortext. Danach wird der Ansatz 5 min auf Eis belassen und zur Phasentrennung 15 min bei 12,000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 1 Vol. Propan-2-ol präzipitiert, gewaschen und das Pellet getrocknet. Die lyophilisierte aDNA kann entweder in 50 µl 1 mM EDTA (pH 7.0) oder 0.5%igem SDS, gelöst in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H_2O_{dd}, aufgenommen werden.

Nukleinsäure-Modifikation: Reparatur-Mechanismen

Ancient DNA ist ein problematisches Arbeitsmaterial in der Molekulargenetik. Das ansonsten intakte doppelsträngige Makromolekül, in Form einer robusten a-Helix vorliegend, ist weitestgehend fragmentiert, vielfach "angebrochen" und chemisch modifiziert (Abb. 2a). Bei notwendigen Denaturierungsschritten, etwa innerhalb von PCR-Temperaturprofilen zerfallen degradierte Bruchstücke des Moleküls in weitaus kleinere Einheiten (Abb. 2b), die PCR-gestützte Amplifikationen von grösseren Segmenten nicht mehr zulassen. Um aDNA-Rohisolate PCR-tauglich zu modifizieren, führt man mithilfe der Enzyme DNA Polymerase I aus *E. coli* und T4-DNA Ligase eine Reparatur-Reaktion durch (Pusch et al. 1998). Der Ansatz beträgt 50 µl im Gesamtvolumen und beinhaltet 5 µl 10x Polymerase I-Puffer, 2.5 U *E. coli* DNA Polymerase I, 50-1,000 ng aDNA-Isolat und 0.4 mM je dNTP in H_2O_{dd}. Die Reaktion wird bei

37°C für 60-90 min in einem Wasserbad durchgeführt und anschliessend für 20 min bei 70°C inkubiert. Bestehende Stranglücken werden durch den Einsatz von T4-DNA Ligase geschlossen. Für diesen Ansatz werden 50-300 ng polymerasebehandelte aDNA mit 2 µl 10x Ligasepuffer und 0.5 U Ligase Enzym in einem Volumen von 20 µl vermischt. Die Ligasereaktion führt man nach einem Temperaturprofil der *Temperature Cycle-Ligation* für 1 h durch (Pusch et al. 1997). Im Anschluss an beide Reaktionen werden die Proben 3-mal über Glaswatte/ Sephadex G-50 Säulen gereinigt, einer PCI-Extraktion unterzogen und präzipitiert. Nach einem 2-minütigen Waschschritt wird das Pellet luftgetrocknet und in 10-15 µl TE-Puffer (pH 8.0) aufgenommen.

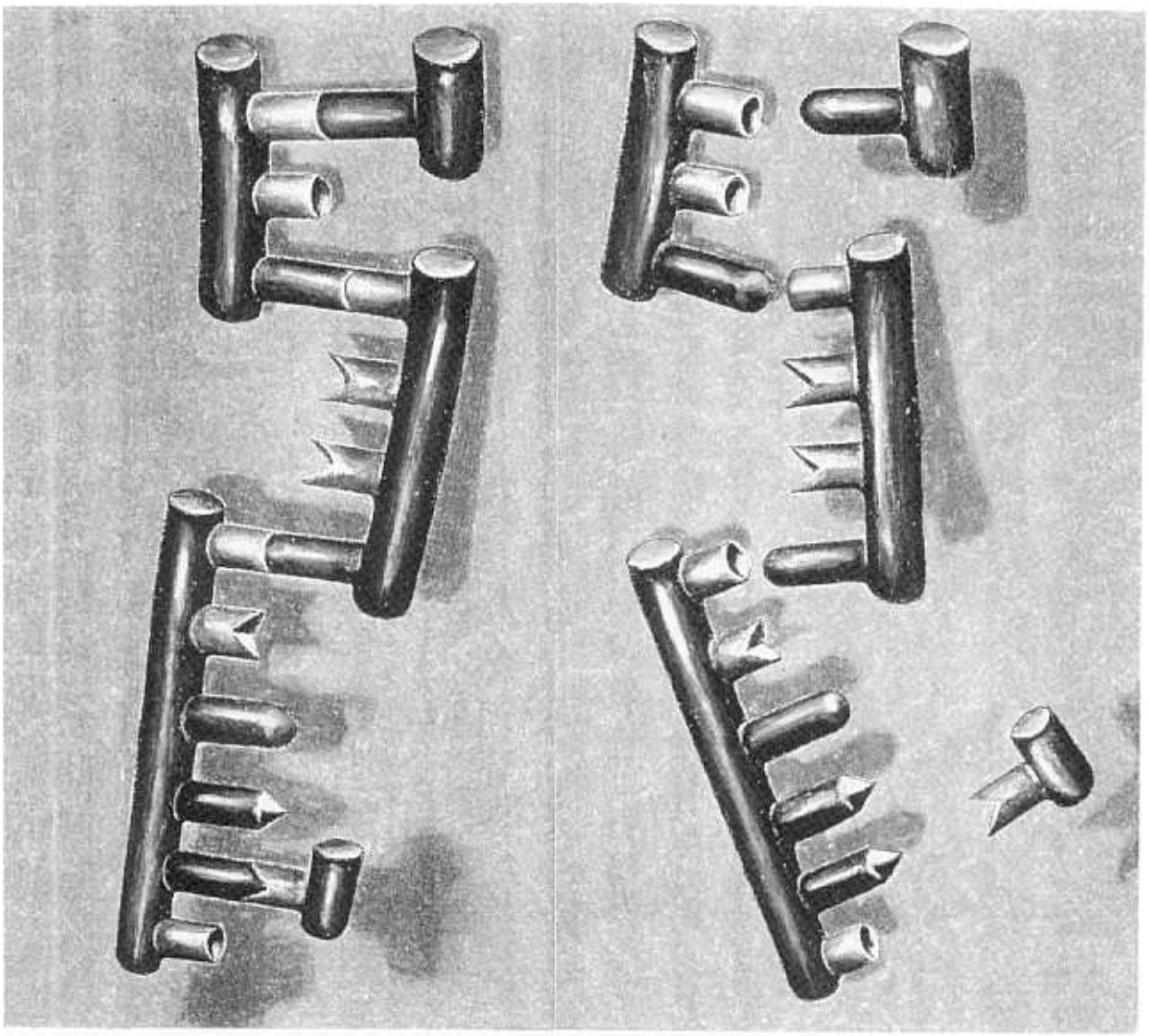


Abb. 2: Problemmaterial aDNA. Schematische Darstellung zur Illustration des Verhaltens von Duplex-aDNA bei Temperatureinwirkung. Abb. 2a: Nativer Zustand alter DNA nach Extraktion aus der *Compacta*. Abb. 2b: Zerfall der Nukleinsäure-Fragmente in kleinere Einheiten nach Einfluss von Denaturierungsprofilen innerhalb von PCR-Reaktionen.

Elektrophoresen

Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese

Hierbei wird das Polysaccharid Agarose verwendet, das aus roten Meeresalgen hergestellt wird. Agarose wird durch Aufkochen in wässrigen Lösungen gelöst und geliert beim Abkühlen, was durch die Ausbildung doppelhelikaler Strukturen, die sich zu Bündeln zusammenlagern und ein dreidimensionales Netzwerk bilden, bedingt ist. Die Porengrösse dieser Matrix ist abhängig von der Konzentration an Agarose (z.B. 1%iges Gel: mittlere Porengrösse von 150 nm). Bei linearen Nukleinsäuren besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der elektrophoretischen Mobilität.

Die Auftrennung von aDNA in der charakteristischen Grössenordnung von ca. 0.05-0.8 kb erfolgt in der Regel in 1-2%igen Agarosegelen. Um sowohl eine Kalkulation der vorherrschenden Fragmentgrössen als auch die Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration durchführen zu können (evtl. inklusive Edaphon DNA), werden den Proben benachbart kommerziell erhältliche Molekulargewichtsstandards parallel mitaufgetragen. Anhand dieser Standards kann eine halblogarithmische Eichgerade erstellt werden, die dann der massstäblichen Bestimmung der exakten Fragmentgrössen dient.

Für die Herstellung des Gels löst man die Agarose in einer Mikrowelle in 1x Puffer (TBE, TAE) auf, lässt die Lösung auf ca. 50°C abkühlen und giesst die flüssige Agarose in eine vorbereitete Gelform. Der Plastikkamm für die Ausbildung der Auftragstaschen wird gesteckt und nach Erstarren des Gels wieder entfernt. Das polymerisierte Gel wird nun in die Elektrophoresekammer eingelegt und der Puffertank mit 1x TBE gefüllt, so dass das Gel von einer 5-10 mm hohen Flüssigkeitsschicht bedeckt ist. Nach Behandlung der Proben- und Marker-DNA mit 1-2 µl Ladepuffer wird zügig Probe um Probe in die Geltaschen appliziert. Die Laufparameter für die Elektrophorese sind abhängig von der Grösse des Gels, der Konzentration des verwendeten Laufpuffers, und der Agarosekonzentration im Gel. Um den Endpunkt der Elektrophorese erkennen zu können, lässt man Farbstoffe im Ladepuffer mit hohen elektrophoretischen Mobilitäten (z.B. Xylencyanol, Bromphenolblau) mit der Probe mitlaufen. Um die Präsenz von Nukleinsäuren für das Auge sichtbar zu machen, muss das Agarosegel für 10 min mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt werden. Alternativ dazu kann man diese Chemikalie auch bereits in die flüssige Matrix applizieren. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert mit einer planaren Gruppe des Moleküls zwischen die benachbarten Basenpaare der DNA (Wenzel/Amman 1991). Nach dieser Reaktion wird das Gel 2-3 mal mit Wasser abgespült und kann dann auf einem UV-Transilluminator durch Detektion der ausgebildeten Ethidiumbromid-DNA-Komplexe betrachtet werden.

Auftrennung von aDNA mit hohem Einzelstranganteil durch Formaldehydgele

Diese Methode eignet sich vorzüglich zur Detektion und Quantifizierung einzelsträngiger Moleküle, wie sie in aDNA-Isolaten mitunter keine Seltenheit sind. Einzelstränge (d.h. ohne komplementären Partner) reduzieren den Erfolg an PCR-gestützten Analyseverfahren um ein Vielfaches. Dieses Phänomen erklärt weitestgehend die Diskrepanz zwischen PCR-Misserfolg und der Visualisierung relativ hoher Konzentrationen an detektierbarer Gesamt-DNA via nativer Agarosegel-Elektrophorese.

Die folgenden Schritte sollten unter einer Abzugshaube durchgeführt werden: Für die Herstellung von 100 ml eines 1%igen Gels mischt man 10.1 ml 1x MOPS-Puffer, 88 ml H_2O_{dd} und 1 g Agarose, löst dies in einer Mikrowelle und lässt es bis zu einer Temperatur von 60-65°C abkühlen. Nachdem man 17-20 ml (1/5tel bis 1/6tel Vol.) 37%ige Formaldehydlösung hinzugefügt und gleichmässig verteilt hat, wird das Gel in eine vorbereitete Gelkammer gegossen und bis zum Erhärten stehengelassen. Der Probenmix für eine Geltasche setzt sich aus 2.5 µl 10x MOPS-Puffer, 3.5 µl 37%iges Formaldehyd, 10 µl deionisiertes Formamid, 2 µl Bromphenolblau, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) und der isolierten Gesamtprobe zusammen. Als Referenzstandard appliziert man 15 µg hitzedenaturierte *E. coli* RNA (16S-, 23S rRNA). Die gelelektrophoretische Separation erfolgt in 1x MOPS-Laufpuffer bei einer Spannung von 90-100 V. Da der Auftragsmix bereits Ethidiumbromid enthält, kann das Gel zur späteren Dokumentation ohne zusätzlichen Färbevorgang sofort unter ultravioletter Bestrahlung betrachtet und fotografiert werden.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit dieser 1985 von dem Chemiker Kary Mullis (Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986) etablierten Methode ist es möglich, relativ schnell und problemlos spezifische DNA-Sequenzen bis zu einer Grösse von maximal 2,000-3,000 bp in vitro zu amplifizieren (bei rezentem *Template*!), d.h. zu vervielfältigen. Benötigt werden hierzu die nach Hitzedenaturierung einzelsträngig vorliegenden komplementären DNA-Abschnitte, die die gewünschte, zu amplifizierende Sequenz enthalten; des weiteren Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), ein Reaktionspuffer und ein an deren flankierenden Bereichen ansetzendes strangspezifisches und im Überschuss vorhandenes *Primer*paar (je ein *Primer* ist zu jeweils einem Strang komplementär), von denen jeder einzelne *Primer* nach Anlagerung an einem der beiden zueinander komplementären Ausgangsstränge (DNA-Matrize) den Startpunkt für das enzymatische Wirken der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* (sog. *Taq*-Polymerase) bildet. Für die Synthese der neu zu bildenden Stränge arbeitet diese Polymerase vom 5´- zum 3´-Ende der DNA, die durch die *Primer* an diesen Stellen partiell doppelsträngig ist. Dieses Enzym, das eine wesentlich höhere Prozessivität gegenüber anderen Polymerasen aufweist, katalysiert somit, ausgehend von der freien 3´-Hydroxygruppe der angelagerten *Primer*, den nukleophilen Angriff auf die 5´-Triphosphatgruppe des nächstfolgenden Nukleotids. Die Amplifikation der DNA wird durch das zeitlich und temperaturmässig genau abgestimmte Hintereinanderschalten von der Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize, der Anlagerung der *Primer* (engl.: „Annealing") und der Synthese des Komplementärstranges (engl.: „Extension") erreicht. Zu der selektiven, exponentiellen, 10^6-10^7-fachen Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz kommt es aber nur deswegen, weil die drei Grundreaktionen automatisiert durch ein PCR-Gerät in ca. 25-40 Zyklen (ca. 4 h Reaktionszeit) wiederholt werden. Das Pipettierschema für ein Safe-Lock-Eppendorfgefäss ist wie folgt: 5 µl 10 x Taq-Polymerasepuffer, 0.2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) (Zugabe erfolgt in der Regel später), 2 µl der 4 dNTPs (je 5 mM), je 1 µl 0,5 µl *Primer* 1 und 2 (10 µM), 0.5-2.0 µl DNA Isolat ad 50 µl H_2O_{dd} werden gemischt. Nach der Denaturierung der DNA für 2 min bei 94°C werden 2 µl (10 Units) *Taq*-Polymerase zugegeben. Es folgt die festgelegte Anzahl der Verdopplungszyklen mit 1 min bei ca. 55°C („Annealing"), 2 min bei 72°C („Extension") und 45 sec bei 94°C („Denaturation"), wobei die „Extension"-Phase des letzten Zyklus 5-10 min dauert. Nach Beendigung der PCR-Reaktion werden ca. 10 µl der Reaktion auf ein 1-4%iges Agarosegel bzw. - bei kleineren Fragmentgrössen - auf ein 6-12%iges Polyakrylamidgel aufgetragen, das nach Beendigung der Laufzeit mit dem interkalierenden Farbstoff Ethi-

diumbromid gefärbt wird, um die Produkte anschliessend unter UV-Bestrahlung analysieren zu können.

Klonierung von PCR-Produkten

Der Erhalt eines DNA-Fragmentes, das über spezifische Oligonukleotide generiert wurde, erlaubt über eine Visualisierung der vervielfältigten Nukleinsäuremoleküle nur die Grössenabschätzung des betreffenden Fragmentes. Weitere Methoden stehen zur Verfügung, die Aufschluss darüber geben können, ob dieses Fragment in der Tat denjenigen DNA-Sequenzinhalt besitzt, der erwartet wird. Diese Techniken werden in diesem Aufsatz später behandelt (siehe Kapitel „DNA/DNA Hybridisierungen"). Um die Basenabfolge des PCR-Produktes erhalten zu können, kann das Fragment nicht nativ sequenziert werden. Dies ist darin begründet, dass Amplifikate, die aus degradierter DNA hergestellt wurden, in der Regel eine Population leicht bis signifikant unterschiedlicher Sequenzen darstellt. Dies lässt sich aus der zerstörten Doppelstrangmorphologie des Erbmoleküls erklären, die zudem noch mannigfaltig chemisch modifiziert vorliegen kann. Ein Umweg muss daher über die Methode der DNA-Klonierung gemacht werden und ermöglicht, dass ein repräsentativer Auszug unterschiedlicher Moleküle einzeln begutachtet werden kann. Die Summe der einzeln begutachteten und sequenzierten Basenabfolgen ergibt dann nach algorithmischer Extrapolation die wahrscheinlichste Sequenz, die sogenannte Konsensussequenz.

Die einzelnen Schritte lassen sich wie folgt beschreiben: Die erhaltenen PCR-Produkte müssen aus der respektiven Gelmatrix isoliert und aufgereinigt werden, damit sie für die Einbringung (Ligation) in Trägermoleküle (Vektoren) bereitstehen. Diese neuen Konstrukte (Rekombinanten) werden in geeignete Wirtszellen (z.B. Bakterien) eingeschleust (Transformation); diese werden unter Selektionsdruck kollektiv, dann einzeln vermehrt, und in Folge deren DNA isoliert. Der Vorteil dieser Methode besteht weiterhin auch in der Tatsache, dass man die urprünglichen PCR-Produkte „immortalisiert" hat, da man sie in ein „lebendiges System" eingeschleust hat.

Zentrifugationsgetriebene Nukleinsäureisolierung aus Agarosegelen

Die von Heery et al. (1990) entwickelte Methode ist gegenüber den bis dato etablierten Techniken zur DNA-Isolierung aus Agarosegelen, wie z.B. Elektroelution (Perbal 1984), Squeeze Freeze-Verfahren (Sealey/Southern 1989), eine äusserst einfache und schnelle Technik, bei der vor allem zeitaufwendige Reinigungsschritte (PCI, repetierte Alkoholreihen etc.) entfallen. Trotz teilweise geringer Ausgangskonzentrationen der im Gel elektrophoretisch aufgetrennten DNA (z.B. 20 ng) wird eine bis zu 90%ige Ausbeute erzielt (Heery et al. 1990). Der Nachteil dieser Methode besteht in der groben Behandlung der Nukleinsäuren durch Scherkräfte bei der Zentrifugation, die eine Qualitätsminderung isolierter Fragmente darstellt.

Der erste Schritt ist die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes auf 1.5-2.0%igen Agarosegelen. Nach Färbung des Gels und Detektion der gewünschten Bande folgt das Ausschneiden des Agarosestückchens mittels Skalpell, das die gewünschte Bande enthält. Falls die weitere Bearbeitung der DNA nicht sofort erfolgt, kann der Agarosequader problemlos in einem geschlossenen 1.5 ml-Eppendorftube bei -20°C weggefroren werden.

Für die Isolierung der DNA aus der Agarose wird der Boden eines 0.5 ml-Eppendorfhütchens mit einer Kanüle durchstossen und das untere Viertel mit silanisierter und sterilisierter Glaswolle manuell gestopft. Das Gelstück wird in das vorbereitete 0.5 ml-Hütchen überführt, das in ein 1.5 ml-Eppendorfhütchen gesteckt und dann für 10 min bei 6,000 rpm zentrifugiert wird. Bei kleinen Eluatvolumina (abhängig von der Grösse des vorher geschnittenen Agarosestückchens) kann die Konzentration der isolierten DNA direkt auf einem UV-Transilluminator anhand einer definierten Referenzprobe gemessen und die DNA sofort für geplante Experimente eingesetzt werden. Falls das Eluat ein Volumen von ca. 20-30 µl übersteigt, wird mit 2 Vol. $EtOH_{abs}$ gemischt, 10 min bei -70°C gefällt und die DNA für weitere 10 min in der Eppendorfzentrifuge pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgt das 2-minütige Waschen mit 70%igem EtOH und ein anschliessender Zentrifugationsschritt von 10 min bei 15,000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge. Das Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und in 5-20 µl TE-Puffer (pH 7.6) aufgenommen. Von dieser Präparation werden 1-5 µl zur Konzentrationsbestimmung auf ein schnelles Minigel aufgetragen und analysiert.

Isolierung von PCR-Produkten mittels Invers-Säulen

In jüngster Zeit wurde eine qualitativ hochwertige (d.h. schonende) Extraktionstechnik entwickelt, die sowohl für die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose- als auch aus Polyakrylamid-Gelen geeignet ist (Pusch 1997a). Dazu wird ein fragmentiertes Gelstück (> 10 ng DNA) in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäss transferiert. Parallel wird eine frisch angesetzte Stammlösung (10 mg/ml) aus Waschmittelpulver (z.B. Dalli™, Sunil™, Omo™, Persil™, Dash™) und H_2O_{dd} hergestellt. Von diesem Extraktionsmix werden 300 µl dem Reaktionsgefäss hinzugeführt. Um die Diffusion der DNA aus den Gelfragmenten zu erleichtern, wird das Gefäss auf einer rotierenden Plattform bei 60°C, 15 min und 250 rpm arretiert. Um die Invers-Säulen zu konstruieren, wird die Suspension mit ca. 1 cm^3 sterilisierter Polymerwatte, 300 µl trockener Sephadex G50-Lösung und einer weiteren Lage von Polymerwatte belegt. Diese Schichtung wird für 5 min bei 11,500 g in einer Mikrofuge zentrifugiert. Der Überstand wird mittels einer Mikropipette aspiriert. Die Präsenz der Watte verhinderte jegliche Kontamination der extrahierten DNA mit anwesendem Sephadex, Polyakrylamid oder Agarose. Anschliessend wird die DNA mit 20 µg tRNA präzipitiert und in Folge gewaschen. Das Pellet wird luftgetrocknet und in 15 µl H_2O_{dd} gelöst.

Ligationen

Die Ligation der isolierten DNA-Fragmente in linearisierte Vektoren (Plasmide) mit einem sogenannten „T-*Overhang*" erfolgt über Nacht in 1x Ligasepuffer in einem 20 µl Reaktionsvolumen mit 0.5 U T4 DNA-Ligase bei 14°C. Routinemässig werden 0.05 µg Vektor-DNA eingesetzt, bei einem molaren Verhältnis der Enden von Insert zu Vektor von 4:1. Im Falle von schwach-effizienten Ligationen wird die weitaus effektivere Reaktion der *Temperature Cycle-Ligation* (TCL) gewählt (Pusch et al. 1997). Der Reaktionsmix wird in einer Biometra PCR-Maschine für mehrere Stunden diversen Temperatur-Zyklen zwischen 10°C und 30°C ausgesetzt. Die niedrigere Temperatur favorisierte die Verknüpfung der DNA-Stränge, die höhere wirkte sich positiv auf die Interaktion von Enzym und DNA-Enden aus. Verglichen mit Standardinkubationen unter Anwendung einer sogenannten Kompromisstemperatur resultiert der TCL-Ansatz in einer höheren Anzahl an ligierten Molekülen und bedingt so eine erhöhte Transformationseffizienz (Tab. 1). Die Ligationsprodukte stehen hiermit für die Ein-

bringung in Bakterien bereit, die speziell für diese Applikation vorbehandelt werden (d.h. kompetent gemacht werden).

Tab. 1: TCL-Temperaturprofil.

Stufe	Temp.	Zeit	Zyklen	
0	22 °C	10 min		
1	16 °C	10 min	3x	1→0
2	4 °C	20 sec		
3	27 °C	20 sec		
4	13 °C	20 sec	40x	4→2
5	4 °C	20 sec		
6	16 °C	1 h	2x	6→0
7	22	1 h		
8	18 °C	2 h		
9	4 °C	unbestimmt		

Zellkompetenz durch die $CaCl_2$-Methode

Die Vorbereitung des Bakteriums *E. coli* für die Transformation mit Ligationskonstrukten erfolgt am einfachsten nach der $CaCl_2$-Methode (Mandel/Higa 1970, Cohen et al. 1972, Dagert/Ehrlich 1979). Die Herstellung der kompetenten Zellen, die fähig sein sollen, Ligationsprodukte inkorporieren zu können, wird folgendermassen durchgeführt: mit einer Einzelkolonie von *E. coli* werden 5 ml 2x TY-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Mit 0.2 ml dieser Übernachtkultur werden 25 ml 2x TY-Medium angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} = 0.3 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wird 10 min in Eiswasser gekühlt, bevor die Zellen geerntet werden (5 min, 4°C, 1,500 g). Das Zellpellet wird in 10 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$-Lösung suspendiert und die Suspension 15 min in Eiswasser gekühlt. Die Zellen werden erneut abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 0.1 M $CaCl_2$ und 0.5 ml 50%igem Glyzerin suspendiert. Die Zellsuspension wird 1 h auf Eis gestellt und dann in 200 µl-Portionen aliquotiert, die bis zu ihrem Gebrauch bei -70°C gelagert werden.

Transformation von *Escherichia coli*

Hierfür werden 50-100 µl kompetente Zellen (je nach Kompetenzniveau) mit maximal 10 µl rekombinanter DNA bzw. Ligationsansatz (0.01-0.5 µg DNA) gemischt und für 30 min auf Eis belassen. Der Transformationsansatz wird 1 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert, 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 ml vorgewärmtem (37°C) SOC-Medium aufgefüllt. Es folgt eine Inkubation bei 37°C für 60 min auf einem horizontalen Schüttelinkubator, um die erworbenen Resistenzgene zur Expression zu bringen. 10-150 µl der Suspension werden in der Regel auf LB/Ampizillin und/oder Kanamyzin-Agarplatten (siehe Genotyp der Plasmide) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Passagieren und Konservieren von Bakterienklonen

E. coli Stämme und Klone werden in Flüssigkultur über Nacht bei 37°C auf einem Rund-

schüttler gezüchtet. Transformierte Bakterien werden grundsätzlich unter antibiotischem Selektionsdruck gehalten. Für die mittelfristige Stammhaltung werden die Bakterien als Verdünnungsausstriche auf Agarplatten angezogen, bei 4°C aufbewahrt und alle 4-6 Wochen überimpft. Zur längerfristigen Lagerung werden Bakterien aus Flüssigkultur bei 4°C und 1,500 g abzentrifugiert, in frischem Flüssigmedium mit 50% Glyzerin resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Rekombinantenisolierung aus Bakterienzellen

Auch für diesen Schritt stehen mehrere Protokolle zur Verfügung, die sich nur minimal in den Parametern Schnelligkeit, Ausbeute und Nukleinsäurequalität voneinander unterscheiden. Für eine darauf folgende DNA-Sequenzierung sind die so hergestellten Nukleinsäuren daher gleichermassen geeignet.

Plasmid-Isolierung mittels alkalischer Lyse

Die alkalische Lyse (Birnboim/Doly 1979) wird bei der Schnellisolierung von Plasmiden angewendet: 1.5 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienkolonie beimpft. Die Zellen werden über Nacht angezogen und bei 4°C und 1,500 g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 100 µl Birnboim-Doly I-Lösung suspendiert. Die Suspension wird mit 200 µl Birnboim-Doly II-Lösung versetzt, auf dem Vortexer gemischt, 5 min auf Eis gestellt, mit 150 µl Birnboim-Doly III-Lösung versetzt, sofort geschüttelt und 5 min auf Eis gestellt. Anschliessend wird das Präzipitat pelletiert (5 min, 4°C, 10,000 g) und der klare Überstand in ein neues Gefäss überführt. Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe von 800 µl EtOH ausgefällt und zentrifugiert (10 min, 4°C, 10,000 g). Das Pellet wird mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

Für grössere DNA-Präparationen werden die Kultur- und Puffervolumina entsprechend angepasst. Um den Reinheitsgrad der DNA, z.B. für den Einsatz in der Klonierung oder zur Sequenzierung zu erhöhen, kann nach dieser Präparation noch eine Aufreinigung der gewonnenen Plasmid-DNA mit Hilfe von Silicasäulen (z.B. Qiagen) vorgenommen.

CTAB-Präparation

Zur Charakterisierung und Sequenzierung von Transformanten hat sich eine Minipräparation bewährt, die aus 3-10 ml Vorkultur eine hohe Ausbeute und Qualität an isolierter DNA garantiert (Del Sal et al. 1989). Fünf Milliliter TB-Medium (inkl. Antibiotikum) werden angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden für 5 min bei 1,500 g sedimentiert und in 600 µl $STET_{CTAB}$ suspendiert. Zum Ansatz werden 10 µl Lysozym-Stammlösung hinzupipettiert, für 2 min bei RT inkubiert und anschliessend für 45-60 sec gekocht. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12,500 g wird das kissenförmige Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entnommen. Zum Überstand gibt man 10 µl RNase A-Stammlösung, inkubiert für 20 min bei 65°C, fügt dann 30 µl 5%ige CTAB-Lösung hinzu und lässt den Ansatz 10 min bei RT stehen. Der Zentrifugationsschritt wird wiederholt und das Pellet in 300 µl 1.2 M NaCl resuspendiert, die DNA gefällt, gewaschen und in 30 µl H_2O_{dd} gelöst.

Minilysatprozedur

Diese Technik ist das Mittel der Wahl, um eine grosse Anzahl von Klonen (30-80) effektiv aufzuarbeiten (Holmes/Quigley 1981). Bakterienkolonien werden mittels Impföse oder sterilen Zahnstochern in 0.5-1 ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank belassen. Nach einminütigem Abzentrifugieren in der Eppendorf-Zentrifuge (v_{max}) wird das Pellet in 30 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 3 µl Lysozym für 1 min bei 100°C im Kochwasserbad inkubiert. Es folgt das erneute Abzentrifugieren für 5 min in der Eppendorf-Zentrifuge (v_{max}). Der Überstand wird mit 1 Vol. Propan-2-ol gefällt und anschliessend nochmals für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 µl TE-Puffer (pH 8.0) resuspendiert und der Restalkohol für 5 min bei 50°C abgeraucht. Mit dieser Prozedur kann eine Ausbeute von ca. 1-2 µg DNA pro Ansatz erzielt werden.

TENS-DNA Isolierung

Das schnellste Rezept mit der geringsten Anzahl an Arbeitsschritten stellt die TENSprep dar (Zhou et al. 1990). In einer Mikrofuge werden die entsprechenden Kulturen bei V_{max} für 10-30 sec zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, ein LB-Rest verbleibt aber im Reaktionsgefäss. Das Pellet wird durch kräftiges Vortexen resuspendiert. Es werden 300 µl TENS Lösung hinzugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur (RT) für 10 sec gevortext. Es werden anschliessend 150 µl 3 M NaOAc (pH 5.2) hinzugefügt und das Gemisch bei RT für 10 sec gevortext. Es schliesst sich ein Zentrifugationsschritt von 2 min in einer Mikrofuge an. Der Überstand wird dann in eine neues *Tube* überführt, 900 µl eiskalter 100%iger EtOH hinzugegeben und sorgfältig gemixt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation in einer Mikrofuge wird das Pellet in 30 µl TE Puffer oder sterilem Wasser gelöst. Beide Lösungen sollten eine RNase A-Konzentration von 100 µg/ml besitzen.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die jetzt folgenden Schritte in der Hybridisierung oder für die Sequenzierung ist es notwendig, dass eine exakte Mengenbestimmung der vorrätigen DNA durchgeführt wird. Konzentrationsbestimmungen von rekombinanter DNA und Oligonukleotiden erfolgt über photometrische Messungen bei 260 nm (Ausubel et al. 1994). Dabei entspricht die Absorptionseinheit (OD) 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer Oligonukleotid-Konzentration von 33 µg/ml. Für genauere Bestimmungen der Oligonukleotid-Konzentration wird folgende Berechnung angestellt:

Konzentration [nmol/µl] = E_{260nm} x Verdünnung / (n_A x 15.4 +n_G x 11.7 + n_C x 7.4 + n_T x 8.7), wobei $n_{A,,G,C,T}$ die Anzahl der jeweiligen Basen in einem Oligonukleotid beinhaltet.

Um DNA-Konzentrationen und eventuelle Verunreinigungen in aDNA-Isolaten visualisieren zu können, werden in der Regel *Wavelength Scanning*s über einen Bereich von λ = 240-500 nm durchgeführt. Die *Wavescan* Einstellungen werden so gewählt, dass keine Hintergrundreduktion während der Messung erfolgt und die *Scanning* Intervalle von 0.5 nm in *Slow Speed* Option während der Detektion gemessen werden. Die Konzentrationsbestimmung von aDNA Molekülen über obig genannte Methoden durchzuführen, ist allerdings nicht zulässig. Die messbaren Werte, die sich ergeben, sind in der Regel viel zu hoch (bis zu 15 µg/µl) und stehen somit auch in keiner Korrelation zu den geschätzten Konzentrationen, die sich nach In-

spektion eines aDNA-Isolats auf einem niedrigprozentigen Agarosegel ergeben. Dieses Phänomen mag nicht zuletzt mit dem hohen Grad an inter- und intramolekularer "Vernetzung" assoziiert sein, das sogenannte Pseudo-hochmolekulare Netzwerke vorgaukelt (z.B. Maillard Reaktionsprodukte).

Sequenzierung von Nukleinsäuren

Da der Informationsgehalt der DNA durch die Abfolge der verschiedenen Nukleotide bestimmt ist, ermöglicht erst die vollständige Sequenzanalyse eines DNA-Fragmentes die Feststellung der Authentizität und die Interpretation der untersuchten Probe. Methoden zur Sequenzierung von Nukleinsäuren existieren schon länger, allerdings wurden schnelle und vor allem reproduzierbare Sequenzanalysen erst seit Ende der siebziger Jahre entwickelt. Fast zeitgleich wurden zwei verschiedene Methoden etabliert, (i) die Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) in Grossbritannien und (ii) die chemische Abbaumethode von Maxam/Gilbert (1977) in den USA. In der heutigen Zeit hat sich allerdings nur die erstgenannte Technik effizient und auch automatisiert etablieren können. Wichtigste Voraussetzung für die DNA-Sequenzanalyse ist die Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen in Polyakrylamidgelen, so dass Längenunterschiede von nur einem Nukleotid aufgelöst werden. Eine solche Trennschärfe wird in Gelen von 30-80 cm Länge und einer Dicke von 0.1-0.3 mm in vertikalen Elektrophoresesystemen erreicht. Um die exakten Längen der Einzelstränge zu bestimmen, werden die Proben vor der Elektrophorese in Formamid-Puffer denaturiert. Während der Elektrophorese verhindert eine hohe Harnstoff-Konzentration im Gel, dass die DNA-Einzelstränge wieder renaturieren.

Sangers Prinzip beruht darauf, DNA in Gegenwart geringer Konzentrationen sogenannter Terminatoren zu synthetisieren (Sanger et al. 1977). Die dabei entstehenden neuen DNA-Fragmente werden dann auf Polyakrylamidgelen aufgetrennt. Ketten-Terminatoren sind Didesoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs), die sich von den gewöhnlichen Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) darin unterscheiden, dass sie keine 3´-OH Gruppe am Zuckerrest besitzen. Wird ein ddNTP von der DNA-Polymerase als Substrat verwendet, kann die Nukleinsäure-Kette an dieser Position nicht weiter verlängert werden.

Taq Cycle-PCR mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden

Die *Taq Cycle*-Sequenzierung wird mit dem DyeDeoxy Cycle Sequencing Kit Biosystems bzw. BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit Biosystems durchgeführt. Hierfür werden ausschliesslich Plasmid-DNAs verwendet, die über eine der obig genannten Präparationen hergestellt und/oder über Qiagen-Tips aufgereinigt worden sind. 200-300 ng DNA und 10 pmol *Primer* werden mit 2.0 µl BigDye Terminatoren-Mix versetzt, mit sterilem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen gebracht, und im *Thermocycler* 25 Reaktionszyklen bei 94°C für 15 sec, 50-55°C für 15 sec und 60°C für 4 min durchgeführt. Die Proben werden mit 75%igem Isopropanol gefällt, zweimal mit 80%igem EtOH gewaschen und anschliessend in 3 µl Ladepuffer aufgenommen.

Polyakrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) für die Sequenzierung

In Polyakrylamidgelen werden DNA-Fragmente in einem Bereich von 20 bis 800 bp aufge-

löst. Die Nachweisempfindlichkeit ist damit erheblich höher als bei hochprozentigen Agarosegelen und eignet sich daher als denaturierende Polyakrylamidgel-Elektrophorese-Applikation vorzüglich für die Sequenzierung (Detektion von Einzelbasenunterschieden) von Nukleinsäuren. Die Herstellung des Geles erfolgt mit Hilfe einer Reihe niedermolekularer Substanzen (Akrylamid, N,N′-Methylen-bisakrylamid, Tetramethylendiamin (TEMED), Ammoniumperoxodisulfat (APS)). Das in Wasser gelöste APS bildet freie Radikale, die auf die Akrylamid-Moleküle übertragen werden und zur Polymerisierungsreaktion führen. Diese basiert auf der Vernetzung der langen Polyakrylamidketten durch N,N′-Methylen-bisacrylamid. TEMED dient hierbei als Katalysator der Reaktion. Die Grösse der Poren im Gel wird durch zwei Parameter bestimmt, (i) der Akrylamid-Konzentration pro Volumeneinheit des Reaktionsmediums, und (ii) dem Grad der Vernetzung, d.h. der applizierten Menge an N,N′-Methylen-bisacrylamid. Die mittlere Porengrösse derartiger Gele beläuft sich auf 0.2-0.5 nm.

Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Proben erfolgt am Applied Biosystems 377 XL DNA Sequenzierer. Die benutzten Chemikalien müssen frei von Fluoreszenzverunreinigungen sein. Zur Auftrennung der Sequenzier-Proben wird eine Vertikalelektophorese-Apparatur benutzt. Die Glasplatten werden vor dem Giessen des Gels mit Repel-Silane behandelt, um (i) beim Giessvorgang Luftblaseneinschlüsse zu vermeiden und um (ii) nach dem Lauf ein leichtes Ablösen des Gels von der Glasplatte zu gewährleisten. Es wird ein 8%iges Harnstoff/Polyakrylamid-Gel verwendet: 50 ml Gel-Lösung werden entgast, mit 25.6 µl TEMED und 190 µl 10%iger APS-Lösung vermischt und sofort zwischen die Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisierung des Gels wird ein 30-minütiger Vorlauf bei 40 W durchgeführt. Währenddessen werden die DNA-Proben 3 min bei 93°C denaturiert, auf Eis gestellt und je 1.5-3 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 30 W für 11 h mit 1x TBE als Laufpuffer. Die Analyse der Proben erfolgt mit Hilfe des Applied Biosystems Software Paketes „Sequencing Analysis Version 3.3".

Nukleinsäure-Charakterisierung über Datenbanken

Sequenzabgleiche, Homologiesuchen und Multisequenzvergleiche werden mit dem HUSAR-Programm unter Verwendung des GCG-Programmpakets in *GenBank/EMBL/hgmp*-Datenbanken vorgenommen. Die Wahl zu benutzender Algorithmen wird aufgrund jedweder spezifischer Fragestellung im einzelnen entschieden werden müssen. Vektorflankenerkennung und multiple Vergleiche von homologen DNA-Sequenzen werden am effizientesten mit dem Programm DNAStar von USA Lasergene durchgeführt. Selektives Oligonukleotid-*Designing* für PCR-*Primer* wird in der Regel am einfachsten mit Oligo 5.0 von National Bioscience bewerkstelligt.

DNA/DNA-Hybridisierungen

Dieser Abschnitt soll sich mit alternativen Techniken befassen, die ebenfalls Informationen bereitstellen können, wenn es um die Feststellung der Authentizität alter DNA geht; oder aber auch um die spezifische Sequenzkompostion bzw. Basenabfolge von nativen oder klonierten PCR-Produkten. Die Techniken eignen sich aber auch für die Identifizierung und Interpretation der rohextrahierten aDNA per se.

Hierfür werden gel-separierte Nukleinsäuren auf positiv geladene Trägermembranen aus Nylon transferiert und in Folge fixiert. Diese Membranen stellen somit ein identisches - und

quasi immortales - Abbild des korrespondierenden („kurzlebigen") Geles dar. Diese Matrix wird in Folge mit einer der Fragestellung entsprechenden Nukleinsäuresonde hybridisiert, die bei positiver Reaktion eine Schwärzung auf aufgelegten Röntgenfilmen hervorruft, falls die Methode der Autoradiographie zur Signaldetektion gewählt wird.

Transfer-Techniken

Southern Blot: Alkali-*Blot* für Agarosegele

Gelelektrophoretisch separierte DNA-Fragmente werden nach einer methodischen Kombination von Southern (1975) und Reed/Mann (1985) auf Nylonmembranen transferiert. Das Agarosegel wird nach Elektrophorese unter leichtem Schütteln 15 min in 0.25 N HCl und anschliessend 30 min in Denaturierungslösung inkubiert. Drei Lagen Whatman 3MM Papier werden mit 0.4 N NaOH befeuchtet und als Brücke benutzt. Darauf wird das Agarosegel gelegt und mit einer positiv geladenen grössenidentischen Nylonmembran abgedeckt, die ebenfalls in 0.4 N NaOH äquilibriert wird. Eingeschlossene Luftblasen werden sorgfältig entfernt. Es folgen ein trockenes Whatman Papier, ebenfalls von Gelgrösse, und eine 8-15 cm dicke Schicht aus saugfähigem Papier. Der Aufbau wird schliesslich mit einer Glasplatte (0.5 x 20 x 30 cm) beschwert. Um einen etwaigen Flüssigkeitsverlust zu vermeiden, wird der untere Teil des *Blot*-Apparatur mit Parafilm abgedeckt. Das Gel wird mindestens 6 h *geblottet*, die Membran für 1 min mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6.5) gewaschen und für 1-2 h luftgetrocknet. Die DNA geht im alkalischen Milieu mit der positiv geladenen Membran eine kovalente Bindung ein und muss daher nicht mehr fixiert werden.

AP Blot: Hitzedenaturierungs-*Blot* für native Polyakrylamidgele

Diese Technik sichert einen effizienten und schnellen Transfer kleiner DNA-Fragmente (0.05-1.0 kb) von Polyakrylamidgelen zu Nylonmembranen (Pusch 1997b). Das Gel wird nach UV-Begutachtung mit einem 3MM Whatman Papier bedeckt (auf jeder Seite 3-5 cm überlappend) und bis zur vollständigen Adsorption nicht berührt. Diese Schichtung wird vom UV-Transilluminator abgezogen und auf zwei neue 3MM Whatman Papiere mit den Massen 20 x 20 cm plaziert. Dieses *Sandwich* wird in einer Mikrowelle bei 600-700 W für 20 sec, und sofort danach in einem *UV-Crosslinker* bei 0.2 J/cm^2 für 3 min inkubiert. Anschliessend kann nach dem beschriebenen Aufbau für alkalinen Passiv-Blot (Southern 1975) verfahren werden. Als Transfer-Puffer für das 3-5-stündige Blotten wird allerdings H_2O_{dd} verwendet.

Northern Blot Technik bzw. aDNA Einzelstrang-*Blotting*

Im Prinzip verfährt man beim Aufbau einer Northern Blot-Apparatur (hier: Transfer von aDNA mit hohem Einzelstranganteil) in der gleichen Art und Weise, wie es für einen Southern Blot vorgeschrieben ist. Die Unterschiede beschränken sich im wesentlichen darauf, dass man den 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6.5 (beim Southern Blot zur späteren Neutralisierung der Membran) bereits als Äquilibrier- (2mal 5 min) und Transferlösung benutzt, da sowohl Depurinierungs- als auch Denaturierungsschritte bei Einzelsträngen entfallen. Die Membran kann weiterhin unter UV-Bestrahlung auf einen kompletten Transfer der Moleküle überprüft und anschliessend fotografiert werden (Fourney et al. 1988).

Herstellung von Dot Blot-Filtern

Auch hier gilt die Regel, dass die Filterbearbeitung nur mit Handschuhen durchgeführt werden sollte, um ein Blockieren der Membran durch z.B. Lipide und lipidähnliche Substanzen zu vermeiden. Ein Nylon-Filterstück wird für die geplante Anzahl aufzutragender DNA-Dots passend zurechtgeschnitten und an den zukünftigen Auftragsstellen mit Kugelschreiber unterstrichen oder durch Umkreisen kenntlich gemacht. Mittels einer Pasteurpipette wird ein Tropfen 1 M NaOH punktförmig auf jede so markierte Stelle plaziert, wobei darauf zu achten ist, dass die einzelnen NaOH-Tropfen auf der Membran nicht ineinanderlaufen. Ohne die zur Denaturierung nötige Natronlauge antrocknen zu lassen, werden ungefähr je 50 ng der für die spätere Hybridisierung gewünschten DNA hinzugefügt. Nach einer Dauer von 5 min, in der das Gemisch in die Membran weitestgehend eintrocknet, trägt man erneut einen Tropfen 1 M NaOH auf die bezeichneten Dotpunkte des Filters, der dann nach weiteren 2 min bei 1200 kJ/ cm^2 gecrosslinkt wird. Der Filter ist nun bereit für die Prähybridisierungsreaktion.

Sondenherstellung: Markierung von Nukleinsäuren

Bei der nicht-radioaktiven Markierung werden Biotin- oder Digoxigenin-markierte Nukleotide verwendet. Biotin bindet z.B. mit hoher Affinität an Streptavidin, das über eine oder mehrere Antikörperkopplungen enzymatisch oder über die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert werden kann. Die nicht-radioaktive Markierung von Nukleinsäuren hat sich in der Molekulargenetik nicht erfolreich durchsetzen können, da sie einen grösseren Zeitaufwand darstellt und nicht annähernd vergleichbare Ergebnisse bietet, wie man es von der radioaktiven Markierung kennt.

Radioaktiv markierte Sonden werden in der Regel über den Einbau von ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S oder ^{3}H markiert. Am häufigstens findet das Phosphor-Isotop ^{32}P in der molekulargenetischen Analyse Anwendung. ^{32}P emittiert hochenergetische β-Strahlung, ist jedoch mit einer Halbwertszeit von 14.3 Tagen relativ instabil. Für manche Anwendungen ist es deshalb sinnvoller, z.B. ^{35}S oder ^{33}P markierte Nukleotide zu verwenden, da sie durch die geringere Strahlungsintensität eine höhere Auflösung ermöglichen (z.B. bei der radioaktiven DNA-Sequenzierung).

Markierung von Duplex-DNA durch *Random Priming*

Zur radioaktiven Markierung von DNA > 150 bp wird die Methode des *Random Priming* angewendet (Feinberg/Vogelstein 1989). Dabei wird eine Mischung aus Hexanukleotid-Primern als Initiation der Markierungsreaktion mit Klenow-Enzym (grosses Fragment) benutzt. Die benutzen Primer repräsentieren ein chemisch synthetisiertes Gemisch aller denkbaren Oligonukleotide mit einer Länge von sechs bis neun Basen (z.B. Gassen et al. 1987). Nachdem sich die *Primer* angelagert haben, erfolgt die Markierung der DNA über die katalytische Wirkung der grossen Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E.coli* (Tab. 2). Die Elongation der DNA erfolgt mit der sukzessiven Aneinanderreihung der zu der Matrize komplementären Nukleotide, von denen eines der vier dNTPs mit dem radioaktiven α-^{32}P markiert ist.

Tab. 2: Random Priming Reaktionsansatz.

DNA, hitzedenaturiert	10	ng
Hexanukleotid-Primer	100	ng
DTT	5	mM
dCTP	0.25	mM
dGTP	0.25	mM
dTTP	0.25	mM
Klenow-Fragment	2	U
10x Puffer	2	µl
α-^{32}P-dATP (37 Mbq/ml)	4	µl
H_2O_{dd}	ad 20	µl

Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert.

3´-terminale Oligonukleotid-Markierung durch Terminale Transferase

Oligonukleotide werden an ihrem 3´-Ende durch Anfügen eines oder mehrerer radioaktiver Nukleotide mittels Terminaler Transferase markiert. Um die Entstehung von homo-oligomeren Enden zu vermeiden, wird als Substrat α-^{32}P-ddATP verwendet (Tab. 3).

Tab. 3: Reaktionsansatz zur Markierung des 3´-Endes von Oligonukleotiden.

Oligonukleotid	30	pmol
$CoCl_2$	2.5	mM
10x Reaktionspuffer	10	µl
Terminale Transferase	25	U
α-^{32}P-ddATP (37 MBq/ml)	5	µl
H_2O_{dd}	ad 50	µl

Der Ansatz wird 2 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zusatz von 5 µl 0.2 M EDTA gestoppt.

Sonden-Aufreinigung

Die hergestellten DNA-Sonden werden über Sephadex/Glaswatte-Säulen von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden gereinigt. Ein 0.5 ml-Eppendorfhütchen wird ca. 1-2 mm hoch mit silanisierter Glaswolle gestopft und mit in STE gequollenem Sephadex G-50 bis zum oberen Rand aufgefüllt. Dieses Konstrukt wird in ein 1.5 ml-Gefäss gesteckt und 2-5-mal für 1 min bei 7,000 g zentrifugiert. Das STE-Eluat wird zwischen diesen Schritten dekantiert und die Zentrifugation so oft wiederholt, bis die Säule eine trockene, ca. 10-15 mm hohe Pak-

kung zeigt. Die DNA-Sonde wird dann auf die Säule aufgetragen und 10 min bei 12,500 g von freien dNTPs separiert. Alternativ können zur Sondenaufreinigung auch *Nick Columns* nach den Angaben des Herstellers verwendet werden.

Hybridisierung mit genomischen Sonden

Nylon- oder Nitrozellulose-Membranen werden 30-60 min in ca. 0.5 ml Hybridisierungs-Lösung/cm^2 Membranfläche bei 65°C prähybridisiert. Dieser Mix wird verworfen und durch frische Hybridisierungs-Lösung (0.1 ml/cm^2) ersetzt. Nach Zugabe der hitzedenaturierten DNA-Sonde werden die Membranen für 5-16 h unter Rotation bei 65°C inkubiert. Die radioaktive Hybridisierungs-Lösung wird abgegossen und zur Wiederverwendung bei RT aufbewahrt. Die Membran wird zweimal 5 min bei 65°C mit Waschlösung I inkubiert. Der stringentere Waschschritt folgt bei 68°C mit Waschlösung II für 20 min. Um hybridisierte DNA zu detektieren, wird die Methode der Autoradiographie gewählt. Wenn β-Teilchen (emittiert von der filtergebundenen Sonde) auf den aufgelegten Röntgenfilm treffen, werden Ag^+ Ionen in Silberatome umgewandelt. Durch den Entwicklungsprozess werden Silberhalogenidkristalle auf dem Film zu metallischem Silber reduziert. Beim Fixierungsprozess werden alle nichtbestrahlten Silberhalogenidkristalle weggewaschen. Bei -70°C schwanken die Expositionszeiten - je nach Markierungseffizienz der Sonde(n) - zwischen 3 h und 2 Wochen.

Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Hybridisierungen mit Oligonukleotiden werden ohne Formamid, aber in höherer Salzkonzentration durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wird Hefe-tRNA verwendet, da hiermit repetitive DNA-Sequenzen der Zielsequenz nicht blockiert werden. Die Hybridisierungs-Temperatur wird 5-10°C unter der T_M des Oligonukleotids gewählt. Das Waschen der Membranen erfolgt für 10-30 min bei 42°C. Bei -70°C schwanken die Expositionszeiten für die autoradiographische Auswertung in der Regel zwischen 1-5 Tagen.

Rehybridisierung

Nylonmembranen mit immobilisierter DNA können mehrfach für Hybridisierungen verwendet werden. Die Membranen dürfen hierzu jedoch zwischen den Hybridisierungen nie ganz austrocknen. Um die gebundene radioaktive DNA-Sonde vollständig von der Membran abzulösen, wird der Filter in 0.2 M NaOH, 0.1% SDS für 30 min bei 90°C unter Rotation inkubiert. Anschliessend wird die Membran 20 min in 2x SSC gewaschen. Die vollständige Entfernung der Sonde wird durch eintägige Exposition eines Röntgenfilms kontrolliert.

Ausblick

Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Katalog an etablierten Techniken hat sich für unser Labor als sehr hilfreich herausgestellt. Wir wünschen uns, dass andere Arbeitsgruppen von unseren Erfahrungen und Vorarbeiten auf dem Gebiet der Paläogenetik profitieren können. Die Etablierung neuer Methoden ist und bleibt allerdings weiterhin unabdingbar. Dies ist umso

wichtiger, wenn man den Sektor Kontrollen und Authentizität von Daten anspricht. Die bereits existierende Palette an biochemischen und molekulargenetischen Techniken ist bei weitem nicht fehlerfrei, aber immerhin bis dato ein erfolgreicher Weg, der authentische Daten generieren kann, wenn man sie auch kritisch evaluiert. Wir werden daher in Zukunft einen Schwerpunkt auf die Entwicklung von Methoden setzen, die die Authentizität eruierter Daten prüfen können.

Die in dieser Arbeit gewählte Palette und Reihenfolge der gelisteten Techniken ist bewusst einer Labor-chronologischen Darstellung unterworfen. Zum einen soll dies generell zeigen, was an Methodik subsequent aufeinander zu folgen hat und welche Schritte in welchem zeitlichen Rahmen durchführbar bzw. miteinander koordinierbar sind. Zum anderen soll dieser didaktische Ansatz bewirken, dass auch fachfremde Wissenschaftler (z.B. Anthropologen und Archäologen) Zugang zum Gebiet der Molekulargenetik finden, um sowohl genetische Arbeitstechniken als auch komplette Projektplanungen innerhalb multidisziplinärer Kooperationen kompetent und kritisch auf prospektiven Erfolg oder Misserfolg hin beurteilen zu können.

Appendix

Feinchemikalien, Puffer und Medien, empfohlene Geräte.

Enzyme

Boehringer Mannheim, Mannheim, D:
Alkalische Phosphatase, Kalb
Dispase
Kollagenase
Lysozym
Restriktionsendonukleasen
T4 DNA-Ligase

Fermentas MBI, Vilnius, LT:
Restriktionsendonukleasen

Gibco-BRL Lifetechnologies, Rockville, USA:
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment

New England Biolabs, Beverly, USA:
Restriktionsendonukleasen

Perkin Elmer, Norwalk, USA:
Ampli-*Taq* DNA-Polymerase

Promega, Madison, USA:
Tfl DNA-Polymerase

Stratagene, La Jolla, USA:
E. coli DNA-Polymerase I
Pfu DNA-Polymerase

USB Amersham, Cleveland, USA:
Alkalische Phosphatase, Garnele

Chemikalien und Kits

Aldrich, Milwaukee, USA:
Ammoniumpersulfat
Ampizillin
Glyzerin
Manganchlorid

Applied Biosystems, Foster City, USA:
PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator CycleSequencing Kit
BigDye CycleSequencing Kit

Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA:
Akrylamid/Bisakrylamid
Bromphenolblau
TEMED
Xylencyanol

Boehringer Mannheim, Mannheim, D:
Ampizillin
DNA aus Heringssperma
Fetales Kälberserum
Glykogen
Hexanukleotid-Mix
kb ladder marker X
Kollagen S
Lambda DNA standards, native, digested
Random primed DNA labelling kit
tRNA

Difco Laboratories, Detroit, USA:
Bacto-Agar
Bacto-Trypton
Hefe-Extrakt
Kollagen

Fluka Feinchemikalien, Buchs, A:
Dimethylsulfoxid
Propan-2-ol
Natriumdodecylsulfat

Gibco-BRL Lifetechnologies, Rockville, USA:
DMEM
EDTA
Harnstoff

humane cot1-DNA
100 bp ladder DNA-Längenstandard

ICN Biomedicals, Aurora, USA:
α-^{32}P-dATP
α-^{32}P-dCTP
α-^{32}P-ddATP
α-^{32}P-dGTP
α-^{32}P-dTTP
Ampizillin
IPTG
Tris-base

Kodak Eastman, Rochester, USA:
Formamid
TEMED
Ammoniumpersulfat

LKB Produkte, Bromma, S:
1,1,1-Trichlorethan
Dimethyldichlorsilan-Lösung

Merck, Gibbstown, USA:
Borsäure
Chloroform
EDTA
Essigsäure
Ethanol
Glukose
Harnstoff
HCl 37%
Kaliumazetat
Magnesiumchlorid
Magnesiumsulfat
Natriumazetat

Pharmacia, Piscataway, USA:
Ficoll 400
Sephadex G50
Triton-X-100

Qiagen, Chatsworth, USA:
Qiaquick PCR Purification Kit
Qiagen Tip20, 100 und 500

Roth und Co, Karlsruhe, D:
dATP
dCTP
dGTP
dTTP
Phenol
SDS
X-Gal

Serac, Bad Homburg, D:
Testkits zur DNA-Typisierung

Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D:
Akrylamid
EDTA
N,N´-Methylen-bisakrylamid

Sigma Chemie, St. Lois, USA:
Ammoniumpersulfat
Bromphenolblau
BSA Fraction V
Ethidiumbromid
Kollagen I
Mineralöl
Polyethylenglycol
Pyruvat
Spermidin
T4 DNA
Xylencyanol

USB Amersham, Cleveland, USA:
Terminale Transferase DNA Labelling Kit

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien werden am besten von den Firmen Merck oder Sigma bezogen.

Verbrauchsmaterialien

Agfa-Gaevert, Leverkusen, D:
Röntgenfilme

American National Can, Greenwich, USA:
Parafilm

Amicon GmbH, Witten, D:
Centricon 30
Centricon 100
Microcon Einwegkonzentrator green vials
Microcon Einwegkonzentrator blue vials

Blücher-Schering, Lübeck, D:
flüssige Gallseife

Coca Cola GmbH, Essen, D:
Coke classic

Dalli-Werke, Stolberg, D:
Dalli Vollwaschmittel

JBL, Dieburg, D:
sterile Filterwatte

Millipore, Molsheim, F:
Nitrozellulose-Filter

Molecular Bio-Products Inc., San Diego, USA:
DNAaway

Pall Ultrafine Filtration Ltd., New York, USA:
Biodyne Nylonmembran, ungeladen

Pharmacia, Piscataway, USA:
Sephadex-G50 Säulen (Nick Columns)

Polaroid, Cambridge, USA:
Polaroid Film

Qiagen, Chatsworth, USA:
Qiabrane Nylonmembran, positiv geladen
Qiabrane Nylonmembran, ungeladen

Sigma GmbH, Osterode, D:
sterile Glaswatte

Whatman, Maidstone, GB:
3MM Papier

Geräte

Applied Biosystems, Foster City, USA:
Automated DNA Sequencer 373A
Automated DNA Sequencer 377XL

Bachofer, Reutlingen, D:
Heizofen
Hybridisierungsofen
Röntgenfilm-Beleuchter
UV-Transilluminatoren: 254 nm, 304 nm
Vakuumofen

Beckman Instruments, Palo Alto, USA:
L-80 Ultrazentrifuge
SW28-Rotor

Biometra, Göttingen, D:
Hybridisierungsofen
Trio-Thermocycler

Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA:
Gel-Dryer 583

DuPont, Boston, USA:
Sorvall RC24 Zentrifuge

Froebel, Lindau, D:
Geltrockner

Heraeus, Osterode, D:
Begasbarer Zellkulturbrutschrank
Biofuge 15 R

Herolab, Wiesloch, D:
Geldokumentation mit Enhanced Analysis System (E.A.S.Y.)

Kaltenbach und Voigt, Biberach, D:
DBP Supra
Orthodontros, Ultraflex 912-EF
Orthodontros, Schleifaufsatz aus Kunststoff/Diamant mit Trianonbeschichtung GD 6830

Perkin Elmer, Norwalk, USA:
GeneAmp PCR-System 2400 und 9600

Pharmacia, Piscataway, USA:
Ultrospec 3000

Sigma GmbH, Osterode, D:
Sigma 4K10-Kühlzentrifuge

Stratagene, La Jolla, USA:
UV-Stratalinker 1800

Volkswagenwerk AG, Wolfsburg, D:
Achatmörser
Schüttelmühle

Lösungen

40%ige Akrylamid-Stammlösung:		
Akrylamid	380	g
Bisakrylamid	20	g
H_2O_{dd}	ad 1	l
8%ige Akrylamid-Lösung:		
40 %ige Akrylamidlösung	200	ml
10x Sequenzierpuffer	100	ml
Harnstoff	8	M
H_2O_{dd}	ad 1	l
aDNA-Extraktionspuffer:		
GITC	10	mM
Tris-HCl, pH 7	0.1	M
EDTA	0.02	M
Triton X-100	1.3	%
aDNA-Waschpuffer:		
GITC	5	M
Tris-HCl, pH 6.4	0.1	M
Auftragsmix, ss-Gele:		
MOPS	1	x
Glycerin	70	%
EDTA	40	mM
Bromphenolblau	0.05	%
Xylencyanol	0.05	%
Aufbewahrung abgedunkelt bei 4°C		

Birnboim-Doly I:		
Glukose	50	mM
EDTA, pH 8.0	10	mM
Tris-HCl, pH 8.0	25	mM
Birnboim-Doly II:		
SDS	1	%
NaOH	200	mM
Birnboim-Doly III:		
KOAc, pH 4.8	2.55	M
Ethidiumbromid-Stammlösung:		
Ethidiumbromid	10	mg
H_2O	1	ml
Aufbewahrung bei 4°C im Dunkeln		
GITC-Lösung:		
GITC	100	g
H_2O	100	ml
Tris-HCl, pH 7.6	50	mM
EDTA	10	mM
bis zur vollständigen Lösung rühren		
Sarkosyl	2	%
ß-Merkaptoethanol	1	%
H_2O_{dd}	ad 200	ml
Gellösung, Sequenzierung:		
Harnstoff	30	g
Akrylamidlösung, 40 %	9	ml

TBE-Puffer, 10x	6	ml
H_2O_{dd}	23.5	ml
Denaturierungslösung:		
NaOH	0.5	M
NaCl	1.5	M
100x Denhardt´s Reagens:		
Ficoll 400	2	g
Polyvinylpyrrolidon	2	g
BSA Fraction V	2	g
H_2O_{dd}, sterilfiltriert	ad 100	ml
dNTP-Mix:		
dATP	5	mM
dTTP	5	mM
dCTP	5	mM
dGTP	5	mM
Tris-HCl, pH 7.5	5	mM
Efflux-Puffer:		
Sukrose	8	%
Triton X-100	5	%
Tris-HCL, pH 8.0	5	mM
Entwicklerlösung:		
Na_2CO_3, 3 %	150	ml
Formaldehydlösung, 37 %	75	µl
$Na_2S_2O_3$-Lösung, 43 %	5	µl
Fixierlösung, CBB:		
MetOH	45	%
HAc	10	%
H_2O	45	%
Färbelösung, Silber:		
AgNO3	125	ml
10x Klenow-Puffer:		
Tris-HCl, pH 7.5	500	mM
$MgSO_4$	100	mM
DTT	1	mM
BSA	50	µg/ml
H_2O_{dd}	ad 1	ml
Fixierlösung, Silber:		
EtOH	50	%
HAc	12	%
H_2O	38	%

GDIS:		
Triton X-100	2	%
SDS	1	%
NaCl	100	mM
EDTA	1	mM
Tris-HCl, pH 8.0	10	mM
Hauptgel, Sequenzierung:		
Gellösung	45	ml
APS, 10 %	163	µl
TEMED	22	µl
ca. 2 h polymerisieren lassen		
Hybridisierungs-Waschlösung I:		
SSC	2	x
SDS	0.1	%
Hybridisierungs-Waschlösung II:		
SSC	0.1	x
SDS	0.1	%
Hybridisierungs-Lösung, genomische Sonden:		
Formamid	50	%
SSPE	5	x
SDS	1	%
Denhardt's Lösung	5	x
Hefe-tRNA	100	µg/ml
H_2O_{dd}	ad 100	ml
Ladepuffer, Agarose-Gelelektrophorese:		
Ficoll 400	20	%
EDTA, pH 8.0	100	mM
Bromphenolblau	0.2	%
Xylencyanol	0.2	%
Ladepuffer, Polyakrylamid-Gelelektrophorese:		
Formamid	80	%
EDTA, pH 8.0	10	mM
10x Ligase-Puffer:		
Tris-HCl, pH 7.6	0.5	M
$MgCl_2$	100	mM
DTT	100	mM
FCS	500	ug/ml

Lysozym-Lösung:

H_2O	1	ml
Lysozym	50	mg

100 ml-Aliquots bei -20°C aufbewahren nach dem Auftauen nicht wiederverwenden

Lysepuffer, DNA-Isolierung:

NH_4Cl	155	mM
$KHCO_3$	10	mM
EDTA, pH 8.0	0.1	mM

Mix I-Puffer:

Sukrose	8	%
Triton X-100	5	%
EDTA	10	mM
Tris-HCL, pH 8.0	5	mM
Ammoniumazetat	5	mM
Magnesiumazetat	2	mM

Mix II-Puffer:

Sukrose	8	%
Triton X-100	0.1	%
EDTA	5	mM
NaCl	1.2	M

10x MOPS-Puffer:

MOPS	200	mM
NaOAc	50	mM
EDTA, pH 7.0	10	mM

alternativ DEPC-Behandlung, 37°C, ÜN

DEPC	2	ml/1 l

Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C für maximal 2 Monate

Neutralisierungspuffer:

Tris, pH 7.4	0.5	M
NaCl	1.5	M

Phosphat-Puffer:

Na_2HPO_4	500	mM
NaH_2PO_4, pH 7.2	500	mM

Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung, Oligonukleotid-Sonden:

SSC	5	x
SDS	1	%
Denhardt's Lösung	5	x
Hefe-tRNA	100	µg/ml

Proteinase K-Stammlösung:

Proteinase K	20	mg
H_2O	1	ml

aufbewahren bei -20°C

Reaktionspuffer:

Tris-HCl, pH 9.5	100	mM
NaCl	100	mM
$MgCl_2$	50	mM

RNase-Stammlösung:

RNase A	10	mg/ml
Tris-HCl, pH 7.5	10	mM
NaCl	15	mM

15 min bei 100°C kochen, bei RT aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

SE-Puffer:

NaCl	75	mM
EDTA, pH 8.0	25	mM

10x Sequenzierpuffer:

Tris Base	0.5	M
Bors‰ure	0.5	M
EDTA, pH 8.0	10	mM

Silika-Lösung:

Silika-Partikel S-5631	12	g
H_2O_{dd}	100	ml

Suspension 24 h quellen lassen, Überstand abnehmen, 3-mal wiederholen, beim letzten Schritt plus

10 M HCl	120	µl

0.5 ml-Aliquots bei RT im Dunkeln lagern, max. 6 Monate haltbar

20x SSC:

NaCl	3	M
Na_3-Zitrat	0.3	M

20x SSPE:

NaCl	0.3	M
NaH_2PO_4	0.2	M
EDTA, pH 7.4	20	mM

STE-Puffer:

Tris-HCl, pH 7.5	10	mM
EDTA, pH 8.0	1	mM
NaCl	100	mM

STET-Puffer:		
Sukrose	8	%
Triton X-100	5	%
EDTA	5	mM
Tris-HCL, pH 8.0	5	mM

STET (CTAB)-Puffer:		
Herstellung wie STET-Puffer, aber nur		
Triton X-100	0.1	%

50x TAE-Puffer:		
Tris-Azetat, pH 8.0	2	M
EDTA, pH 8.0	50	mM

10x TBE-Puffer:		
Tris Base	890	mM
Borsäure	890	mM
EDTA, pH 8.0	25	mM

TE-Puffer		
EDTA	1	mM
Tris-HCl, pH 7.5	10	mM

Vorgel, Sequenzierung:		
Gellösung	5	ml
APS, 10 %	27	µl
TEMED	3.6	µl
ca. 30 min polymerisieren lassen		

Vorinkubationslösung, Silber:		
$Na_2S_2O_3$-Lösung, 43 %	100	µl
H_2O	200	ml

Waschlösung, Silber:		
EtOH	10	%
HAc	5	%
H_2O	85	%

Nährlösungen

Alle Nährmedien werden, wenn nicht anders vermerkt, 20 min bei 121°C und 1,000 hPa autoklaviert. SOB- und SOC-Medien werden zusätzlich sterifiltriert. Zur Herstellung von Agarplatten wird den Medien vor dem Autoklavieren 1.5% Agar zugefügt.

LB-Medium:		
Bacto-Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
pH 7.2		
H_2O_{dd}	ad 1	l

NZYM-Medium:		
NZ-Amine	10	g
NaCl	5	g
Hefeextrakt	5	g
$MgSO_4$	2	g
H_2O_{dd}	ad 1	l

NZCYM-Medium:		
wie NZYM-Medium. aber zusätzlich		
Kaseinhydrolysat	1	g

SOB-Medium:		
Bacto-Trypton	10	g
Hefeextrakt	2.5	g
$MgCl_2$	10	mM
$MgSO_4$	10	mM
KCl	2.5	mM
H_2O_{dd}	ad 1	l

SOC-Medium:		
Bacto-Trypton	10	g
Hefeextrakt	2.5	g
NaCl	10	mM
KCl	2.5	mM
nach dem Autoklavieren sterile Zugabe von		
$MgCl_2$	10	mM
$MgSO_4$	10	mM
Glukose	20	mM
H_2O_{dd}	ad 1	l

TB-Medium:		
Bacto-Trypton	10	g
NaCl	5	g
pH 7.4		

nach dem Autoklavieren sterile Zugabe von		
$MgSO_4$	10	mM
Maltose	0.2	%
H_2O_{dd}	ad 1	l
<u>2x TY-Medium:</u>		
Bacto-Trypton	16	g
Hefeextrakt	10	g
NaCl	5	g
nach dem Autoklavieren sterile Zugabe von		
$MgSO_4$	10	mM
Maltose	0.2	%
H_2O_{dd}	ad 1	l

Medienzusätze

Die in diesem Ausatz favorisierten Medienzusätze sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die in H_2O, EtOH oder DMF gelösten Substanzen werden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tab. 4: Medienzusätze zur Zell- und Bakterienzüchtung.

Medienzusatz	Stammlösung	gelöst in	Konzentration im Medium
Ampizillin	100 mg/ml	H_2O_{dd}	100 µg/ml
Gentamyzin	50 mg/ml	$EtOH_{abs}$	50 µg/ml
IPTG	100 mM	H_2O_{dd}	0.2 mM
Kanamyzin	25 mg/ml	H_2O_{dd}	25 µg/ml
X-Gal	2%	DMF	0.004%

Vektoren

Tab. 5: Plasmidvektoren zur Klonierung von DNA-Fragmenten.
Die beiden erstgenannten Vektoren eignen sich nur für Klonierung von PCR-Produkten, die über thermostabile Polymerasen generiert werden und eine sogenannte *Proofreading*-Aktivität besitzen (z.B. *Pfu* Polymerasen, *Pwo* Polymerasen). In den Vektor pCR™ 2.1 können über *Taq* Polymerasen (z.B. *Ampli*Taq) generierte Fragmente problemlos einligiert werden.

Vektor	Grösse	Charakteristika
pUC 19	2.686 kb	*amp*, α-Komplementation, Polylinker flankiert von *forward* und *reverse* Primer-Sequenz, verwendeter Wirt: *E. coli* DH5α, XL1-Blue
pBluescript SK II	2.961 kb	*amp*, α-Komplementation, Polylinker flankiert von *forward* und *reverse*, T7 und T3, KS und SK Primer-Sequenz, sowie von *Bss*H II-Schnittstellen, verwendeter Wirt: *E. coli* AG1, *E. coli* DH5α, DH10B
pCR™ 2.1	3.9 kb	Invitrogen

Bakterienstämme

Tab. 6: Empfohlene Bakterienstämme zur Transformation.
Die höchsten Ligationseffizienzen werden in der Regel mit *Escherichia coli* DH5αF′ erzielt. Bei der Verwendung von PCR-Produkten empfiehlt sich *E. coli* INVαF′ One Shot.

Stamm	Charakteristika
E. coli AG1	*rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17, (*rk-mk*+), *sup*E44, *rel*A1
E. coli DH5αF′	F/*end*A1, *hsd*R17(r_K-r_K+), *sup*E44 *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A(NaI^r), *rel*A1, Δ(*lac*IZYA-*arg*F), *U*169, *deo*R, (ϕ80d*lac*Δ(*lac*Z)M15)
E. coli DH10B	F^- *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80d*lac*ZΔM15, Δ*lac*X74,*deo*R, *rec*A1, *end*A1, *ara*D139, Δ(*ara,†leu*)7697, *gal*U, *gal*K, λ^-, *rps*L, *nup*G
E. coli XL1-Blue MRA	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173, *end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac*
E. coli INVαF′ One Shot	Invitrogen
E. coli TOP10F′ One Shot	Invitrogen

Literatur

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1994
Current protocols in molecular biology. Wiley. New York.

Birnboim H.C., Doly J. 1979
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, p. 1513-1523.

Chomczynski P., Sacchi N. 1987
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem.162, p. 156-159.

Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L. 1972
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria, genetic transformation of E. coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69, p. 2110.

Dagert M., Ehrlich S.D. 1979
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of E. coli cells. Gene 6, p. 23-28.

Del Sal G., Manfioletti G., Schneider C. 1989
The CTAB-DNA precipitation method: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages and plasmids suitable for sequencing. Biotechniques 7, p. 514-519.

Feinberg A.P., Vogelstein B. 1983
A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to a high specific activity. Anal.Biochem.132, p. 6-13.

Fourney R.M., Miyakoshi J., Day R.S., Paterson M.C. 1988
Northern Blotting: Efficient RNA staining and transfer. Focus 10(1), p. 5-7.

Gassen H.G., Martin A., Bertram S. 1987
Gentechnik. Einführung in Prinzipien und Methoden. Fischer. Stuttgart.

Hodges R.S., Smith J.A. 1994
Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Escom. Leiden.

Heery D.M., Gannon F., Powell R. 1990
A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. Trends Genet. 66, p. 173.

Holmes D.S., Quigley M. 1981
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, p. 193-197.

Höss M., Pääbo S. 1993
DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Res. 21, p. 3913-3914.

Mandel M., Higa A. 1970
Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, p. 159-162.

Maxam A.M., Gilbert W. 1977
A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, p. 560-564.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. Cold Spring Harbor Symposia in quantitative biology 51, p. 263-273.

Perbal B. 1984
A practical guide to molecular cloning. Wiley. New York.

Pusch C. 1997a
A simple and fast procedure for high quality DNA isolation from gels using laundry detergent and inverted columns. Electrophoresis 18, p. 1103-1104.

Pusch C. 1997b
High-quality blotting of polyacrylamide gels. Trends Genet. 13, p. 207. Technical Tips Online, TTO. http://www.biomednet.com/db/tto T01052

Pusch C., Schmitt H., Blin N. 1997
Increased cloning efficiency by cycle restriction-ligation CRL. Trends Genet. 13, p.164. Technical Tips Online, TTO. http://www.biomednet.com/db/tto T40071

Pusch C.,Scholz M. 1997
DNA extraction from ancient human bones via enzymatic treatment. Trends Genet. 13, p. 417. Technical Tips Online, TTO. http://www.biomednet.com/db/tto T01217

Pusch C., Scholz M. 1998
DNA isolation from ancient bone samples using a mixture of Coca-Cola™ and gall-soap. Bull. Soc. Suisse d'Anthrop. 4(2), p. 1-6.

Pusch C.M., Giddings I., Scholz M. 1998
Repair of degraded duplex DNA from prehistoric samples using Escherichia coli DNA polymerase I and T4 DNA ligase. Nucleic Acids Res. 26, p. 857-859.

Reed K.C., Mann D.A. 1985
Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucleic Acids Res. 13, p. 7207-7221

Saiki R.K., Mullis K.B., Scharf S., Faloona F., Horn G.T., Erlich H., Arnheim N. 1985
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, p. 1350-1354.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977
DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, p. 5463-5467.

Scholz M., Bachmann L., Nicholson G.J., Bachmann J., Giddings I., Rüschoff-Thale B., Czarnetzki A., Pusch C.M. 2000
Genomic differentiation of Neanderthals and anatomically modern man allows a fossil-DNA-based classification of morphologically indistinguishable hominid bones. Am. J. Hum. Genet. 66, p. 1927-1932. http://www.journals.uchicago.edu/AJHG/journal/issues/v66n6/991491/991491.html; see also comment in Nature Rev Genet: Human origins: Digging up our past; by Jane Alfred: http://www.nature.com/reviews/genetics/ hlights/gen_hl1606ja.html

Scholz M., Giddings I., Pusch C.M. 1998
A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. Anal. Biochem. 259, p. 283-286.

Sealy P.G., Southern E.M. 1989
In: Rickwood D., Hames B.D. (eds), Gel electrophoresis of nucleic Acids. IRL Press. Oxford, p. 39-76.

Southern E.M. 1975
Detection of specific sequences separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, p. 503-517.

Wenzel W., Amann M.J. 1991
Lexikon der Gentechnologie. Springer. Heidelberg.

Zhou C., Yang Y., Jong A.Y. 1990
Mini-prep in ten minutes. Biotechniques 8, p. 172-173.

Dank

Wir danken Dr. A. Czarnetzki, Prof. Dr. Dr. H.-P. Uerpmann und M. Broghammer für fruchtbare Diskussionsbeiträge. Ausserdem bedanken wir uns bei S. Hengst für ihre langjährige technische Unterstützung und Serac™ Serologische Reagenzien GmbH für die gute Zusammenarbeit.

Anschrift

Carsten M. Pusch
Molekulargenetisches Labor
Universitäts-Augenklinik Abteilung II
Auf der Morgenstelle 15
D - 72076 Tübingen
E-mail: carsten.pusch@ uni-tuebingen.de
Tel: +49-7071-29-87619, Fax: +49-9181-9005230

Michael Scholz
Osteologische Sammlung der Universität Tübingen
Eberhardt-Karls-Universität Tübingen
Wilhelmstrasse 27
D - 72074 Tübingen

und

Institut für Ur- und Frühgeschichte
Abteilung für Archäobiologie
Eberhardt-Karls-Universität Tübingen
Eugenstrasse 40
D - 72072 Tübingen

Eingang: 10.11.00

Impressum

Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie
Bulletin de la Société Suisse d'Anthropologie
herausgegeben von der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie (SGA/SSA)
mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften (SANW)

Redaktion:
Susi Ulrich-Bochsler, Bern

Korreferentin (textes français):
Isabelle Gemmerich, Brugg

Layout:
Andreas Cueni, Aesch

Bezugsort:
Redaktion: S. Ulrich-Bochsler, Historische Anthropologie, Medizinhistorisches Institut der Universität Bern, Fabrikstrasse 29d, CH - 3012 Bern
Telefon 031/631 84 92. Fax 031/631 37 82. E-mail susi.ulrich-bochsler@mhi.unibe.ch.

Herstellung: Atelier d'Impression de l'Université de Genève
Couverture: Montage Isabelle Gemmerich d'après un dessin original de Lucrezia Bieler-Beerli (Zürich) pour l'exposition du Musée d'Anthropologie de l'Université de Zürich

Erscheinungsweise: Vom Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie erscheinen in der Regel zwei Hefte pro Jahr (Frühjahr, Herbst), die zusammen einen Band bilden.

ISSN 1420 - 4835

Deutschsprachige Sommerakademie als Chance für den schweizerischen anthropologischen Nachwuchs

Frank J. Rühli[1] und Anja Schilitz[2]

Résumé

Les perspectives d'emploi des jeunes chercheurs, surtout en anthropologie, sont très préoccupantes. Pour offrir à ces jeunes chercheurs de langue allemande des possibilités de formation continue, une université d'été annuelle sur le thème de la paléopathologie est organisée par la Société d'Anthropologie Allemande depuis 1998. Ce cours intensif de deux semaines permet aux participants de rafraîchir leurs connaissances et de les élargir. Ils peuvent à cette occasion pratiquer des analyses paléopathologiques sur divers squelettes (voir annexe 1a) en utilisant de multiples méthodes (voir annexe 1b) d'une manière intensive. L'objectif de cet article est de présenter dans ses grandes lignes le contenu de cette formation (sources, matériel, et méthodes d'analyse) afin de le faire connaître à de potentiels participants suisses, et de les inviter ainsi à saisir l'opportunité de prendre part à cette université d'été en langue allemande unique en son genre.

Berufsaussichten für junge Wissenschaftler - speziell AnthropologInnen - zeichnen sich als sehr schwierig ab, Stellen sind knapp, die Anforderungen bei Bewerbungen sehr hoch und Spezialkenntnisse sind vermehrt gefragt.

Um deutschsprachigen NachwuchswissenschaftlerInnen eine Möglichkeit zur Weiterbildung zu geben, wird seit 1998 vom Vorsitzenden der Deutschen Gesellschaft für Anthropologie (siehe Adresse am Schluss des Artikels) eine Sommerakademie zum Thema "Paläopathologie" durchgeführt. In einem zweiwöchigen Intensivkurs können die Teilnehmer ihr Wissen auffrischen und erweitern. Es wird ihnen die einmalige Gelegenheit geboten, an diversem Skelettmaterial (siehe Tab. 1a) mittels verschiedener Methoden (siehe Tab. 1b) paläopathologische Diagnostik zu üben. Insbesondere werden die wichtigsten Techniken der Untersuchung an ossärem Fundmaterial gefestigt.

Das detaillierte Praktikumsprogramm kann bei den Autoren angefordert werden.

Dieser Zuwachs an Wissen und praktischen Fertigkeiten ist für jeden einzelnen von grosser Bedeutung. Auch Grundlagen für internationale Zusammenarbeit an verschiedenen Projekten können gelegt werden; Beispiele hierfür sind: Hesse/Lanz (1998), Rühli et al. (2000).

[1] Arbeitsgruppe für klinische Paläopathologie, Universität Zürich
[2] Fachgebiet Humanbiologie, Universität Potsdam

Tab. 1a: Untersuchtes Material (Sommerakademie 1998).

		Geographische Region	Zeitepoche
1)	Div. Schädel	Wandersleben/D	ca. 5500 v. Chr.
2)	drei Mumien	versch. Regionen/Ägypten	versch. Epochen
	(aktuell untergebracht in der Universität Göttingen)		
3)	Brandgräber-Fundmaterial	Rheinzabern/D	30-260 n. Chr.
4)	Div. Knochen	Sajala/Türkei	6. Jh. n. Chr.
5)	Femurpräparat	Truchtelfingen/D	6.-7. Jh. n. Chr.
6)	Div. Knochen	Straubing/D	frühes Mittelalter
7)	Div. Knochen	Unterseen/CH	Mittelalter
8)	Div. Knochen	Berlin/ D	Mittelalter

Tab. 1b: Verwendete Untersuchungsmethoden, praktische Arbeiten (Sommerakademie 1998).

- Sterbealter- und Geschlechtsbestimmungen; Material Nr. 1): siehe Tabelle 1a.
- Unterscheidung von Trepanation und Schädeldachtrauma; 1).
- Klassifizierung von Gelenkveränderungen 7) sowie weitere pathologische Diagnostik; 2) 5).
- Einführung in die Anfertigung von Dünnschliffpräparaten, Vorstellen der Plastinationsanlage, verschiedener Säge- und Schleifmöglichkeiten.
- Praktische Übungen für die Anfertigung von Dünnschliffpräparaten.
- Mikroskopische Untersuchungen verschiedener pathologischer Knochenfunde mit Auswertung am Sichtgerät; 4) 8).
- Brandknochenanalyse; 4).
- Arbeit am Rasterelektronenmikroskop (REM) 6).
- Untersuchung der Elementverteilung durch das EDAX gekoppelt mit einem REM.
- Diavorträge über eigene Arbeiten der Teilnehmer.
- Videofilm über traditionelle Schädeltrepanationen im heutigen Kenia.
- Studium ausgewählter Publikationen zum Thema Paläopathologie.

Die bisher durchgeführten Sommerakademien stiessen bei den Partizipanten u.a. aus folgenden Gründen auf ein sehr positives Echo:

limitierte Teilnehmerzahl (max. 10 Personen),
multidisziplinäre/internationale Beteiligung,
keine Kursgebühr, preisgünstige Unterkunftsmöglichkeit,
limitierter Zeitaufwand,
strukturiertes, individuellen Wünschen angepasstes Programm (Kombination von Theorie und Praxis).

Die starke Resonanz bei der Präsentation des Sommerakademie-Konzeptes an Fachtagungen (Schilitz/Rühli (1998), Rühli/Schilitz (1999)) zeigt, dass ein solcher „post-graduate-Kurs" nicht nur in Deutschland einem Bedürfnis entspricht. Für interessierte TeilnehmerInnen aus der Schweiz bietet sie eine einzigartige Gelegenheit, im deutschsprachigen Raum paläopathologische Kenntnisse zu erwerben respektive zu vertiefen.

Kursorganisation und Auskünfte:

Prof. Dr. Dr. M. Schultz
Zentrum Anatomie
Kreuzbergring 36
D - 37075 Göttingen
Fax: +49-551-397043
Tel: +49-551-397002 (Sekretariat)
E-mail: schult1@uni-goettingen.de

Literatur

Hesse H., Lanz Ch. 1998
Friedhof des Berliner Heilig-Geist-Spitals - anthropologische Aspekte. Poster. Homo 49, Suppl., S. 44.

Rühli F., Lanz Ch., Ulrich-Bochsler S., Hesse H., Schultz M., von Smekal A. 2000
Vergleichende Morphologie von Knochenpathologien im Multislice CT und in der Histologie. Vortrag, GfA-Jahrestagung in Potsdam.

Schilitz A., Rühli F. 1998
Göttinger Sommerakademie: eine gezielte Form von wissenschaftlicher Nachwuchsförderung (abstract), Homo 49, Suppl, S. 86.

Rühli F., Schilitz A. 1999
Postgraduate short study programs in paleopathology – a visionary example from germany. In: Cockburn, E. (ed.), Papers on Paleopathology, Paleopathology Newsletter (Suppl.), April, S. 13.

Anschrift

Dr. med. Frank J. Rühli
Biological Anthropology and Comparative Anatomy Research Unit
Department of Anatomical Sciences
The University of Adelaide
SA 5005 Adelaide
Australien
E-mail: ruehli@hotmail.com

Eingang: 12.5.00

Abb. 1: Teilnehmer der Sommerakademie 1998 beim mikroskopischen Studium von Knochen-Dünnschliffpräparaten.

Impressum

Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie
Bulletin de la Société Suisse d'Anthropologie
herausgegeben von der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie (SGA/SSA)
mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften (SANW)

Redaktion:
Susi Ulrich-Bochsler, Bern

Korreferentin (textes français):
Isabelle Gemmerich, Brugg

Layout:
Andreas Cueni, Aesch

Bezugsort:
Redaktion: S. Ulrich-Bochsler, Historische Anthropologie, Medizinhistorisches Institut der Universität Bern, Fabrikstrasse 29d, CH - 3012 Bern
Telefon 031/631 84 92. Fax 031/631 37 82. E-mail susi.ulrich-bochsler@mhi.unibe.ch.

Herstellung: Atelier d'Impression de l'Université de Genève
Couverture: Montage Isabelle Gemmerich d'après un dessin original de Lucrezia Bieler-Beerli (Zürich) pour l'exposition du Musée d'Anthropologie de l'Université de Zürich

Erscheinungsweise: Vom Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie erscheinen in der Regel zwei Hefte pro Jahr (Frühjahr, Herbst), die zusammen einen Band bilden.

ISSN 1420 - 4835

Workshop Taphonomie

Die Arbeitsgemeinschaft für „Historische Anthropologie der Schweiz" (AGHAS) organisiert seit den 90er Jahren für ihre Mitglieder und andere Interessierte Workshops, die der Weiterbildung in der Historischen Anthropologie dienen und den aktuellen Wissensstand streuen sollen. Die meisten von uns sind im Verlaufe von Ausgrabungen tierischem Knochenmaterial begegnet, sei dies in Form von Tierknochen, die durch das Einfüllmaterial in die Gräber gelangten, sei dies – bei zeitlich alten Gräbern – in Form von echten Beigaben (Speisebeigaben). Die Untersuchung und Bestimmung dieser nichtmenschlichen ossären Funde gehören zwar in die Hand der Archäozoologen. Dasselbe gilt für allfällige Spuren von „Tierfrass" an menschlichen Skelettteilen. Dennoch ist es von Vorteil, wenn auch der Anthropologe eine Vorstellung von den verschiedenartigen postmortalen Einwirkungsmöglichkeiten hat, damit er in der Lage ist, sie überhaupt zu erkennen und sie zu bestimmen oder aber vom Archäozoologen bestimmen zu lassen.

Anlässlich der Jahresversammlung der AGHAS 1999 wurde beschlossen, einen Workshop zum Thema „Tierspuren" zu organisieren. Unser Vorstandsmitglied Renate Ebersbach vom Seminar für Ur- und Frühgeschichte der Universität Basel, übernahm in verdankenswerter Weise die Vorbereitung und Durchführung dieses Kurses. Er fand am 21. Januar 2000 statt und stiess auf überaus reges Interesse. Das „Kursmaterial" stammte grösstenteils aus der (tier)-osteologischen Sammlung des Basler Seminars, so dass die Tierknochen denn auch das Schwergewicht nicht nur in bezug auf „Bearbeitungsspuren" sondern auch bezüglich taphonomischer Prozesse allgemein bildeten. Dies widerspiegelt sich im Handout, welches den Kursteilnehmerinnen und -teilnehmern abgegeben wurde. Da die Zusammenstellung gerade für uns AnthropologInnen eine gute Ergänzung unserer Arbeitsunterlagen sowohl fürs Feld wie fürs Labor ist, sei sie an dieser Stelle für weitere Interessierte verfügbar gemacht, ergänzt um anthropologische Literatur und Anregungen von Tanya Uldin und Susi Ulrich-Bochsler.

Susi Ulrich-Bochsler (Präsidentin der AGHAS und Redaktorin des Bulletin)

Handout zum Taphonomie-Workshop

Zusammengestellt von Renate Ebersbach

Definitionen für „Taphonomie“

Die Taphonomie beschreibt alle Prozesse, die zwischen dem Zeitpunkt der Ansammlung von Skelettmaterial (Thanatocoenose oder „Totengemeinschaft“) und dessen Auffindung Auswirkungen auf den Knochen haben (Noe-Nygaard 1987, S. 19). Diese umfassen physikalische, chemische und biologische Prozesse. Dazu zählen:

Ereignisse vor der Einbettung der Knochen:
- Klima.
- Grad der Exposition des Materials.
- Dauer der Exposition.
- Tierfrass.
- Verschleppung bzw. Vernichtung durch Tiere.

Ereignisse während der Einbettung der Knochen:
Sedimentationsgeschwindigkeit.
Zeiträume zwischen Sedimentationsereignissen.

Ereignisse nach der Einbettung der Knochen:
Mächtigkeit der Sedimentabdeckung.
Schichtpressung.
Tätigkeit von Wurzeln und grabenden Tieren.
Wassereinfluss bzw. Feuchtigkeit.
Tätigkeit von Mikroorganismen.
Beschaffenheit des Sediments (Säuregrad, Durchlässigkeit, Korngrösse etc.).

Knochen mit hoher struktureller Dichte sind weniger anfällig gegenüber postmortalen Zerstörungen durch Sedimentdruck etc. als solche mit niedriger struktureller Dichte (Lyman 1994). Je nach der Zusammensetzung des tierischen Knochenmaterials (Tierarten- und Skeletteilhäufigkeiten) liegt deshalb eine unterschiedliche Anfälligkeit für taphonomische Prozesse vor. Dies führt zu unterschiedlich ausschnitthaften Überlieferung. Die Repräsentanz und damit die Aussagefähigkeit von Tierknochenmaterial wird wesentlich durch die peri- und postmortalen (taphonomischen) Prozesse beeinflusst.

Nagespuren (Abb. 1: Lyman 1994, S. 196b)

Beschreibung:
- Feine Linien, die dicht nebeneinander liegen und in Feldern oder Reihen angeordnet sind. Es lassen sich jeweils paarige Reihen unterscheiden.
- Zu achten ist auf gegenüberliegende, punktartige Eindrücke.

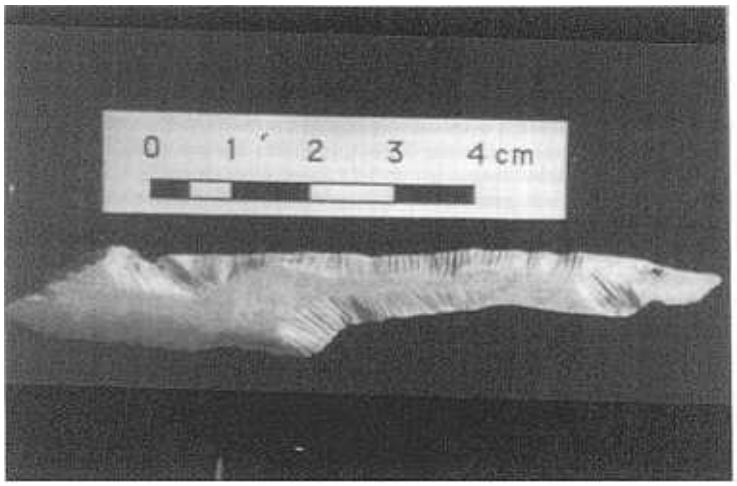


Abb. Nagerverbiss durch Marmota sp. (Lyman 1994, S. 196b).

Technik des Nagens:
Genagt wird mit den Unterkieferzähnen, während die Oberkieferzähne das Stück festhalten.

Mögliche Verursacher:
Nagetiere. In Frage kommen Mäuse, z.B. Gelbhalsmaus (Apodemus flavicollis), Waldmaus, ab dem Mittelalter auch Ratten (Wanderratte, Rattus norvegicus), evtl. Eichhörnchen.

Häufigkeit an Tierknochen:
- Je nach Epoche und Lagerungsbedingungen bestehen Unterschiede: In Twann (neolithische Feuchtbodensiedlung) wiesen beispielsweise 1-2% aller Tierknochen Nagespuren auf, in Riehen-Landvogtei (Keller des späten 18. Jh.) 2.5%.

Bevorzugung von Knochen oder Knochenteilen:
- Keine. Spuren sind an allen möglichen Stellen an Röhrenknochen und platten Knochen zu beobachten. Eine Ausnahme stellt das Hirschgeweih dar, welches bevorzugt benagt wird.

Literatur:
- An Tierknochen sind Nagespuren mit Ausnahme einzelner auffälliger Stücke generell eher selten beschrieben. Vor allem liegt keine systematische Auswertung vor. Bsp.: Becker/Johansson 1981, S. 34. Lyman 1994, S. 196 f., Wells 1967.

Bissspuren (Abb. 2: Lyman 1994, S. 208b. Abb. 3: Lyman 1994, S. 209b)

Beschreibung:
- Spitz-kegelförmige Eindrücke, die oft annähernd parallel und gegenüberliegend (Gegenbiss bei spitzkronigen Zähnen) sind, oder breite, flache, oft längere Ritzungen.

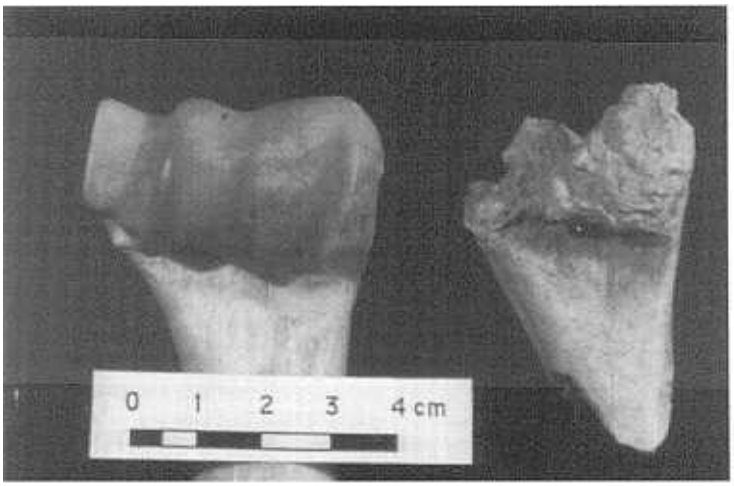


Abb. 2: Verbiss an Cervus-Humerus distal (Lyman 1994, S. 208b).

Vollständig zerfressene Knochenstücke kommen vor allem im Epiphysenbereich vor. Bissspuren manifestieren sich in verschiedenen Grössenklassen.

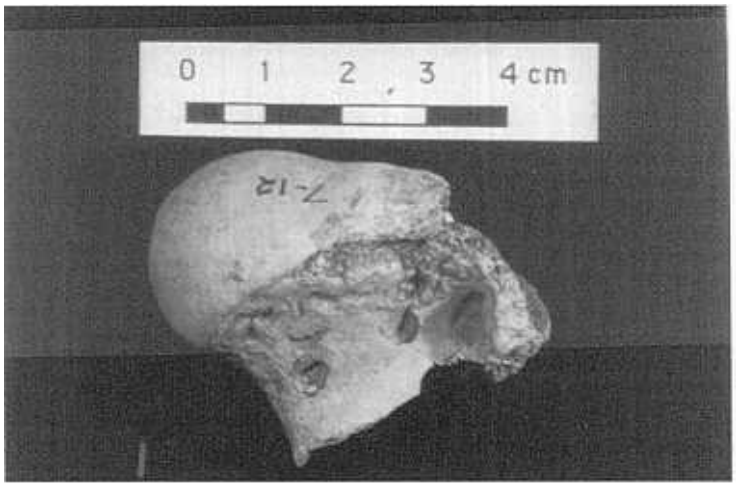


Abb. 3: Verbiss Humerus proximal Cervus sp. (Lyman 1994, S. 209b).

Mögliche Verursacher:
- Hunde, Schweine, Wölfe, Katzen, Füchse, Dachse (?).
- Kleinere Bissspuren stammen evtl. von Marder oder Iltis.
- Die Häufigkeit von Hunden und die Häufigkeit des Hundeverbisses können korrelieren z.B. in Twann, neolithische Feuchtbodensiedlung, Cortaillod-Schichten (Becker/Johansson 1981, S. 32).

Häufigkeit an Tierknochen:
- Twann, neolithische Feuchtbodensiedlung: 6-9% aller Tierknochen sind verbissen (Becker/ Johannson 1981).
- Salzgitter-Lebenstedt, mittelpaläolithische Freilandfundstelle: 20-70% aller vollständig erhaltenen Knochen haben Verbissspuren (Gaudzinski 1998).
- Experimente zum Carnivorenverbiss (gefleckte Hyänen) (Blumenschine 1988):
  a) Anthropogener Speiseabfall, d.h. zerbrochene und weitgehend entfleischte Knochen: 15% Verbiss.
  b) Nur von Hyänen gefressenes Aas, vollständige Skelette: 82% Verbiss.

Bevorzugung von Knochen oder Knochenteilen:
- Vor allem Gelenkenden sowie Schlachtabfall mit schwer lösbaren Fleischteilen wie Wirbel, Fussknochen etc. werden bevorzugt.
- Stabile Knochen (-teile) weisen häufiger Bissspuren auf, da weniger stabile eher ganz verzehrt werden.
- Kleinknochen (Carpalia, Tarsalia etc.) werden vollständig verzehrt oder in nicht mehr bestimmbare Splitter zerlegt. Der Anteil an Spuren von Hundeverbiss nimmt mit der Grösse der Knochenfragmente ab (Blumenschine 1988).
- Schweine hinterlassen kaum Spuren auf den stabilen Langknochen Radius, Femur und Tibia, fressen dagegen Wirbel und Kreuzbein vollständig auf und zerstören das Becken sehr stark (Experimente mit jungadulten Rinderknochen: Greenfield 1988). Die Spuren sind schwer von den von Hunden verursachten Spuren zu unterscheiden.

Literatur:
- Bissspuren sind in der archäozoologischen Literatur relativ häufig beschrieben. Sie werden meist standardmässig in der Auswertung von grösseren Materialmengen berücksichtigt.
- Hundeverbiss: Becker/Johansson 1981, S. 32 f. (neolithische Feuchtbodensiedlungen). Blumenschine 1988 (Experimente zur Frage: zuerst Hominiden oder zuerst Carnivoren?). Ebersbach 1998 (keltische Landsiedlung). Haynes 1980. Haynes 1982. Haynes 1983. Palmqvist/Martinez-Navarro et al. 1996. Stallibrass 1990 (moderne Experimente: Fuchs-Koprolithen; Hundeverbiss an gekochten und gebratenen Knochen; inkl. Abbildungen). Walters 1984 (Verlagerung und Zerstörung von Knochen durch Wildtiere).
- Schweinefrass: Greenfield 1988.
- Speziell Feliden- bzw. Katzenverbiss, moderne Experimente inkl. Abbildungen: Andrews/ Nesbit Evans 1983, Moran/O'Connor 1992.

Wurzelfrass (Abb. 4: Binford 1981, S. 50)

Beschreibung:
- Lange, im Querschnitt runde, stark gewundene Vertiefungen an der Knochenoberfläche.

Mögliche Verursacher:
- Wurzeln. Brothwell (1992) stellt zur Diskussion, ob und in welcher Form Insekten Spuren

auf den Knochen selbst hinterlassen können. Dazu wurden Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen von Defekten auf römerzeitlichen Hühnerknochen angefertigt (Abb. in Brothwell 1992, S. 15/16).

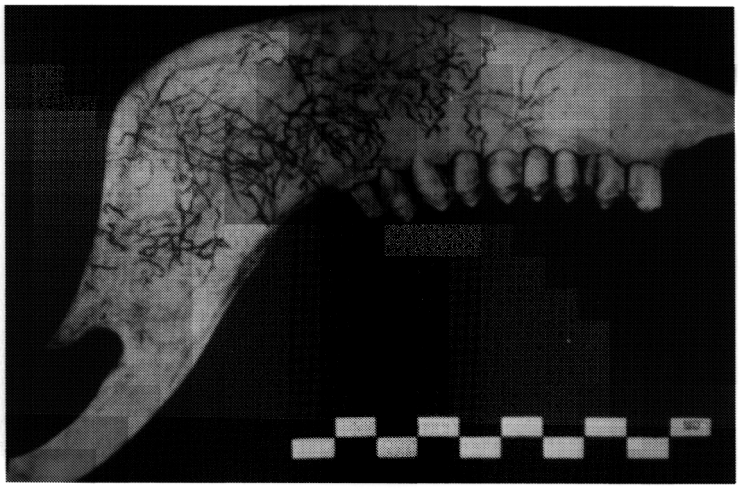


Abb. 4: Wurzelfrass an Unterkiefer (Binford 1981, S. 50).

Häufigkeit an Tierknochen:
- Generell selten, meist unter 1% (im Gegensatz zu menschlichen Skelettresten).

Bevorzugung von Knochen oder Knochenteilen:
- Überall möglich, besonders gut zu beobachten ist Wurzelfrass auf Schaftstücken.

Literatur:
- An Tierknochen generell sehr selten beschrieben und nur bei auffälligen Häufungen erwähnt, keine Standardauswertung. Bsp.: Aichel 1927 (für Moorleichen). Lyman 1994, S. 375 f. Brothwell 1992.

Verdaute Knochen

Beschreibung:
- Scharfkantige Dellen auf der Oberfläche, klar abgegrenzt und z.T. Verbissspuren ähnlich.
- Die Oberfläche kann z.T. bis auf die Spongiosa abgelöst sein ⇒ in solchen Fällen ist die Bestimmbarkeit gering. Dies gilt besonders für Felide, deren Verdauungssäfte die Knochenoberflächen offensichtlich besonders stark anlösen (Andrews/Nesbit Evans 1983).
- Abgebrochene Kanten der Knochen sind verrundet und glatt.
- Je nach Tierart haben alle Fragmente eine bestimmte Maximalgrösse, z.B. Fuchs: maximal 10-12 mm Länge, durchschnittlich 4-6 mm.

Mögliche Verursacher:
- Caniden, Feliden, Mensch. Durch saure Verdauungssäfte werden die Oberflächen der Knochen angegriffen und z.T. aufgelöst.

Häufigkeit an Tierknochen:
- Sehr selten, vor allem in Koprolithen von Carnivoren nachgewiesen (verdaute menschliche Knochen sind aus der forensischen Anthropologie bekannt, z.B. ein in einem Haikadaver gefundenes Schienbein (Maples 1996).
- Als Einzelknochen sind verdaute Stücke innerhalb grösserer Tierknochenansammlungen gut erkennbar.

Bevorzugung von Knochen oder Knochenteilen:
- Nein. Am besten erkennbar sind Epiphysen-Stücke mit relativ glatter Oberfläche.

Literatur:
- Andrews 1995. Andrews/Nesbit Evans 1983. Crandall/Stahl 1995 (Experiment: Mensch verdaut Kleinsäuger). Stallibrass 1990, S. 154 f. (moderne Fuchs-Koprolithen).

Verwitterung, Erosion von Knochen (Abb. 5: Lyman 1994, S. 357a. Abb. 6: Lyman 1994, S. 355)

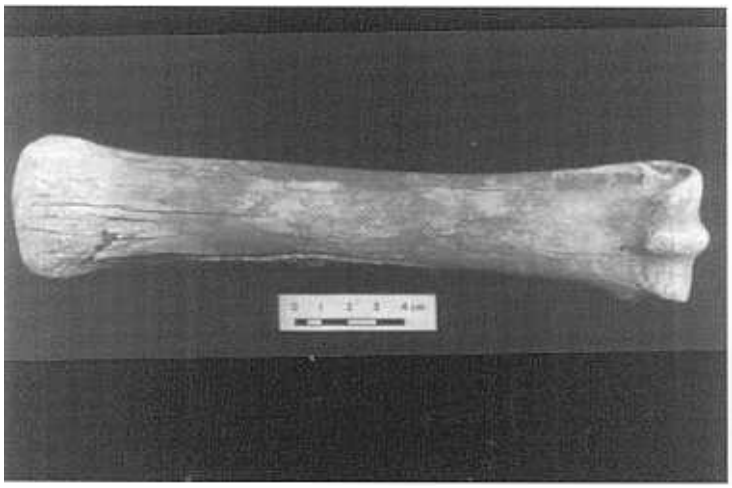


Abb. 5: Erhaltung: beginnende Oberflächenzerstörung (Lyman 1994, S. 357a).

Beschreibung:
- Verwitterungsdefekte sind die häufigsten an Skelettmaterial zu beobachtenden Phänomene.
- Die Verwitterung in verschiedenen Stadien wird z.B. bei Behrensmeyer 1978 und Lyman 1994 ausführlich beschrieben.
- Ein kurzer Überblick über die aktuelle Diskussion findet sich bei Noe-Nygaard 1987.
- Zum Einfluss der Entkalkung auf Knochenoberfläche und -grösse: Noe-Nygaard 1987, S. 20, Abb. 8.
- Zum Einfluss von (Grund-)Wasser auf die Erhaltung s. Hedges/Millard 1995.

Häufigkeit an Tierknochen:
- Häufig.

Bevorzugung von Knochen oder Knochenteilen:
- Die Gelenkenden lösen sich zuerst vollständig auf, während sich die Schaftteile als längliche Splitter länger erhalten und bestimmbar bleiben.
- Grundsätzlich gilt: Je mehr Kompakta vorhanden ist, desto besser und länger ist die Erhaltung im Boden. Am besten erhält sich Zahnschmelz.
- Beispiel: Mays 1992: Menschliche Skelette aus Ipswich, Suffolk, U.K., Mittelalter (die theoretisch vorhandene Zahl Knochen und Skelettelemente sollte bekannt sein).

Literatur:
- Andrews 1995. Hedges/Millar 1995. Lyman 1994. Mays 1992. Noe-Nygaard 1987.

Table 9.1 *Weathering stages in large (after Behrensmeyer 1978) and small (after Andrews 1990) mammals. Additions to large mammal descriptions from Johnson (1985) in parentheses*

	LARGE MAMMALS		SMALL MAMMALS	
Weathering stage	Description	Range in years since death	Description	Range in years since death
0	greasy, no cracking or flaking, perhaps with skin or ligament/ soft tissue attached (marrow edible, bone still moist)	0-1	no modification	
	cracking parallel to fiber structure (longitudinal); articular surfaces perhaps with mosaic cracking of covering tissue and bone (split lines begin to form, low moisture, marrow sours and is inedible)	0-3	slight splitting of bone parallel to fiber structure; chipping of teeth and splitting of dentine	-5
2	flaking of outer surface (exfoliation), cracks are present, crack edge is angular (marrow decays, split lines well developed)	2-6	more extensive splitting but little flaking; chipping and splitting of teeth leading to loss of parts of crown	
3	rough homogeneously altered compact bone resulting in fibrous texture; weathering penetrates 1-1.5 mm maximum; crack edges are rounded	4-15	deep splitting and some loss of deep segments or „flakes" between splits; extensive splitting of teeth	
4	coarsely fibrous and rough surface; splinters of bone loose on surface, with weathering penetrating inner cavities; open cracks	6-15		
5	bone falling apart in situ, large splinters present, bone material very fragile	6-15		

Abb. 6: Verwitterungsstadien (Lyman 1994, S. 355).

Spezialfälle

Gekochte/gebratene Knochen:
- Literatur: Pearce/Luff 1994 (Experimente mit Gewichtsverlust und Bruchfestigkeit).

Spuren von Vögeln an Knochen (Pick-Marken):
- Beschrieben bei Noe-Nygaard 1987.

Zerstörung von Geweih durch Wildtiere:
- Vgl. z.B. Altum 1897.

Schneckenfrass:
- Schnecken lösen die Oberfläche zuerst mit Hilfe eines Sekretes an (es entstehen helle Flekken) und raspeln anschliessend das angelöste Material mit ihrer „Zunge" ab (Altum 1897). Eine gute Abbildung findet sich bei Fechter/Falkner 1989, S. 271.

„Trockenscheuerung":
- Starke Verrundung und Politur von Knochen, die in trockenem Sediment stark mechanisch beansprucht werden. Gefahr der Verwechslung mit Artefakten.
- Beispiel: Knochen aus Augster Strassenkoffern (Schmid 1965).
- Moderne Experimente zur Verrundung: Andrews 1995.

Zerstörung der Mikrostrukturen von Knochen durch Pilze und Bakterien:
- Tierknochen: s. Child 1995.
- Am menschlichen Skelettmaterial spielen Pilz- und bakterieller Befall eine grosse Rolle, da sie u.a. zu Pseudopathologien führen. Mikroskopische und REM-Untersuchungen vgl. z.B. Schultz 1986, S. 84 f. und S. 108 f. Bei Spuren- und speziell aDNA-Analysen ist die diesbezügliche Kontamination der Knochenproben vorab zu klären.

Literaturverzeichnis

Aichel O. 1927
Über Moorleichen, nebst Mitteilung eines neuen Falles. Verhandlungen der Gesellschaft für Physische Anthropologie Bd. II, S. 57-73.

Altum Prof. Dr. 1897
Zerstörung abgeworfener Geweihstangen durch Schnecken, Fuchs, Eichhorn, Schwarzwild. Zeitschrift für Jagd und Forstwesen 29, S. 146-152.

Andrews P. 1995
Experiments in Taphonomy. Journal of Archaeological Science 22, 2, S. 147-153.

Andrews P., Nesbit Evans E.M. 1983
Small mammal bone accumulations produced by mammalian carnivores. Paleobiology 9, 3, S. 289-307.

Becker C., Johannson F. 1981
Die neolithischen Ufersiedlungen von Twann. Tierknochenfunde. 2. Bericht, Band 11. Bern.

Behrensmeyer A.K. 1978
Taphonomic and ecologic information from bone weathering. Paleobiology 4, 2, S. 150-162.

Binford, L.R. 1981
Bones. Ancient men and modern myths. Studies in Archaeology. New York, London.

Blumenschine R.J. 1988
An Experimental Model of the Timing of Hominid and Carnivore Influence on Archaeological Bone Assemblages. Journal of Archaeological Science 15, S. 483-502.

Brothwell D. 1992
Bones and beyond bones: insects, stains and keratin remains. Papers from the bone taphonomy workshop at York, September 1991. Circea 9, 1, S. 15-17.

Crandall B.D., Stahl P.W. 1995
Human Digestive Effects on a Micromammalian Skeleton. Journal of Archaological Science 22, 6, S. 789-797.

Ebersbach R. 1998
Ausgrabungen am Basler Murus Gallicus Teil 2: Die Tierknochen. Materialhefte zur Archäologie in Basel 13. Basel.

Eickhoff S., Herrmann B. 1985
Surface Marks on Bones from a Neolithic Collective Grave (Odagsen, Lower Saxony). A Study of Differential Diagnosis. Journal of Human Evolution 14, S. 263-274.

Fechter R., Falkner G. 1989
Weichtiere. Die farbigen Naturführer. Mosaik-Verlag. München.

Gaudzinski S. 1998
Vorbericht über die taphonomischen Arbeiten zu Knochengeräten und zum faunistischen Material der mittelpaläolithischen Freilandfundstelle Salzgitter-Lebenstedt. Archäologisches Korrespondenzblatt 28, S. 323-337.

Greenfield H.J. 1988
Bone Consumption by Pigs in a Contemporary Serbian Village: Implications for the Interpretation of Prehistoric Faunal Assemblages. Journal of Field Archaeology 15, S. 473-479.

Haynes G. 1980
Evidence of carnivore gnawing on Pleistocene and Recent mammalian bones. Paleobiology 6, 3, S. 341-351.

Haynes G. 1982
Utilisation and Skeletal Disturbances of North American Prey Carcasses. Arctic 35, 2, S. 266-281.

Haynes G. 1983
A guide for differentiating mammalian carnivore taxa responsible for gnaw damage to herbivore limb bones. Paleobiology 9, 2, S. 164-172.

Hedges R.E.M., Millard, A.R. 1995
Bones and Groundwater: Towards the Modelling of Diagenetic Processes. Journal of Archaeological Science 22, 2, S. 155-164.

Lyman, R.L. 1994
Vertebrate Taphonomy. Cambridge Manuals in Archaeology. Cambridge.

Maples W.R. 1996
Knochengeflüster: mysteriösen Kriminal- und Todesfällen auf der Spur. Basel, Boston, Berlin.

Mays S. 1992
Taphonomic factors in a human skeletal assemblage. Papers from the bone taphonomy workshop at York, September 1991. Circea 9, 2, S. 54-58.

Moran N.C., O'Connor T.P. 1992
Bones that cats gnawed upon: a case study in bone modification. Circea 9, 1, S. 27-34.

Noe-Nygaard N. 1987
Taphonomy in Archaology - with special emphasis on Man as a Biasing Factor. Journal of Danish Archaeology 6, S. 7-62.

Orschiedt J. 1999
Manipulationen an menschlichen Skelettresten. Taphonomische Prozesse, Sekundärbestattungen oder Anthropologie? Urgeschichtliche Materialhefte Bd. 13. Tübingen.

Palmqvist P., Martinez-Navarro B., Arribas A. 1996
Prey selection by terrestrial carnivores in a lower Pleistocene paleocommunity. Paleobiology 22, 4, S. 514-534.

Pearce J., Luff R. 1994
The Taphonomy of Cooked Bone. In: Luff R., Rowley-Conwy P. (eds.), Whither Environmental Archaeology? Oxbow Monograph 38, S. 51-56.

Schmid E. 1965
Über gerundete Knochenbruchstücke aus dem römischen Strassenkies von Augusta Raurica. Festschrift Alfred Bühler ([o.O.], S. 333-338.

Schultz M. 1986
Die mikroskopische Untersuchung prähistorischer Skelettfunde. Anwendung und Aussagemöglichkeiten der differentialdiagnostischen Untersuchung in der Paläopathologie. Archäologie und Museum, Bd. 1. Liestal.

Stallibrass S. 1990
Canid Damage to Animal Bones: Two current lines of research. In: Robinson D.E. (ed.), Experimentation and Reconstruction in Environmental Archaeology. Oxford, S. 151-165.

Walters I. 1984
Gone to the Dogs: A Study of Bone Attrition at a Central Australian Campsite. Mankind 14, S. 389-400.

Wells C. 1967
Pseudopathology. In: Brothwell D., Sandison A.T. (eds.), Diseases in Antiquity. Springfield. S. 5-19.

Anschrift

Dr. Renate Ebersbach
Seminar für Ur- und Frühgeschichte
Petersgraben 9-11
CH - 4051 Basel
E-mail: renate.ebersbach@unibas.ch

Eingang: 21.1.00

Impressum

Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie
Bulletin de la Société Suisse d'Anthropologie
herausgegeben von der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie (SGA/SSA)
mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften (SANW)

Redaktion:
Susi Ulrich-Bochsler, Bern

Korreferentin (textes français):
Isabelle Gemmerich, Brugg

Layout:
Andreas Cueni, Aesch

Bezugsort:
Redaktion: S. Ulrich-Bochsler, Historische Anthropologie, Medizinhistorisches Institut der Universität Bern, Fabrikstrasse 29d, CH - 3012 Bern
Telefon 031/631 84 92. Fax 031/631 37 82. E-mail susi.ulrich-bochsler@mhi.unibe.ch.

Herstellung: Atelier d'Impression de l'Université de Genève
Couverture: Montage Isabelle Gemmerich d'après un dessin original de Lucrezia Bieler-Beerli (Zürich) pour l'exposition du Musée d'Anthropologie de l'Université de Zürich

Erscheinungsweise: Vom Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie erscheinen in der Regel zwei Hefte pro Jahr (Frühjahr, Herbst), die zusammen einen Band bilden.

ISSN 1420 - 4835