

**Mikroevolution und Geschichte der Pest:
Paläogenetische Detektion und Charakterisierung von *Yersinia pestis*,
gewonnen aus historischem Skelettmaterial**

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

eingereicht von
Dipl.-Biol. Lisa Seifert
aus
Pocking/München

München 2013

Diese Dissertation wurde angefertigt
unter der Leitung von Prof. Dr. Gisela Grupe
am Institut für Anthropologie und Humangenetik
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstgutachter: Prof. Dr. Gisela Grupe
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Enard

Arbeit eingereicht am: 9.10.2013
Tag der mündlichen Prüfung: 26.2.2014

Die vorliegende Arbeit wurde dankenswerterweise durch ein Promotionsstipendium nach dem Bayerischen Eliteförderungsgesetz (BayEFG) gefördert.

Mama & Papa

Ich kann, weil ich will, was ich muss.
Immanuel Kant

Inhalt

I	Zusammenfassung	12
II	Einleitung	13
1	<i>Drei Pestpandemien der Menschheitsgeschichte</i>	13
1.1	Begriffsklärung	13
1.2	Die Pest vom 6. Jahrhundert bis heute	14
2	<i>Yersinia pestis</i>	17
3	<i>Pathogenese und Formen der Pest</i>	19
3.1	Lehrmeinung in der Moderne	20
3.2	Die Pest im Verständnis des mittelalterlichen Menschen	25
4	<i>Erhalt und Degradation von Biomolekülen in Skelettmaterial</i>	26
5	<i>Kontamination</i>	30
6	<i>Aktueller Forschungsstand</i>	31
6.1	Alternativtheorien.....	31
6.2	Forschungen an „alter“ DNA	35
7	<i>Ziele der Arbeit und Fragestellung</i>	37
III	Material	39
1	<i>Das frühmittelalterliche Gräberfeld Aschheim-Bajuwarenring</i>	41
2	<i>Das Massengrab in Manching-Pichl</i>	44
3	<i>Drei Söldner aus Brandenburg</i>	44
4	<i>Individuen vom Elisabethengottesacker in Basel</i>	46
IV	Methoden	48
1	<i>Studiendesign und Strategien zur Kontaminationsvermeidung</i>	48
2	<i>Molekulargenetische Applikationen</i>	52
2.1	Untersuchte Genloci	52
2.1.1	<i>pla</i>	53
2.1.2	<i>HLA</i>	54
2.1.3	<i>pPCP1</i>	54
2.1.4	<i>napA</i>	54
2.1.5	<i>caf1</i>	55
2.1.6	SNPs	55
2.2	Probenvorbereitung	57
2.3	DNA-Extraktion.....	58
2.3.1	Protokoll 1 nach Yang <i>et al.</i> (1998)	58
2.3.2	Protokoll 2 nach Rohland & Hofreiter (2007a, b)	59
2.3.3	Protokoll 3 nach Rohland <i>et al.</i> (2010) und Rohland & Hofreiter (2007a).....	59
2.3.4	Protokoll 4 mit Verwendung des QIAamp [®] DNA Investigator-Kits.....	60
2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	60
2.4.1	Konventionelle PCR und Detektion des Amplifikationserfolgs auf einem Agarosegel	61
2.4.2	Sanger-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese	63
2.4.3	Real Time-PCR.....	64
2.4.3.1	Absolute Quantifizierung 2nd derivative Maximum	65
2.4.3.2	Endpunkt-Genotypisierung	66

2.4.4.	PCR-Optimierung	70
2.4.4.4.	Optimierung Real Time-basierter Assays	70
2.4.4.4.1	<i>pla</i>	70
2.4.4.4.2	HLA.....	73
2.4.4.4.3	SNPs	73
2.4.4.1	Optimierung konventioneller Assays	76
2.4.4.1.1	<i>pla</i>	76
2.4.4.1.2	SNPs und andere Genloci.....	77
3	Versuch der Detektion des F1-Antigens von <i>Yersinia pestis</i>	78
3.1	Das <i>Yersinia pestis</i> -spezifische F1-Antigen.....	78
3.2	Methodisches Vorgehen	78
3.2.1	Probenvorbereitung und Protein-Extraktion	79
3.2.2	Vergleich von vier Tests zur Detektion des F1-Antigens von <i>Yersinia pestis</i>	80
V	Ergebnisse	83
1	Wahl der Extraktionsmethode	83
2	Molekulargenetische Resultate.....	84
2.1	PCR-Optimierungen	84
2.1.1	Auswirkung des Poolens von Extrakten	84
2.1.2	Bedeutung des REPLI-Kits	85
2.1.3	PCR-Assays zur <i>pla</i> -Detektion	85
2.1.4	Real Time basiertes Assay zur <i>HLA</i> -Detektion	91
2.1.5	Konventionelle PCR-Assays zur Typisierung	93
2.1.6	Real Time-basierte Assays zur Typisierung	94
2.1.7	Optimierte PCR-Protokolle	96
2.2	DNA-Detektionen in historischem Skelettmaterial	100
2.2.1	Basen-Abweichungen	100
2.2.2	<i>pla</i> -und <i>HLA</i> -Detektionen	102
2.2.3	Typisierungen	104
2.2.3.1	Justinianische Pest	105
2.2.3.2	Black Death	106
3	F1-Antigen-Detektion.....	108
VI	Diskussion.....	110
1	Authentizität	110
2	Optimierung der Protokolle zur Extraktion und Amplifikation.....	116
2.1	Wahl der Extraktionsmethode	116
2.2	PCR-Optimierungen	118
2.2.1	Vermeidung des Poolens von Extrakten	118
2.2.2	Eignung des REPLI-g-Kits für die Amplifikation alter DNA	119
2.2.3	<i>pla</i> -Assay	120
2.2.4	<i>HLA</i> -Assay	121
2.2.5	SNP-Assays	122
2.2.6	Generelle Bemerkung zu konventionellen PCRs vs. qPCRs.....	122
2.2.7	Strategieempfehlung für die Analyse alter DNA auf <i>Yersinia pestis</i>	122
3	Analyse der DNA aus historischem Skelettmaterial	123
3.1	DNA-Erhalt	123
3.2	Bedeutung und Erklärung der Negativergebnisse.....	125
3.2.1	Mögliche Gründe für Negativergebnisse	125

3.2.2	Aschheim	128
3.2.3	Manching-Pichl	129
3.2.4	Basel.....	130
3.3	Pest-Nachweise	131
3.3.1	Die Pest in Aschheim im 6. Jahrhundert	131
3.3.1.1	Phylogenetische Lokalisierung des Aschheimer Erregers	131
3.3.1.2	Bedeutung der Ergebnisse für frühere <i>Y. pestis</i> -Detektionen in aDNA	135
3.3.1.3	Alter und Ursprung des Erregers.....	136
3.3.1.4	Verbreitung der Justinianischen Pest nach Bayern.....	136
3.3.1.5	Frühmittelalterliche Mehrfachbestattungen als Pest-Indikatoren	137
3.3.2	Das große Sterben in Manching-Pichl und Brandenburg.....	138
3.3.2.1	Einordnung der Ergebnisse in die Phylogenie.....	138
3.3.2.2	Ausbreitung.....	143
3.3.2.2.1	Bisherige Erkenntnisse aus anderen Studien.....	143
3.3.2.2.2	Verbreitungswege der Pest zu den Detektionsorten dieser Arbeit.....	143
3.3.2.2.2.1	Weg nach Manching-Pichl.....	144
3.3.2.2.2.2	Weg nach Brandenburg.....	146
3.3.2.3	Datierung	147
4	<i>Fehlschlagen der F1-Antigen-Detektion</i>	147
5	<i>Synthese der Ergebnisse</i>	149
6	<i>Ausblick</i>	150
VII	Literaturverzeichnis	152
VIII	Anhang	166
1	<i>Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</i>	166
2	<i>Zahnschema</i>	166
3	<i>Sequenzen der artifiziellen DNA-Konstrukte</i>	167
4	<i>Primer und Sonden</i>	168
5	<i>Optimierungsläufe der konventionellen <i>pla</i>-PCR</i>	171
6	<i>Optimierungsläufe der <i>pla</i>-qPCR</i>	176
7	<i>Optimierungsläufe der HLA-qPCR</i>	179
8	<i>Optimierungsläufe konventioneller Typisierungs-PCRs</i>	181
9	<i>Optimierungsläufe Real Time-basierter Typisierungs-PCRs</i>	182
10	<i>Probit-Regressions-Analyse</i>	186
11	<i><i>pla</i>- und HLA-Ergebnisse</i>	187
12	<i>IUB Nucleotide Codes</i>	193
13	<i>Sequenzen je Genort</i>	194
14	<i>Basenabweichungen</i>	204
IX	Danksagung	205
X	Erklärung	206
XI	Lebenslauf	207

I Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung von *Yersinia (Y.) pestis* in historischem Skelettmaterial. Die Disziplin Paläomikrobiologie verspricht, Beweise zu liefern, die durch die Erforschung moderner Pathogene nicht möglich wären und dadurch möglicherweise das Verständnis zu historischen Infektionen zu verändern (Tsangaras & Greenwood 2012).

Yersinia pestis als der Erreger der Pest wird für drei Pandemien der Menschheitsgeschichte verantwortlich gemacht: die Pest der Moderne, den Schwarzen Tod im 14. und den nachfolgenden Jahrhunderten sowie die Pest des Justinian.

Diese Dissertation beschäftigte sich mit dem Nachweis und der Typisierung des Pest-Erregers in historischen Individuen verschiedener Fundorte aus den beiden letztgenannten Pandemien. Dazu wurden methodisch zwei Wege beschritten: Der Nachweis des Erregers auf molekulargenetischer Ebene durch die Detektion verschiedener Loci und ein davon unabhängiger alternativer Weg zur Detektion des Pathogens über den Nachweis seines Kapselproteins. Letzten Weg zu beschreiten, ist in dieser Arbeit nicht geglückt. Dafür waren die auf Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruhenden Ansätze umso erfolgreicher.

Für die Analysen standen Individuen von vier Fundorten in Deutschland und der Schweiz aus unterschiedlichen Zeitstellungen zur Verfügung. Die Skelette des Gräberfelds Aschheim-Bajuwarenring datieren ins 6. Jahrhundert, die Individuen aus Manching-Pichl und Basel ins 14. bis 17. Jahrhundert und die skelettalen Überreste von drei Menschen aus Brandenburg in die Zeit des Dreißigjährigen Kriegs.

Nach der Erprobung eines für das zur Verfügung stehende Material optimal geeigneten Extraktions-Protokolls und der Etablierung neuer PCR-Protokolle wurden die Verfahren auf Extrakte alter DNA (aDNA) angewandt. Dabei wurde zur Generierung authentischer Ergebnisse im neu etablierten aDNA-Labor des ArchaeoBioCenters der LMU gearbeitet, das die maximalen Möglichkeiten der Verhinderung von Kontaminationen bereitstellt.

Es ist in dieser Arbeit gelungen, bereits publizierte Pest-Nachweise in Skeletten aus Aschheim und Manching-Pichl zu reproduzieren und damit zu validieren. Darüber hinaus konnte in Individuen eines weiteren, bisher molekulargenetisch nicht untersuchten Fundorts in Brandenburg die Anwesenheit der Pest gezeigt werden. Durch tiefer gehende molekulargenetische Untersuchungen anderer Loci sowie Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) wurden die jeweiligen Erreger in einen bereits existierenden phylogenetischen Stammbaum eingeordnet.

Durch den Beweis der Anwesenheit der Pest in Aschheim im 6. Jahrhundert wurde das Bakterium *Yersinia pestis* eindeutig als Verursacher der ersten Pandemie identifiziert – eine Assoziation, die nach anfänglichem Konsens zuletzt in Frage gestellt worden war. Spekulationen um das ätiologische Agens können jetzt definitiv eingestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit beenden auch weitere Diskussionen bezüglich des Biovars des Erregers während der ersten Pandemie. Durch Typisierungen wurde gezeigt, dass es sich bei diesem Erreger um einen anderen handelt als den, der für die zweite oder dritte Pandemie verantwortlich ist.

Der Nachweis und die Typisierung des Erregers im Zuge des Schwarzen Todes in Manching-Pichl und Brandenburg schließt die bis dato existierende genauer charakterisierte Detektionslücke in Deutschland. Bisher waren nur in England, Frankreich und den Niederlanden der bzw. die Erreger durch zwei Arbeitsgruppen aus Mainz und Tübingen/Kanada glaubhaft detektiert worden. Der in Deutschland identifizierte Erreger passt dabei zu den Ergebnissen der anderen Fundorte in Europa. Zudem scheint es in Deutschland über einen längeren Zeitraum nur einen Erregertyp gegeben zu haben, da die Ergebnisse der Individuen aus Brandenburg und Manching-Pichl in allen untersuchten Loci genau übereinstimmten.

Obwohl aufgrund ungenügenden Quellenmaterials nicht exakt belegbar scheint der Weg der Pest zu diesen beiden letztgenannten Fundorten in Deutschland ein anderer gewesen zu sein als der zu den anderen europäischen Fundorten.

II Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis der Pest, einer seit Jahrhunderten endemisch und epidemisch auftretenden Infektionskrankheit. Eingangs wird in diesem Kapitel auf die drei Pestpandemien der Menschheitsgeschichte eingegangen (Abschnitt 1). In weiteren Abschnitten werden das verursachende Bakterium *Yersinia pestis* (Abschnitt 2) sowie die Pathogenese und Formen der Krankheit „Pest“ (Abschnitt 3) beleuchtet. Da in dieser Arbeit DNA aus historischem Skelettmaterial untersucht wurde, werden anschließend die Erhaltungsbedingungen des Erbmaterials im Knochen bzw. Zahn sowie das Problem der Degradation (Abschnitt 4) erklärt, bevor durch einen Blick auf vorausgehende Arbeiten der aktuelle Forschungsstand (Abschnitt 5) dargestellt wird. Am Ende dieses Kapitels steht die Formulierung der Ziele und Fragestellung der vorliegenden Dissertation (Abschnitt 7).

1 Drei Pestpandemien der Menschheitsgeschichte

Bevor auf die einzelnen Pandemien der Menschheitsgeschichte eingegangen wird (Abschnitt 1.2), ist es nötig, diverse Begriffsdefinitionen vorzunehmen (Abschnitt 1.1).

1.1 Begriffsklärung

Das Wort „Pest“ bezeichnet nicht notwendigerweise nur die Beulenpest, sondern diente den Zeitgenossen der historischen Pandemien als generelle Beschreibung für eine schwere oder weitverbreitete Pestilenz (Cunha 2004). Im Altertum bezeichnete die „große Pest“ auch Pocken, Typhus, Malaria, Dengue-Fieber und andere ansteckende Seuchen. Deren finale Krankheitsbilder wie Gewichtsverlust, Benommenheit, Flüssigkeitsverlust, Bluthusten, Diarrhoe, Hautgeschwüre, Augenentzündungen, Lymphknoten-Schwellungen entsprechen sich (Bergdolt 2006, 2000). Gemeinsames Kennzeichen dieser Krankheiten ist auch, dass der Zusammenbruch des Immunsystems eine mehr oder weniger einheitliche Symptomatik hervorruft, die rasch zum Tod führt (Bergdolt 2000). Heute beschreibt der Begriff „Pest“ eine tödliche Epidemie oder Pestilenz (Scott & Duncan 2001).

Der Begriff „Schwarzer Tod“ als Bezeichnung für die „Große Pestilenz“ soll erst seit dem 16. Jahrhundert (Morris 1971) bzw. 17. Jahrhundert (Bergdolt 2006) in Gebrauch sein. Laut dem Medizinhistoriker Klaus Bergdolt soll „erst die Katastrophe des Dreißigjährigen Kriegs einen Pestmythos geschaffen“, also „dem Schwarzen Tod das Image einer besonders grausamen Seuche verliehen“ haben (Bergdolt 2006). Die ursprüngliche Bedeutung von „Schwarzer Tod“ ist strittig. Zu der Bezeichnung sollen sich im Zuge der Erkrankung schwarz verfärbende Körperpartien geführt haben (Suerbaum *et al.* 2009; Jones *et al.* 1979). Der Historiker Ole Benedictow hingegen widerspricht der Namensgebung aufgrund von Symptomen (Benedictow 2004) und führt als Grund einen Übersetzungsfehler des lateinischen Ausdrucks „atra mors“ an, worin „atra“ sowohl „schrecklich“ als auch „schwarz“ bedeuten könne (D'Irsay 1926 IN: Benedictow 2004). Bergdolt hingegen übersetzt „atra mors“ mit dem „unglückbringenden Sterben“. Rolf Kiessling spricht sich dafür aus, die Bezeichnung „Schwarzer Tod“ nur für die Zeit von 1347 bis 1350 zu verwenden (Kiessling 2005) – eine Eingrenzung, die auch der Historiker Manfred Vasold fordert, um den ersten Ausbruch von nachfolgenden Wellen abzugrenzen (Vasold 2003). Andere Autoren setzen das Ende 1351 an, folgen aber der Eingrenzung (z. B. Bergdolt 2006; Perry & Fetherston 1997).

Die Pest kann sowohl enzootisch als auch endemisch herrschen. Eine „Endemie“ beschreibt ein gehäuftes, räumlich begrenztes, aber zeitlich unbegrenztes Auftreten einer Krankheit in einer Region, von der ein Anteil der Population erfasst wird (Kramer *et al.* 2009; siehe auch Tabelle 1). Zur Beschreibung einer Endemie unter Tieren wird der Begriff Enzoonose verwendet (Reuter 2007), auch gebräuchlich ist Enzootie. Diese Begriffe sind abzugrenzen von einer „Epidemie“ und einer „Pandemie“. In der Infektionsepidemiologie versteht man unter einer „Epidemie“ ein gehäuftes, aber

zeitlich und räumlich begrenztes Auftreten einer Infektionskrankheit. Eine „Pandemie“ bezeichnet eine sich über Länder und Kontinente ausbreitende Epidemie (Kramer *et al.* 2009).

Tabelle 1: Unterscheidung zwischen Epidemie, Pandemie und Endemie.

	zeitlich begrenzt	räumlich begrenzt
Epidemie	ja	ja
Pandemie	ja	nein
Endemie/Enzootie	nein	ja

1.2 Die Pest vom 6. Jahrhundert bis heute

In der Geschichte der Menschheit gibt es drei große Pestpandemien, die viele Todesopfer – laut der Weltgesundheitsorganisation WHO über 200 Millionen (WHO 2009) – gefordert haben: die Justinianische Pest, der Schwarze Tod und die Moderne Pest (Suerbaum *et al.* 2009; Perry & Fetherston 1997; WHO 2009).

Justinianische Pest

Der Beginn der Justinianischen Pest im byzantinischen Reich fällt in die Zeit der Regentschaft von Kaiser Justinian (Little 2007; Allen 1979). Obwohl es noch zuvor in historischen Texten Hinweise auf die Pest gibt (siehe Kapitel Diskussion, Abschnitt 6), werden die zyklisch wiederkehrenden Pest-Epidemien zwischen 541 und 750 AD als erste Pandemie bezeichnet (Perry & Fetherston 1997). Perry & Fetherston datieren die Justinianische Pest lediglich auf die Zeit von 541 bis 544 AD und geben mit Bezug auf ihre Quellen für die Zeit zwischen 558 und 654 die zweite bis elfte Epidemie der Krankheit an, die in acht- bis zwölfjährigen Zyklen wiederkehrte (Perry & Fetherston 1997). Anderen Quellen zufolge haben die Zyklen zwischen der ersten Epidemie und dem 20. Schub vier bis 15 Jahre betragen (Biraben 1975). In Europa und dem Vorderen Orient traten seit dem ersten Ausbruch 18 schwere Epidemien auf (Stathakopoulos 2004). Jean-Noël Biraben (1975) listet sieben Epidemien unter europäischer Beteiligung und 13 auf den Orient beschränkte Schübe auf. Durch die wenigen überlieferten schriftlichen Dokumente und die Neigung zeitgenössischer Autoren, Todeszahlen zu übertreiben, vermeiden die meisten Historiker jedoch eine Angabe von Opfer-Zahlen (Perry & Fetherston 1997). Schätzungen zufolge sind von 542 bis 700 n. Chr. 40 bis 50 Prozent der Bevölkerung gestorben (Russel 1968). Mitte des 8. Jahrhunderts verschwand die Pest (Biraben 1975; Brandes 2005; Niederstätter 2001).

Historiker wie Lester K. Little und der Arzt und Medizinhistoriker August Hirsch sowie der Molekularbiologe Robert Sallares zitieren mehrere zeitgenössische Autoren, um den Ausbreitungsweg der Pest widerzugeben (Little 2007; Hirsch 1881; Sallares 2007). Der Historiker Prokop, der in den frühen 540ern am Hof von Justinian in Konstantinopel war, schreibt in seinem Werk „Persischer Krieg“, die Pest habe unter den Ägyptern in Pelusium etwa im Juli 541 AD begonnen und sich von dort westwärts nach Alexandria und weiter über das Meer verbreitet, sei aber nach Norden auch Richtung Palästina und Syrien gelangt. Im zweiten Jahr soll die Pest Prokop zufolge in der Mitte des Frühlings Byzanz [später Konstantinopel, heute Istanbul] erreicht haben (Little 2007). Im Winter 543 seien Italien, Spanien, Nordafrika sowie im Norden Reims und Trier erreicht worden (Bergdolt 2006). Laut einem weiteren Zeitgenossen, Agathias, habe die Pest nach 544, als sie in Konstantinopel aufhörte, nie wirklich gestoppt, sondern sei von Ort zu Ort gezogen bis sie im Frühling 588 zum zweiten Mal ausbrach (Little 2007). Die betroffenen Gebiete der bekannten Welt waren letztendlich Nordafrika, Europa mit Italien und Spanien, Zentral- und Südasien sowie Arabien (Perry & Fetherston 1997). Obwohl Kaiser Justinian 544 die Pest für erloschen erklärte, flackerte sie 577 wieder auf und blieb im Mittelmehrraum rund 200 Jahre endemisch (Bergdolt 2006).

Aufgrund der von den Chronisten benutzten Bezeichnungen „pestis inguinalis“ – William MacArthur nutzt als Übersetzung des Ausdrucks bei den Römern „Leisten-Pest“ (engl. Original: „groin plague“; MacArthur 1957) – oder „glandolaria“ gibt es laut Hirsch keinen Zweifel an der Beulenpest (Hirsch

1881). Auch nach Meinung von Sallares unterstützen die historischen urkundliche Belege die allgemeine Auffassung, dass *Yersinia pestis* die Justinianische Pest verursacht hat (Sallares 2007).

Der Schwarze Tod und seine nachfolgenden Wellen

Vom 7. bis 14. (Vasold 2003) bzw. 8. bis 14. Jahrhundert (Drancourt & Raoult 2002; Brandes 2005) scheint Europa pestfrei gewesen zu sein und auch den meisten epidemischen Krankheiten entkommen zu sein (Perry & Fetherston 1997), wengleich noch in der Zwischenkriegszeit Medizinhistoriker der Auffassung waren, dass die Pest auch vor dem 14. Jahrhundert in Mitteleuropa grassierte (Vasold 2003). Andere Quellen sprechen davon, dass die Pest bereits Ende des 6. Jahrhunderts aus Süd-Europa verschwand (Scott & Duncan 2001; Twigg 1984) und dort für die nächsten 700 Jahre nicht auftrat (Twigg 1984).

Die zweite Pestpandemie verbreitete sich wahrscheinlich aus Zentral-Asien kommend 1330 bis 1346 entlang von Handelsrouten (Perry & Fetherston 1997). Laut zeitgenössischen Berichten erreichte die Pest im Frühjahr 1347 mit Caffa erstmals eine europäische Stadt (Bergdolt 2000). Caffa oder Kaffa heißt heute Feodosija und liegt auf der Insel Krim, die heute zur Ukraine gehört. Caffa war eine Handelsniederlassung der Genuesen, die mit tartarischen, russischen und asiatischen Händlern Beziehungen unterhielten. Seit 1346 war die Stadt jedoch von den Tartaren belagert worden. Als unter den Tartaren die Pest ausbrach, katapultierten sie die Leichen laut dem Zeitgenossen Gabriele de Mussis mittels Wurfmaschinen in die Stadt, sodass die Bewohner ebenfalls sterben sollten. Da die Christen die Leichen nicht wegschaffen konnten, warfen sie sie ins Meer, was dazu geführt haben soll, dass die ganze Luft verpestet und das Wasser vergiftet wurde (Bergdolt 1989). Wie noch in Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel beschrieben wird, ist eine Verbreitung der durch *Yersinia pestis* verursachten Pest so jedoch nicht möglich. Die Entstehung der Pest beim Menschen ist an einen Ratten-Floh als Vektor gebunden (WHO 2009), der seinen toten Wirt verlässt (Tikhomirov 1999; Gross 2009), wodurch von Toten selbst keine Infektionsquelle mehr ausgeht. Die einzig mögliche verbleibende Gefahr wären Flöhe, die sich noch in Kleidung aufhalten. Kleidung, Getreide und andere Handelswaren werden in vielen historischen Quellen der zweiten Pandemie – unterstützt von den Schlussfolgerungen jener Forscher, welche die dritte Pandemie studiert haben – als Transportmedium von Rattenflöhen (*Xenopsylla cheopis*) angesehen (Sallares 2007). Dem Historiker Robert S. Gottfried erscheint wahrscheinlicher, dass die Nager-Population der Stadt von den Nagern auf dem Land infiziert wurde (Gottfried 1983). Zudem besteht Zweifel an Gabriele de Mussis als Augenzeugen. Dieser soll seine Heimat Italien während des Schwarzen Tods nicht verlassen und seine Geschichte von zurückkehrenden Seefahrern aufgegriffen haben – eine Quelle, die Gottfried als „nicht immer verlässlich“ wertet (Gottfried 1983). Dennoch passt die Beschreibung der Luftverpestung zur Erklärung der Zeitgenossen für die Entstehung der Pest (siehe Abschnitt 3.2 in diesem Kapitel).

Unterschiedlichen Angaben nach soll ein Mensch aus dem Heer (Bergdolt 2000) bzw. sollen italienische Bewohner Caffas auf der Flucht die Pest verbreitet haben (Lechner 1884; Gottfried 1983). Von Caffa aus sollen infizierte Flöhe auf Ratten, Waren und der Kleidung von Seeleuten nach Süden und Westen verschleppt worden sein. 1347 erreichte die Pest Trapezunt an der Südküste des Schwarzen Meeres, Alexandria und Zypern. Im Sommer 1347 ist sie in Konstantinopel. Ausgehend von jeder neu infizierten Hafen- und Handelsstadt der Levante verbreitete sich die Seuche weiter (Bergdolt 2000), so laut de Mussis nach Genua und Venedig (Bergdolt 1989). Das erste von der Pest betroffene westeuropäische Gebiet war Sizilien, in dessen Stadt Messina zwölf genuesische Schiffe laut Michele da Piazza auf der Flucht vor der Pest im Oktober 1347 anlegten. Von Sizilien aus erreichte die Pest per Schiff die Hafenstädte der Adria und des Tyrrhenischen Meers mit Venedig, Pisa und Genua (Bergdolt 2000). Als die von den Schiffen ausgehende Gefahr erkannt worden war, soll in Genua versucht worden sein, das Anlegen eines Schiffes gewaltsam zu verhindern (Ziegler 1972). Als ein Schiff, das in Italien nicht anlanden durfte, in Marseilles gelöscht wurde, wurde die Pest nach Frankreich eingeschleppt (Ziegler 2009). Seit dem Schwarzen Tod bis zur Mitte des 17. Jahrhunderts zogen alle zehn bis 20 Jahre größere oder kleinere Pestzüge durch Europa (Koelbing 1984), wenn auch nicht häufig (Perry & Fetherston 1997).

Die Pest traf in der Mitte des 14. Jahrhunderts auf eine gebeutelte Bevölkerung. Kurz nach 1300 verschlechterte sich in Europa das Klima als Auswirkung einer fortschreitenden Abkühlung und beendete damit das warme mittelalterliche Regime (Lamb 1989), das Paläoklimatologen „die frühmittelalterliche Wärmeperiode“ oder „das kleine Optimum“ nennen (Gottfried 1983). Im West- und Mitteleuropa des 14. Jahrhunderts kam es zu starken und langandauernden Witterungsschwankungen. Waren die Sommer in den späten zwanziger, dreißiger Jahren und achtziger Jahren des 14. Jahrhunderts überwiegend warm und (zu) trocken, waren sie in den sechziger Jahren vornehmlich feucht. In den dreißiger Jahren des 15. Jahrhunderts folgten in Mittel- und Westeuropa harte Winter bzw. lange winterliche Kälteperioden aufeinander. Die Winter der Jahre 1407/08 und 1422/23 erreichten historische Bedeutung, da das Eis der Ostsee überquert werden konnte. Der in England im Mittelalter teilweise über 100 Jahre ununterbrochen erfolgreich betriebene Weinbau verzeichnete Misserfolge. Aufgrund der ungünstigen Witterung kam es in Italien bereits Anfang des 14. Jahrhunderts zu schlechten Ernten – im Jahr 1315 reifte das Getreide in ganz Europa nicht aus (Lamb 1989) – und in deren Folge zu Hungersnöten (Vasold 1991). Regenperioden gefährdeten den Salzgewinn durch Meerwasserverdunstung, wodurch Fleisch nicht gepökelt bzw. konserviert werden konnte. Als Folge des Eiweißmangels habe sich eine Infektanfälligkeit entwickelt, da die Antikörperbildung gehemmt wurde (Bergdolt 2006). Laut Vasold endeten die vermehrt auftretenden Krankheiten vor allem für Kinder tödlich (Vasold 1991).

Der Schwarze Tod im 14. Jahrhundert soll geschätzt 50 Millionen Menschen das Leben gekostet haben (WHO 2000). Andere Quellen geben mit Bezug auf die Zeit von 1347 bis 1351 Bevölkerungsverluste von rund einem Drittel an, also etwa 25 Millionen Tote (Suerbaum *et al.* 2009; Bergdolt 2006), ausgehend von einer Bevölkerung in Europa von 75 bis 80 Millionen Menschen (Bergdolt 2006). Ebenfalls von rund einem Drittel Toter sind laut Robert S. Gottfried Berater von Papst Clemens VI. angesichts von 23.840.000 Opfern ausgegangen. In seinem Werk von 1983 gibt Gottfried die „aktuellsten Schätzungen zur Morbidität in Europa“ in einem Bereich von 25 und 45 Prozent an (Gottfried 1983). Die Zeitgenossen geben die Zahl der Opfer sehr hoch an – mit mehr Toten als ein Gebiet überhaupt Einwohner hatte. Beispiele dafür listen diverse Quellen (Niederstätter 2001; Koelbing 1984; Buess 1956; siehe auch Kapitel Material, Abschnitt 4). Laut Niederstätter ist das Ausdruck der mittelalterlichen Sichtweise, nicht aber von realistischen Schätzungen (Niederstätter 2001). Trotz der hohen Mortalität während der Epidemie des Schwarzen Todes sind aber die bedeutendsten Effekte durch die zyklisch wiederkehrenden Epidemien begründet (Perry & Fetherston 1997).

Aus historischer Sicht hält Hirsch die Vermutung, dass es sich im Mittelalter um die Beulenpest gehandelt hat, für begründet. Zwar sei die Seuchengeschichte des Mittelalters reich an chronistischen Mitteilungen über schwere „Pesten“, jedoch würden viele Seuchen im 16. und 17. Jahrhundert ausdrücklich als „Clades inguinalis“ oder „glandularia“ oder „Pestis bubonica“ bezeichnet, was für eine große Bedeutung der Beulenpest unter diesen „Pestilenzen“ spreche (Hirsch 1881). Eine ausführlichere Schilderung der Krankheit findet sich jedoch von Seiten ärztlicher Schriftsteller des Mittelalters nicht und das Wenige Angeführte beweise, dass sie unter dem alten, allgemeinen Begriff „Pestis“ verschiedene schwere epidemische Krankheitsformen vermengt haben. Nur der Schwarze Tod sei ausführlich geschildert worden (Hirsch 1881).

Die moderne Pest

Die dritte Pandemie begann in den 1850er Jahren in der chinesischen Provinz Yünnan. Seit mindestens 1800 hatte die Pest dort fast ausschließlich wilde Nager befallen. Als eine muslimische Rebellion ausbrach, in deren Folge viele Menschen starben oder flüchteten, verbreitete sich die Pest langsam südwärts und durch China aus (Kohn 2008). 1894 kam sie in Hong-Kong an, wo der Schweizer Tropenarzt Alexandre Yersin und ein japanischer Schüler Robert Kochs, Shibasaburo Kitasato, unabhängig voneinander und mit einigen Tagen Abstand das Bakterium als Erreger der Pest erkannten (Bergdolt 2006; Perry & Fetherston 1997). Da Kitasato jedoch in den Verdacht kam, ein anderes Bakterium beschrieben zu haben, entstand eine jahrzehntelange Debatte um den Erstbeschreiber des Pest-Erregers (Bergdolt 2006). Durch die Isolierung des *Bacterium pestis* wurde die Arbeit des Franzosen Paul Louis Simond akzeptiert, der bei seinem Studium der Pest in den

1890ern in Indochina die Verbindung zwischen Menschen- und Rattenpest hergestellt und die Bedeutung des Rattenflohs in der Übertragung zwischen ihnen postuliert hatte (Simond 1898).

Der Mikroorganismus wurde seit seiner Entdeckung mehrfach umbenannt. Zunächst wurde es *Bacterium pestis* genannt. Nach 1900 und bis 1923 hieß er *Bacillus pestis*, später *Pasteurella pestis* (Kohn 2008; Butler 1983). 1971 wurde das Bakterium zu Ehren von Yersin in *Yersinia pestis* umbenannt (Carmichael 1993).

Zwischen 1896 und 1907 wurde die Pest per Schiff nach Indien, Afrika, Thailand, Burma, Hawaii, Australien, Nord- und Südamerika verbreitet und erreichte in der Folge die ganze Welt. Laut Angaben der WHO dauerte die dritte Pandemie bis 1959, als weltweit nur von 200 Fällen berichtet wurde (Kohn 2008). Bedingt durch das Aufkommen effektiver öffentlicher Gesundheitsmaßnahmen und seit dem Einsatz von Antibiotika ab etwa 1950 sind die Mortalitätsraten und die Verbreitung sporadischer Pestfälle im Vergleich mit vorhergehenden Pandemien stark reduziert (WHO 2010). Dennoch dauert die dritte Pandemie bis heute an (Parkhill *et al.* 2001; WHO 2010). In den Jahren 2004 bis 2009 wurden aus 16 Ländern insgesamt 12.503 Fälle von Pest beim Menschen gemeldet, inklusive 843 Tode. Afrika ist dabei am stärksten betroffen. Die Krankheit ist jedoch nicht auf Entwicklungsländer beschränkt. 2009 wurden aus den Vereinigten Staaten von Amerika 27 Fälle an die WHO gemeldet, fünf Menschen starben (WHO 2010). In Europa existieren heute natürliche Foci nur in Randgebieten der Kaspischen Senke und im Osten des Kaukasus (Tikhomirov 1999).

Biowaffe

Die Pest heute hat daneben eine Bedeutung als potentielle Biowaffe (z. B. Gross 2009; WHO 2009). Zwar scheint eine vorsätzliche Verbreitung schwierig, da viele Erreger viele Menschen infizieren müssten, um eine Epidemie auszulösen. Dennoch stufen die Centers for Disease Control (CDC) *Yersinia pestis* als Kategorie-A-Biowaffenagens ein (Suerbaum *et al.* 2009). Das Schleudern der Pesttoten seitens der Tartaren in die Stadt Caffa wird als der erstmalige – wenn auch strittige (siehe oben) – Einsatz als biologische Waffe gewertet (Sallares 2007). Im Zweiten Weltkrieg sollen die Japaner den Pesterreger gegen China eingesetzt haben (Williams & Wallace 1989 IN: Worsham *et al.* 2007).

2 *Yersinia pestis*

Eigenschaften

Yersinia pestis gehört zur Familie der gramnegativen *Enterobacteriaceae* (Engelkirk & Duben-Engelkirk 2008; Brubaker 1991; Worsham *et al.* 2007) und wird zusammen mit den beiden anderen humanpathogenen Bakterien, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Sodeinde & Goguen 1988; Perry & Fetherston 1997), sowie acht weiteren Arten in das Genus der *Yersinien* gezählt (Perry & Fetherston 1997). *Y. pestis* ist der einzige Erreger der humanen Pest (Butler 1994). Das Bakterium ist unbeweglich, nicht säurefest, bildet keine Sporen und erscheint in klinischem Material nach verschiedenen Färbungen wie Giemsa, Wright oder Wayson in Form einer Sicherheitsnadel (Perry & Fetherston 1997; Tikhomirov 1999). Ursache dafür ist, dass die Enden des Bacillus Farbe besser aufnehmen (Tikhomirov 1999). Optimal wächst der Coccobacillus bei 28 bis 30 °C, vermehrt sich aber auch zwischen 4 °C und etwa 40 °C (Perry & Fetherston 1997). Das Bakterium wächst langsam. Zur Koloniebildung benötigt es auf angereicherten Medien 24 bis 48 Stunden (Brubaker 1991). In bestimmten Medien kann die Generationszeit auch nur 1,25 Stunden betragen (Staggs & Perry 1991). Zwar existiert keine richtige Kapsel, bei einem Wachstum über 33 °C bildet *Y. pestis* jedoch eine Hülle aus, die Kapsel-Antigen oder Fraktion 1 (F1) genannt wird (Brubaker 1972 IN: Perry & Fetherston 1997; siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 3.1).

Evolution

Y. pestis ist ein hoch-einheitlicher, hoch-konservierter Klon des Enteropathogens *Y. pseudotuberculosis* (Achtman *et al.* 1999). Neuesten Ergebnissen zufolge liegt die Abspaltung 1500 bis 6400 Jahre zurück (Cui *et al.* 2013). Anhand von 2298 SNPs in den Genomen von 133 Stämmen haben Cui *et al.* (2013) den derzeit aktuellsten phylogenetischen Baum von *Y. pestis* erstellt und damit den seit 2010 bestehenden Baum von Morelli *et al.* (2010) erweitert (siehe Abbildung 1). Der

Stammbaum enthält nun einen dritten und vierten Ast (Branch 3 und 4), die sich gleichzeitig mit den Ästen 1 und 2 während eines „Big Bangs“ an der als Knoten N07 bezeichneten Abzweigung abgespalten haben.

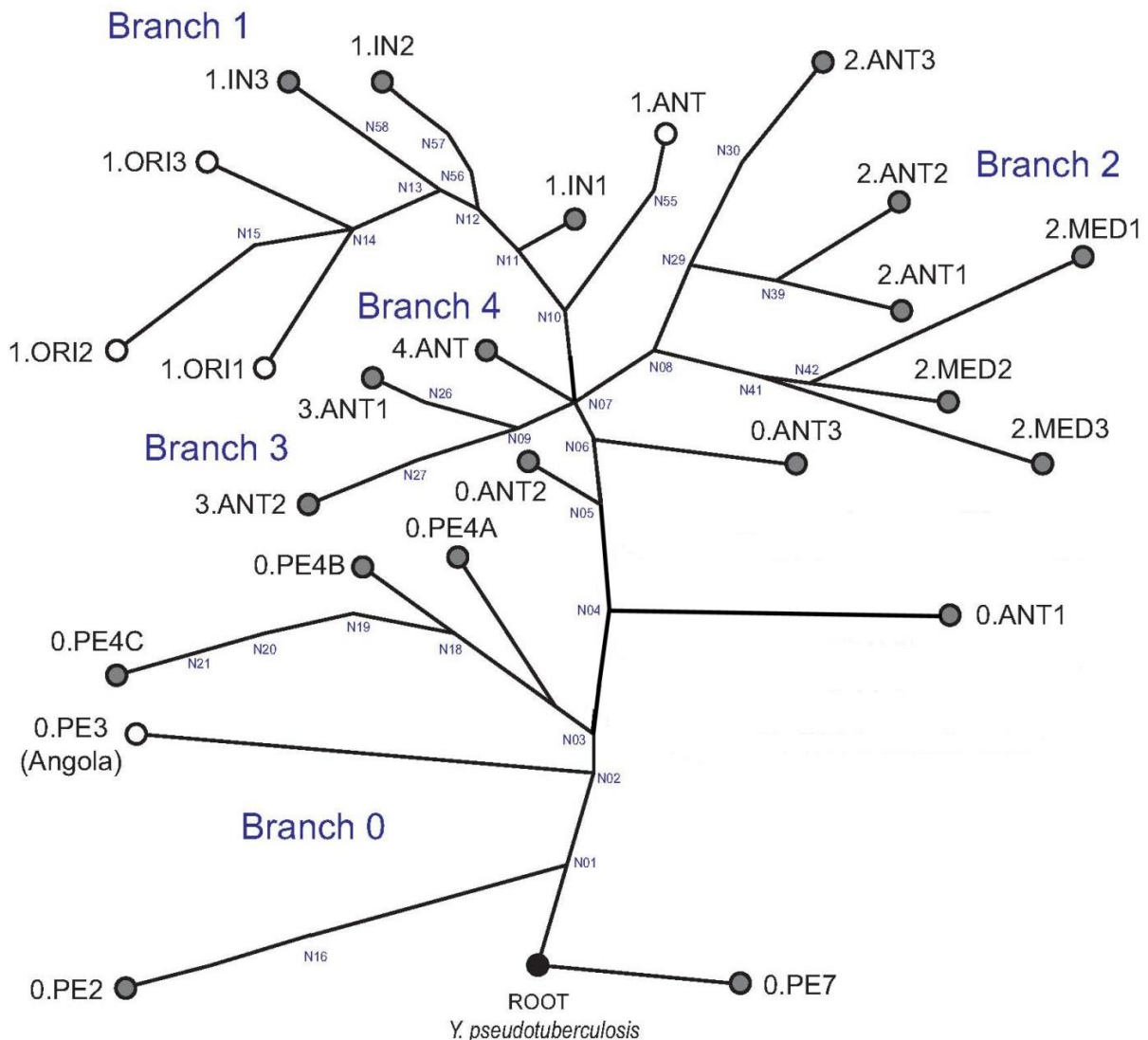


Abbildung 1: Aktueller phylogenetischer Stammbaum von *Yersinia pestis* nach den Daten von Cui *et al.* (2013). *Y. pestis* ging vor 1500 bis 6400 Jahren aus dem Bakterium *Y. pseudotuberculosis* hervor, welches den Ursprung des Stammes (Branch 0) bildet. Vom Stamm spalten sich insgesamt vier Äste (Branchs 1 bis 4) ab. Diese untergliedern sich wiederum in molekulare Gruppen. Bei ihrer Bezeichnung wurde die alte Biovar-Nomenklatur von Devigant (1951) beibehalten. Abbildung aus Harbeck *et al.* (2013) mit leichten Modifikationen mit Erlaubnis der Autoren.

In den Stammbäumen wurde die alte Biovar-Nomenklatur beibehalten, um den Wechsel in die neue Gruppen-Nomenklatur zu erleichtern (Achtman *et al.* 2004). René Devignat hatte *Y. pestis* ursprünglich 1951 basierend auf biochemischen Eigenschaften in Varietäten/Biovare eingeteilt und sie aufgrund der heutigen geographischen Verteilung der Biovare jeweils einer der drei Pandemien zugeordnet (Devignat 1951; Tabelle 2). Da jedoch Medievalis und Antiqua keine monophyletischen Gruppen sind und die *Y. pestis*-Populationen mit den als Biovare bezeichneten Phänotyp-Kategorien nur teilweise kompatibel sind, hatten Achtman *et al.* vorgeschlagen, *Y. pestis* statt in Biovare basierend auf molekularer Verwandtheit in molekulare Gruppen einzuteilen (Achtman *et al.* 2004).

Tabelle 2: Einteilung von *Yersinia pestis* nach Devignat (1951) in Varietäten/Biovare basierend auf biochemischen Eigenschaften.

	Varietät II: Antiqua	Varietät III: Medievalis	Varietät I: Orientalis
Glycerol-Fermentierer	ja	ja	nein
Nitrat-Reduzierer	ja	nein	ja
Ursprung	Afrika	Kaspisches Meer	Hong-Kong
Vorkommen heute	Zentralasien	Süd-Ost-Russland	Hauptfoci in Indien, Burma, Süd-China
Assoziation	Justinianische Pest	Black Death	Moderne Pest ab 1894

Genom

Seit der Abspaltung von *Y. pseudotuberculosis* hat sich *Y. pestis* zu einem durch Blut übertragenen, obligaten Pathogen entwickelt (Gage & Kosoy 2005). Im Vergleich zu dem Genom von *Y. pseudotuberculosis* ist das von *Y. pestis* stark reduziert (Chain *et al.* 2004). *Y. pestis* unterscheidet sich von seinem Vorfahren jedoch durch die Akquirierung mehrerer genomischer Komponenten inklusive zweier Virulenz-Plasmide (Parkhill *et al.* 2001). Neben einem Chromosom mit einer Größe von 4,65 Megabasen (Parkhill *et al.* 2001) enthält die Mehrheit der *Y. pestis*-Stämme drei Plasmide (z. B. Ferber & Brubaker 1981; Ben-Gurion & Shafferman 1981; Filippov *et al.* 1990, siehe Abbildung 2). Diese werden in Derivaten des KIM-Stamms „pPCP1“ für „Pesticin, Coagulase, Plasminogen-Aktivator“ (Sodeinde & Goguen 1988; Perry & Fetherston 1997), „pCD1“ für „calcium dependence“ (Calcium-Abhängigkeit) und „pMT1“ für „mausletales Toxin“ genannt. Für andere Stämme existieren weitere Plasmid-Bezeichnungen. Beispielsweise wird das pMT1-Plasmid in anderen Stämmen als KIM „pFra“ genannt (Perry & Fetherston 1997). Das pFra-Plasmid ist mit 100 bis 110 kb das größte der drei Plasmide, gefolgt vom 70 kb großen Plasmid pCD1 (pYV) – das bei allen pathogenen Yersinien vorkommt – und dem 9,5 kb großen Plasmid pPCP1 (pPst; Parkhill *et al.* 2001).

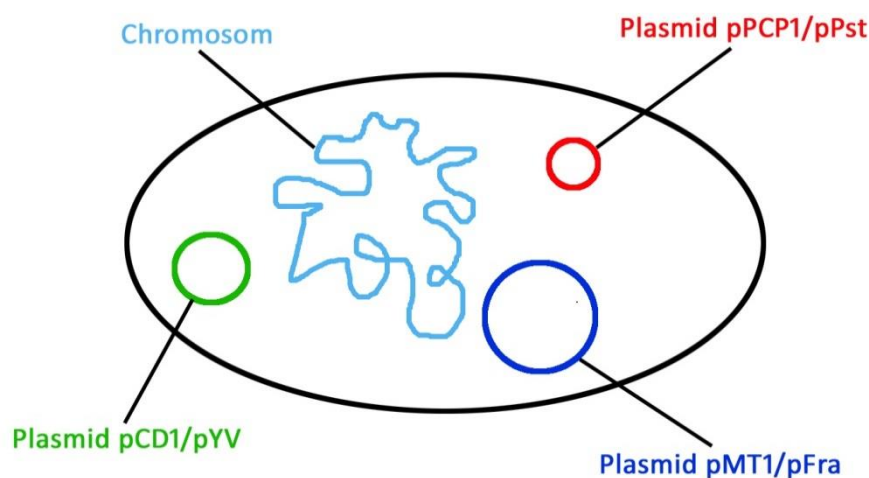


Abbildung 2: Das Genom der Mehrheit der *Y. pestis*-Stämme besteht neben einem Chromosom aus drei Plasmiden.

Zwei Gene, kodiert auf jeweils einem Plasmid, wurden in dieser Arbeit partiell untersucht. Auf Einzelheiten zu den Genen wird in den Abschnitten 2.1.1 und 2.1.5 im Kapitel Methoden eingegangen.

3 Pathogenese und Formen der Pest

Das Bild von der Pathogenese der Pest-Erkrankung hat sich im Laufe der Zeit gewandelt. Im nächsten Abschnitt (3.1) wird ausführlich die Lehrmeinung in der Moderne wiedergegeben, ein Wissen, das den Betroffenen im Mittelalter nicht gegeben war. Die Zeitgenossen der beiden ersten Pestpandemien hatten dafür andere Erklärungen für das Auftreten der Pest, welche in Abschnitt 3.2 beschrieben sind.

3.1 Lehrmeinung in der Moderne

Die Pest ist eine bakterielle Zoonose, verursacht durch das Bakterium *Yersinia pestis* (Gross 2009). Wichtigste Überträger der Pest sind Flöhe (Worsham *et al.* 2007; Vasold 2003; Pollitzer 1954). *Xenopsylla cheopis* wird dabei als Hauptvektor angenommen (Hirst 1925; Butler 1994; Bayliss 1980; siehe weiter unten in diesem Abschnitt).

Der natürliche Lebenszyklus des Pestbakteriums (siehe Abbildung 3) spielt sich zwischen Nagetierreservoir und dem angepassten Nagetierfloh ab, der als Überträger (Vektor) fungiert. Man spricht von einem sylvatischen Zyklus. Wilde Nager-Arten sollen empfänglich für die Infektion, aber resistent gegen die Krankheit sein (WHO 2009). Pest-Epidemien treten entweder bei zyklisch wiederkehrenden Populations-Gipfeln ihrer üblichen Wirte auf oder folgen ihnen (Sallares 2007). Springt der Nagetierfloh versehentlich auf eine Ratte über, so kann eine urbane Rattenpest entstehen (Gross 2009). Ratten gehören zu den wenigen Wirbeltieren, die an der Pest erkranken und versterben (Vasold 2003). Flöhe erkranken nicht (Morris 1971). Menschen scheinen in der Aufrechterhaltung der Pest in der Natur keine Rolle zu spielen (Butler 1994, 1983; Gill 1928). Aufgrund der häuslichen Nähe der Ratten oder seltener anderer Nagetiere zum Menschen, können aber auch Menschen von einem infizierten Floh gebissen werden (Gross 2009) oder durch Kontakt mit einem infizierten Säugetier erkranken (Hinnebusch & Schwan 1993). Mehr als 200 verschiedene Säuger- und mindestens 80 unterschiedliche wilde Nager-Floh-Arten sind natürlich oder künstlich mit *Y. pestis* infiziert bzw. infizierbar (Pollitzer 1954). Beim Menschen tritt Pest jedoch nur in seltenen sporadischen Fällen in Regionen mit sylvatischer Pest auf (Douglas & Wheeler 1943). Er ist ein zufälliger Wirt (Sallares 2007). In der Literatur wird auch die Übertragung von Pest zwischen Nagern und zu anderen Tieren durch wilde Nagerflöhe, Kanibalismus oder möglicherweise durch kontaminierten Boden (Tikhomirov 1999) sowie durch die Inhalation von aerolisierten infektiösen Flüssigkeiten und direkten Kontakt mit infektiösem Tiergewebe beschrieben (Butler 1994). Dennoch ist das akzeptierte Modell und der häufigste Übertragungsweg der Pest vom infizierten Nager auf den Menschen die durch Flöhe vermittelte indirekte Übertragung (Eisen *et al.* 2006; Tikhomirov 1999; Butler 1983).

Häufigkeiten verschiedener Pestformen

Beim Menschen treten drei unterschiedlich häufige Hauptformen der Pest auf: Beulenpest, septikämische Pest und Lungenpest (WHO 2000; Jones *et al.* 1979). Die klassische bzw. häufigste Form der Krankheit ist die Beulenpest (Perry & Fetherston 1997; Butler 1994; Chanteau *et al.* 1998), in deren Verlauf sich eine sekundäre Pestseptikämie (Teissier *et al.* 1921a) und eine sekundäre Pneumonie entwickeln können (Swearengen 2012). Die Beulenpest stellt mit 75 bis 85 Prozent die häufigste Ausprägung der Krankheit dar (Gross 2009; Keyes 2005). Eine sekundäre Septikämie entsteht nahezu immer in Folge einer Beulenpest, ist jedoch in milden Fällen reversibel (Ohoto 1923 IN: Pollitzer 1954). In drei bis 25 Prozent der Fälle tritt eine sekundäre Lungenpest auf (Benedictow 1992; Butler 1983; Cantey 1974 IN: Butler 1983). Die primäre Lungenpest ist im Vergleich zur Beulenpest vergleichsweise selten (Gross 2009; Butler 1983), macht lediglich einen Anteil von fünf Prozent der Pestfälle aus (Gross 2009). Die primäre Variante der Pestseptikämie entsteht ebenfalls selten (Philip & Hirst 1917; Butler 1994), hat laut Keyes einen Anteil von 15 Prozent (Keyes 2005).

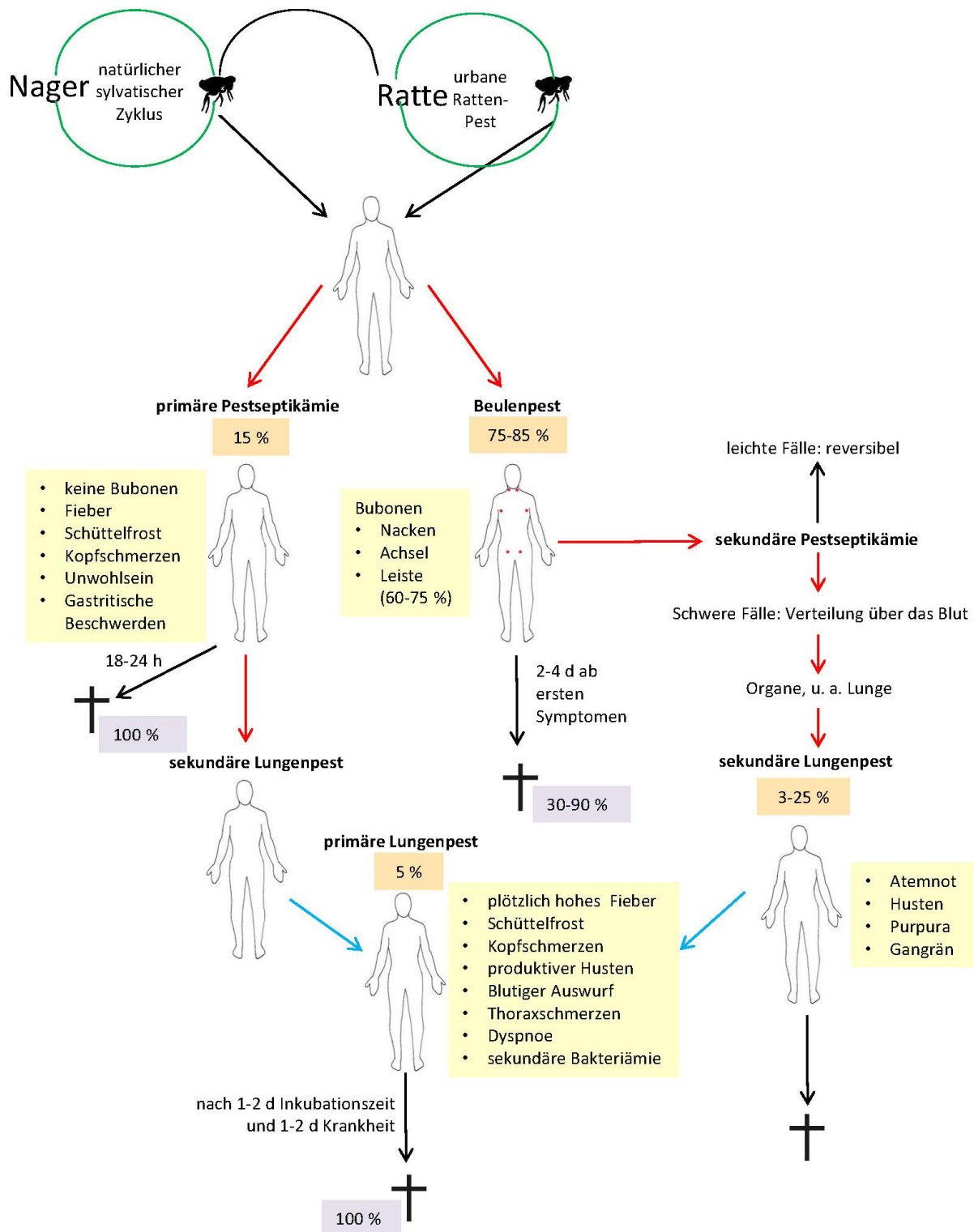


Abbildung 3: Pathogenese und Formen der Pest. Rote Pfeile geben über das Blut verlaufende Wege an, blaue Pfeile Infektionen durch Tröpfchen. Gelb hinterlegte Felder geben die Symptome der jeweiligen Pestform an, orange hinterlegte die Häufigkeit der jeweiligen Form und lila hinterlegte die mit einem Kreuz symbolisierte Letalitätssrate. Rote Punkte bei der Person mit Beulenpest kennzeichnen häufige Lokalisationsorte von Bubonen im Nacken, der Achsel und der Leiste. In Letzterer treten sie mit 60-75 Prozent am häufigsten auf. h = Stunden, d = Tage

Beulenpest

Eine Beulenpest entsteht folgendermaßen: Hat ein Rattenfloh bei einer infizierten Ratte Blut gesaugt, so gerinnt durch die Umgebungstemperatur im Magen des Flohs das Blut. Verantwortlich dafür ist der Virulenzfaktor Koagulase, der abhängig von der Temperatur verschiedene Funktionen aufweist. Unter 30 °C wirkt das Enzym gerinnungsfördernd, darüber führt es zur Fibrinolyse (Gross 2009), zur enzymatischen Aufspaltung von Fibrin (Reuter 2007). Im Vormagen und Ösophagus des Flohs dehnt sich das Gerinnungsgemisch aus Blut, Bakterien und Hämin aus, was zu einer Blockade des Vormagens führt (Gross 2009). Diese Blockade entsteht in etwa zwölf Prozent der Flöhe (Bayliss 1980).

Auf der Suche nach einer neuen Blutmahlzeit verlassen blockierte, hungrige Flöhe tote Ratten und können dabei auf einen Menschen als neuen Wirt treffen (Tikhomirov 1999; Gross 2009). Beim erneuten Blutsaugen vermischen sich frisches und geronnenes Blut, woraufhin der Floh die Bakterien in den neuen Wirt injiziert. Im neuen Wirt kommt es durch die Körpertemperatur von 37 °C zur Fibrinolyse, aufgrund der sich die Erreger systemisch besser ausbreiten können (Gross 2009). An der Einstichstelle entwickelt sich der Pest-Primärfekt. Dieser besteht aus einem Bläschen, in dem sich Bakterien stark vermehren (Suerbaum *et al.* 2009). Das Auftreten erster Symptome nach Inokulation des Erregers wird in der Literatur meist mit zwei bis sechs Tagen (Gross 2009; Suerbaum *et al.* 2009; Jones *et al.* 1979) bzw. zwei bis acht Tagen (Butler 1994) angegeben. Symptomatisch werden plötzlich auftretendes Fieber, Unwohlsein, Kopfschmerzen und Schüttelfrost beschrieben (Suerbaum *et al.* 2009; Perry & Fetherston 1997; Butler 1994). Einen Tag später entstehen charakteristische, schmerzhaft schwellende drainierende Lymphknoten, sogenannte Bubonen, und zwar dadurch, dass Bakterien vom Primärfekt aus über die afferenten Lymphbahnen zu einem lokalen Lymphknoten gelangen (Suerbaum *et al.* 2009) und sich dort vermehren (Butler 1994). Eine Erkrankung der Lymphknoten wird als Lymphadenopathie bezeichnet (Reuter 2007). Bubonen entstehen gewöhnlich, mit 60 bis 75 Prozent, in der Leiste (WHO 2000; Jones *et al.* 1979). Begründet wird dies damit, dass Flöhe meistens im Bereich der Beine zubeißen (Jones *et al.* 1979). Das griechische Wort für „Leiste“ gab ihnen ihren Namen. Sie können aber auch in der Achsel oder im Nacken (WHO 2000; Butler 1994) oder an mehreren Stellen entstehen (Cunha 2009). Da oft Blutungen in den Lymphknoten entstehen, scheinen diese bläulich-schwarz durch die Haut durch. Solange die Lymphknoten geschlossen sind, besteht keine Ansteckungsgefahr (Gross 2009).

Septikämie

Wenn die Filterkapazität der Lymphknoten erschöpft ist und diese Abwehr zusammenbricht, treten die Erreger in die Blutbahn über (Suerbaum *et al.* 2009; Sebbane *et al.* 2005). Verantwortlich hierfür ist die hohe Konzentration von Toxin in und in der Nähe von primären Bubonen, die zur hämorrhagischen Infiltration der Zellwände der benachbarten Adern führt und als Konsequenz zur Einwanderung von Bakterien ins Blut (Pollitzer 1954). Die Bakterien lösen ein schweres Krankheitsbild mit intravasaler Verbrauchskoagulopathie aus (Suerbaum *et al.* 2009). Dabei werden durch die Aktivierung der Blutgerinnung vermehrt Fibrinthromben gebildet, die zu Mikrothrombosen führen. Gleichzeitig kommt es zu einer reaktiv gesteigerten Fibrinolyse und damit zu einem erhöhten Verbrauch an Gerinnungsfaktoren, Fibrinolysefaktoren und Thrombozyten, was zu einer vermehrten Blutungsneigung führt. Die Verbrauchskoagulopathie stellt keine Erkrankung an sich dar, sondern ist die Folgeerscheinung einer Grundkrankheit wie Sepsis, kann aber zu lebensbedrohlichem Organversagen durch Thrombosierung der Mikrozirkulation und massiven Blutungen führen (Reuter 2007). Über das Blut werden Leber, Lungen und Milz und gegebenenfalls auch die Meningen befallen. In den infizierten Organen und insbesondere in der Haut bilden sich Hämorrhagien aus. Häufig entsteht ein septischer Schock (Suerbaum *et al.* 2009).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die Begriffe Bakteriämie und Septikämie zu unterscheiden. Eine Sepsis oder Septikämie bezeichnet in der klassischen Definition von Hugo Schottmüller (Internist, Hamburg, 1867-1936) Krankheitszustände, bei denen aus einem Herd konstant oder periodisch Mikroorganismen in die Blutbahn eindringen und dabei klinische Krankheitserscheinungen hervorrufen. Treten durch eine passagere Einschwemmung von Bakterien ins Blut keine klinischen Symptome auf, wird dies Bakteriämie genannt (Lepper & Trautmann 2009).

Eine Bakteriämie endet nicht zwangsläufig tödlich, betroffene Patienten können sich erholen (Pollitzer 1954). In den frühen, akuten Stadien einer Beulenpest soll sich – als einzigartige Eigenschaft der Pest – immer eine massive, wenn auch intermittierende Bakteriämie entwickeln (Butler 1983, 1994). Teissier *et al.* (1921b) zufolge ist selbst bei mild verlaufenden Beulenpest-Fällen im frühen Krankheitsstadium eine Bakteriämie üblich, die laut Ohoto aber zwischen dem zweiten und zehnten Tag verschwindet und nur bei schweren Fällen darüber hinaus bestehen bleibt (Ohoto 1923 IN: Pollitzer 1954). Die Persistenz einer Bakteriämie in späteren Stadien führt zu einer ungünstigen Prognose (Butler 1983; Teissier *et al.* 1921a). Die Tierversuche von Jawetz & Meyer unterstützen diese Behauptung. Sie haben gezeigt, dass in Folge der lymphatischen Verbreitung das Blut immer invadiert wird, nachdem die lokale Abwehr überwunden wurde, die anfängliche Bakteriämie aufgrund der effektiven Filterung von Leber und Niere aber nur eine kurze Zeit dauert. Werden die Filter überrannt, tauchen Bakterien nach ihrer massiven Vermehrung wieder im Blutsystem auf (Jawetz & Meyer 1944).

Die oben beschriebene sekundäre Septikämie ist abzugrenzen von der primären septikämischen Pest. Sie ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Bakterien im Blut ohne Auftreten einer Lymphadenopathie (Perry & Fetherston 1997; Butler 1994, 1983). Es entstehen also keine Bubonen (Philip & Hirst 1917; Perry & Fetherston 1997; Butler 1994, 1983). Bei dieser Pestform gelangen Bakterien durch eine Wunde (Jelinek 2012) durch Inokulation (Butler 1983) ins Blut, wobei das Immunsystem entweder wegen einer heftigen Infektion oder wegen einer verringerten Resistenz des Wirts überrollt wird (Pollitzer 1954) – ein Szenario, das sich laut dem Historiker Benedictow bei einem Flohbiss abspielen kann (Benedictow 2010). Andere Autoren nennen den Kontakt mit infizierten Nagern oder anderen Wirten als Ursache (Keim & Wagner 2009). Patienten klagen über Fieber, oft leiden sie an Schüttelfrost, Kopfschmerzen und Unwohlsein. Gastrointestinale Beschwerden wurden hier häufiger beschrieben als bei Beulenpest, wenn auch nicht auf statistisch signifikantem Niveau. Der Tod kann innerhalb von 18 bis 24 Stunden eintreten (Philip & Hirst 1917). Klinisch erinnert eine Pest-Septikämie an andere durch gram-negative Bakterien verursachte Septikämien. Sie ist daher schwerer zu diagnostizieren (Perry & Fetherston 1997). Todesursache bei einer Septikämie ist meist ein Zustand septischen Schocks mit refraktärer Hypotonie, Nierenversagen, gastrointestinalen Symptomen und Lethargie, begleitet von massiven Blutungen (Jelinek 2012).

Als weiterer Punkt muss angemerkt werden, dass bei Pestfällen bereits mesenterische Lymphadenopathien mit und ohne oberflächlichen Lymphadenopathien beschrieben wurden (z. B. Jones *et al.* 1979; Kaufmann *et al.* 1980). Das Mesenterium bezeichnet das Aufhängeband des Verdauungskanals (Eichhorn 2005). Neben Nerven und Gefäßen verlaufen Lymphknoten zwischen den beiden Blättern des Mesenteriums (Reuter 2007). Die dort lokalisierten Lymphadenopathien können für die beschriebenen Abdominal-Schmerzen bei Patienten mit Pestseptikämie verantwortlich sein. Diese Patienten können Beulenpest-Fälle repräsentieren, bei denen Bubonen durch eine palpatorische Untersuchung nicht zugänglich waren. Ein Patient der Hull *et al.*-Studie hatte Schmerzen in der Achselhöhle, jedoch keinen Bubo, was daher eine frühe Form einer Beulenpest darstellen kann (Hull *et al.* 1987).

Lungenpest

Werden im Zuge einer Beulenpest über das Blut die Lungen befallen (Butler 1994), entwickelt sich innerhalb von ein bis drei Tagen eine sekundäre Pestpneumonie. Diese entsteht laut einer Studie von Hull *et al.* über Pestfälle in den 1980ern in New Mexiko auch bei Patienten mit Septikämie und das mit doppelter Wahrscheinlichkeit verglichen mit Beulenpest-Patienten, wenn dies auch ebenfalls nicht auf statistisch signifikantem Niveau gezeigt wurde (Hull *et al.* 1987). Der Patient leidet an Atemnot und Husten, das Sputum ist hell, blutig gefärbt und purulent. Die Infizierten zeigen in der Regel Purpura, die nekrotisch werden und zu Gangrän führen (Suerbaum *et al.* 2009). Purpura sind durch Blutungen entstehende Rötungen der Haut und Schleimhaut. Gangrän bezeichnen einen Gewebeuntergang mit Nekrose, Autolyse und schwärzlicher Verfärbung (Reuter 2007). Drei bis fünf

Tage nach Auftreten der ersten Symptome einer sekundären Pestpneumonie stirbt der Infizierte (Suerbaum *et al.* 2009).

Das Fatale an der sekundären Lungenpest: Patienten können Bakterien abhusten und dadurch über Aerosole verbreiten (Gross 2009; Suerbaum *et al.* 2009; Ratsitorahina *et al.* 2000). Bei der durch diese Tröpfchen infizierten Kontaktperson gelangen Bakterien direkt in die Lunge (Gross 2009; Suerbaum *et al.* 2009). Die direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist jedoch selten, geschieht nur während Lungenpest-Epidemien (Butler 1994). Bei einem Lungenpest-Ausbruch in Madagaskar schätzten Ratsitorahina *et al.* die Infektionsrate in der Kontaktpopulation auf 8,4 Prozent (Ratsitorahina *et al.* 2000). Bakterien sollen ausgehend von der Quelle durch normales Sprechen bzw. Husten über zwei Meter verteilt werden können (Byrne 2012; Drancourt *et al.* 2006). Die Reichweite verdoppelt sich bei ungehindertem Niesen (Byrne 2012). Bei einer primären Lungenpest werden die Lymphknoten als Abwehrbarriere umgangen. Symptomatisch treten plötzlich hohes Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen auf. Am zweiten Tag treten produktiver Husten, blutiger Auswurf, Thoraxschmerzen und Dyspnoe (Atemnot) auf (Jelinek 2012). Sekundär entwickelt sich rasch eine Bakteriämie (Pollitzer 1954). Der Tod tritt nach ein bis zwei Tagen Inkubationszeit und weiteren ein bis zwei Tagen Krankheitsdauer ein (WHO).

Mortalitätsraten

Die verschiedenen Pestausprägungen führen zu unterschiedlichen Prognosen. Die Beulenpest endet unbehandelt in 30 bis 60 Prozent der Fälle tödlich (Gross 2009; Suerbaum *et al.* 2009; Carmichael 1993; Butler 1994; Cunha 2009) und das nach zwei bis vier Tagen nach Auftreten erster Symptome (Butler 1994). Andere Quellen sprechen von einer 50- bis 75-prozentigen (WHO 2009) bzw. 60- bis 90-prozentigen Letalität (Benedictow 2010; Jones *et al.* 1979; Hatcher 1977). Bei einer frühzeitigen Diagnose kann sie jedoch erfolgreich mit Antibiotika behandelt werden (WHO; Butler 1994). Durch eine frühzeitige Behandlung kann die Mortalitätsrate auf wenige Prozent gesenkt werden (Jones *et al.* 1979; Jelinek 2012), das heißt auf etwa 10 bis 15 Prozent (Butler 1994; WHO 2009). Die Lungenpest unterscheidet sich von einer Beulenpest in ihrem sehr viel schnelleren Voranschreiten und einem fast ausnahmslos tödlichen Ende (Pollitzer 1954). Sie ist die am häufigsten tödliche Form der Krankheit (Worsham *et al.* 2007). Bei einer unbehandelten primären Lungenpest liegt die Letalität bei nahezu oder exakt 100 Prozent (Ratsitorahina *et al.* 2000; Butler 1994; Hatcher 1977; WHO 2009), wenn nicht innerhalb von 24 Stunden nach Auftreten von Symptomen eine Behandlung gestartet wird (Ratsitorahina *et al.* 2000; Butler 1994; WHO 2009). Eine septikämische Pest endet immer tödlich, bei Behandlung vielleicht bei 40 Prozent der Fälle (WHO 2009). Menschen, die infolge einer primären Pestseptikämie sterben, erhielten entweder eine falsche Diagnose oder wurden nicht rechtzeitig mit geeigneten Antibiotika behandelt (Hull *et al.* 1987; Butler 1983).

Bedeutung des Menschenfloh und anderer Vektoren

Xenopsylla cheopis soll der Hauptvektor sein, da er leichter die beschriebene Blockade ausbildet als andere Floharten (Benedictow 2010) und weltweit der effizienteste Überträger ist (Hirst 1925; Butler 1994; Bayliss 1980). Neben dem orientalischen Rattenfloh wird auch der Menschenfloh *Pulex irritans* als Überträger des Pesterregers diskutiert (Jones *et al.* 1979). Im Vergleich zum Rattenfloh fehlt diesem aber ein Vormagen (Gross 2009), weswegen der zur Beulenpest führende Infektionsweg nicht möglich ist. Jedoch glaubte Paul-Louis Simond, dass eine Infektion über die Inokulation von infizierten Fäzes, die gleichzeitig zum Saugen in Flüssigkeitströpfchen abgegeben werden, in die Biss-Wunde des Wirts-Tieres erfolgt (Simond 1898). In der Aufrechterhaltung und Verbreitung der Pest soll dieser Mechanismus aber eine vernachlässigbare Rolle spielen. Nicht jeder infizierte Floh soll entgegen dem allgemeinen Glauben große Bakterienmengen in Fäkaltröpfchen abgeben. Die Bakterien werden in geringer Anzahl von zehn bis 400 Zellen und so unregelmäßig gefunden, dass sie im Transfer von infektiösem Agens zum Säugetierwirt keine Rolle spielen können (Douglas & Wheeler 1943). Mehreren Autoren (Butler 1983; Gross 2009) bzw. der von Pollitzer (1954) zitierten Plague Research Commission zufolge ist der Menschenfloh kein effektiver Vektor. Er müsse in genügender Dichte vorhanden sein, um die Pest unter Menschen verbreiten zu können, was in der Vergangenheit durchaus der Fall gewesen sein soll (Vasold 2003). Dennoch habe er selten oder niemals Pest von

Mensch zu Mensch übertragen (Butler 1983). Laut Benedictow sei in keinem der Millionen Fälle von Beulenpest jemals ein Menschenfloh beteiligt gewesen (Benedictow 2010).

Auch andere Ektoparasiten wie Bettwanzen (*Cimex lectularius*), Läuse und Fliegen können *Y. pestis* enthalten (Bayliss 1980), wenn sie kontaminiertes Blut von Pestopfern aufgenommen haben. Sie spielen allerdings ebenfalls offenbar eine geringe bis gar keine Rolle als Vektoren der Krankheit (Worsham *et al.* 2007; Bayliss 1980). Zwar ließ sich durch die Inokulation von *Y. pestis*-Bakterien aus zerdrückten Läusen und deren Ausscheidungen die Pest vom Menschen auf das Meerschweinchen übertragen (Blanc & Baltazard 1941b). Meerschweinchen, die auch bei Übertragungsversuchen der Pest vom Menschen durch *P. irritans* verwendet wurden (Blanc & Baltazard 1941a), stellen allerdings ein hier ungeeignetes Modell dar, da Menschenläuse Meerschweinchen ungern als Nahrungsquelle nutzen (Drancourt *et al.* 2006). Zudem zeigten sich gefangene Tiere, die hoch-suszeptibel für Nager-Ektoparasiten sind, wenig suszeptibel für menschliche Ektoparasiten (Drancourt *et al.* 2006). Auch Drancourt *et al.* weisen daher darauf hin, dass nicht bewiesen sei, dass humane Ektoparasiten die Pest auf natürlichem Weg übertragen könnten (Drancourt *et al.* 2006).

3.2 Die Pest im Verständnis des mittelalterlichen Menschen

Der mittelalterliche Mensch wusste noch nichts von Bakterien. Bis ins 17. Jahrhundert fehlen die technischen Voraussetzungen, Erreger optisch oder auf andere Weise zu identifizieren. Dennoch hatten die Zeitgenossen seit der Antike Erklärungen für das Auftreten der Pest (Bergdolt 2006). Die Mediziner des Spätmittelalters verließen sich auf antike Fachautoren wie Hippokrates und Galen, die die humoralpathologische Krankheitslehre vertraten. Gesundheitsstörungen bedeuteten demnach eine Fehlmischung der vier Körpersäfte Blut, Schleim sowie gelber und schwarzer Galle. Ein Überschuss des feucht-warmen Blutes beispielsweise bedeutete eine Gefahr der Fäulnis von Organen, welche nach Überzeugung der antiken und mittelalterlichen Ärzte den eigentlichen Pestvorgang darstellte. Die Fäulnis soll auf zwei Wegen in den Körper gelangt sein: aus der Nahrung oder aus der Luft. Speisen wie verdorbener Fisch sollen Magen und Darm infizieren haben können. Die Luft wiederum soll durch Ausdünstungen, sogenannte Miasmen, verpestet worden sein (Bergdolt 2000). Daher wurde schon früh ein Zusammenhang zwischen Erdbeben mit der assoziierten Öffnung von Erdsplattung und Pestseuchen vermutet. Als Miasmenquellen galten auch stehende Gewässer, Tümpel, trög fließende Flussarme und Zisternen. Theologen und Philosophen waren überzeugt, dass Sterbende oder unmittelbar Verstorbene giftige Miasmen abgeben. Die Miasmen-Theorie wurde an den Universitäten teils noch bis in das 18. Jahrhundert hinein gelehrt (Bergdolt 2006). Die Pesttheorien des Mittelalters gipfelten im Pesthauchmodell von Gentile da Foligno. Er machte die ungünstige Konstellation der drei „oberen“ Planeten Mars, Jupiter, Saturn am 23. Mai 1345 dafür verantwortlich, dass krankmachende Ausdünstungen von Meer und Land in die Luft gesogen, erhitzt und verdorben auf die Erde zurückgeschleudert wurden. Wird dieser Pesthauch eingeatmet, verdichtet er sich um Herz und Lunge zu einer „Giftmasse“ und infiziert sie. Durch die ausgeatmete Luft konnten andere angesteckt werden (Bergdolt 2000).

Für die Zeit der Justinianischen Pest beschreibt Bergdolt die von vielen Zeitgenossen erwähnten Naturkatastrophen wie Unwetter und Erdbeben, merkwürdige astrologische Konstellationen und Kometenerscheinungen, die der Pest vorausgingen. Die zweite Pandemie im 14. Jahrhundert folgte ebenfalls auf ungünstige klimatische Bedingungen (siehe Abschnitt 1.2 in diesem Kapitel) (Bergdolt 2006).

Während der Justinianischen Pest sollen nicht nur Geistliche überzeugt gewesen sein, dass Gott die Menschen strafen wolle (Bergdolt 2006). Ähnlich ist es während der zweiten Pandemie. Es existierte die Prädestinationslehre, Gott schicke die Pest als Strafe für die Sünden der Menschen (Lang 2004). Dass es sich um ein unbarmherziges Gottesurteil handelte, schien am wahrscheinlichsten, da die Ursache der Katastrophe unklar blieb (Bergdolt 2006).

Daneben war man seit der Antike davon überzeugt, dass Seuchen auch absichtlich herbeigeführt werden konnten. Zu Beginn der zweiten Pandemie entwickelten sich Fremdenhass und

Sündenbocksuche, der im Vorwurf der Brunnenvergiftung an die Juden gipfelte und zu Morden führte (Bergdolt 2006).

Zur Behandlung von Pestkranken und Gefährdeten stand den Ärzten als traditioneller Heilversuch der Aderlass zur Verfügung, um mit dem Blut den Körpersaft zu reduzieren, dem die Hippokratiker die Eigenschaften „heiß“ und „feucht“ zugeordnet hatten. Pestbeulen wurden auch aufgeschnitten (Bergdolt 2006). Der medizinisch interessierte Kaiser des byzantinischen Reiches, Johannes Kantakuzenos (Bergdolt 2000), schrieb in seiner Chronik, dass sich daraufhin eine übelriechende Masse aus ihnen ergoss und Erkrankte so gerettet werden konnten (deutsche Übersetzung bei Haeser 1865). Der Geschichtsschreiber Prokop hatte bereits festgestellt, dass eine Überlebenswahrscheinlichkeit bestand, wenn die Pestbeule nach außen aufplatzte, wodurch sich der infektiöse Inhalt nach außen entleeren konnte. Daneben wurden während der zweiten Pandemie bestimmte Diäten empfohlen, ein Klimawechsel oder Sport in geschlossenen und durch Räucherungen gereinigten Räumen, um die Einatmung verpesteter Luft zu verhindern. Daneben gab es die Allheilmittel Theriak und Mithridat. Allerdings war bis zum 18. Jahrhundert eine Behandlung der Pest wenig effektiv. Dies gelang erst mit der Entwicklung effizienter Antibiotika in den dreißiger und vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts (Bergdolt 2006).

4 Erhalt und Degradation von Biomolekülen in Skelettmaterial

Eine Infektion mit *Y. pestis* hinterlässt keine spezifischen Knochenveränderungen (Grupe 1986; Gilbert *et al.* 2004), weshalb eine osteologische Bestätigung nicht möglich und eine retrospektive Diagnose komplett DNA-basiert ist (Gilbert *et al.* 2004). Die Akronyme „DNS“ bzw. „DNA“ stehen für den deutschen bzw. englischen Begriff für die Erbinformation einer Zelle, für „Desoxyribonukleinsäure“ bzw. „deoxyribonucleic acid“. Das Molekül besteht aus vier Basen, den Purinen Adenin und Guanin sowie den Pyrimidinen Cytosin und Thymin, sowie Phosphat- und Zuckermolekülen. Die DNA ist als Doppelhelix organisiert: zwei Einzelstränge mit unterschiedlicher Polarität sind zu einer Schraube verdreht. Die Basen liegen dabei im Inneren der Doppelhelix, wobei jede Base in einem Strang mit einer komplementären Base in einem anderen Strang durch Wasserstoffbrücken verknüpft ist. Adenin und Thymin bilden zueinander zwei H-Brücken aus, Cytosin und Guanin drei. Das Molekül ist aufgrund der Phosphatreste des Rückgrates negativ geladen.

Relevant für den Nachweis eines bakteriellen Erregers, der in das Blut invadieren kann (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 3.1), ist die Pulpahöhle, die neben Nerven und lockerem Bindegewebe Blutgefäße enthält (Grupe *et al.* 2012). Zwar ist nicht endgültig geklärt, wie und wo DNA in Knochen und Zähnen erhalten bleiben kann, aber es existieren verschiedene Theorien, die von der Bindung der DNA an Hydroxylapatit bzw. Kollagen ausgehen (zusammengefasst bei Campos *et al.* 2012), den beiden Hauptbestandteilen der Hartgewebe Knochen und Zähne. Der mineralische Bestandteil ist analog dem geologischen Hydroxylapatit, einem Kalzium-Phosphat-Gemisch. Das tripelhelikale Molekül Kollagen I bildet mit 90 Prozent den größten Teil der organischen Grundsubstanz, des Osteoids (Grupe *et al.* 2012).

Die Interaktionen von Kollagen mit DNA sind vergleichsweise undurchsichtiger und wurden bisher seltener untersucht (Campos *et al.* 2012). Nach einer Hypothese wird DNA irgendwie in der organischen Matrix gefangen und bildet entweder einen Komplex mit Kollagen, ist der Protein-Matrix beigesetzt oder mit Proteinen kreuzverknüpft. DNA soll dabei nicht nur an Kollagen binden, sondern als Gerüst für die Bildung von Fibrillen dienen (Mrevlishvili & Svintradze 2005b; Kitamura *et al.* 1997). Alternativ können nach dem Tod Kollagenfragmente, die durch Hydrolyse oder mikrobielle Degradation von unmineralisiertem Osteoid frei geworden sind, in poröse Stellen des Knochens eingelagert werden (Campos *et al.* 2012). Kollagen soll zudem die Stabilität der Hydrathülle und die Struktur der DNA-Doppelhelix fördern (Mrevlishvili & Svintradze 2005a), was das Überdauern von DNA verlängern kann (Campos *et al.* 2012).

Vor dem Aufkommen dieser Theorien wurde vermutet, dass DNA durch Hydroxylapatit stabilisiert wird (Lindahl 1993; Okazaki *et al.* 2001) und dass sie in Bioapatit-Kristallen überdauern kann (Salamon *et al.* 2005). Dazu soll es wiederum zwei Mechanismen geben. Die Adsorption von DNA an

den Hydroxylapatit soll *in vivo* während des Wachstums und der Knochenremodellierung stattfinden bzw. sollen bei der Degradation der zellulären Komponenten des Knochengewebes DNA-Fragmente in Knochenporen gelangen, wo sie sich mit einer Lösung aus Kalzium- und Phosphat-Ionen vermischen (beschrieben bei Campos *et al.* 2012). Mehrere Autoren gehen davon aus, dass der zuletzt beschriebene Weg, nämlich die Bindung von DNA an den Hydroxylapatit, für den DNA-Erhalt verantwortlich ist (Campos *et al.* 2012; Burger 2007; Kemp & Smith 2005). Den Mechanismus dafür beschreiben Okazaki *et al.* (2001): die wahrscheinliche Interaktion ist die von Calcium-Ionen im Apatit mit den negativ geladenen Phosphat-Gruppen der DNA (Abbildung 4).

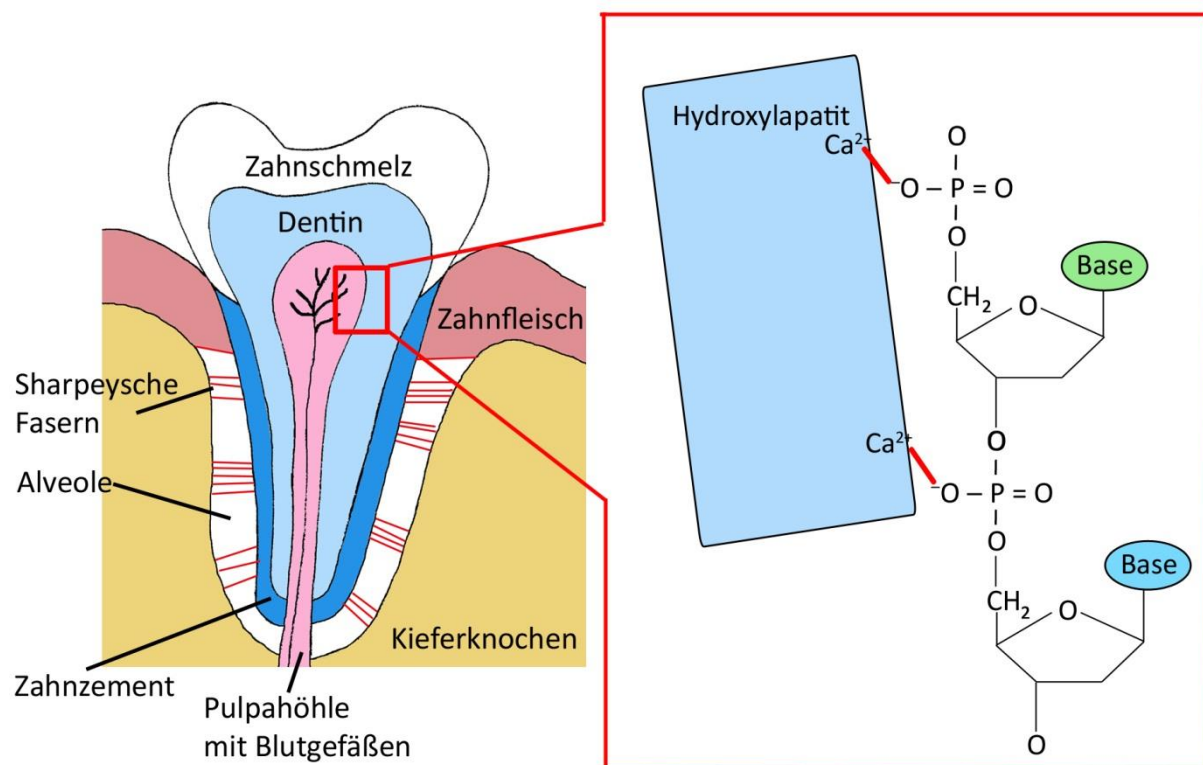


Abbildung 4: Schematische Darstellung der vermuteten Bindung der DNA an den Hydroxylapatit des Zahns. Linke Seite: Schematischer Aufbau des Zahns mit Zahnhalteapparat *in vivo* (nach M. Schulz IN: Grupe *et al.* 2012, Seite 92). Rechte Seite (nach Okazaki *et al.* 2001): Ausschnitt aus der angenommenen *post mortem* stattfindenden Interaktion der DNA mit dem Hydroxylapatit: Die Phosphat-Ionen der DNA binden an die Calcium-Ionen (Ca^{2+}) des Hydroxylapatits.

Proteine bleiben auf ähnliche Weise erhalten. Nach dem Tod diffundieren Proteine aus dem Kapillarsystem in die Knochenmatrix, wo sie aufgrund ihrer negativ geladenen Gruppen an das Mineral gebunden werden und maskiert und geschützt durch das schwer lösliche Kalziumphosphat erhalten bleiben (Wiechmann *et al.* 1999).

Trotz dem DNA in Hartgewebe erhalten bleiben kann, wird man bei der Arbeit mit „alter DNA“ (aDNA) mit zwei grundlegenden Problemen konfrontiert: Degradationen und Kontaminationen (Tsangaras & Greenwood 2012). Auf letztere wird in Abschnitt 5 in diesem Kapitel eingegangen. Im Folgenden sollen Degradationen behandelt werden, die zu den Charakteristika von aDNA führen: wenige, kurze Fragmente mit *post mortem* entstandenen DNA-Modifikationen.

Nach dem Tod eines Individuums beginnt mit der Autolyse das erste Stadium der Leichenzerstörung, in dem körpereigene Enzyme organische Bestandteile abbauen. Als weitere Stadien folgen nacheinander Fäulnis und Verwesung. Erstere wird vor allem durch Bakterien bewirkt und ist durch einen starken Flüssigkeitsverlust gekennzeichnet. Verwesung findet in eher trockenem Milieu statt. Hierbei zerfallen verbliebene angetrocknete Weichgewebe torfig unter Mitwirkung von Pilzhyphen. Es kommt zur Skelettierung (Herrmann 1990).

Unter besonderen Umständen wie schneller Austrocknung (Pääbo *et al.* 2004; Hofreiter *et al.* 2001b), geringen Temperaturen oder hohen Salzkonzentrationen werden die Nukleasen jedoch selbst zersetzt, bevor sie alle DNA-Moleküle zu Mononukleotiden abbauen konnten. Dann greifen langsamere Prozesse die DNA an (Pääbo *et al.* 2004; Hofreiter *et al.* 2001b), die beispielsweise oxidativer und hydrolytischer Art sind. Letztere führen zur Zerstörung des Phosphodiester-Rückgrats der DNA, zu Depurinierungen und Deaminierungen (Willerslev & Cooper 2005).

Als Depurinierung wird das spontane Freiwerden einer Base durch die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung bezeichnet (Pruvost *et al.* 2008). Es entstehen apurinische/ apyrimidinische Stellen (AP-Stellen), eine häufige Form eines DNA-Schadens (Pruvost *et al.* 2008), welche zu Strangbrüchen führen (Willerslev & Cooper 2005).

Als Folge von Strangbrüchen sind aDNA-Fragmente kurz. Ihre Größe wird in der Literatur mit meist 100-200 Basenpaaren (bp) angegeben (Pääbo 1989; Pääbo *et al.* 1989; Prüfer *et al.* 2010), wobei gelegentlich Stücke von 1500 bp auftreten können (Pääbo 1989). Verglichen mit DNA aus frischem Gewebe ist aDNA jedoch ausnahmslos kürzer (Pääbo *et al.* 2004).

Eine hydrolytische Deaminierung hingegen, also der Verlust der Aminogruppe ($-NH_2$) der Base, resultiert im Einbau von falschen Basen während einer PCR (Pääbo 1989) und führt somit zu einer veränderten Basenpaarung. Das wahrscheinlich am weitesten akzeptierte Beispiel eines solchen *post mortem* entstandenen biochemischen Schadens (Gilbert *et al.* 2006a) ist die hydrolytische Deaminierung von Cytosin zu Uracil oder seinen Analoga, woraus bei einer nachfolgenden enzymatischen Replikation ein C→T- bzw. G→A-Basenaustausch resultiert, da Uracil wie Thymin mit Adenin paart (z. B. Pruvost *et al.* 2008; Gilbert *et al.* 2005b; Hofreiter *et al.* 2001a). Nach Hansen *et al.* wird diese Transition als Typ 2 bezeichnet und abgegrenzt zu Typ 1-Transitionen (Hansen *et al.* 2001) von A→G- bzw. T→C (Gilbert *et al.* 2005b; Karran & Lindahl 1980; siehe Tabelle 3), die durch die Deaminierung von Adenin zu Hypoxanthin entstehen (Pääbo *et al.* 2004; Lindahl 1993). Der Vollständigkeit halber: Auch Guanin kann deaminiert werden. Es entsteht Xanthin (Pääbo *et al.* 2004; Lindahl 1993), was jedoch zu keiner veränderten Basenpaarung führt, da Xanthin wie Hypoxanthin bevorzugt mit Cytosin paart (Lindahl 1993; siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Resultate der Deaminierung von DNA-Basen.

Base	Deaminationsprodukt	Paarungspartner 1. PCR	Paarungspartner 2. PCR	Transition	Typ
Cytosin (C)	Uracil (U)	A (statt G)	A+T	C→T bzw. G→A	2
Adenin (A)	Hypoxanthin (H)	C (statt T)	C+G	A→G- bzw. T→C	1
Guanin (G)	Xanthin (X)	C	C+G	keine	-

In der Vergangenheit wurde diskutiert, ob beide Transitions-Typen tatsächliche endogene aDNA-Schäden darstellen (siehe Diskussion bei Gilbert *et al.* 2006a und Brotherton *et al.* 2007). Neuesten Ergebnissen nach spielen Typ 1-Transitionen keine oder nur eine kleine Rolle bei Schadens-induzierten Misskodierungen (Gilbert *et al.* 2006a; Brotherton *et al.* 2007; Stiller *et al.* 2006). Stattdessen werden sie als nicht-endogenes, durch PCRs generiertes Phänomen angesehen (Brotherton *et al.* 2007; Gilbert *et al.* 2006a): Misskodierungs-Läsionen können – als Alternative zu Deaminierungsprozessen – durch reguläre Fehler der PCR-Polymerase bei der Amplifikation entstehen (Hansen *et al.* 2001; Hofreiter *et al.* 2001a). Hingegen sollen Typ 2-Schäden die dominante Form der Schadens-induzierten Misskodierungs-Läsionen darstellen (Gilbert *et al.* 2006a; Brotherton *et al.* 2007; Stiller *et al.* 2006). Diese sind Brotherton *et al.* zufolge allein durch Cytosin-Deaminierungen zu erklären (Brotherton *et al.* 2007) – einem Prozess, der auch älteren Forschungen nach die häufigste Form eines DNA-Schadens darstellt (Lindahl 1993; Hofreiter *et al.* 2001a). Eine zwischenzeitlich angenommene, auf einem unbekanntem chemischen Prozess beruhende Modifikationen von Guanin zu einem Adenin-Analogen (Gilbert *et al.* 2006a; Stiller *et al.* 2006) soll dabei keinen Beitrag zu den Typ 2-Schäden leisten (Brotherton *et al.* 2007).

Basendeaminierungen können sich in einem Elektropherogramm, in einer Darstellung der Basenabfolge eines DNA-Strangs, als Mischbasen zeigen (siehe Abbildung 5). Mischbasen zu detektieren ist jedoch weniger schlimm als sie nicht zu entdecken. Statt sie in diesem Fall als

Degradationserscheinungen zu erkennen, können sie als authentische Mutationen gedeutet werden (Pruvost *et al.* 2008), die zu falschen Aussagen über evolutionäres Geschehen führen mögen.

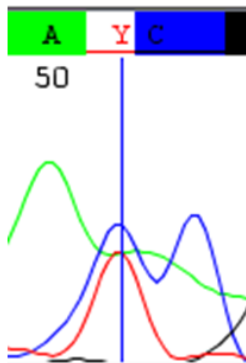


Abbildung 5:
Elektropherogramm mit Mischbase. Dargestellt sind die einzelnen Basen jeweils als unterschiedlich farbige Peaks (unten) und als Buchstaben. Hier überlagern ein Cytosin (C) und ein Thymin (T), was nomenklatorisch als Y dargestellt wird (siehe Anhang 12).

Zu den sich hauptsächlich manifestierenden oxidativen Schäden bei aDNA zählen Oxidationsprodukte von Pyrimidinen (Pääbo 1989). In aDNA-Sequenzen ist ein großer Anteil an Cytosin- und Thymin-Resten oxidativ zu Hydantoinen modifiziert, die die DNA-Polymerase und damit die PCR blockieren (Höss *et al.* 1996).

Neben hydrolytischen und oxidativen Prozessen kann aDNA durch Kreuzverknüpfungen *post mortal* modifiziert werden. Kreuzverknüpfungen zwischen nicht komplementären benachbarten Basen in einem DNA-Molekül entstehen beispielsweise durch Alkylierungen. Derartige DNA kann nicht amplifiziert werden (Willerslev & Cooper 2005).

Wie in totem Gewebe wird auch in metabolisch aktivem Gewebe DNA geschädigt. Der Unterschied besteht darin, dass in lebenden Organismen DNA-Schäden durch enzymatische DNA-Reparatur-Prozesse repariert werden können, während DNA aus archäologischem Material degradiert wird (Pruvost *et al.* 2008; Lindahl 1993). Mit der Zeit kumulieren die der DNA zugefügten Schäden (Höss *et al.* 1996) so sehr, dass kein brauchbares Molekül mehr übrig bleibt (Hofreiter *et al.* 2001b). Wenn DNA in archäologischen Hartgeweben wie Knochen und Zahn erhalten bleibt, dann in geringen Mengen und kurzen Fragmenten (Pruvost *et al.* 2008).

Obwohl Campos *et al.* festgestellt haben, dass der DNA-Gehalt innerhalb des ersten Jahres nach dem Tod stark abfällt (Campos *et al.* 2012), ist die Dauer der Bestattung nicht ausschlaggebend für den DNA-Erhalt (Hagelberg *et al.* 1989; Smith *et al.* 2003). Faktoren wie der Salzgehalt der Umgebung, der pH-Wert, das Vorhandensein von Sauerstoff und Wasser – DNA ist wasserlöslich – sowie das ausgesetzt-Sein von Strahlung beeinflussen die Zerfallsrate von DNA (Campos *et al.* 2012). Das Schlüssel-Kriterium für die Langlebigkeit von aDNA soll jedoch die Temperatur sein (Lindahl 1993; Poinar 2003). Proben, die in kalter Umgebung aufbewahrt wurden, stellen brauchbareres genetisches Material bereit als gleichaltrige Proben, die bei wärmeren Temperaturen begraben waren (Smith *et al.* 2001). Pruvost *et al.* haben darüber hinaus gezeigt, dass sich frisch ausgegrabene Knochen besser für aDNA-Studien eignen als solche, die im Museum aufbewahrt wurden. Grund dafür ist neben der erhöhten Temperatur der bessere Zugang von Sauerstoff (Pruvost *et al.* 2007).

5 Kontamination

aDNA ist durch eine geringe Anzahl endogener Moleküle, kurze Fragmente sowie *post mortem* entstandene Molekül-Modifikationen charakterisiert. Daher ist eine aDNA enthaltene Probe der ständigen Gefahr der Kontamination ausgesetzt (Cooper & Poinar 2000). Grundsätzlich kommen drei Arten von Kontaminationsquellen in Frage (Kemp & Smith 2005):

1. Prä-Labor-Kontaminationen, die während der Bestattung, Ausgrabung oder Handhabung von skelettalen Überresten entstehen, bevor Proben in ein aDNA-Labor gebracht werden.
2. Intra-Labor-Kontaminationen des Typs 1: Kontaminationen mit moderner DNA, beispielsweise durch den Gebrauch kontaminierter Plastikprodukte und Reagenzien oder durch den Umgang mit moderner DNA.
3. Intra-Labor-Kontaminationen des Typs 2: Kreuzkontaminationen mit Amplifikaten einer vorhergehenden PCR (carry over).

Prä-Labor-Kontaminationen

Die Gefahr der Kontamination von Skeletten stellt sich ab ihrer Ausgrabung. Archäologen und Anthropologen können Skelette durch die Handhabung oder das Waschen der Knochen kontaminieren (Gilbert *et al.* 2005b; Sampietro *et al.* 2006; Gilbert *et al.* 2006b). Jedoch soll es Unterschiede zwischen Knochen und Zähnen in der Suszeptibilität für Kontaminationen geben. Mehrere Autoren haben in der Vergangenheit postuliert (Drancourt *et al.* 1998) oder gezeigt (Gilbert *et al.* 2006b; Gilbert *et al.* 2005b; Pilli *et al.* 2013), dass Zähne weniger kontaminationsanfällig sind für DNA oder dass sie leichter zu dekontaminieren sind.

Relevant für die Analyse von *Yersinia pestis* ist die Pulpahöhle von Zähnen, einer „natürlich geschlossenen Höhle“ (Drancourt *et al.* 1998), in der einer Hypothese von Drancourt *et al.* (1998) zufolge Reste von Bakterien erhalten bleiben können. Gilbert *et al.* haben festgestellt, dass die Pulpa relativ vor Umwelt-Kontaminationen geschützt ist (Gilbert *et al.* 2004) – und das in doppelter Weise. Bei einem intakten, im Kieferknochen festsitzenden Zahn sind die permeablen Wurzelspitzen durch den Knochen (Sampietro *et al.* 2006) und die Pulpahöhle ist durch das umgebende Dentin und Enamel geschützt (siehe Abbildung 4). Allerdings: werden Zähne gewaschen oder die Wurzel direkt gehandhabt, hilft das Enamels nicht mehr bei der Verhinderung von Kontaminationen (Gilbert *et al.* 2005b). Dennoch werden Zähne als Material der Wahl für klassische aDNA-Studien empfohlen (Pilli *et al.* 2013).

Intra-Labor-Kontaminationen des Typs 1

Kontaminierte Reagenzien sind eine Quelle von Kontaminationen durch moderne DNA. Leonard *et al.* amplifizierten in PCRs in jedem der vier unabhängigen Labore ihrer Studien routinemäßig Fremd-DNA domestizierte Tier-Arten – sowohl in DNA-Template-freien Kontrollen (no template control = NTC) als auch in aDNA-Extrakten anderer Spezies. Zu den nicht-humanen Kontaminationsquellen zählten DNA der Kuh, des Schweins und des Huhns. Nach Ausschluss der anorganischen PCR-Bestandteile Wasser, Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) und Puffer und der Feststellung, dass Primer chemisch synthetisiert und HPLC aufgereinigt werden, erklärten sie, dass dNTPs das einzige PCR-Reagenz mit einer bekannten Verbindung zu Tier-DNA sind. Ein Hersteller hatte verraten, dass Deoxynukleosid-Monophosphate durch die Hydrolyse von Tier-DNA erhalten und dann chemisch zu Triphosphaten phosphoryliert werden (Leonard *et al.* 2007).

Intra-Labor-Kontaminationen des Typs 2

Intra-Labor-Kontaminationen des Typs 2 sind deswegen kritisch, weil bei einer erfolgreichen Amplifikation 10^{11} bis 10^{13} amplifizierte Moleküle entstehen (Pruvost *et al.* 2005; Champlot *et al.* 2010; Kwok & Higuchi 1989). Einige davon können nach dem Öffnen eines PCR-Tubes, um beispielsweise auf einem Agarosegel den Amplifikationserfolg zu testen, in entstehenden Aerosolen durch die Kleidung oder Haare des Laborarbeiters verschleppt werden. In einer nachfolgenden neu angesetzten PCR mit einer anderen Probe können diese Amplifikate nochmals vervielfältigt werden und damit das eigentliche Ergebnis maskieren (Lottspeich & Engels 2012).

Die Kontaminations-Problematik zusammen mit den genannten Eigenschaften alter DNA machen die Arbeit unter aDNA-Bedingungen in einem eigenen Labor sowie die Entwicklung und den Einsatz bestimmter Methoden notwendig.

6 Aktueller Forschungsstand

Die Erforschung der Pest war nach 1893 zunächst ein Gebiet der Medizin (Vasold 2003). Später nahmen sich Historiker des Themas an und entwickelten aufgrund (vermeintlicher) Unterschiede in der Epidemiologie der modernen Pest im Vergleich zu jahrhundertalten Überlieferungen Alternativtheorien, die in der Annahme gipfelten, dass der Schwarze Tod und die Justinianische Pest keine durch *Yersinia pestis* verursachte Pest gewesen sein können (Abschnitt 6.1). Durch die Entstehung eines neuen Zweigs, der Erforschung „alter“ DNA, wird seit 1998 ein naturwissenschaftlicher Ansatz zur Aufdeckung des ursächlichen Agens verfolgt (Abschnitt 6.2).

6.1 Alternativtheorien

Das Interesse, Beweise für *Y. pestis* als ätiologisches Agens der Opfer des Schwarzen Todes und der Justinianischen Pest zu finden, war in der Vergangenheit gestiegen, da das Bakterium durch verschiedene Alternativtheorien als Verursacher der früh- und spätmittelalterlichen Epidemie (nahezu) ausgeschlossen worden war (Twigg 1995; Scott & Duncan 2001; Cohn 2002 IN: Clouse 2002; zusammengefasst bei Benedictow 2010). Historische Pest-Epidemien sollen demnach keine Beulenpest gewesen sein (zusammengefasst bei Benedictow 2010), was bisher als erwiesen angenommen wurde (Karlsson 1996; siehe auch Abschnitt 1.2 in diesem Kapitel).

Es kann nicht Aufgabe dieser Arbeit mit naturwissenschaftlichem Hintergrund sein, die große Fülle an Informationen in der zumeist von Historikern verfassten Literatur zur Pest auf ihre Plausibilität hin zu prüfen. Dennoch seien nachfolgend die gängigen Theorien und ihre Gegenargumente zusammenfassend dargestellt, wobei zunächst die verschiedenen Alternativen zur Pest und anschließend die verschiedenen Diskussionspunkte genannt werden. Für eine umfassende Darstellung sei auf andere verwiesen, beispielsweise die Arbeiten des Historikers Ole J. Benedictow (2010) und des Biologen Robert Sallares (2007).

Dem Historiker Christopher Morris (1971) scheint eine Lungenpest zugrunde zu liegen – eine Ansicht, die der Historiker Gunnar Karlsson (1996) gegen Benedictows (1992) Gegenargumente verteidigt. Karlsson (1996) denkt in diesem Zuge auch an eine mutierte Version der Krankheit. Nach der Meinung verschiedener anderer Autoren war die Pest eine durch andere Mikroorganismen nach einem anderen Mechanismus verbreitete Krankheit. Die Historikerin Susan Scott und der Zoologe Christopher J. Duncan weisen der Beulenpest für die Zeit der Justinianischen Pest keine große Bedeutung zu und sprechen für den Schwarzen Tod von einer „hämorrhagischen Pest“ (z. B. in Scott & Duncan 2001 auf Seiten 50 und 108), verursacht durch ein virales hämorrhagisches Fieber. Sie denken an ein Filovirus, nennen und beschreiben die Ebola- und Marburg-Viren als Vertreter (Scott & Duncan 2001), jedoch ohne diese beiden konkret als Pestursache vorzuschlagen. Der Zoologe Graham Twigg hält Anthrax für eine Erklärung für die plötzlich hohe Sterblichkeit (Twigg 1984). Sallares bewertet dies als „schwache Idee“, da Anthrax nicht von Person zu Person übertragen werden könne und für diesen Mechanismus hier auch kein Vektor existiere (Sallares 2007). Der Historiker Samuel K. Cohn spricht sich komplett gegen *Y. pestis* als Verursacher der zweiten Pandemie aus (Cohn 2002). Obwohl er keine Alternativen nennt, diskutiert er „neue Fragen über den Charakter der spätmittelalterlichen und frühmodernen Pest“. Der Nachweis eines Pathogens sei dafür nicht notwendig (Cohn & Alfani 2007). Dennoch hat er laut dem Historiker Benedictow eine virale Krankheit im Sinn, da er behauptete, nach dem Schwarzen Tod habe die Pest den Charakter einer Kinder-Krankheit angenommen. Erwachsene wären demnach zu einem großen Teil Überlebende, die eine persistierende Immunität erworben hätten, was ein Markenzeichen einer viralen Krankheit sei (Benedictow 2010). Laut der Anthropologin Gisela Grupe sind die Überlebenden einer ersten Pestwelle ausreichend immunisiert, wodurch einer weiteren Welle überwiegend die Kinder und Jugendlichen ohne Immunschutz zum Opfer fielen. In der Literatur finde sich daher gelegentlich der

Begriff „Kinderpest“ (Grupe 1986). Hierzu sei ergänzt, dass die Pest überlebt werden kann und dass Überlebende einen langdauernden, aber nicht absoluten Schutz gegen Reinfektionen aufbauen können (Suerbaum *et al.* 2009; siehe auch Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel). In einer späteren Arbeit sprechen Cohn und sein Historiker-Kollege Guido Alfani von einer Verbreitung der frühmodernen Pest ähnlich der einer tödlichen Influenza, wobei die Pest in der Frühmoderne keine Influenza gewesen sein soll (Cohn & Alfani 2007). Der Bakteriologe Shrewsbury hingegen zieht ausschließlich die Beulenpest in Erwägung, spricht ihr aber nur eine marginale Rolle als demographischer Faktor in England zu und macht andere Krankheiten für die im späten 14. und während des 15. Jahrhunderts wiederkehrenden Pest-Epidemien verantwortlich (Shrewsbury 1970).

Laut Benedictow weisen die Autoren die vorhergehende alternative Theorie jeweils zurück (Benedictow 2010). Beispielsweise kritisieren Cohn & Alfani (2007) die Arbeiten von Scott & Duncan (2004, 2001). Morris (1971) bemängelt teilweise scharf und in amüsierender Form die Arbeit von Shrewsbury (1970). Autoren wie Sallares und Benedictow widerlegen alle „Unterschiede“, indem sie andere Erklärungen liefern und kritisieren die Alternativtheoretiker (Sallares 2007; Benedictow 2010), Benedictow darunter besonders stark Cohn und dessen Vorgehensweise (Benedictow 2010). Grund dafür ist, dass dieser behauptete, Wissenschaftler würden einen Zirkelschluss machen (Cohn 2002), er selbst aber misszitiere und missinterpretiere andere Autoren, um seine Theorie zu stärken (Benedictow 2010). Allerdings wird auch in umgekehrter Richtung kritisiert, z. B. wettern Cohn (2005) und Karlsson (1996) gegen Benedictow (2004, 1992).

Anlass zu den Alternativtheorien hatten verschiedene Eigenschaften und Vorbedingungen der Pest gegeben, von denen nachfolgend vier näher erläutert werden.

Abwesenheit von Ratten

Einige Autoren führen das Fehlen von Informationen zu Nagern (Twigg 1995) und Ratten/Mäusen (Shrewsbury 1970) an bzw. eines einer Epidemie vorhergehenden Rattensterbens im europäischen Mittelalter (Twigg 1995; Cohn 2002) sowie das nicht-Vorhandensein von Ratten (Karlsson 1996). Zu erwähnen sei hier, dass laut Morris „die Alten keine separaten Wörter für Ratten und Mäuse“ hatten (Morris 1971) und dass laut Shrewsbury erst ab 1910 offiziell vokabulär zwischen Ratten und Mäusen getrennt wurde (Shrewsbury 1970), was die nicht-Nennung von Ratten allein sprachlich erklären würde. Sallares zeigt Gegenargumente sowohl für das vermeintliche Fehlen von Rattenknochen im archäologischen Fundgut als auch von Hinweisen in historischen Quellen zu einem Rattensterben in Assoziation mit Pest-Epidemien auf. Die archäologischen Techniken seien bis in die 1970er Jahre generell nicht zufriedenstellend, was das Auffinden von Knochen kleiner Säugetiere angehe. Klassische Archäologen seien darauf trainiert, griechische und römische Skulpturen und Ähnliches wert zu schätzen – nicht Rattenknochen. Im Übrigen würden inzwischen routinemäßig Rattenknochen bei archäologischen Ausgrabungen gefunden, die in die Zeit des Schwarzen Todes im 14. Jahrhundert datieren. Die Beweislage für die früheren Perioden sei zwar dünner, wachse aber Jahr um Jahr. Die verstreuten Funde von Rattenknochen in Europa, die in die klassische und frühmittelalterliche Periode datieren, beweisen für ihn hinreichend, dass Ratten zur Zeit der Justinianischen Pest vorhanden waren, wahrscheinlich sogar in Nord- und Südeuropa. Hinsichtlich des vermeintlichen Mangels an Hinweisen zu Ratten in Verbindung mit Pest-Epidemien nennt er fünf Pest-Epidemien, darunter die Justinianische Pest laut der Schilderung von Johannes von Ephesos und den Schwarzen Tod in der Darstellung von Nicephorus Gregorus, worin Ratten jeweils explizit mit der Krankheit assoziiert sind. Darüber hinaus merkt er an, dass sich die Zeitgenossen der Rolle von Ratten als Wirt von *Yersinia pestis* oder des Flohs als Vektor nicht bewusst waren (siehe Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel), weswegen es auch keinen Grund gegeben habe, diese in der Beschreibung humaner Pest-Epidemien zu erwähnen. Er sieht nur dann ein Problem, wenn moderne Historiker Menschen der Vergangenheit modernes Wissen zuschreiben, das diese nicht hatten (Sallares 2007).

Unterschiedliche Verbreitungsgeschwindigkeiten

Ein zweiter Punkt, den die Alternativtheoretiker gegen die Identität der historischen Pesten als durch *Yersinia pestis* verursachte Krankheit anführen, ist die Verbreitungsgeschwindigkeit der Pest. Die Verbreitung der Pest in der Moderne von Kunming, wo sie 1866 herrschte, bis Canton und Hong-Kong 1894 geschieht Scott & Duncan zufolge mit einer ziemlich langsamen Geschwindigkeit. Ihnen

zufolge kann die Beulenpest unter anderem wegen der schnellen Verbreitung der Krankheit über lange Distanzen keine Hauptkomponente der Justinianischen Pest gewesen sein (Scott & Duncan 2001). Auch die extrem schnelle Verbreitung während des Schwarzen Todes in Genua führte zu Bedenken hinsichtlich der Beulenpest als Ursache (Sallares 2007). Innerhalb von ein paar Tagen nach dem Andocken von Schiffen mit Pest an Board wurden dort Pesttote erfasst. Für eine Verbreitung der Pest hätten genug infizierte Ratten und Flöhe an Land kommen müssen, die lokale Rattenpopulation infizieren, eine Epizootie initiieren und die ersten Menschen infizieren müssen, was ein langwieriger Prozess sei. Der Schwarze Tod aber habe sich sehr viel schneller verbreitet, wohingegen sich die Pest sehr langsam ausbreite (Twigg 1995). Wie Sallares und Benedictow anführen, teilten jene Forscher, die die dritte Pandemie studierten, die Meinung zur unterschiedlichen Verbreitungsgeschwindigkeit der Pest jedoch nicht (Sallares 2007; Benedictow 2010). Benedictow führt weiterhin an, dass Cohn fälschlicherweise Hirst, einem der Erforscher der modernen Pestpandemie, die Entdeckung der gleichen Unterschiede in der Verbreitungsgeschwindigkeit zugeschrieben habe, die Cohn gefunden haben will. So könne Cohn Hirsts Standardwerk unterminieren und den Weg für seine eigene Theorie bereiten, nämlich, dass der Schwarze Tod eine virale Krankheit war (Benedictow 2010). Statt die Identität des Pathogens anzuzweifeln beweise die Verbreitungsgeschwindigkeit während der Zeit der Justinianischen Pest laut Sallares stattdessen, dass während des 6. bis 8. Jahrhunderts im Mittelmeerraum genug Handel getrieben worden sei, um das Pathogen zu verbreiten. Wie Sallares weitergehend erklärt, verbreitet sich die Pest auf zwei Arten: schnell durch menschlichen Transport über lange Strecken und langsam über kurze Distanzen mit der Entstehung von Epizootien unter Ratten (Sallares 2007).

Auch die verschiedenen Pest-Formen mit den ihnen eigenen Inkubationszeiten und Krankheitsdauern – neben Übertragungsarten und Überlebenswahrscheinlichkeiten – können unterschiedliche Verbreitungsgeschwindigkeiten erklären (siehe Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel). Wie Sallares anführt herrschte dem Bericht von Guy de Chauliac zufolge, Arzt von Papst Clemens VI., in den ersten zwei Monaten des Schwarzen Todes die Lungenpest vor, später dominierte die Beulenpest. Die direkte Übertragung der Lungenpest von Mensch zu Mensch erkläre die schnelle Entwicklung der Krankheit in der anfänglichen Phase. Hinsichtlich der Justinianischen Pest ist für Sallares der Bericht von Prokop das Hauptbeweisstück, dass viele Menschen starben, nachdem sie plötzlich Blut gespuckt hatten. Er hält es für möglich, dass sich die Justinianische Pest in den frühen Stadien epidemiologisch genauso verbreitete wie der Schwarze Tod in Avignon mit einer zunächst hohen Lungenpest-Frequenz, was die explosionsartige Verbreitung der Krankheit durch direkte zwischenmenschliche Übertragung erklären würde, und einem Übergang in die Beulenpest (Sallares 2007).

Unterschiede in der Epidemiologie

Ein dritter Aspekt betrifft die Epidemiologie der Pest. Die Epidemiologie ist die Lehre von der Häufigkeit und der Verteilung von Krankheiten (Reuter 2007). Scott & Duncan sind die hohe Sterblichkeit und „andere biologische Eigenschaften“ der ersten Pandemie ein Dorn im Auge, weswegen sie für eine von Mensch zu Mensch übertragene Krankheit plädieren (Scott & Duncan 2001) – Sallares meint, sie hätten die „hämorrhagische Pest“ als neue Krankheit und einen neuen Virus „erfunden“ (Sallares 2007). Auch die Plague Research Commission in Indien teilt die Meinung zur Epidemiologie nicht ganz (Sallares 2007). Einen Punkt hält Sallares hier jedoch für berücksichtigenswert: der Unterschied zwischen durchschnittlich einem Fall pro Haushalt in Indien und einer hohen Infektionsrate pro Haushalt in Europa. Laut John Cantacuzenus wurden in Konstantinopel während des Schwarzen Tods ganze Haushalte zerstört. Für die Justinianische Pest lieferten Evagrius und Johannes von Ephesos ein ähnliches Bild. Eine mögliche Erklärung liefert Sallares mit dem von Thompson (1906) geschilderten Fall von Pest in Sydney 1900, wo unter nicht-Verwandten eine Serie sporadischer Beulenpest-Fälle auftrat – jeweils nur ein Fall pro Haushalt. Die Erklärung war, dass sich die Menschen an ihrem Arbeitsplatz infiziert hatten und in ihrem Haushalt keine Ratten lebten und eine Weiterverbreitung zu Hause nicht stattfand. Für Sallares erklärt sich so ein unterschiedliches epidemiologisches Muster, welches Scott & Duncan nicht berücksichtigt hätten. In Europa seien die Menschen in der Vergangenheit durch beispielweise Quarantäne gezwungen worden, zu bleiben, wo sie waren. Dass verschiedene Pest-Epidemien von dem gleichen Organismus

verursacht worden sind, muss nicht notwendigerweise bedeuten, dass die Pestepidemiologie immer die gleiche sein muss, da Nager, Flöhe, Menschen und andere Faktoren wie das Klima weitere Variablen darstellen. Laut Sallares kann die Pestepidemiologie variieren und tut dies auch (Sallares 2007).

Geringere Infektiosität der heutigen Pest

Ein vierter Punkt, warum die Justinianische Pest und der Schwarze Tod keine tatsächliche Pest gewesen sein sollen, ist die geringere Infektiosität der Pest während der dritten Pandemie im Vergleich zu den beiden historischen Seuchengeschehen (diskutiert in Sallares 2007). „Infektiosität“ bezeichnet die Fähigkeit, bei einem Wirt eine Infektion hervorzurufen (Reuter 2007). Für die Justinianische Pest existieren widersprüchliche Aussagen zur Infektiosität. Wie Sallares anführt, erkrankten den Zeitgenossen Evagrius und Prokop zufolge manche Menschen selbst dann nicht, wenn sie intensiven Umgang mit Kranken pflegten (Sallares 2007). Dies entspricht einer Beobachtung zu Beginn des 20. Jahrhunderts, als die Infektiosität der Pest in Indien so gering war, dass eine Pest-Krankenstation als der sicherste Aufenthaltsort in Pest-Zeiten angesehen wurde (The Advisory Committee 1907). Die Zeitgenossen Evagrius und Prokop beschreiben laut Sallares aber auch, dass andere Menschen wiederum durch das Zusammenleben, das gegenseitige Berühren, gemeinsames Schlafen oder Treffen auf öffentlichen Plätzen infiziert wurden (Sallares 2007). Niederländische Professoren und Doktoren stuften die Patienten des 17. Jahrhunderts als sehr kontagiös ein, in den tropischen und subtropischen Ländern hingegen ist die Beulenpest praktisch nicht ansteckend, schreibt 1918 Professor van Loghem vom Department für tropische Hygiene des Kolonial-Instituts in Amsterdam (van Loghem 1918). Um das Problem in Zahlen zu fassen: In Indien starben 1917 fast zehn Millionen Menschen an Pest, was 0,135 Prozent der Gesamtpopulation darstellt, wohingegen während der Pest in London 1665 zwischen 15 und 20 Prozent der Bevölkerung allein während der Sommer-Monate gestorben sein sollen (Twigg 1984). Ein zweites Beispiel: In den USA traten zwischen 1908 und 1966 nur 115 Beulenpest-Fälle mit 65 Toten auf (Christie 1969 IN: Scott & Duncan 2001), was sich laut Scott & Duncan um viele Zehnerpotenzen von der Mortalität des Schwarzen Todes und von der Epidemie der hämorrhagischen Pest in Lyon in den Jahren 1628-29 unterscheidet, bei der 30.000 Menschen starben (Scott & Duncan 2001). Es ist fraglich, inwieweit der Vergleich zweier vollkommen unterschiedlicher Verbreitungsgebietsgrößen (die Länder Indien bzw. USA und die Städte London bzw. Lyon) zu unterschiedlichen Zeiten (vor und nach Entwicklung von Antibiotika) unter unterschiedlichen Lebensbedingungen geeignet ist.

Tendenziell werden Infektionskrankheiten mit fortschreitender Zeit weniger schlimm (Wylie & Stubbs 1983). Dennoch wurde trotz intensiver Forschung bisher keine chromosomale genetische Komponente gefunden, anhand der sich der Pest-Erreger von seinem Vorfahren *Y. pseudotuberculosis* hinsichtlich der Virulenz unterscheiden ließe (Achtman *et al.* 1999). Auch die drei Biovare weisen keinerlei Unterschiede hinsichtlich ihrer Virulenz oder Pathogenität auf (Brubaker 1972 und Poland & Barnes 1979 IN: Perry & Fetherston 1997). Alle bekannten Populationen von *Y. pestis* sind sich auf dem DNA-Level sehr ähnlich. Eine mögliche Erklärung wäre laut Sallares – der sich für *Y. pestis* als Verursacher beider historischen Pandemien ausspricht – die Postulation, dass das Orientalis-Biovar (siehe Abschnitt 2 in diesem Kapitel) heute weniger effizient in der Übertragung durch Luft wäre als die beiden anderen Biovare in der Vergangenheit (Sallares 2007). Dennoch hält Sallares trotz des Schrumpfens genetischer Variation bei *Y. pestis* Faktoren wie das Klima, Menschen, Flöhe und Nager für zusätzliche Variablen in der Variation der Pest-Epidemiologie. Zudem wäre es möglich, dass wenige genetische Unterschiede zwischen den Biovaren sowohl Medievalis als auch Antiqua eine höhere Infektiosität verliehen haben (Sallares 2007).

Die Alternativtheorien widersprechen neben den genannten Historikern (siehe Abschnitt 1.2 in diesem Kapitel) der Ansicht der Mediziner R. Pollitzer (1954), dem als „great authority on the disease“ (Russel 1968) bezeichneten L. Fabian Hirst (Hirst 1953 IN: Benedictow 2010) und Wu Lien-Teh (Wu Lien-Teh 1926 IN: Benedictow 2010) sowie sieben weiteren von Benedictow genannten Autoren (Benedictow 2010), welche die Pest – im Gegensatz zu den Alternativtheoretikern – in Madagaskar, Indien und China zu Beginn der dritten Pandemie studiert haben. Sie schlussfolgerten

alle, dass es sich bei der Pest der Moderne und der historischen Pest mindestens überwiegend um die gleiche Krankheit handelt (Benedictow 2010).

6.2 Forschungen an „alter“ DNA

Nach Meinung von Twigg ist es schwierig bis unmöglich, eine Beulenpest in vergangener Zeit mit Sicherheit zu identifizieren (Twigg 1995). Diese Aussage stammt von 1995, drei Jahre bevor mit der erstmaligen Isolation von DNA von *Yersinia pestis* aus archäologischem Zahnmaterial (Drancourt *et al.* 1998) mit der Analyse alter DNA ein naturwissenschaftlicher Ansatz zur Beendigung der Debatte beschränkt wurde. Seitdem wurden viele weitere erfolgreiche (Garrelt & Wiechmann 2003 bzw. Wiechmann *et al.* 2010; Raoult *et al.* 2000) und fehlgeschlagene (Gilbert *et al.* 2004) Detektionsversuche publiziert. Unterdessen wurden viele aDNA-Untersuchungen zur Detektion von *Y. pestis* angezweifelt, da laut Tsangaras & Greenwood nicht genügend Authentizitätskriterien eingehalten wurden (Tsangaras & Greenwood 2012). Dem gegenüber steht, dass laut Pääbo *et al.* nicht in jedem Fall jedes Kriterium rigide befolgt werden muss, da nicht alle Fehlerquellen in jeder Studie auftreten (Pääbo *et al.* 2004). Insgesamt wurde bis 2007 kein Konsensus gefunden, ob die historischen Pestseuchen durch *Yersinia pestis* verursacht worden waren (Cohn & Alfani 2007).

Hänsch *et al.* erbrachten mit dem Nachweis und der Typisierung des Pesterregers in Individuen aus England, Frankreich und den Niederlanden eindeutig den Beweis, dass *Y. pestis* den Tod von Menschen während des großen Sterbens im 14. Jahrhundert verursacht hatte (Hänsch *et al.* 2010). 2011 legten Schünemann *et al.* 98,68 Prozent der Sequenz des 9.600 bp großen pPCP1-Plasmids vor, zu dem sie über eine Gesamtgenom-Sequenzierung mittels der Illumina-Technik gekommen waren (Schünemann *et al.* 2011). Im gleichen Jahr legte dieselbe Arbeitsgruppe das Gesamtgenom von *Y. pestis* vor, das sie ebenfalls über eine Next Generation Sequencing (NGS)-Methode derselben Individuen des Friedhofs East Smithfield in London erstellt hatte. Bei diesem soll es sich um einen Friedhof handeln, dessen Individuen im Gegensatz zu anderen Kollektiven sicher an den Beginn der mittelalterlichen Pandemie datiert werden können (Schünemann *et al.* 2011). Er soll speziell für die Bestattung von Opfern des Schwarzen Todes zwischen 1348 und 1350 geschaffen worden sein (Cowan *et al.* 2008). Schünemann *et al.* beanspruchten damals für sich, nicht nur die älteste, sondern auch die längste authentische Sequenz eines alten Pathogens rekonstruiert zu haben (Schünemann *et al.* 2011).

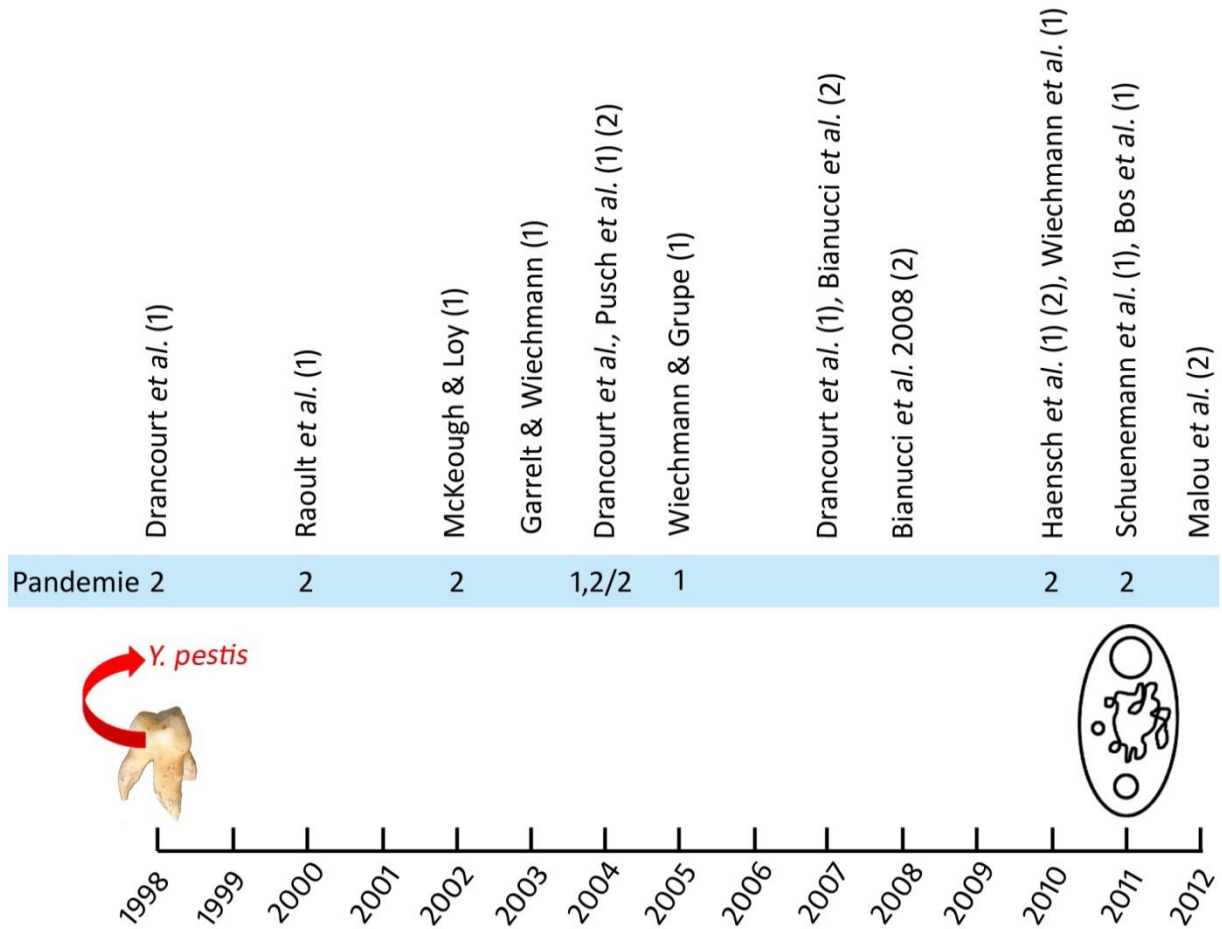


Abbildung 6: Zeitleiste der erfolgreichen Analyse von *Yersinia pestis* in historischem Skelettmaterial. Seit der erstmaligen Detektion von *Y. pestis* 1998 wurden viele weitere Erfolge publiziert bis 2011 die Erstellung einer nahezu vollständigen Gesamtgenom-Sequenz gelang. Noch 2012 galt die Studie von Hänsch *et al.* (2010) als die robusteste *Y. pestis*-Studie, allerdings waren in diesem Ranking die Studien ab 2011 noch nicht berücksichtigt (Tsangaras & Greenwood 2012). (1) = molekulargenetische Detektionen, (2) = F1-Antigen-Detektionen

Mit dem Gesamtgenom präsentierten Bos *et al.* 2011 ein neues Entstehungsalter von *Y. pestis*. Alle Stämme, die mit humanen Infektionen assoziiert würden, sollten einen gemeinsamen Vorfahren vor 668 bis 729 Jahren gehabt haben, also 1282-1343. Dies würde zudem darauf hinweisen, dass alle derzeit zirkulierenden Isolate der Äste 1 und 2 frühestens im 13. Jahrhundert entstanden wären. Menschen wären demnach erstmals im Mittelalter mit dem Vorfahren aller bekannten pathogenen *Y. pestis*-Stämme in Kontakt gekommen. Aufgrund ihrer Schätzung für die Entstehung des Erregers wäre die Pest des Justinian folglich entweder durch eine Variante von *Yersinia pestis* verursacht worden, die sich von allen derzeit zirkulierenden, mit humanen Infektionen assoziierten Stämmen unterschied, oder die Seuche vom 6. bis 8. Jahrhundert wäre eine ganz andere Krankheit gewesen (Bos *et al.* 2011). Diese Ansicht haben Bos *et al.* wenige Monate später revidiert. Nach dem Vergleich ihres mittelalterlichen Pestgenoms mit dem moderner Stämme hielten sie *Yersinia pestis* dann doch für den möglichen Verursacher der Justinianischen Pest (Bos *et al.* 2012). Einen Beweis aus einem Opfer hatten sie jedoch nicht.

7 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Der Nachweis von Erregern in historischem Skelettmaterial bietet die Möglichkeit, Informationen zum Gesundheitsstatus vergangener Populationen zu erhalten. Dies ist besonders dann hilfreich, wenn wie im Fall einer Pest-Infektion keinerlei morphologisch an Knochen feststellbare Hinweise auf eine Erkrankung oder Todesursache gefunden werden können (Gilbert *et al.* 2004).

Die vorliegende Arbeit gliederte sich in die Bearbeitung von Material zweier verschiedener Epochen, die Zeit der Justinianischen Pest und des Schwarzen Todes. Entsprechend der zeitlichen Einteilung unterschieden sich Ziele und Fragestellungen (siehe Abbildung 7).

Angesichts vorangehender Arbeiten (Garrelt & Wiechmann 2003; Wiechmann *et al.* 2010; Hänsch *et al.* 2010; Schünemann *et al.* 2011; Bos *et al.* 2011) ging es in dieser Arbeit nicht primär darum, einen weiteren Beweis für die Anwesenheit des Bakteriums in historischem Skelettmaterial aus der Zeit des Schwarzen Todes zu finden. Für die Proben aus Manching-Pichl war dies ohnehin bereits gezeigt worden (Garrelt & Wiechmann 2003; Wiechmann *et al.* 2010), wohingegen der Erregerstatus in den anderen Proben dieser Zeit aus Basel sowie des Dreißigjährigen Kriegs aus Brandenburg unbekannt war. Vielmehr sollte in dieser Arbeit nach der Erregerdetektion mittels einer nachfolgenden Typisierung der isolierten DNA geklärt werden, welcher Stamm sich in den Individuen der verschiedenen Fundorte befindet. Hänsch *et al.* (2010) hatten in Individuen aus England, Frankreich und den Niederlanden zwei verschiedene Erregertypen festgestellt und daraus auf zwei Verbreitungswege geschlossen. Der Erreger aus den deutschen und schweizer Proben sollte mit den in den anderen europäischen Ländern identifizierten Stämmen verglichen werden, um möglicherweise Rückschlüsse auf die Verbreitung des Erregers im 14. Jahrhundert und den nachfolgenden Wellen des Schwarzen Todes zu ziehen.

Da die Proben aus Brandenburg in eine andere Zeit datieren als jene aus Manching-Pichl – sie sind grob 200 Jahre jünger – war darüber hinaus von Interesse, ob in allen mitteleuropäischen Individuen der gleiche Erregerstamm nachweisbar ist oder ob dieser inzwischen mutiert war.

Mit dem Nachweis des F1-Antigens von *Yersinia pestis* in archäologischem Skelettmaterial eines dieser Fundorte sollte ein von DNA-Analysen unabhängiger, zweiter Weg zur Detektion des Erregers beschritten werden. Allerdings stellte diese Herangehensweise in dieser Arbeit lediglich einen Nebenaspekt dar.

Für die Zeit der Justinianischen Pest hatten Wiechmann & Grupe (2005) zwar die Anwesenheit des Erregers in Individuen aus Aschheim gezeigt. Arbeiten von Drancourt *et al.*, die sich ebenfalls mit Individuen aus dieser Zeit beschäftigten und den Erreger dem Orientalis-Biovar zugeordnet hatten (Drancourt *et al.* 2007) und die fehlende Reproduktion der Aschheim-Ergebnisse in einem unabhängigen Labor (Tsangaras & Greenwood 2012), ließen jedoch Zweifel an der Identität des verursachenden Bakteriums aufkommen. Bos *et al.* (2011) hatten aufgrund ihrer Studie die Möglichkeit der Existenz des Erregers in dieser Zeit ausgeschlossen. Ein Ziel war daher, die Ergebnisse von Wiechmann & Grupe (2005) durch die Untersuchung derselben und anderer Individuen aus Aschheim unter Einhaltung der geforderten Authentizitätskriterien (siehe Kapitel Diskussion, Abschnitt 1) im neuen Labor des ArchaeoBioCenters zu verifizieren. Bei Gelingen dieses ersten Schritts sollte durch eine nachfolgende Typisierung der *Y. pestis*-Stamm im 6./7. Jahrhundert identifiziert und evolutionär eingeordnet werden, anhand dessen Rückschlüsse auf die Entstehungsregion des Erregers gezogen werden könnten.

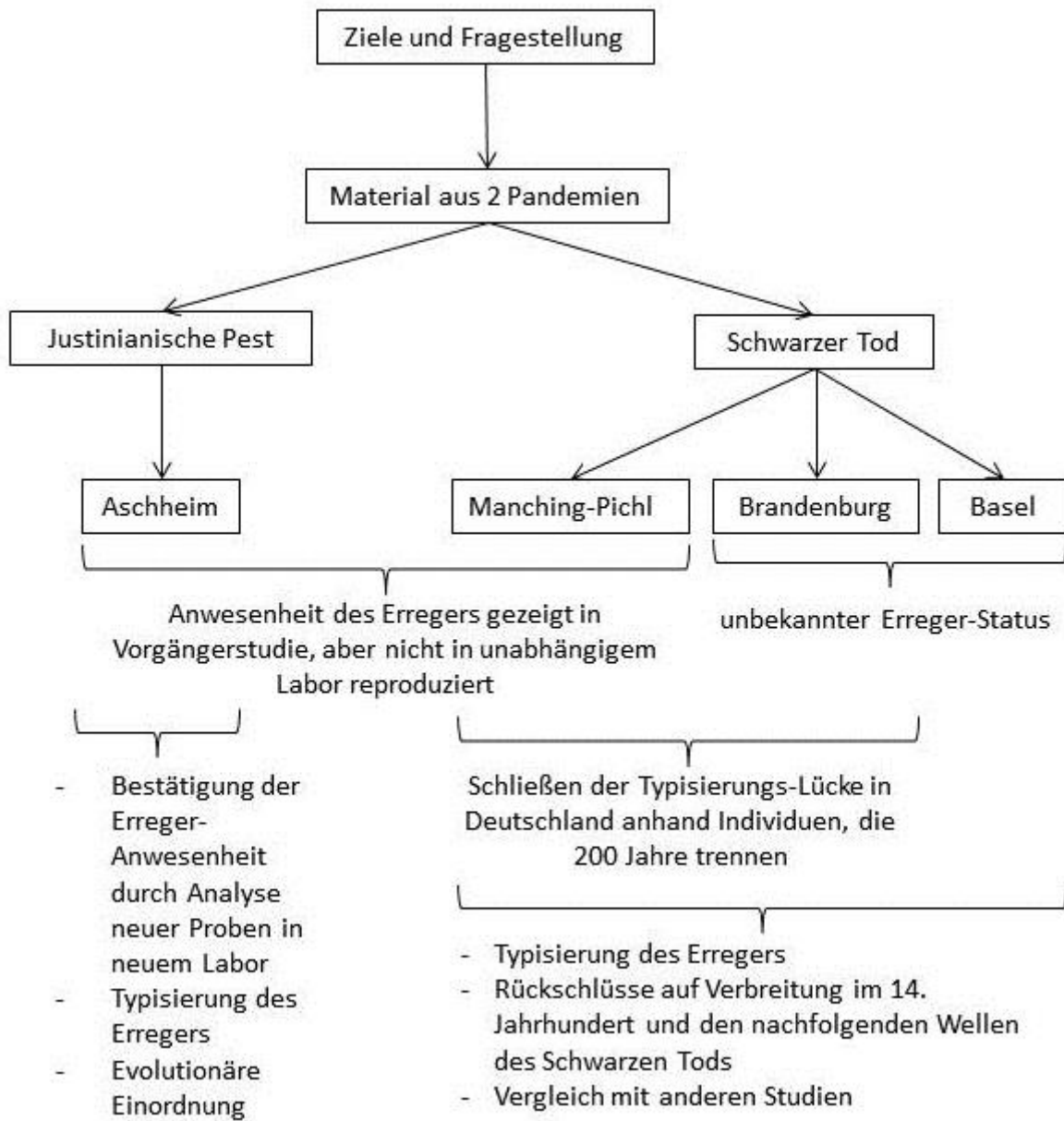


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ziele und Fragestellung dieser Dissertation.

III Material

In der vorliegenden Arbeit lagen vier verschiedene Materialkomplexe zur Untersuchung vor, die von unterschiedlichen Fundplätzen in Deutschland und der Schweiz stammen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die untersuchten Individuen, dazugehörige demographische Daten wie Geschlecht und Sterbealter, ihren Fundort sowie ihre Datierung und spezifiziert das für die aDNA-Extraktion eingesetzte Zahnmaterial. Mit einer Ausnahme (MP34-I) wurden von allen Individuen Zähne als Material entnommen und damit einer Empfehlung für aDNA-Studien gefolgt (Pilli *et al.* 2013; siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 5).

Zähne wurden aus weiteren zwei Gründen für die aDNA-Extraktion herangezogen. Erstens sterben Menschen an der Pest gewöhnlich in der septikämischen Phase, weshalb alle mit Blut versorgten Gewebe inklusive der Pulpahöhle Spuren von *Y. pestis* enthalten sollten (Garrelt & Wiechmann 2003). Zweitens ist die Qualität von DNA aus Zähnen oft besser als die aus Knochen, wenngleich es sich bei der Quantität genau anders herum verhält (Zierdt *et al.* 1996; Schünemann *et al.* 2011).

Die Präferenz bei der Auswahl der Zähne für die aDNA-Extraktion wurde der Empfehlung von Burger & Bollongino (2010) folgend Molaren mit geschlossenen Zahnwurzeln gegeben. Zähne mit mehreren Wurzeln besitzen eine Pulpahöhle mit größerem Volumen, wodurch die Anzahl an Blutgefäßen und potentiell vorhandenen *Y. pestis* erhöht sein sollte. Ein weiteres Auswahlkriterium bildete die Abwesenheit von Karies, um einen möglichen Eintrag von mikrobieller DNA von der veränderten Zahnoberfläche auszuschließen (Zierdt *et al.* 1996), und Zahnstein sowie das Vorliegen möglichst geringer Zahnabration. Zähne mit geschlossener Pulpahöhle werden ebenfalls aus Kontaminationsgründen bevorzugt. Da das zur Verfügung stehende Material eine unterschiedliche Qualität aufwies bzw. durch die Vorauswahl der Probeneinsender festgelegt war, wurden jedoch mitunter auch Zähne für die Analysen ausgewählt, die diesen Kriterien nicht entsprachen.

Die Zähne der Kollektive Aschheim und Manching-Pichl wurden für die Untersuchung in dieser Arbeit zum Teil aus den Beständen vorhergehender Studien ausgewählt (Garrelt 2002 bzw. Garrelt & Wiechmann 2003; Wiechmann & Grupe 2005; Wiechmann *et al.* 2010). Für einige Individuen war es nötig, vor Ort weitere Proben zu nehmen, was zusammen mit Dr. Michaela Harbeck von der Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie München (SAPM) in der Aschheimer Gruft bzw. im Stadtmuseum Ingolstadt geschah, wo die Skelette wiederbestattet bzw. magaziniert sind.

Entsprechend waren die Zähne aus Vorbeständen und Vorarbeiten bereits größtenteils anthropologisch bestimmt worden. Gleiches gilt für die Zähne aus Brandenburg in der Probensendung von Dr. Bettina Jungklaus und jene aus Basel von Dipl. phil. Cornelia Alder eingeschickten Zähne. Wo noch eine Bestimmung der Zähne nötig war, wurde dies unter Zuhilfenahme der Kriterien von White & Folkens (2005) in dieser Arbeit durchgeführt. Die Zähne wurden entsprechend des in Anhang 2 aufgeführten Zahnschemas numerisch benannt. Dennoch war eine exakte Zuordnung der Zähne nicht in jedem Fall möglich, weshalb einige nur entsprechend ihrer Stellung im Gebiss bestimmt wurden, also als Incisivi, Canini, Prämolaren, Molaren.

Tabelle 4: Material der in dieser Arbeit untersuchten Individuen. Angaben sind für Brandenburg Dalitz *et al.* (2012), für Aschheim Staskiewicz (2007) und Gutschmiel (2010), für Manching-Pichl dem Befund von DDR. Olav Röhler-Ertl (internes Dokument der SAPM) und Wiechmann *et al.* (2010) und für Basel Matt & Alder (2008) entnommen.

*Die Individuen MP54-VI und MP56-II tauchen in der Aufstellung von DDR. Röhler-Ertl nicht auf. Vermutlich handelt es sich bei den beiden richtigerweise um die Individuen MPS4-VI und MPS6-II. Da dies jedoch nicht sicher geklärt werden kann, werden die beiden Individuen weiter der Beschriftung des vorhandenen Probenmaterials folgend geführt.

*¹⁴C-Datierungen laut Harbeck *et al.* (2013). a = Jahre; ♂ = männlich; ♀ = weiblich

Probe	Individualalter	Geschlecht	Datierung		Herkunft	Zahn-Material
			archäologisch	¹⁴ C		
A049	frühadult	♀	530-570 AD		Aschheim-Bajuwarenring	26
A056	matur	♀	580-600 AD			17
A058	spät matur bis frühsenil	♂	580-600 AD	431-544 AD**		27, UK-M3
A059	matur	♂	580-600 AD			28
A060	mitteladult bis mittelmatur	♂	580-600 AD			26
A066	adult	♀	530-570 AD			16
A072	matur	♂	570-620/630 AD			48
A076	(matur bis) senil	♀	530-570 AD	443-566 AD**		17, 27
A077	mittelmatur bis frühsenil	(♂)	530-570 AD			36
A082	Infans II, 10-12 a	(♀)	530-570 AD			16, UK-M
A105	mitteladult	♀	590/600-620/630 AD			36, OK-M3
A119	frühadult, 21-24 a	♀	525-550 AD			27
A120	frühadult, 20-23 a	♀	525-550 AD			26, 16
A166	matur	♀	530-570 AD			27
A167	juvenil, 13-16 a	♀	530-570 AD			23
A197	matur?	♂	590/600-620/630 AD			26
A205	früh-bis mitteladult	♂	590/600-620/630 AD			16
A278	senil	♀	530-570 AD			47
A295	mittel-bis spätadult	♀	600/610-670/680 AD			26
MP03-I	Infans I, 3 a	♀	1250 bis 1500 AD			Manching-Pichl
MP10-I	spätadult	♀		37		
MP17-I	Infans II, 11 a	♂		36		
MP19-II	Infans I, 6 a	♂		75, M		
MP22	frühadult, 20-22 a	♀		26		
MP26-I	frühadult? spätadult	♂		26		
MP34-I	frühadult	♀		Humerus		
MP54-VI* (MPS4-VI)				46		
MP56-II* (MPS6-II)				37		
MP59-I	frühmatur	♀		16		
MP73-I	frühadult, 20-25 a	♂		18		
MPS01-I	Infans II, 8 a	♂		36, UK-M (Milchg.)		
MPS03-IIX	Infans II, 12-14 a	♂		16		
MPS04-VI	Infans II, 10 a	♂		I		
MPS08-XXXI	Juvenil, 15 a	♂		16		

Fortsetzung Tabelle 4:

Probe	Individualalter	Geschlecht	Datierung		Herkunft	Zahn-Material	
			archäologisch	¹⁴ C			
MPS09-II	frühadult	♂	1250 bis 1500 AD		Manching-Pichl	33	
MPS09-VI	Infans I, 6a	♂					46
MPS12-I	juvenil, 15 a	♂					16
MPS15-V	Infans I, 6a	♂					26
MPS15-VII	Infans I, 6a	♂					C
MPS4-XX	juvenil, 15 a	♀					P
B1	31-37 a	♂	Zeit um den 30-jährigen Krieg von 1618-48		Brandenburg	16	
B2	22-24 a	♂					17
B3	18-20 a	♂					36, UK-M
Ba04	unbekannt	unbekannt	14. bis 17. Jahrhundert		Basel	45	
Ba40	unbekannt	unbekannt					34
Ba27	unbekannt	unbekannt					35
Ba10	unbekannt	unbekannt					45
Ba21	unbekannt	unbekannt					35
Ba67	unbekannt	unbekannt					44

In den weiteren Abschnitten (1 bis 4) dieses Kapitels werden Details zu den Skeletten der einzelnen Fundorte beschrieben.

1 Das frühmittelalterliche Gräberfeld Aschheim-Bajuwarenring

In Aschheim bei München wurden 1997 und 1998 in einem Baugebiet insgesamt 430 Bestattungen eines frühmittelalterlichen Reihengräberfelds gefunden (siehe Abbildung 8). Dessen Grenzen wurden bis auf die in westlicher Richtung gelegene alle erreicht, wo eine Kiesgrube des 19. Jahrhunderts eine unbestimmte Anzahl an Gräbern zerstört hat. Auffallend ist an dieser Nekropole die große Anzahl von Doppel- und Mehrfachbestattungen. In Zahlen befanden sich hier 27 Doppelgräber, vier Dreifach-, ein Vierfach- und ein Fünffachgrab, in denen 77 Individuen bestattet waren (Gutsmiedl 2005). Bei der anthropologisch-morphologischen Bestimmung aller Individuen durch Dr. Anja Staskiewicz war ein mögliches 28. Doppelgrab entdeckt worden, das bei der Grabung im Feld vermutlich übersehen wurde (Staskiewicz 2007).

Die Belegung des Friedhofs wurde archäologisch anhand von Perlen und anderer Bestattungsbeigaben in verschiedene Zeitstufen (A = vor 525/535 bis E = 620/630-670/689) eingeteilt und auf die Zeit von etwa 500-670 AD festgelegt. Die meisten Doppel- und Mehrfachbestattungen lassen sich in das mittlere Drittel und das Ende des 6. Jahrhunderts datieren (Gutsmiedl 2010). Diese zeitliche Einordnung wird durch ¹⁴C-Datierungen gestützt, die an zwei in dieser Arbeit untersuchten Individuen durchgeführt wurden. Das Individuum A058 wurde in die Jahre cal. 431-544 AD (95,4 Prozent Wahrscheinlichkeit) datiert. Für das Individuum A076, das aus einem anderen Grab stammt, wurde die Zeit von cal. 443-566 AD (95,4 Prozent Wahrscheinlichkeit) als wahrscheinlichster Bereich ermittelt (Harbeck *et al.* 2013).

Ausgehend von der Vermutung, dass jede dieser Zeitspannen eine Epidemie repräsentiert, folgerte Staskiewicz, dass sich in Aschheim mit Fokus um die Mitte des 6. Jahrhunderts jeweils ein Pest-Szenario abspielte. Die Justinianische Pest habe, beginnend 544 AD, etwa 200 Jahre lang auch in Teilen Zentraleuropas ein Gesundheitsrisiko für die Bevölkerung dargestellt und auch die Gegend um Aschheim betroffen. Nur jene wenigen Individuen aus der Zeit von 500 bis 530 (ASH I) hätten in einer Pest-freien Periode gelebt. Zudem ergab die Ermittlung der Lebenserwartung die geringste Lebenserwartung sowohl für Männer als auch für Frauen in ASH II. Anzeichen für zugefügte tödliche

Wunden bei einem Massaker oder durch eine andere Form von Gewalt, die für das gleichzeitige Bestatten sprechen würden, fand Staskiewicz (2007) nicht.

Zwei der Individuen aus einem Doppelgrab mit den Nummern 166 und 167 sind bereits molekulargenetisch untersucht worden (Wiechmann & Grupe 2005). Es handelt sich dabei um das Grab zweier Frauen, die mit außergewöhnlich reichen Beigaben ausgestattet waren (Gutsmiedl 2005). Die Analyse beinhaltete die Bestimmung diverser humaner Loci sowie Tests auf das Vorhandensein der *Yersinia pestis*-spezifischen *pla*-Sequenz, welche klar die Anwesenheit der Justinianischen Pest in Südbayern gezeigt hatte (Wiechmann & Grupe 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den beiden bereits untersuchten Individuen 17 weitere dieser Nekropole molekulargenetisch analysiert (siehe Tabelle 4 und Abbildung 8). Dazu wurden ausschließlich Individuen aus Doppel- und Mehrfachbestattungen ausgewählt, deren Datierung laut den Angaben in der Dissertationsschrift von Dr. Doris Gutsmiedl-Schümann (2010) mit dem Beginn der Justinianischen Pest übereinstimmt.



Abbildung 8: Gräberfeldplan des Fundorts Aschheim-Bajuwarenring im Landkreis München. Farblich markiert sind darin Doppel- und Mehrfachbestattungen, aus denen Material mindestens eines Individuums für molekulargenetische Untersuchungen zum Nachweis und zur Typisierung des Pest-Erregers entnommen wurde. Unterschiedliche Farben beziehen sich auf unterschiedliche Datierungen und wurden der Dissertation von Dr. Doris Gutmiedl-Schumann (Seiten 420 und 421) entnommen.

Abbildung modifiziert aus Gutmiedl (2010) mit freundlicher Genehmigung der Autorin

Wie auch beim Kollektiv der Skelette aus Manching-Pichl (siehe nachfolgenden Abschnitt 2 in diesem Kapitel) lag die Zielsetzung nicht darauf, alle Skelette des Kollektivs zu untersuchen, um Einzelschicksale und die Gesamtzahl der Opfer zu klären. Stattdessen war geplant, bei einem Gelingen des Pest-Nachweises den enthaltenen Stamm näher zu charakterisieren und dadurch

mögliche Unterschiede des Stamms aus der Zeit der Justinianischen Pest zu den Stämmen der zweiten Pandemie (Hänsch *et al.* 2010; Bos *et al.* 2011) aufzuzeigen.

2 Das Massengrab in Manching-Pichl

Im Ortsteil Pichl der Gemeinde Manching im Landkreis Pfaffenhofen an der Ilm wurde bei der Renovierung der Leonhardi-Kirche 1984/85 ein Massengrab entdeckt. Dieses befand sich unterhalb der Sakristei und datiert vermutlich in die Zeit, bevor die Sakristei an den Kirchturm angebaut wurde. Als weiterer Hinweis zur Datierung diente ein Drachenamulett vom Ende des 15. Jahrhunderts (Albrecht & Mayr 1991). Die Vermutung, dass es sich hier um ein Massengrab aus der Zeit des Schwarzen Todes handelt, wurde neben der zeitlichen Einordnung durch die Fundumstände aufgestellt (Garrelt 2002). Die mindestens 75 Individuen lagen eng in vier Schichten übereinander (Garrelt 2002; Garrelt & Wiechmann 2003). Einzelne Grabgruben, also eine zeitliche Trennung von Aushebungen, waren nicht erkenntlich. Ebenso wurden keine Reste von Särgen oder Kleidung gefunden, was auf die Verwendung von Leichentüchern schließen lässt. Die Individuen waren eingebettet in eine Grabverfüllung aus einer dicken Schicht aus lockerem, humosem Sediment und lagen oberhalb mehrerer farblich unterscheidbarer Schichten, die den Hügel bilden (Garrelt 2002), auf dem der Ortskern angesiedelt ist (Albrecht & Mayr 1991). Es schien folglich so, als sei für die Toten kaum eine Grube ausgehoben worden, sondern als seien sie fast ebenerdig niedergelegt und schichtweise mit Sediment bedeckt worden (Garrelt 2002). Der Hügel war namensgebend für den Ort Pichl. Er wird auch als „Bühel“, „Bichel“ oder „Pich(e)l“ bezeichnet, was „Ort an der Anhöhe, am Bühel“ bedeutet. Im Mittelhochdeutschen bezeichnet ein „Bühel“ einen kleinen Hügel (Albrecht & Mayr 1991).

Einige der Individuen sind bereits positiv auf das Vorhandensein von DNA des Bakteriums *Yersinia pestis* getestet worden (Garrelt & Wiechmann 2003; Garrelt 2002; Wiechmann *et al.* 2010). Eine SNP-Typisierung ist bisher jedoch noch nicht versucht worden. In dieser Arbeit wurden zum Einen Individuen untersucht, die in den vorangegangenen Arbeiten bereits positiv getestet worden waren (Garrelt 2002; Garrelt & Wiechmann 2003), um bei einer möglichen Reproduktion der Ergebnisse den enthaltenen Stamm weiter zu typisieren. Zum Anderen wurden skelettale Überreste ausgewählt, die noch nicht im Labor analysiert worden waren, um die Anzahl der insgesamt molekulargenetisch untersuchten Individuen dieses Kollektivs zu erhöhen. Insgesamt wurden in dieser Arbeit Zähne und Knochen von 21 Individuen bearbeitet (Tabelle 4).

3 Drei Söldner aus Brandenburg

Die Skelette von drei Individuen (siehe Abbildung 9) wurden im Herbst 2011 bei einer archäologisch begleiteten Baugrunduntersuchung auf dem Grundstück Domlinden 12 gefunden, das sich auf der Dominsel in der Stadt Brandenburg an der Havel befindet. Sie befanden sich in einer Grube auf der Gartenseite. Die Fundumstände ließen den Schluss zu, dass die Individuen gleichzeitig niedergelegt worden waren.

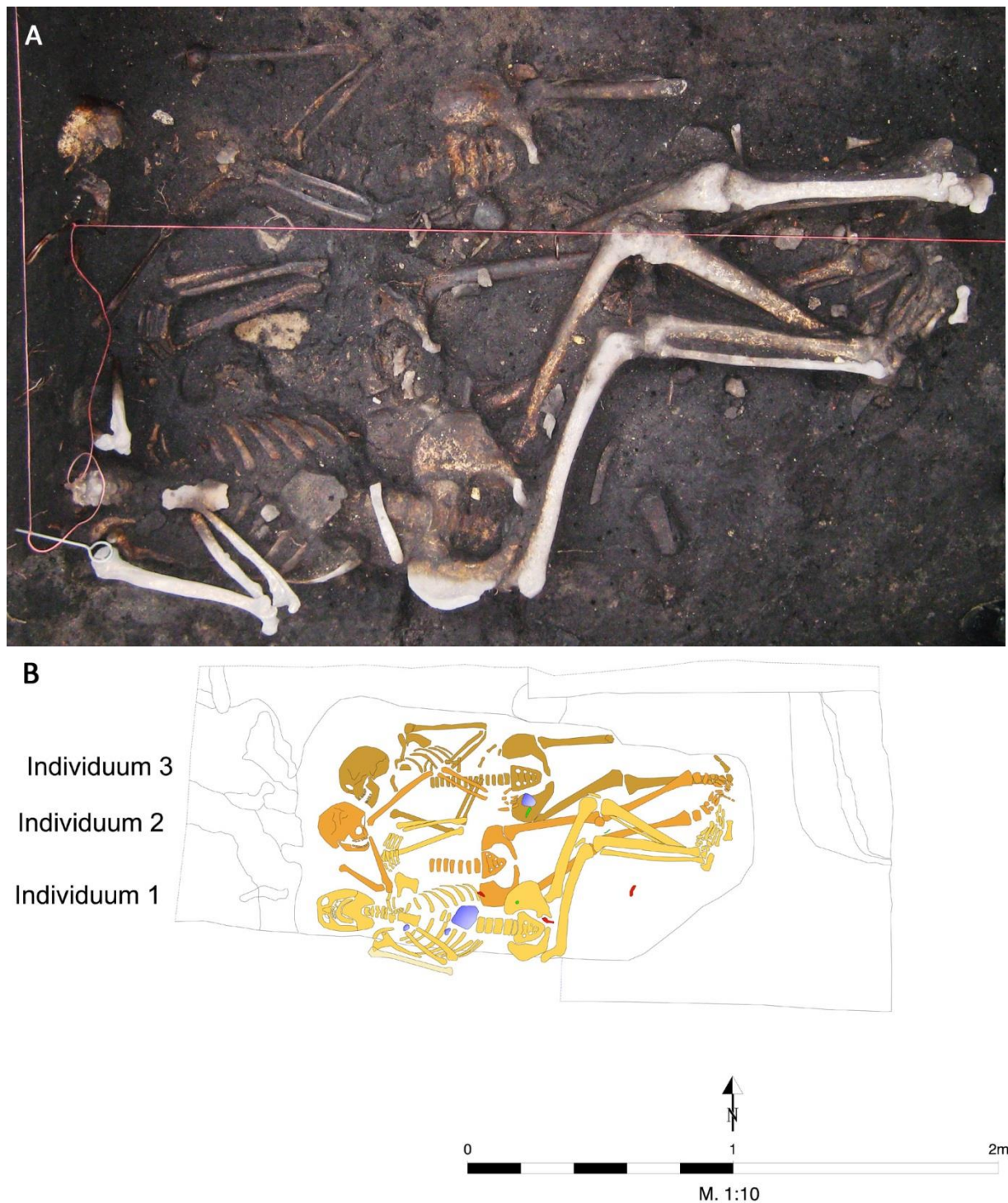


Abbildung 9: Fundsituation der drei Brandenburger Skelette auf der Gartenseite des Grundstücks Domlinden 12 in Bandenburg an der Havel. Bild A zeigt die Skelette beim Freilegen, wobei der Kopfbereich noch mit Erde bedeckt ist. Bild B gibt die komplette Fundsituation wieder.

Foto: Bettina Jungklaus, Grabungszeichnung: S. Dalitz (umgezeichnet von A. Grothe) mit freundlicher Genehmigung

Datiert wurden sie anhand einer Beigabe, eines Tonpfeifenkopfs mit Fersenmarke, die eine Krone und die Initialen „SC“ aufweist (Dalitz *et al.* 2012). Wie bei Dalitz *et al.* zu lesen ist, handelt es sich laut Auskunft des niederländischen Experten Jan van Oostveen um eine Pfeife des Amsterdamer Pfeifenbäckers Samuel Collier, der von 1630 bis 1640 produzierte. Diese soll wie eine Münze recht genau zum Datieren geeignet sein. Damit wurde die Bestattung gesichert in die Zeit des Dreißigjährigen Krieges von 1618 bis 1648 eingeordnet. Da die Toten nicht wie die Einwohner der Domkietze, zu denen das Anwesen Domlinden 12 gehörte, auf dem regulären Friedhof der

Petrikapelle bestattet wurden, sondern auf dem Grund eines normalen Bürgerhauses, wurde von einer Sonderbestattung ausgegangen (Dalitz *et al.* 2012). Die Stadt Brandenburg an der Havel wurde während der kriegerischen Auseinandersetzung ab 1626 von ersten Armeen durchzogen. Zwischen 1626 und 1631 mussten Truppen einquartiert werden. 1631 wurde Brandenburg von schwedischen Truppen besetzt (Kunkel *et al.* 2003). Aus dieser Zeit sind auch mehrere Pestwellen überliefert wie von 1625 bis 1627 und 1631 (Geiseler 2008 IN: Dalitz *et al.* 2012). Dalitz *et al.* vermuteten daher, dass es sich bei den Toten um Söldner aus dem Dreißigjährigen Krieg handelte, die möglicherweise 1631 an der Pest verstarben und, da sie keine Einheimischen waren, auf dem Grundstück hinter dem Haus begraben wurden (Dalitz *et al.* 2012; Tabelle 4).

Ob diese Vermutung molekulargenetisch gestützt werden kann, wurde in dieser Arbeit anhand von Zähnen der drei Männer untersucht. Die Zähne hatte Dr. Bettina Jungklaus aus Berlin zur Verfügung gestellt.

4 Individuen vom Elisabethengottesacker in Basel

Nördlich der Elisabethenkirche wurden 2006 in Basel bei der Erneuerung von Werkleitungen 80 Individuen des Elisabethengottesackers gefunden. Die Bestatteten wurden nur soweit gehoben, als es der Leitungsbau erforderte. Unter den Leitungen liegen daher noch unbekannt viele Tote. Das Ausmaß des Massengrabs ist folglich unklar. Der Elisabethengottesacker wurde von Ende des 13. Jahrhunderts bis Anfang des 19. Jahrhunderts genutzt. Der Friedhof gehört zu der 1864 abgebrochenen Saalkirche von 1515/16 bzw. zu einer älteren Kapelle an gleicher Stelle. Auf dem Friedhof wurden Menschen der Kirchengemeinde und Tote des Spitals beerdigt. Er diente auch als Sonderfriedhof für Hingerichtete, Selbstmörder und Fremde. Auffallend bei der Bergung der Skelette war die Bestattungssituation. Die oberste Bestattung lag nur 50 cm unter dem heutigen Bodenniveau, Gräber waren in vier Schichten übereinander angelegt, zwischen einzelnen Skeletten befand sich nur wenig Sediment. Auch horizontal lagen die Gräber nah zusammen. In einer Reihe lagen oft Erwachsene nebeneinander, Kleinkinder in einer zweiten Reihe zwischen den Beinen der Erwachsenen. Das Geschlechterverhältnis war ausgeglichen, das Verhältnis von Erwachsenen zu Kindern betrug 3:1. Krankheitsanzeichen oder Verletzungen wurden nicht festgestellt. Die Gräber enthielten keine Beigaben, keine Holzreste, keine Sargnägel. Jedoch wurden Spuren von gelöschtem Kalk gefunden. Bei manchen Individuen wurde ein Leichentuch wegen der Haltung der Bestatteten vermutet, bei dreien wurde grobes Tuch gefunden. Viele der Toten waren gemeinsam bestattet worden. Als Todesursache wurde eine der vielen epidemischen Erkrankungen im 14. bis 17. Jahrhundert vermutet. Angesichts des Pestberichts des Basler Stadtarztes Felix Platter über die Jahre 1610/11, wonach auf dem Elisabethengottesacker 327 Menschen, auf dem Spitalfriedhof 269 und in ganz Basel 3922 Opfer der Pest bestattet worden sein sollen (Matt & Alder 2008, 2007), wurde zunächst vermutet, Verstorbene aus ebendiesen Pestjahren 1610/11 gefunden zu haben (Alder & Matt 2007). Eine ¹⁴C-Untersuchung an drei gehobenen Individuen ergab jedoch, dass die unterste Bestattung ins 14./15. Jahrhundert datierte. Zwei der drei Individuen aus dem frühen 15. Jahrhundert lagen in der Kernzone des Massengrabs. Das dritte wurde in die erste Hälfte des 14. Jahrhunderts oder ins beginnende 15. Jahrhundert datiert. Allerdings war unklar, ob alle gehobenen Individuen zu diesem Massengrab gehören oder auch der reguläre Elisabethengottesacker bei der Grabung angeschnitten worden war (Matt & Alder 2008). Auch aus früherer Zeit sind in Chroniken Sterbezahlen in Basel genannt, wenngleich laut Huldrych M. Koelbing hier Misstrauen walten müsse, sofern die Zahlen nicht durch Akten bestätigt seien (Koelbing 1984; zur Thematik „überschätzte Sterbezahlen“ siehe auch Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.2). Beispielsweise sind laut dem Basler Chronisten Christian Wurstisen, der seine Chronik 1580 aufgrund älterer Überlieferungen verfasste, während des Schwarzen Todes 1349 in Basel 14.000 Einwohner gestorben (Koelbing 1984; Buess 1956). Auch Heinrich Buess hält diese Zahl für zu hochgegriffen. Er rechnet mit 10.000 Einwohnern und in den Jahren des Schwarzen Todes mit höchstens der Hälfte Toter – dennoch eine „für damals unheimlich hohe Zahl“ (Buess 1956).

Interessant ist der Fundort Elisabethengottesacker für diese Dissertation angesichts der Frage, ob auch zwei bzw. drei Jahrhunderte vor den Jahren 1610/11 Seuchenopfer hier beerdigt worden sind. Dazu wurden exemplarisch sechs Individuen untersucht, deren Zähne von Dipl. phil. Cornelia Alder von der Archäologischen Bodenforschung des Kantons Basel-Stadt zur Verfügung gestellt worden waren (Tabelle 4). Zu diesen waren keine anthropologischen Daten wie Angaben zu Alter und Geschlecht bekannt. Der Probeneinsendung lag lediglich ein Schreiben mit der Bitte um Untersuchungen auf Pest- und nachfolgend Tuberkulose-Erreger bei.

IV Methoden

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze zur Analyse von Biomolekülen in historischem Skelettmaterial unternommen. Falls nicht anders angegeben, wurden die methodischen Schritte von der Verfasserin dieser Dissertation ausgeführt. Den Großteil der Arbeit machten Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCRs) zum Nachweis *Yersinia pestis*-spezifischer Genomabschnitte sowie eines humanen Lokus aus (Abschnitt 2). Ein kleinerer Teil dieser Dissertation bestand in dem Versuch der Detektion des F1-Antigens des Pesterregers (Abschnitt 3). Doch vor der Erklärung der Prinzipien dieser beiden Methoden werden zunächst in Abschnitt 1 das Studiendesign und die in diesem Zusammenhang wichtigen Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung beschrieben.

1 Studiendesign und Strategien zur Kontaminationsvermeidung

Hinsichtlich der molekulargenetischen Detektionen sah das von Dr. Michaela Harbeck, Dr. Ingrid Wiechmann, Dr. Julia Riehm und Dr. Holger Scholz entwickelte Konzept dieser Arbeit vor, in den Laboren des Kooperationspartners, des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr (IMB), zunächst PCRs zur Detektion von *Yersinia pestis*-spezifischen Genomabschnitten und des humanen Lokus zu optimieren, um dann Extrakte aus historischem Skelettmaterial unter den im Reinraum-Komplex des ArchaeoBioCenters gegebenen Bedingungen auf das Vorhandensein dieser zu analysieren. Unabhängig davon wurden im Labor der Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie München (SAPM) in der vorliegenden Arbeit und in einer Bachelorarbeit (Fischersworing 2012) Versuche unternommen, das F1-Antigen von *Y. pestis* in skelettalen Überresten aus historischer Zeit nachzuweisen.

Bei der Untersuchung aller Biomoleküle aus historischem Skelettmaterial ist die Vermeidung von Kontaminationen eklatant wichtig, um glaubhafte Ergebnisse zu produzieren. Das Studiendesign dieser Arbeit sah daher von Anfang an eine strikte Trennung von Arbeitsschritten vor, insbesondere von prä- und post-PCR-Bereich während molekulargenetischer Analysen (Abbildung 10). Dies war besonders insofern wichtig, als mit dem Kooperationspartner IMB ein Labor beteiligt war, in dem moderne *Y. pestis*-Stämme analysiert werden. Die Vermeidung von sogenannten *carry over*-Kontaminationen durch Amplifikate aus vorhergegangenen Reaktionen (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 5) war daher besonders bedeutend, um falsch-positive Resultate zu vermeiden.

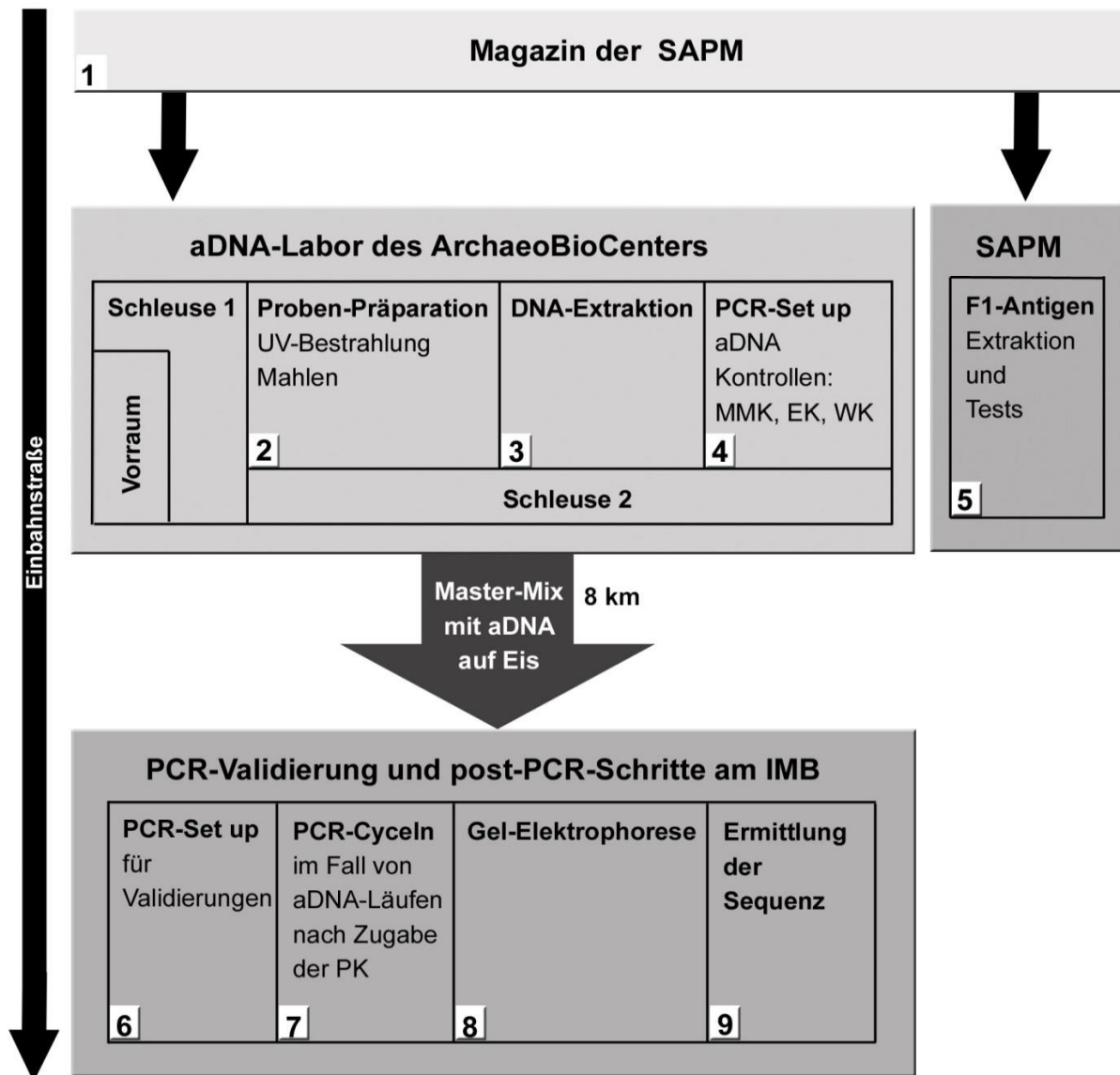


Abbildung 10: Einbahnstraßenprinzip für die Analyse von Biomolekülen aus historischem Skelettmaterial in dieser Arbeit. Proben aus dem Magazin der SAPM wurden zum Nachweis des F1-Antigens in Knochen und Zähnen in das Labor der SAPM bzw. zur molekulargenetischen Detektion von DNA des Pesterregers sowie eines humanen Lokus in den Reinstraum-Komplex des ArchaeoBioCenters transportiert. PCR-Gefäße wurden aus dem Reinstlabor zur Prozessierung und Analyse in das acht Kilometer entfernte IMB gebracht.

SAPM = Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie München, IMB = Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, EK = Extraktionskontrolle, MMK = Mastermix-Kontrolle, WK = Wasserkontrolle, PK = Positivkontrolle.

Abbildung modifiziert aus Seifert *et al.* (2013) mit Genehmigung der Autoren

In den Laboren des IMB wurden alle PCRs durch Verwendung künstlich hergestellter Konstrukte oder DNA von *Y. pestis*-Stämmen optimiert. Der Arbeitsablauf in diesen Laboren folgt einem Einbahnstraßenprinzip, um das maximal Mögliche der Kontaminationsvermeidung zu realisieren. Verschiedene Arbeitsschritte finden in unterschiedlichen Räumen statt: In einem Labor wird der Mastermix für PCRs angesetzt, in einem anderen die DNA zugegeben und die PCR prozessiert. In einem dritten Labor, das sich in einem anderen Gebäudeabschnitt des Instituts befindetet, sind alle post-PCR-Arbeiten wie Gelelektrophorese und Sequenzierung situiert.

Im Reinstraum-Komplex des ArcheoBioCenters der LMU wurden die historischen Proben für die Analyse vorbereitet. Der Reinstlabor-Komplex besteht aus drei separaten Räumen, einem für jede Stufe der Prozessierung von alter DNA: Probenvorbereitung, DNA-Extraktion und Ansetzen von PCRs. Die Räume sind über eine Schleuse miteinander verbunden, die ihrerseits zu einer ersten Schleuse

führt. Das Labor ist mit einem Überdruck-System und HEPA-Filtern ausgestattet, die Kontaminationen durch den Eintrag exogener DNA verhindern sollen. Alle Laborräume sind weiterhin mit je einem UV Air Cleaner ausgestattet, der Luft ansaugt und UV-bestrahlt und DNA dadurch fragmentiert (Wiechmann *et al.* in press). Verbrauchsmaterialien werden direkt vom Hersteller bezogen. Diese ebenso wie die gesamte Ausstattung werden ausnahmslos durch das Abwischen mit Natriumhypochlorid (NaOCl) bzw. herkömmlicher Bleiche (Danchlorix) und/oder durch UV-Bestrahlen dekontaminiert, bevor sie in den Arbeitsbereich eingeschleust werden. Da sich Kontaminationen selbst auf der Haut von Arbeitern absetzen, verschleppt werden und damit zu falsch-positiven Resultaten führen können (Kitchin *et al.* 1990), wird für Arbeiten mit alter DNA in diesem Labor generell zudem ein striktes Hygiene-Regime durchgesetzt. Das Laborpersonal muss nach Arbeiten in einem post-PCR-Bereich oder jeden Tag vor Betreten des Vorraums des Reinstraumbereichs frisch geduscht sein, die Haare gewaschen haben und frisch gewaschene Kleidung tragen wie von Kemp & Smith (2010) gefordert. Im Vorraum wird die persönliche Kleidung durch Unterkleidung ersetzt. Zudem wird ein erstes Paar Einweghandschuhe und Überschuhe sowie ein Haarnetz (VWR, Ismaning, Deutschland) angezogen. In der folgenden Schleuse wird ein Ganzkörperanzug mit Kapuze (DuPont™ Tyvek®, Deutschland) und je ein zweites paar Einweghandschuhe und Überschuhe angezogen sowie ein Mundschutz mit integriertem Sichtschutz (Nitritex, Suffolk, United Kingdom) angelegt. Das Tragen von sauberen Labormänteln, Haarnetzen, Gesichtsmasken und Handschuhen soll das Risiko verringern, das im aDNA-Labor Arbeitende an ihre eigene Studien stellen (Kemp & Smith 2010). Vor Betreten eines Arbeitsraums zieht der Laborarbeiter jeweils den dafür vorgesehene zweiten Overall an, dessen Kapuze den Kopf und somit die Haare bedeckt.

Vor dem Beginn von Arbeiten sowie nach deren Ende steht als grundlegende Dekontaminationsmaßnahme das Reinigen von Arbeitsflächen, verwendeten Pipetten und Tischmülleimern mit DNA Away bzw. einprozentiger NaOCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, München). Routinemäßiges Reinigen von Oberflächen empfehlen auch Kemp & Smith (2010).

In dieser Studie wurden PCR-Reaktionen mit Mastermix und aDNA im Reinstlaborkomplex verschlossen und gekühlt zum Prozessieren in die Labore des in acht Kilometern Entfernung befindlichen IMBs transferiert, wo sie nicht nochmals geöffnet wurden. Lediglich jene Reaktionsgefäße oder Nöpfchen (Wells), die für Positivkontrollen (PK) vorgesehen und im aDNA-Labor nur mit Mastermix gefüllt worden waren, wurden hier noch einmal geöffnet und nach Zufügen der Positivkontrolle zusammen mit den aDNA-Proben und Negativkontrollen prozessiert. Diese wurden zum Aufdecken möglicher Kontaminationen in jedem Arbeitsschritt ab der Generierung von Knochenmehl routinemäßig angefertigt. Pro Extraktionsrunde und maximal sieben Zahn- bzw. Knochenmehlproben wurde eine Extraktionskontrolle (EK) angefertigt, die lediglich die Extraktionslösung enthielt. Bei PCRs auf die Genorte *pla* und *HLA* wurde diese jeweils zusammen mit einer Mastermix- (MMK) und einer Wasserkontrolle (WK) mitgecyclt. Die MMK enthielt lediglich Mastermix und die WK Wasser statt DNA.

Um falsche Resultate aufgrund von Uracil in der aDNA zu minimieren, wurde allen PCRs routinemäßig Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) zugesetzt, welches während eines der PCR vorgeschalteten Inkubationsschritts Uracil aus dem aDNA-Strang herausschneidet (Lindahl 1993; siehe Abbildung 11). UDG ist ein effizientes, ubiquitäres und reichlich vorhandenes DNA-Reparatur-Enzym (Lindahl 1993). Uracil kann auf zwei Weisen in das DNA-Molekül gelangen: degradationsbedingt und durch den gezielten Einbau während einer PCR. Degradationsbedingt entsteht Uracil durch die Deaminierung von Cytosin (Lindahl 1993), also durch den Verlust der Aminogruppe der Base (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4).

Dieses Prinzip wird auch durch den gezielten Einbau von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) statt Desoxythymidintriphosphat (dTTP) bei der DNA-Synthese im Reaktionsgefäß genutzt, um potentiell verschleppte Amplifikate einer vorhergehenden Reaktion zu zerstören. Enthält ein solches Amplifikat jedoch Uracil, so löst das UNG dieses während einer Inkubationsphase heraus, was zur Generierung von abasischen Stellen und in deren Folge zu Strangbrüchen und damit zur Zerstörung des Amplifikats führt (Hofreiter *et al.* 2001a). Das verschleppte Amplifikat kann nicht mehr amplifiziert

werden. Eine Verfälschung des neuen Ergebnisses ist dadurch ausgeschlossen. Um in der nachfolgenden PCR wieder dUTPs einbauen zu können, die nicht subsequent durch das Enzym herausgelöst werden, wird das UDG durch einen der PCR vorgeschalteten Hitzeschritt im Thermocycler deaktiviert. Letztlich erhält man nur das Produkt des gewünschten neuen Extrakts. Das verschleppte Amplifikat ist zerstört worden. Negative Auswirkungen auf die Auswertung der Sequenzen mit Uracil als Baustein hat das Prozedere nicht. Bei einer Sequenzierung (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.2) werden Didesoxythymidintriphosphate (ddTTP) anstelle von Didesoxyuridintriphosphaten (ddUTP) eingebaut, die Sequenz lässt sich einwandfrei auswerten. In dieser Arbeit wurde das Enzym in alle PCRs pipettiert. Falls es nicht im Mastermix des Herstellers enthalten war, wurde es jeder Reaktion in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration zugesetzt. Aufgrund der Komposition des Mastermixes konnte nur bei qPCRs mit dem Produkt von Platinum (Quantitative PCR SuperMix-UDG) zudem auf den Einbau von Uracil und dessen nachfolgende Zerstörung gesetzt werden.

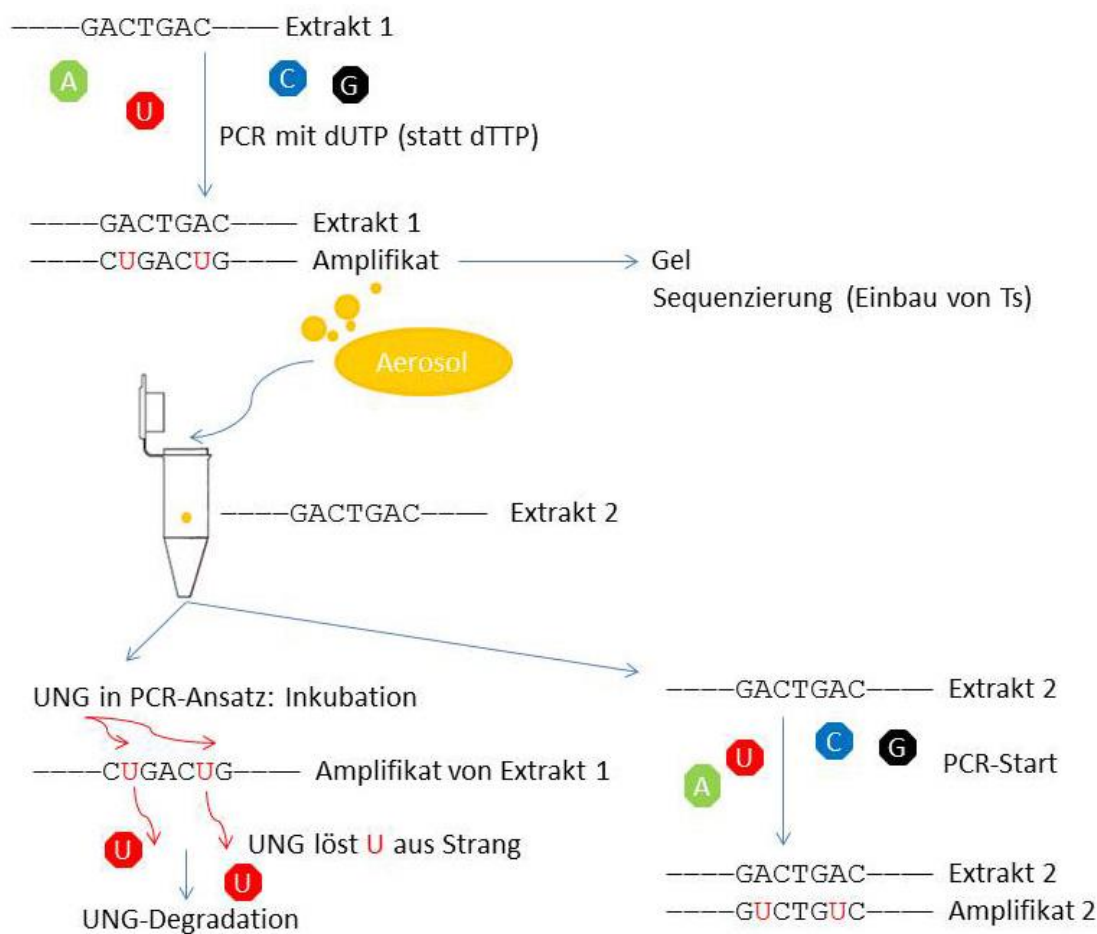


Abbildung 11: Wirkungsweise der Uracil-DNA-Glykosylase (UDG). Uracil (U) kann bei einer PCR anstelle von Thymin (T) in den DNA-Strang eingebaut werden oder durch die Deaminierung von Cytosin entstehen. Wird ein Amplifikat über Aerosole verschleppt, schneidet das Enzym das Uracil während einer Inkubationsphase heraus, wodurch der Uracil-haltige Strang zerstört wird und nicht mehr amplifizierbar ist. Nach der Degradation des UDG werden in den gewünschten, neu zu synthetisierenden Strang wieder Us statt Ts eingebaut. Diese werden bei einer Sequenzierung durch Ts ersetzt, wodurch eine gewohnte Auswertung der Sequenz möglich ist.

Auch für die Detektion des F1-Antigens von *Yersinia pestis*, die getrennt von allen molekulargenetischen Anwendungen im Labor der SAPM durchgeführt wurde, wurden kontaminationsvermeidende Maßnahmen ergriffen. Vor Beginn der Arbeiten mit einer NaOCl-haltigen Lösung wurde der Raum, der das erste Mal für derartige Versuche genutzt wurde, vollständig gereinigt. Bei der Bearbeitung des Skelettmaterials wurde durch Arbeiten unter dem

Abzug und Reinigen des Werkzeugs mit Ethanol sowie der Arbeitsfläche und der Geräte vor der Prozessierung jeder neuen Probe mit 0,4-prozentigem NaOCl auf die Vermeidung von Kontaminationen hingewirkt (siehe Fischersworrying 2012).

2 Molekulargenetische Applikationen

Verschiedene Genorte, die in Abschnitt 2.1 beschrieben werden, waren in dieser Arbeit das Ziel unterschiedlicher PCRs. Nach der Vorbereitung der Proben (siehe Abschnitt 2.2) für die nachfolgende Extraktion von alter DNA nach verschiedenen Methoden (siehe Abschnitt 2.3) wurden in dieser Arbeit verschiedene Varianten der 1983 von Kary B. Mullis erfundenen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) angewandt (Mullis *et al.* 1986; siehe Abschnitt 2.4).

2.1 Untersuchte Genloci

Die Analyse der DNA-Extrakte aus historischem Skelettmaterial folgte einem festgelegten Studienaufbau (siehe Abbildung 12). Die Extrakte wurden sowohl mittels konventioneller als auch quantitativer PCR zuerst auf das Vorhandensein der *pla*-Sequenz (siehe Abschnitt 2.1.1) hin untersucht. Konnte diese reproduzierbar in den meisten der insgesamt drei konventionellen und vier quantitativen PCRs nachgewiesen werden, so wurden nachfolgend PCRs zur Genotypisierung und zum Nachweis anderer Genloci durchgeführt (siehe Abbildung 12), die eine Eingrenzung des Erregers auf eine molekulare Gruppe oder einen Stamm erlauben. War die *pla*-Sequenz nicht vorhanden, so wurde die DNA in ein Assay zur Detektion des *HLA*-Lokus (siehe Abschnitt 2.1.2) eingesetzt. Wurde *HLA* detektiert, so wurde davon ausgegangen, dass zwar humane DNA nachweisbar ist, aber keine DNA des Pesteregers. Konnte die Sequenz des *HLA*-Genlokus hingegen nicht amplifiziert werden, so wurden in einer folgenden PCR zusätzlich zu dem Extrakt 100 Kopien des künstlichen *HLA*-Konstrukts eingesetzt. Man spricht von Spiken. Sind die Kopien dann bei etwa dem gleichen CT-Wert nachweisbar wie eine mitgeführte Kontrolle, die nur die *HLA*-Kopien enthält, so ist gezeigt, dass sich in dem DNA-Extrakt keine inhibierenden Substanzen befinden, aufgrund derer ein Nachweis von *pla* nicht möglich wäre.

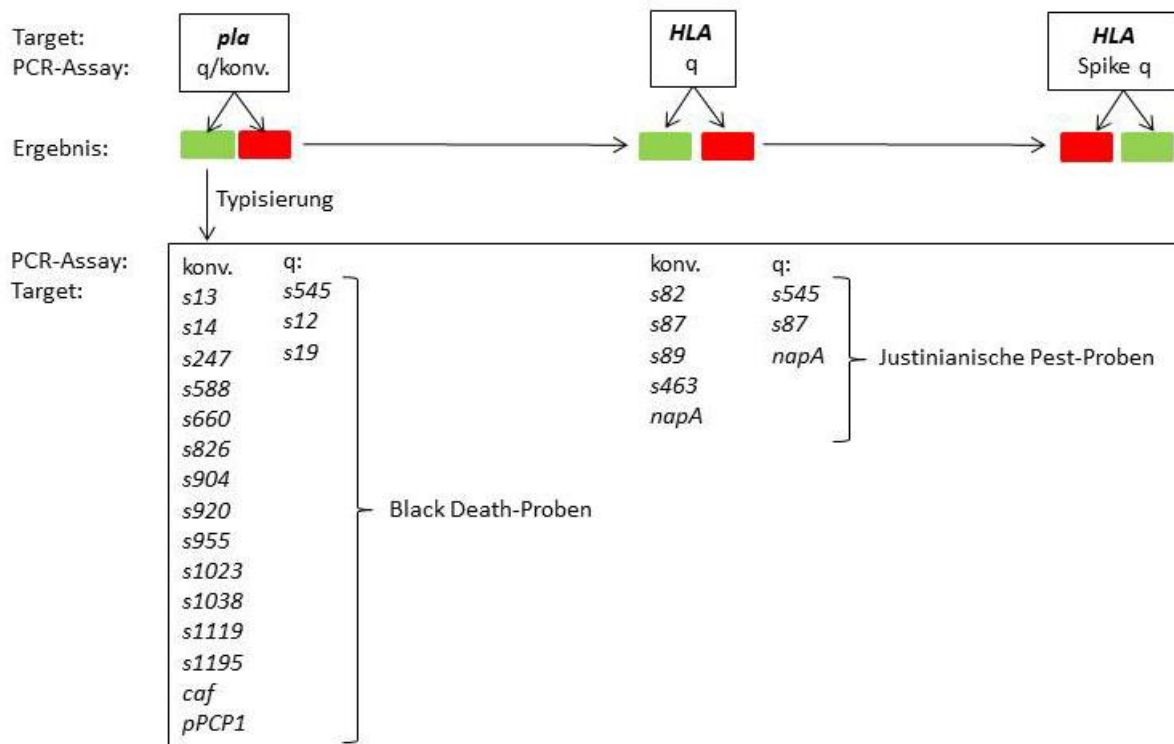


Abbildung 12: Studienaufbau zur Analyse von DNA-Extrakten aus historischem Skelettmaterial. Mittels verschiedener Varianten der Polymerase-Ketten-Reaktion, der konventionellen (konv.) und der Real Time-basierten Methode (q), wurden verschiedene yersiniale Loci sowie ein humaner Genort untersucht. Ein grünes Ergebnis-Kästchen steht für ein positives Ergebnis, ein rotes für ein negatives.

Nachfolgend werden in den einzelnen Abschnitten erst der *pla*- und *HLA*-Lokus (Abschnitt 2.1.1 und 2.1.2) näher beleuchtet, bevor auf die Loci zur genaueren Charakterisierung eingegangen wird (Abschnitte 2.1.3 bis 2.1.6).

2.1.1 *pla*

Auf dem Plasmid pPCP1 (siehe Kapitel, Einleitung 2) befindet sich neben zwei weiteren identifizierten Genen das *pla*-Gen (Sodeinde & Goguen 1988). Das Gen ist spezifisch für *Yersinia pestis*. Weder sein Vorfahr *Y. pseudotuberculosis* (Achtman *et al.* 1999) noch das andere Humanpathogen im Genus, *Y. enterocolitica* (Perry & Fetherston 1997), besitzen das pPCP1-Plasmid und damit das darauf befindliche Gen (Parkhill *et al.* 2001; Achtman *et al.* 1999).

Das Gen kodiert für die Pla-Protease der äußeren Membran (Sodeinde & Goguen 1988), die für zwei Virulenzeigenschaften von *Y. pestis* verantwortlich ist: die Aktivität eines Plasminogen-Aktivators, der zur Lyse von Fibrinklumpen führt, und eine schwache Koagulase-Aktivität, die zur Bildung einer dichten und schützenden Fibrinschicht um die Infektionsstelle führt (Sodeinde & Goguen 1988). Das Genprodukt von *pla* soll bei einer Beulenpest die Verteilung der Bakterien von der subkutanen Stelle des Flohbisses zum peripheren Blutstrom erleichtern (Sodeinde & Goguen 1988; Sodeinde *et al.* 1992) und bei einer Lungenpest die Teilung der Bakterien in der Lunge kontrollieren (Lathem *et al.* 2007).

Die *pla*-Sequenz ist bereits in vorangegangenen Studien zum Nachweis des Pesterregers in historischem Skelettmaterial verwendet worden (z. B. Drancourt *et al.* 1998; Raoult *et al.* 2000; Wiechmann & Grupe 2005; Hänsch *et al.* 2010; Wiechmann *et al.* 2010; Nguyen-Hieu *et al.* 2010; Tran *et al.* 2011c). Es eignet sich besonders gut zum Nachweis des Pesterregers, da das pPCP1-Plasmid, auf dem es sich befindet, in bis zu 186 Kopien pro Bakterienzelle vorkommt (Parkhill *et al.* 2001). *In vitro* kultivierte Zellen können das Plasmid zwar gelegentlich eliminieren (Sample *et al.* 1987), wodurch Stämme mit stark verminderter Virulenz entstehen (Brubaker *et al.* 1965). Die

natürliche Entstehung solcher Mutanten wird aber als unwahrscheinlich angenommen (Hinnebusch & Schwan 1993).

2.1.2 HLA

Als einziger humaner Genlocus wurde ein Abschnitt des Major Histocompatibility Complex, Class II, DQ Alpha 1-Gens untersucht, kurz *HLA-DQA1* (accession number NC_000006.11). Das *HLA-DQA1*-Gen gehört zu einer Gen-Familie, dem Humanen Leukozyten Antigen (*HLA*)-Komplex. Dieser stellt die menschliche Version des Major Histokompatibility Complex (MHC) dar, einer vielen Arten gemeinsamen Gen-Familie. Der Komplex hilft dem Immunsystem zwischen körpereigenen und fremden Proteinen wie denen von Viren und Bakterien zu unterscheiden (Genetics Home Reference 2011). Das Gen *HLA-DQA1* ist auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 6 lokalisiert (6p21.3; NCBI 2013).

2.1.3 pPCP1

Das 9,5 kb große *Y. pestis*-Plasmid war in dieser Arbeit von Interesse, um in den Extrakten aus historischem Zahnmaterial die An- bzw. Abwesenheit einer TT-Insertion zu erforschen. Im *Y. pestis*-Stamm CO92 (GenBank AL109969.1), der zum Orientalis-Biovar gerechnet wird, befinden sich an den Positionen 8528-8532 fünf Thymine (T; Parkhill *et al.* 2001). Wiechmann *et al.* hatten bei der Untersuchung von Individuen aus Manching-Pichl nur drei Ts gefunden (Wiechmann *et al.* 2010). Auch Schünemann *et al.* hatten weitere zwei Ts in Individuen vom Friedhof East Smithfield in London aus der Zeit von 1348 bis 1350 nicht nachweisen können (Schünemann *et al.* 2011). Diese pPCP1-Plasmid-Sequenz befindet sich in einer nicht-kodierenden Region des Plasmids und ist durch mehrere homopolymere Teile mit Poly-A und Poly-T charakterisiert (Tran *et al.* 2011b). Durch die Feststellung der Anzahl der Ts soll zwischen modernen und ursprünglicheren Stämmen unterschieden werden können.

2.1.4 *napA*

Das *napA*-Gen ist bei *Y. pestis* das strukturelle Gen für die periplasmatische Nitrat-Reduktase (NAP), die einzige Nitrat-Reduktase des Organismus. Die bei vielen Bakterien vorkommenden Nitrat-Reduktasen sind für die Stickstoff-Assimilation und -Dissimilation von Bedeutung. Relevant für evolutionäre Studien zu *Y. pestis* sind zwei Punkt-Mutationen in diesem Gen. Eine G→T-Mutation an Position 613 bzw. im 205. Codon führt zu einem Stop-Codon, die Nitrat-Reduktase wird nicht exprimiert. An Position 1021 oder im 341. Codon führt eine G→A-Mutation zum Ersetzen des hydrophoben Alanin durch das hydrophile Threonin. Es wird vermutet, dass dies zur Inaktivierung des NAP-Enzyms ausreicht. Beide Mutationen haben zur Folge, dass das Bakterium Nitrat nicht zu Nitrit reduzieren kann. Sie treten jedoch nicht gleichzeitig in den beiden nitratnegativen Biovaren *Medievalis* und *Microtus* auf, sondern führten zur parallelen Evolution dieses Phänotyps in den Biovaren. Die erstgenannte G→T-Mutation wurde für den zum *Medievalis*-Biovar gehörenden KIM-Stamm beschrieben, die G→A-Mutation für das *Microtus*-Biovar (Zhou *et al.* 2004).

In dieser Arbeit wurde lediglich die zweite Mutation molekulargenetisch untersucht, da hierdurch mehr biochemische Informationen zu dem Erreger in den Individuen aus Aschheim erhalten werden sollten. Diese Mutation ist in aDNA-Studien bisher nicht untersucht worden. Eine Aussage über die andere Mutation zu treffen, schien angesichts einer Veröffentlichung von Hänsch *et al.* unnötig, in der wie in der vorgestellten Arbeit Individuen aus der Zeit des Black Death oder einer nachfolgenden Welle untersucht wurden. Das für das *Medievalis*-Biovar charakteristische Stop-Codon in den *napA*-Amplifikaten war dort nicht nachweisbar (Hänsch *et al.* 2010).

2.1.5 *caf1*

Als weiterer Nachweis von *Yersinia pestis* sollte ein Teil des strukturellen Gens für das Fraktion 1-Kapselprotein (engl. capsular antigen fraction I), kurz *caf1*-Gen, amplifiziert werden. Das Gen befindet sich auf dem 100 kb großen Virulenz-Plasmid pFra, welches ebenfalls ausschließlich in *Y. pestis* vorkommt und nicht in den Enteropathogenen der Gattung, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* (Hinnebusch 1997; Parkhill *et al.* 2001). Anders als das Plasmid pPCP1 kommt das pFra-Plasmid mit einer Häufigkeit von 1,8 in wenigen Kopien in *Y. pestis* vor (Parkhill *et al.* 2001). Auf die Bedeutung des F1-Antigens wird in Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel eingegangen.

2.1.6 SNPs

Um den Erreger in *pla*-positiven DNA-Extrakten zu typisieren, wurden in weiteren PCRs Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) analysiert. Je nach Datierung der Individuen wurde auf unterschiedliche SNPs getestet. Die Individuen aus der Zeit der Justinianischen Pest wurden an fünf Genloci untersucht, die Skelette aus der Zeit des Black Death oder einer nachfolgenden Welle an 16 Loci. Die Analyse von SNPs kann zwei Ergebnisse liefern: ancestral oder derived. Letzteres bezeichnet wörtlich einen „abgeleiteten“ Status, den man sich als höhere Entwicklung vorstellen kann. „Ancestral“ hingegen verweist auf einen ursprünglicheren Typ.

Ausgehend von der Vermutung, dass der Erreger der Justinianischen Pest ursprünglicher sein wird als der der zweiten Pandemie wurde mit dem SNP s545 ein Locus im nächst-basaleren Bereich 3.ANTa und 0.ANT3a untersucht. Nach Vorliegen eines ancestralen Ergebnisses sollten SNPs auf den als nächstes folgenden Abschnitten in Richtung Ursprung untersucht werden. Dies waren die SNPs s87 und s89 auf dem Abschnitt VII und VI sowie die SNPs s82 und s463 im Bereich VI bis III (siehe Abbildung 13).

Die Auswahl der für die zweite Pandemie relevanten SNPs basierte auf der Annahme, dass der Erregerstamm in den in dieser Arbeit untersuchten Individuen aufgrund der ähnlichen Datierung dem in vorangegangenen Studien (Hänsch *et al.* 2010; Bos *et al.* 2011) untersuchten Stamm ähneln wird. Da zu Beginn dieser Arbeit der von Cui *et al.* 2013 publizierte aktuellste phylogenetische Stammbaum noch nicht publiziert war, wurde mit dem Vorgänger-Baum von Morelli *et al.* (2010) gearbeitet. Zwischen den Knoten XI und 3.ANTa wurden alle 13 SNPs untersucht, auf den angrenzenden Abschnitten 3.ANTa und VIII sowie 3.ANTa und 0.ANT3a jeweils einer (s19 bzw. s545, siehe Abbildung 13).

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die analysierten SNPs und Abbildung 13 veranschaulicht ihre Lokalisierung auf einem vereinfachten Stammbaum nach Morelli *et al.* (2010).

Tabelle 5: SNPs zur Typisierung *pla*-positiver Extrakte aus historischem Skelettmaterial. Individuen aus der Zeit der Justinianischen Pest wurden auf die blau hinterlegte SNPs getestet, Individuen aus der Zeit des Schwarzen Tods oder einer nachfolgenden Welle auf die grün hinterlegten und Individuen beider Pandemien auf den rot hinterlegten SNP. In der Tabelle angegeben sind SNP-Bezeichnung, Gen-Nummer im CO92-Genom, Orientierung (anti-clockwise = komplementäre Base auf dem Gegenstrang, keine Angabe = wie angegeben), Nukleotid-Position im CO92-Genom, Art der Mutation (syn = synonym, nsyn = nicht-synonym, intergenic = zwischen Genen gelegen, stop = Mutation führt zu Stop-Codon), Nukleotid (NT) im ancestralen (Anc) und mutierten bzw. derived (Der) Zustand sowie der Ast (Branch), auf dem sich ein SNP befindet. Tabelle modifiziert aus Morelli *et al.* (2010).

SNP	CO92-Gen-Nummer	Orientierung	CO92-Position	Mutation	Anc NT	Der NT	Branch
s12	YPO0643	anti-clockwise	699494	syn	C	T	XI-3.ANT.a
s13	YPO2180	anti-clockwise	2453454	syn	C	T	XI-3.ANT.a
s14	YPO2612	anti-clockwise	2934972	syn	C	G	XI-3.ANT.a
s19	YPO3841	anti-clockwise	4311918	syn	G	A	3.ANT.a-VIII
s82	YPO3268		3639873	syn	G	T	VI-III
s87	YPO2420	anti-clockwise	2721828	syn	T	G	VII-VI
s89	YPO2875	anti-clockwise	3210101	syn	C	T	VII-VI
s247	YPO0319	anti-clockwise	325836	syn	G	A	XI-3.ANT.a
s463	YPO0363	anti-clockwise	373649	nsyn	G	A	VI-III
s545	YPO0993		1102174	nsyn	G	A	3.ANT.a-0.ANT3.a
s588	YPO1348		1512930	nsyn	G	A	XI-3.ANT.a
s660	YPO1851	anti-clockwise	2098628	nsyn	G	A	XI-3.ANT.a
s826	YPO2921	anti-clockwise	3267118	nsyn	C	T	XI-3.ANT.a
s904	YPO3408	anti-clockwise	3806677	nsyn	A	G	XI-3.ANT.a
s920	YPO3559		3973746	nsyn	T	C	XI-3.ANT.a
s955	YPO3781	anti-clockwise	4243823	nsyn	A	T	XI-3.ANT.a
s1023	IG-YPO0421- YPO0422		442439	intergenic	C	T	XI-3.ANT.a
s1038	YPO0508		545488	stop	C	T	XI-3.ANT.a
s1119	IG-YPO1644- YPO1645		1871476	intergenic	A	G	XI-3.ANT.a
s1195	IG-YPO2576- YPO2577		2896636	intergenic	G	A	XI-3.ANT.a

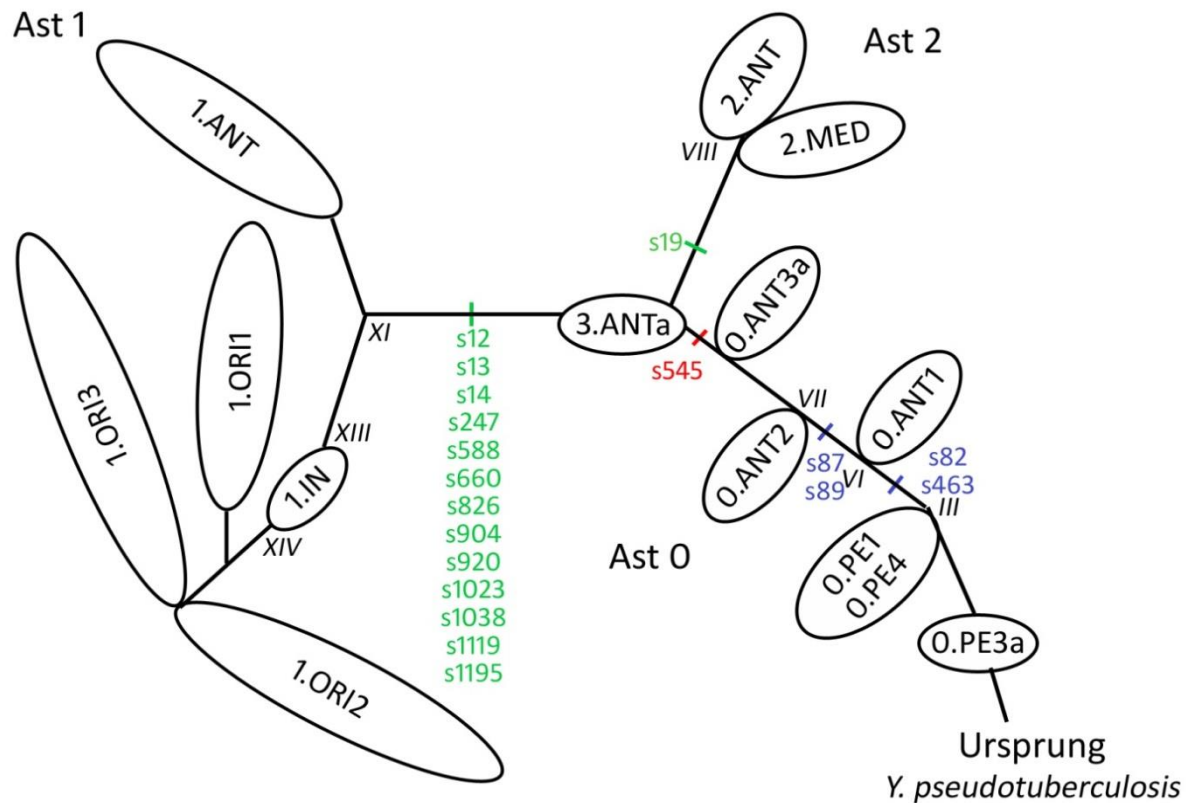


Abbildung 13: Lokalisation der in dieser Arbeit untersuchten SNPs auf einem vereinfachten phylogenetischen Stammbaum nach Morelli *et al.* (2010). Grün markierte SNPs dienen der Typisierung des Erregers, der mit der Zeit des Schwarzen Todes assoziiert ist, blaue zur Typisierung von Extrakten aus Individuen aus der Zeit der Justinianischen Pest und der rote SNP wurde in Extrakten beider Zeitstellungen untersucht. Die Lokalisation der SNPs in einzelnen Abschnitten dient der Veranschaulichung. Eine genaue Lokalisation oder Abfolge ist nicht bestimmbar. Abbildung modifiziert nach Morelli *et al.* (2010).

2.2 Probenvorbereitung

Für die molekulargenetische Untersuchung wurde von jedem Individuum ein Zahn genommen – mit Ausnahme der als „MP34-I“ bezeichneten skelettalen Überreste aus Manching-Pichl, von denen kein Zahnmaterial zur Verfügung stand. Stattdessen wurde aus dem linken Humerus des Individuums mit einer Säge (Proxxon FBS 240/E) ein Knochenstück entnommen. Gearbeitet wurde dabei unter dem Abzug. Zur Kontaminationsvermeidung wurden Arbeitsplatz und benötigtes Werkzeug mit NaOCl (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gereinigt und ein neues Sägeblatt (Proxxon Micromot System Trennscheiben Ø 22 x 0,7 mm) in die Säge eingesetzt. Das Knochenstück wurde in einen sterilen Falcon überführt und bis zur Weiterverarbeitung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Der Empfehlung von Kemp & Smith (2005) entsprechend, wurden die Oberflächen von Knochen und Zähnen sorgfältig mit Bleiche dekontaminiert, aber nicht abgeschliffen. Letzteres soll keine effektive Dekontaminationsmaßnahme darstellen (Gilbert *et al.* 2006b). Jeder Zahn und die eine Knochenprobe wurde mit einem in ein-prozentiges NaOCl getränktem Zellulosepapier allseitig abgetupft und anschließend zweifach in sterilem Wasser (Ampuwa®, Fresenius Medical Care, Deutschland) geschwenkt. Nach Abgießen des Wassers wurden die Proben in den Falcons bei geöffnetem Verschluss mehrere Tage in einer DNA-Workstation (Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland) getrocknet. Nach einer je Seite 15-minütigen UV-Bestrahlung (Peqlab, Erlangen, Deutschland) der Proben mit einer Wellenlänge von 312 nm und 254 nm aus einer Entfernung von etwa zehn Zentimetern zur Probe wurden die Proben in Alufolie gewickelt und mittels Mörser und Pistill aus Eisen bzw. Porzellan zunächst grob zerkleinert und anschließend in einer Kugelschwingmühle Typ MM 2 (Retsch, Haan, Deutschland) pulverisiert. Das erhaltene Mehl wurde in sterile Falcon-Tubes

(Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3 DNA-Extraktion

Anhand von fünf Proben zweier Fundorte wurde exemplarisch die für das verwendete Material geeignetste Extraktionsmethode ermittelt. Dazu wurden drei Protokolle sowie ein Kit getestet: eine modifizierte Methode nach Yang *et al.* (1998) wie bei Wiechmann & Grupe (2005) beschrieben (Abschnitt 2.3.1), ein Verfahren von Rohland & Hofreiter (2007a, b; Abschnitt 2.3.2) sowie eine Methode, die Dr. Ingrid Wiechmann aus zwei publizierten Protokollen (Rohland *et al.* 2010; Rohland & Hofreiter 2007a) zusammengesetzt und in vorangegangenen Extraktionen getestet hatte (Abschnitt 2.3.3). Zudem wurde die Eignung des Investigator-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) für die Extraktion von DNA aus Skelettmaterial getestet (Abschnitt 2.3.4). Alle Verfahren basieren auf der Bindung von DNA an eine Silika-Matrix. Bei allen Extraktionsansätzen wurde zudem das Mehl jeweils desselben Zahns verwendet, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Eingesetzt wurden Zähne der Individuen MP17-I, MP26-I, MP59-I und MPS1-I vom Fundort Manching-Pichl sowie von B2 aus Brandenburg. Bei allen Extraktionen wurden stets safe-lock-Tubes (Biopur Quality, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet, die zertifiziert DNA-frei sind. Nach Ende einer jeden Extraktion wurde der Elutionsschritt – wie von Rohland & Hofreiter (2007a) optional geraten – wiederholt, um an der Silika noch gebundene DNA zu eluieren. Dabei wurden die Säulen zehn Minuten bei 37 °C auf einem TB1-Thermoblock (Biometra, Goettingen, Deutschland) inkubiert, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Jedes erhaltene Eluat wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.3.1 Protokoll 1 nach Yang *et al.* (1998)

Die Extraktion der DNA aus den homogenisierten Proben beruhte auf dem Silika-basierten Extraktionsprotokoll C von Yang *et al.* (1998) und wurde wie bei Wiechmann & Grupe (2005) beschrieben durchgeführt. Ausgegangen wurde von 400 bis maximal 500 mg Probenmehl und einer Extraktionslösung aus 0,5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (kurz EDTA, Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,5 Prozent SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 100 µg/ml Proteinase K (PeqLab, Erlangen, Deutschland).

Um DNA aus Knochen oder Zähnen zu isolieren, muss zuerst die mineralische Komponente durch eine chemische Dekalzifizierung des Knochenpulvers mit EDTA aufgelöst werden (Burger 2007), welches mit den Ca²⁺-Ionen einen Komplex bildet (Schwarz *et al.* 2009). Die Zugabe von Proteinase K zur Extraktionslösung bedingt die enzymatische Auflösung der verbliebenen organischen Matrix, wodurch die DNA frei werden soll (Schwarz *et al.* 2009). Durch SDS erreicht das Enzym seine optimale Aktivität (Lottspeich & Engels 2012).

Nach einer ersten Inkubation der Proben für 15 Stunden bei 55 °C auf einem TB1-Thermoblock (Biometra, Goettingen, Deutschland), folgte eine weitere für 24 Stunden bei 37 °C. Am dritten Tag der Extraktion wurden die Proben zunächst fünf Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert und anschließend fünf Minuten bei 12.000 rpm, um Zelltrümmer abzusedimentieren. Der Überstand wurde in 30 K Zentrifugenkonzentratoren (Merck Millipore, Billerica, USA) überführt und in einer Zentrifuge des Typs Universal 320 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) auf 100 µl Retentat reduziert.

Die Konzentratoren halten Makrosolute (inklusive DNA) zurück, während sie niedermolekulare Substanzen passieren lassen. Durch die Reduktion des Volumens der Lösung steigt die Konzentration der retinierten DNA in der Lösung. Der aufkonzentrierte Überstand mit der enthaltenen DNA wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und im Folgenden mit den Bestandteilen und nach dem Protokoll „QIAquick PCR Purification Kits using a Microcentrifuge“ laut Herstellerangaben prozessiert (Qiagen 2012).

QIAquick™-Säulen wurden konzipiert, um einzel- oder doppelsträngige PCR-Produkte mit einer Größe von 100 bp bis zehn kb von den Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen der Amplifikationsreaktion oder aus anderen enzymatischen Reaktionen aufzureinigen (Qiagen 2012). Im

Folgenden wurden sie aber für die Extraktion verwendet. Da aDNA degradationsbedingt nur wenige 100 bp groß ist (z. B. Pääbo *et al.* 1989; Pääbo 1986), liegt sie innerhalb der gesetzten Anwendungsmöglichkeit der Säulen.

Das Prinzip des Kits ist Folgendes: Bei einer hohen Salzkonzentrationen und sauren Bedingungen, die durch Zugabe des Bindungspuffer PB erreicht werden, binden im Gegensatz zu Kontaminatoren bis zu 10 µg DNA an die Silika-Membran. Durch Zugabe eines ethanolhaltigen Waschpuffers werden Salze quantitativ entfernt. Anders als bei der Adsorption von DNA werden zur Elution der an die Silika-Membran gebundenen Nukleinsäuren basische Bedingungen und geringe Salz-Konzentrationen benötigt (Qiagen 2012). Alle Zentrifugationsschritte wurden für eine Minute und damit an der Obergrenze der im Protokoll angegebenen Zeit durchgeführt.

2.3.2 Protokoll 2 nach Rohland & Hofreiter (2007a, b)

Für die Extraktion nach dem zweiten Protokoll wurde genau der Beschreibung bei Rohland & Hofreiter (2007a, 2007b) gefolgt. Ausgegangen wurde auch hier von etwa jeweils 400 mg Zahnmehl. Zu diesem wurden in einem 10 ml-Falcon acht ml Extraktionspuffer bestehend aus 0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 400 µl Proteinase K (PeqLab, Erlangen, Deutschland) und HPLC-Wasser (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 32 ml gegeben, gut vermischt und über Nacht im Dunkeln auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 5.000 g wurde der Überstand zu 32 ml Bindelösung gegeben. Diese bestand aus 5 M GuSCN, 25 mM NaCl und 50 mM Tris, pH 8.

Im nächsten Schritt wurde eine Silika-Suspension benötigt. Dafür wurden 4,8 g Siliciumdioxid (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in HPLC-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 40 ml suspendiert. Nachdem sich diese eine Stunde gesetzt hatte, wurden 39 ml des Überstands in ein neues Tube überführt. Nach weiteren vier Stunden, in denen sich die Suspension setzen konnte, wurden 35 ml des Überstands abgenommen und verworfen. Zuletzt wurden 48 µl 30-prozentiger HCl (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zum Pellet zugegeben, um die fertige Silika-Suspension zu erhalten.

Nach Zugabe von je 100 µl Silika-Suspension wurde der pH durch Zugabe von 30 Prozent HCl auf ≥ 4 eingestellt. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden je ein paar Tropfen der Zahnmehl-Extraktionslösung auf Parafilm® M (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA) gegeben und der pH-Wert mit Indikatorpapier ermittelt. Nach einer dreistündigen Inkubation im Dunkeln unter Rotation wurden die Proben zwei Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Silika-Pellet in einem Waschschrift in 1 ml Bindelösung resuspendiert und in ein 2 ml-Tube überführt. Nach einer kurzen Zentrifugation für 15 Sekunden bei 16.000 g wurde die Bindelösung mit einer Pipette vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml Wasch-Lösung, bestehend aus 51,3 Prozent EtOH, 125 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8) und 10 mM Tris (pH 8), resuspendiert und erneut 15 Sekunden bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Nach Wiederholen des Waschschrifts wurde das Silika-Pellet bei geöffnetem Deckel 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer resuspendiert, acht Minuten bei geschlossenem Tube bei Raumtemperatur inkubiert, dabei gelegentlich leicht geschüttelt, und zwei Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt.

2.3.3 Protokoll 3 nach Rohland *et al.* (2010) und Rohland & Hofreiter (2007a)

Die dritte Extraktionsmethode ähnelt der gerade beschriebenen und bestand aus einer Kombination zweier Protokolle von Rohland *et al.* (2010) und Rohland & Hofreiter (2007a), wobei lediglich 250 mg Zahnmehl eingesetzt werden. Die Extraktionslösungen wurden wie bei Rohland *et al.* (2010) beschrieben angesetzt. Zu 250 mg Zahnmehl wurden 5 ml Extraktionslösung gegeben und über Nacht auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 5.000 g wurde der Überstand in 2,5 ml Bindepuffer transferiert. Nach Zugabe von 100 µl Silika-Suspension

wurde der pH durch Zugabe von 30-prozentiger HCl auf 4,0 eingestellt. Die Proben wurden für drei Stunden im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert, woraufhin ein zweiminütiger Zentrifugationsschritt bei 5.000 g folgte. Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde das Silika-Pellet in 1 ml Binde-Puffer resuspendiert. Die Puffer-Silika-Suspension wurde in ein neues Tube transferiert und eine Minute bei 16.000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des kompletten Überstands mit einer Pipette wurde das Silika-Pellet in 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 16.000 g, nach dem der Überstand entfernt wurde. Der Waschschrift wurde ein Mal wiederholt. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 16.000 g, nach dem die verbliebene Flüssigkeit wieder entfernt wurde. Die Silika wurde 15 Minuten mit offenen Deckeln bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation des geschlossenen Tubes mit gelegentlichem Schütteln wurden die Proben zwei Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt.

2.3.4 Protokoll 4 mit Verwendung des QIAamp[®] DNA Investigator-Kits

Das QIAamp[®] DNA Investigator-Kit der Firma Qiagen wurde laut Herstellerangaben konzipiert für die Aufreinigung kleiner DNA-Probenvolumen oder -größen. Das Kit soll sich für die Isolierung genomischer wie mitochondrialer Gesamt-DNA aus verschiedenen Ausgangsmaterialien aus dem Bereich der Forensik und zur Klärung der Identität von Menschen eignen. Als Probenmaterial angeführt werden beispielsweise Schleimhautabstriche, Kaugummis, Zigarettenstummel, Nagelabschnitte sowie Knochen und Zähne (Qiagen 2010b).

Für Versuche mit dem Kit stand nicht mehr genug Mehl von allen vorher getesteten Zähnen zur Verfügung. Es konnte lediglich auf Reste der Proben MP17-I und MP59-I vom Fundort Manching-Pichl zurückgegriffen werden.

Bei der Verwendung des Kits wurde vorgegangen wie im Handbuch beschrieben: Nach Zugabe von 360 µl Puffer ATL und 20 µl Proteinase K zu 100 mg Zahnmehl wurden die Proben über Nacht bei 56 °C inkubiert. Zum Entfernen von Tröpfchen am Inneren des Deckels wurden die Proben kurz zentrifugiert und anschließend mit 300 µl Buffer AL versetzt sowie zehn Sekunden gevortext. Bei 900 rpm schüttelnd wurden die Proben für zehn Minuten inkubiert, wobei sie zwischenzeitlich alle drei Minuten gevortext wurden, um die Lyse zu steigern. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm für eine Minute wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 150 µl 96-prozentigem Ethanol durch 15-sekündiges Puls-Vortexen vermenget. Auf eine kurze Zentrifugation hin, um wieder Tropfen aus dem Deckel zu entfernen, wurde das gesamte Lysat auf die QIAamp[®] MinElute-Säulen geladen. Diese wurden eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert, in ein neues 2 ml-Sammel-Tube eingesetzt und mit 600 µl Puffer AW1 beladen. Dieser Schritt wurde jeweils komplett nach der Zugabe von 700 µl Puffer AW2 bzw. 700 µl 96-prozentigem Ethanol wiederholt. Abschließend wurden die Proben zwei Mal zentrifugiert, zunächst bei 8.000 rpm für eine Minute, dann nach Einsetzen der Säule in ein neues Sammel-Tube bei 14.000 rpm für drei Minuten, um die Membran zu trocknen. Bei 56 °C wurden die in ein neues 1,5 ml-Tube eingesetzten Säulen mit offenen Deckeln drei Minuten inkubiert. 50 µl raumwarmen Puffers ATE wurden ins Zentrum der Membran pipettiert, die Säulen bei geschlossenem Deckel bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert und bei 14.000 rpm eine Minute lang abzentrifugiert (Qiagen 2010b).

2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

In den nächsten Abschnitten wird zunächst das Prinzip der konventionellen PCR beschrieben (Abschnitt 2.4.1), auf der die anderen Varianten beruhen: die Sanger-Sequenzierung (Abschnitt 2.4.2) und die Real Time-PCR (Abschnitt 2.4.3). Um das optimale Assay zu erhalten, wurden die genannten Methoden auf verschiedene Weisen validiert. Wie genau – damit befasst sich Abschnitt 2.4.4.

Für jedes Assay wurde von Dr. Julia Riehm mit der Freeware-Software Gene Runner Version 3.05 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Gene-Runner.shtml>) mindestens ein Forward-(vorwärts) und ein Reverse-(rückwärts) Primer konzipiert. Beim Primer-Design wurden die von Butler

festgehaltenen generellen Richtlinien berücksichtigt (Butler 2005). Die Primer sollten eine Länge von 18 bis 30 nt haben, keine Haarnadel-Strukturen oder Dimere mit dem Partner-Primer ausbilden, eine einzigartige, über eine BLAST-Suche zu überprüfende Sequenz sowie einen GC-Gehalt von 40 bis 60 Prozent besitzen und einen Unterschied in der Annealing-Temperatur (AT) zum Partner-Primer von ≤ 5 °C aufweisen. Die AT sollte bei 55 bis 72 °C liegen (Butler 2005). Die Länge eines Amplicons wurde im Bereich der erwarteten kurzen aDNA-Fragmente gewählt. Entsprechend erschien eine Länge von < 200 bp ideal. Jedoch durfte im Falle einer konventionellen PCR die Größe des Amplifikationsprodukts von 100 bp nicht unterschritten werden, um noch eine Sequenzierung der Amplicons zu ermöglichen.

Sonden für die Detektion von *pla* und *HLA* wurden ebenfalls von Dr. Julia Riehm exakt komplementär zur Target-Sequenz konzipiert. Da sich naturgemäß Sonden zur Typisierung von SNPs in einer Base unterscheiden, wurden zwei Sonden designt, die ebenfalls jeweils exakt komplementär waren – entweder zum Wildtyp oder zur Mutante.

Alle Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind in Anhang 4 aufgelistet.

2.4.1 Konventionelle PCR und Detektion des Amplifikationserfolgs auf einem Agarosegel

Eine PCR beruht auf mehrmaligem zyklischen Erhitzen und Abkühlen der Reaktionskomponenten in einem Thermocycler genannten Gerät, wodurch ein mittels Primern definierter Abschnitt der DNA vervielfältigt (amplifiziert) wird. Die Reaktion läuft in einem gepufferten System ab und setzt sich aus mehreren Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von Primern (Annealing) und Extension zusammen. Bei hohen Temperaturen von 94-95 °C denaturiert die DNA-Doppelhelix, was bedeutet, dass sich die DNA durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen-Paaren in ihre beiden Einzelstränge auftrennt. Durch Absenken der Temperatur können Primer genannte Oligonukleotide durch Basen-Paarung mit ihrer komplementären Sequenz des DNA-Einzelstrangs hybridisieren, der als Vorlage (Template oder Matrize) dient. Die hierfür zu wählende Annealing-Temperatur (AT) hängt von den Primern ab und ist wichtig für eine hohe Spezifität der Reaktion. In diesem Schritt beginnt die thermostabile Taq-Polymerase die Primer durch Inkorporation der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP) zu verlängern (elongieren). Im dritten Schritt eines Zyklus wird die Temperatur so angepasst, dass sie für die Aktivität der Taq-Polymerase optimal ist, was gewöhnlich bei 72 °C erreicht wird. Normalerweise wird nach Beendigung aller Zyklen ein weiterer 72 °C-Elongations-Schritt angefügt, um zu gewährleisten, dass alle neu synthetisierten Stränge ihre volle Länge erreichen. Üblicherweise wird die Reaktion zuletzt gekühlt (z. B. McPherson & Møller 2006).

Im ersten Zyklus der PCR entsteht aus jedem Template-Strang eine neue DNA-Doppelhelix, wodurch die Anzahl der Kopien der Ziel-Region verdoppelt wird. Theoretisch verdoppelt sich mit jedem weiteren Zyklus die Anzahl der Kopien der Ziel-DNA, was einer Effizienz von 100 Prozent entsprechen würde. Tatsächlich entspricht die Effizienz aus einer Vielzahl von Gründen nicht diesem Wert (z. B. McPherson & Møller 2006).

In dieser Arbeit wurden an konventionellen PCR-Assays eines zur Detektion eines Fragments des *Yersinia pestis* spezifischen *pla*-Gens, vier zur Amplifikation *Y. pestis* spezifischer Loci und 17 zur Vervielfältigung von Fragmenten etabliert, die Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) überspannen. Die Reaktionen wurden auf einem Eppendorf Mastercycler Pro-Gerät (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) gecycelt.

Zur Visualisierung des Amplifikationserfolgs müssen die Produkte einer solchen PCR anschließend auf einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden 5 μ l des PCR-Produkts zusammen mit 1,5 μ l Lade-Dye (Invitrogen) auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen. Das Gel bestand aus LE Agarose (Biozym) und 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Merck, pH 8,3). Zum Abschätzen der Größe der erhaltenen Banden wurde eine 100 bp-Leiter (Fermentas) mitgeführt. Nach einer 30- bis 35-minütigen Auftrennung der Proben bei 100 V wurde das Gel in einer GelRed-Lösung (Biotium) für zehn Minuten unter leichten Schüttelbewegungen auf einem Celloshaker (Renner GmbH, Deutschland) durch Inkubation gefärbt.

GelRed ist ein fluoreszierender Farbstoff, der Nukleinsäuren anfärben kann. Er soll nicht-mutagen und nicht-zytotoxisch sein und wurde entwickelt, um das laut Biotium hochmutagene Ethidiumbromid (EtBr) zu ersetzen. GelRed soll sogar sensitiver sein als EtBr (Biotium 2012). Zum Sichtbar-Machen von Banden wurde das gefärbte Gel in der Universal Hood II des Gel-Detektions-Systems ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) mit UV-Licht bestrahlt, dadurch der Komplex DNA-Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt und sichtbar gemacht. Das sich ergebende Bild wurde durch einen Bandfilter hindurch von einer Kamera aufgenommen und konnte mit der Software Quantity One 4.6.5 bearbeitet werden. Die Bearbeitung sah eine schwarz-zu-weiß-Konversion des Fotos und die Beschriftung der einzelnen Proben vor.

Proben, die Banden der richtigen Größe gezeigt hatten, wurden mittels des QIAquick® bzw. MinElute® PCR Purification Kits (beides Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Entscheidung für die Verwendung des einen oder anderen Kits wurde abhängig von der Intensität der Bande auf dem Gel getroffen. Für schwache Banden wurde das MinElute Kit verwendet, für starke das QIAquick® Kit (siehe Abbildung 14).

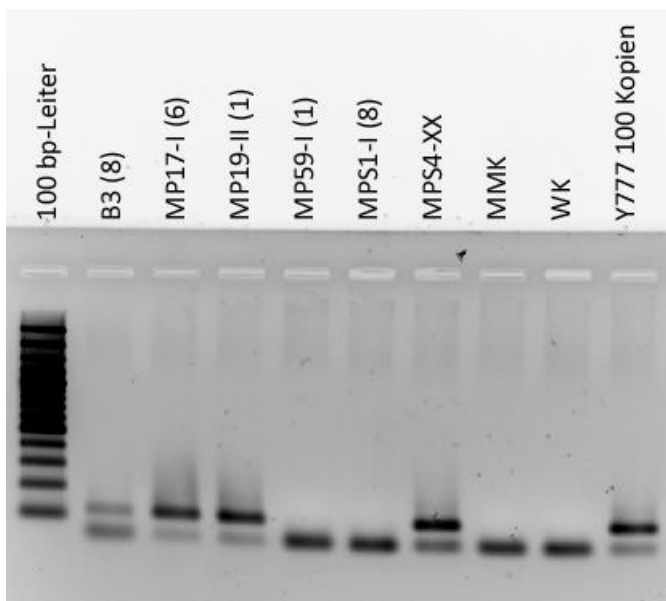


Abbildung 14: Die Intensität einer Bande auf einem Agarosegel entschied über die Verwendung des QIAquick® bzw. MinElute® PCR Purification Kits (beides Qiagen). Die stark ausgeprägten, dicken Banden der Proben MP17-I (6), MP19-II (1) und MPS4-XX wurden mittels QIAquick® aufgereinigt, die feine Bande der Probe B3 (8) mittels MinElute®. Gezeigt ist eine PCR zur Amplifikation des SNP s660 überspannenden Fragments. Links als Größen-Standard aufgetragen ist eine 100 bp-Leiter (Fermentas).

Unabhängig vom Kit wurden alle nachfolgend beschriebenen Zentrifugationsschritte in einer Eppendorf-Zentrifuge 5424 bei 13.000 rpm für eine Minute durchgeführt. Jeweils 25 µl des PCR-Produkts wurden mit 125 µl des Bindepuffers PB vermischt und auf eine QIAquick®- bzw. MinElute®-Säule geladen. Durch einen Zentrifugationsschritt wurde die DNA an die Säule gebunden. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurden 750 µl des Waschpuffers PE auf die Säule geladen und zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt diente dem Entfernen des restlichen im Waschpuffer enthaltenen Ethanols, das die nachfolgende Reaktion hemmen kann (z. B. Huggett *et al.* 2008). Nach Einsetzen der Säule in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die DNA durch Auftragen von 40 µl (QIAquick®) bzw. 25 µl (MinElute®) Elutionspuffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ins Zentrum der QIAquick®-Membran, einer einminütigen Inkubation zur Erhöhung der DNA-Konzentration und eines Zentrifugationsschritts eluiert.

2.4.2 Sanger-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese

Eine Variante der PCR ist die Sequenzierung nach Sanger *et al.*, die auch Kettenabbruch-Methode oder Dideoxy-Sequenzierung genannt wird und dem Feststellen der Basenabfolge der DNA dient (Sanger *et al.* 1977). Dazu müssen die in einer konventionellen PCR erhaltenen, aufgereinigten Amplifikationsprodukte in eine weitere Reaktion eingesetzt werden, in der nur entweder der Forward- oder der Reverse-Primer und zusätzlich zu den dNTPs verschieden fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) verwendet werden. Ein ddNTP unterscheidet sich von einem dNTP dadurch, dass es neben dem reduzierten 2'-Kohlenstoffatom des Desoxyribose-Restes auch an dessen 3'-Kohlenstoffatom reduziert ist ($-OH$ zu $-H$), also keine 3'-Hydroxylgruppe besitzt. Der Einbau eines solchen Moleküls in den DNA-Strang führt dazu, dass die weitere Synthese der DNA durch die DNA-Polymerase gestoppt wird, weil am 3'-C-Atom des Zuckerrests die notwendige OH-Gruppe für die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nucleosidtriphosphats (NTP) fehlt. Bei der Synthese des neuen Strangs baut die DNA-Polymerase stochastisch ddNTPs statt dNTPs in ein Molekül ein und beendet damit dessen weitere Elongation. Auf diese Weise entstehen mit der Zeit Moleküle, die sich in ihrer Länge sukzessive um ein Nucleotid unterscheiden und mit einem der vier ddNTPs enden. Nach der Aufreinigung dieser Produkte findet die Sequenzierung selbst durch Auftrennung mittels Elektrophorese in einer Kapillare statt, die von einem Laser abgetastet wird. Dieser regt das an das ddNTP gekoppelte Fluoreszenzmolekül an, das abgestrahlte Fluoreszenzsignal wird detektiert und von einem Computer der Wellenlänge bzw. Farbe nach den Basen zugeordnet (Thieman *et al.* 2007). Die Sequenz wird als Chromatogramm ausgegeben.

In die in dieser Arbeit verwendete Farbmarkierungs-PCR wurden die in Tabelle 6 angegebenen Substanzen eingesetzt und auf einem GeneAmp 9700-Gerät (Applied Biosystems) prozessiert. Dies und die nachfolgenden Schritte bis zur Datenanalyse wurden teilweise von der technischen Assistentin Astrid Thomas übernommen.

Tabelle 6: Protokoll der Farbmarkierungs-PCR in einem Gesamtvolumen von 10 μ l. Die Tabelle zeigt PCR-Ansatz und Cycle-Bedingungen.

PCR-Ansatz			
Substanz	Hersteller	Konzentration	
BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix	Applied Biosystems, Life technologies, Darmstadt	1 x	
F- oder R-Primer	TibMolbiol, Berlin bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg	1 pmol/ μ l	
aufgereinigtes DNA-Template		3-5 μ l	
Thermoprofil			
Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
Anfangs-Denaturierung	1 x	96	1 Min
Amplifikation	25 x	96	10 Sek
		50	5 Sek
		60	2 Min
Kühlen		4	bis Analyse

Zur Entfernung des Dye-Terminators wurde das Dye Ex™ 2.0 Spin Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurden alle Zentrifugationsschritte bei 750 rpm durchgeführt. Nach Resuspendieren des Gels in den Spin-Säulen und Lockern des Deckels zum Vermeiden eines Vakuums in der Säule wurde der Verschluss am Boden der Säule entfernt, die Säule in ein 2 ml-Sammel-Gefäß eingesetzt und drei Minuten zentrifugiert, wodurch sich das Gel abschrägte. Die Säule wurde in ein sauberes Gefäß eingesetzt. 10 μ l des Produkts aus der Sequenzier-Reaktion wurden auf das abgeschrägte Gelbett geladen und für drei Minuten zentrifugiert. Von dem erhaltenen, aufgereinigten Produkt wurden 3 μ l zusammen mit 12 μ l Hi-Di™-Formamid (Applied Biosystems) in die Sequenzierung eingesetzt. Formamid ist eine farblose bis gelbliche Flüssigkeit. Bezüglich der individuellen Gefährdung bei der Arbeit mit diesem Stoff muss beachtet werden, dass der Stoff das Kind im Mutterleib schädigen kann (Roth 2013).

Die Sequenzen wurden auf einem Genetic Analyzer 3130-Gerät (Applied Biosystems) unter Verwendung des POPTM Polymers (Applied Biosystems) zum Auftrennen der DNA-Fragmente generiert, mittels des Programms Sequencing Analysis 5.2 in auswertbare Daten konvertiert und mit der Software Codon Code Aligner (Version 4.0.4) analysiert. Alternativ wurden einige PCR-Produkte vom Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) sequenziert.

Die Analyse mittels Codon Code Aligner umfasste das Kontrollieren der Zuordnung der für die vier Basen stehenden Buchstaben zu den jeweiligen verschiedenfarbigen Peaks, das Alignen der erhaltenen Sequenz an Referenzsequenzen, das Feststellen von Abweichungen zu diesen und im Falle von Typisierungen die Ermittlung von SNPs (siehe dazu weiter unten).

2.4.3 Real Time-PCR

Bei der Real Time-PCR geschieht der Nachweis der Amplifikation in Echtzeit (Real Time; z. B. Winn *et al.* 2006). In einem Schritt kombiniert die quantitative Real Time-PCR, abgekürzt qPCR, Amplifikation, Analyse und Quantifikation. Die nach einer konventionellen PCR notwendigen Schritte der Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel mit nachfolgender Aufreinigung und Sequenzierung entfallen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Experimente wurden auf einem LightCycler (LC) 480-Instrument (Roche) prozessiert. Dieses verfügt über eine Xenon-Lampe, die Licht über einen Wellenlängenbereich von 430 bis 630 nm emittiert, was die Verwendung verschiedener Fluorophore erlaubt. Nach dem Passieren eines Anregungsfilters wird das Licht auf die Multiwell-Platte projiziert. Das aus dieser von den angeregten Fluorophoren in der Amplifikations-Reaktion emittierte Licht wird durch einen Emissionsfilter geleitet und das Fluoreszenz-Signal vom Chip einer CCD-Kamera detektiert (Roche Diagnostics 2008). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der LightCycler 480 II Software-Version 1.5 (Roche, Mannheim, Deutschland).

In dieser Arbeit wurden 5'-Nuklease-Assays mit Hydrolyse-Sonden durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine spezifische Detektions-Methode im Gegensatz zur unspezifischen Detektions-Methode, die den Farbstoff SYBR[®] Green nutzt. Dieser lagert sich während der PCR in die sich mit jedem Zyklus vermehrende doppelsträngige DNA (dsDNA) ein. Der Anstieg der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Menge der generierten dsDNA. Allerdings bindet SYBR[®] Green an jegliche Art von dsDNA, wodurch nicht zwischen spezifischem und nicht-spezifischem Produkt sowie Primer-Dimeren diskriminiert wird und jedes doppelsträngige PCR-Produkt zur Erhöhung der Signalstärke beiträgt. Um zu bestimmen, ob das gewünschte Produkt amplifiziert wurde, muss daher der PCR eine Schmelzkurven-Analyse angeschlossen werden. Diese basiert darauf, dass jedes dsDNA-Molekül seine charakteristische Schmelztemperatur T_M hat, bei der 50 Prozent der DNA doppelsträngig und 50 Prozent einzelsträngig vorliegen, die DNA also geschmolzen ist. Bei der Analyse wird durch langsames Erhitzen der Reaktion auf 95 °C dsDNA eingeschmolzen, was zu einem scharfen Anstieg der SYBR[®] Green-Fluoreszenz führt, wenn die T_M eines bestimmten Produkts erreicht wird (Roche Diagnostics 2008).

Bei 5'-Nuklease-Assays ist dies nicht nötig. Diese Assays sind auch bekannt als „TaqMan[®]“-PCRs, die Sonden entsprechend als „TaqMan[®]“-Sonden. Bei diesen Sonden befindet sich am 5'-Ende ein Fluorophor und ein Quencher am 3'-Ende. Der englische Begriff „to quench“ bedeutet „löschen, ersticken“. Bei Abwesenheit eines spezifischen Targets faltet sich das Molekül zu einem bestimmten Grad, so dass sich Fluorophor und Quencher in räumlicher Nähe zueinander befinden, wodurch der Großteil jeglicher Fluoreszenz sofort absorbiert wird. Bindet die Sonde an den einzelsträngig vorliegenden komplementären Teil der DNA, der im vorhergegangenen PCR-Zyklus generiert wurde, wird mit fortschreitender Extension des DNA-Strangs die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Fluorophor und Quencher diffundieren auseinander. Wird das Fluorophor dann angeregt, kann die Fluoreszenz nicht mehr gelöscht werden. Licht wird generiert und detektierbar (z. B. Winn *et al.* 2006; siehe Abbildung 15).

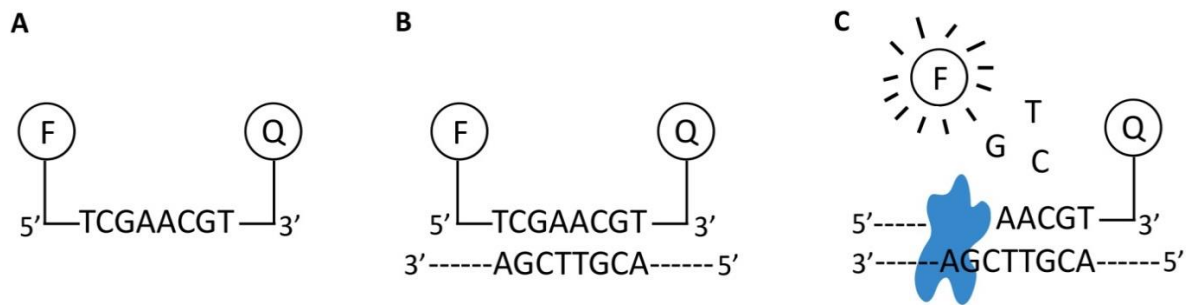


Abbildung 15: Prinzip der Funktionsweise von TaqMan[®]-Sonden. A Bei TaqMan[®]-Sonden befindet sich am 5'-Ende ein Fluorophor (F) und ein Quencher (Q) am 3'-Ende. B Die Sonde bindet an den einzelsträngig vorliegenden komplementären Teil der DNA. C Mit fortschreitender Verlängerung des DNA-Strangs wird die Sonde durch die Taq-Polymerase (blau) hydrolysiert, wodurch das Fluorophor durch die räumliche Trennung zum Quencher fluoresziert. Abb. nach Winn *et al.* (2006)

Eine Variation dieser Hydrolyse-Sonden stellen Locked Nucleic Acids (LNA)-Sonden dar, die über modifizierte Nukleotide verfügen. Der Ribose-Rest im Zucker-Phosphat-Rückgrat wird in diesem bicyklischen RNA-Analogon strukturell durch eine Methylen-Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff- und dem 4'-Kohlenstoff-Atom gehemmt.

Die LNAs in diesen „dual labeled probes“ verändern die Konformation der DNA-Helix und erhöhen die Stabilität der Duplex. Daher kann die T_M der Duplex erhöht werden, was zur Reduktion der Größe der Sonde führt, was wiederum deren Spezifität erhöht. Diese Sonden wurden von Exiqon (Vedbaek, Denmark) entwickelt und können verwendet werden, wenn hoch-affine Sonden benötigt werden, die maximal spezifisch sind (Eurogentec 2004). Eine LNA-Sonde wurde im *pla*-qPCR-Assay eingesetzt.

Hydrolyse-Sonden eignen sich sowohl für quantitative Analysen als auch Mutations-Detektionen. In dieser Arbeit wurden Hydrolyse-Sonden eingesetzt, um zum Einen das *Yersinia pestis* spezifische *pla*-Gen und den *Humanen Leukozyten Antigen* (HLA)-Lokus nachzuweisen und zum Anderen SNPs zu detektieren, anhand derer verschiedene Stämme des Pest-Erregers unterschieden werden können. Bei Letzteren wird die Sonde so designt, dass sie über die Mutationsstelle hinweg an das Template hybridisiert und so spezifisch ist, dass einzelne Basen-Unterschiede detektiert werden können (Eurogentec Download 2012). Im Folgenden wird der Anwendungsbereich beider in dieser Arbeit verwendeten Varianten erklärt.

2.4.3.1 Absolute Quantifizierung 2nd derivative Maximum

Für die Detektion des *pla*-Gens mittels qPCR wurde als Strategie die Absolute Quantifizierung gewählt. Im Gegensatz zur Relativen Quantifizierung, die die Mengen von zwei verschiedenen Target-Sequenzen (beispielsweise Target-Gen und Referenzgen) in nur einer Probe vergleicht, kann mittels der absoluten eine einzige Target-Sequenz quantifiziert und als absoluter Wert angegeben werden. Bei beiden Methoden ist die Detektion eines Crossing Points oder kurz CP-Werts entscheidend. Er bezeichnet jenen Wert, an dem das Signal aus der Hintergrund-Fluoreszenz heraustritt. Der CP wurde hier mittels der „Second Derivative Maximum“-Methode automatisch als der Punkt identifiziert, an dem sich die Fluoreszenz-Kurve der Probe scharf nach oben wendet. Dieser Wendepunkt korrespondiert zum namensgebenden Maximum der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve (Roche Diagnostics 2012b, 2008). Dieser Wert wird auch als Threshold Cycle (CT) für Schwellenwert-Zyklus bezeichnet (z. B. Life Technologies 2011). Ein niedriger CT bedeutet einen frühen Zeitpunkt bzw. eine niedrige Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt. Die Methode erlaubt es dem Anwender daher anders als die manuelle „Fit Point“-Methode nicht, Einfluss auf die Ergebnisse zu nehmen (Roche Diagnostics 2012b).

Um die Konzentration eines Target-Moleküls in einer Probe zu bestimmen, kann der CP einer unbekannt Probe mit definierten externen Standards verglichen werden. Die Software korreliert die erzielten CP-Werte mit den bekannten Standardkonzentrationen und erzeugt dadurch eine Regressionsgerade (Standardkurve), die im Programm hinterlegt und auf nachfolgende qPCR-Läufe

durch Importieren angewandt werden kann. Indem die Software den CP-Wert einer unbekannt Probe mit der Standardkurve vergleicht, kann die anfängliche Konzentration der Target-DNA in der Probe bestimmt werden. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass mit jedem neuen Experiment ein Wert der Standardkurve mitgeführt wird, der mit der importierten Standardkurve abgeglichen wird (Roche Diagnostics 2012b).

In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung des *pla*-Fragments in einem DNA-Extrakt aus historischen Zähnen eine externe Standardkurve erzeugt, indem unter den optimierten Bedingungen verschiedene Konzentrationen des künstlich hergestellten *pla*-Konstrukts prozessiert wurden. Die Reaktion wurde in Triplets von 10.000, 1.000, 750, 500, 250, 100, 75, 50, 25, 10, 5, 1 Kopie(n) durchgeführt und deckt damit den angenommenen Konzentrationsbereich der zu analysierenden Proben ab. In den Läufen mit alte DNA-Extrakten wurden als Standard jeweils 100 Kopien des künstlichen *pla*-Konstrukts mitgeführt. Diese Kontrolle dient zudem als Indikator für die Qualität der Reaktion, sodass falsch-negative Ergebnisse vermieden werden (Roche Diagnostics 2012b).

2.4.3.2 Endpunkt-Genotypisierung

Zur Genotypisierung von *pla*-positiven Proben wurde in dieser Arbeit der Weg der Endpunkt-Genotypisierung (Endpoint-Genotyping) gewählt. Weitere Möglichkeiten wären eine Schmelzkurven-Genotypisierung oder Gene Scanning mit High Resolution Melting. Mittels der Endpunkt-Genotypisierung können bekannte SNPs detektiert werden (Roche Diagnostics 2012b). Ein SNP oder deutsch, aber ungebräuchlich, Einzelnukleotid-Polymorphismus bezeichnet die Variation eines einzigen Basenpaars in einem DNA-Strang (siehe Abbildung 16). Anhand eines SNPs können beispielsweise zwei Bakterien-Stämme an einer bestimmten Position in deren Genom unterschieden werden.

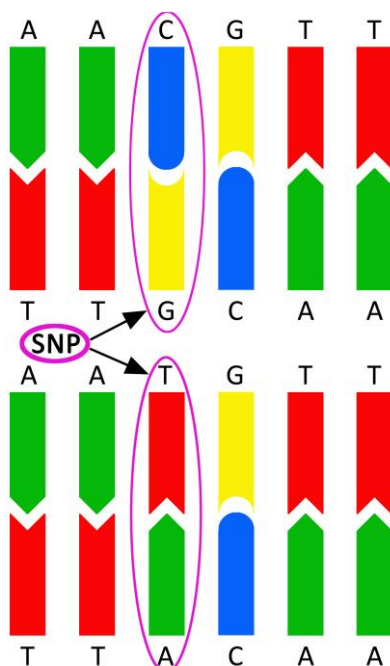


Abbildung 16: Das obige DNA-Molekül unterscheidet sich von dem unteren DNA-Molekül in einem einzigen Basenpaar.

Pro Genotyp wird bei der Endpunkt-Genotypisierung je eine sequenzspezifische Sonde eingesetzt. Durch die Markierung mit unterschiedlichen Farbstoffen können die Sonden voneinander unterschieden werden (Roche Diagnostics 2012b). Die Sonde, die das Wildtyp-Allel trägt, ist beispielsweise mit dem Farbstoff FAM markiert. Die andere Sonde trägt das mutierte Allel und ist YAK-markiert (siehe Abbildung 17). Die Sonde ist jeweils perfekt komplementär zum jeweiligen DNA-

Strang, also dem Wildtyp oder der Mutante. Fehlpaarungen (Mismatches) treten nicht auf. Neben dem Fluorophor trägt jede Sonde – wie bereits oben bei der Beschreibung des allgemeinen Prinzips der Sonden-basierten Real Time-PCR erwähnt – einen Quencher.

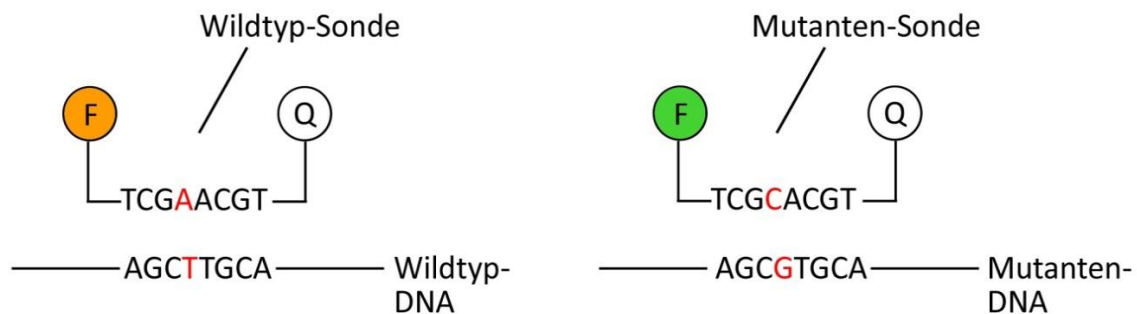


Abbildung 17: Sonden zur Detektion von Wildtyp (links) und Mutante (rechts) in einem Endpunkt-Genotypisierungs-Assay. Die Sonden besitzen jeweils einen Quencher (Q) und ein unterschiedlich farbiges Fluorophor (F). Bei der Detektion des Wildtyps spricht man von einem ancestralen Genotyp (a), bei der Detektion der Mutante von einem Genotyp, der derived (d; deutsch „abgeleitet“) ist.

Bei dieser Typisierungs-PCR handelt sich um eine Duplex-PCR, die im Hydrolysis Probe-Format durchgeführt wird. Ein Fluoreszenzsignal entsteht wieder nur dann, wenn sich Quencher und Fluoreszenzreporter räumlich voneinander trennen. Dies geschieht während der PCR durch Verdau und zwar bevorzugt der Sonde, die ohne Mismatch an das jeweils spezifische PCR-Produkt hybridisiert. Die Sonde, die nur mit Mismatch bindet, wird an der SNP-Position durch die Taq-Polymerase eher verdrängt ohne verdaut zu werden und damit entsteht ein deutlich reduziertes Fluoreszenzsignal. Es wird nur jeweils ein Farbstoff, FAM oder YAK, freigesetzt. Die Analyse erfolgt am Endpunkt der PCR, an dem die Fluoreszenzintensität der Farbstoffe gemessen wird. Die Zuordnung der Proben zu einem Genotyp erfolgt automatisch durch die Software (Roche Diagnostics 2012b).

In die qPCRs zur SNP-Detektion wurden in den Validierungsläufen verschiedene Stämme eingesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Eingesetzte Stämme in qPCR-Validierungsläufen für die Detektion der SNPs s12, s19, s545 und s87 sowie zur Detektion eines SNPs im *napA*-Gen. Angegeben ist zudem, ob ein Stamm als Kontrolle für das Fluorophor FAM (2) oder YAK (1) eingesetzt wurde. „|“ gibt an, ob ein Stamm in das Optimierungs-Assay eingesetzt wurde.

	s12	s19	s545	s87	napA
Y111: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	; 2	; 2	; 1	; 1	
Y777: <i>Yersinia pestis</i> /EV76 Orientalis	; 1		; 2	; 2	; 2
002-0785: <i>Yersinia pestis</i> Orientalis					
Y735: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>					
Y781: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>					
002-3001: <i>Yersinia pestis</i> /Kim Medievalis		; 1			
MNG 3126: <i>Yersinia pestis</i> OPE1 ?					
002-2540: <i>Yersinia pestis</i> Pestoides					; 1
002-2536: <i>Yersinia pestis</i> 2.ANT					
002-2537: <i>Yersinia pestis</i> 2.ANT					
002-0790: <i>Yersinia pestis</i> 1.ANT					
002-3004: <i>Yersinia pestis</i> Medievalis					

Bei der Auswertung generiert die Software zusätzlich zu den beiden Amplifikationskurven für jeden Farb-Kanal (Abbildung 18) ein Scatter Plot (Abbildung 19).

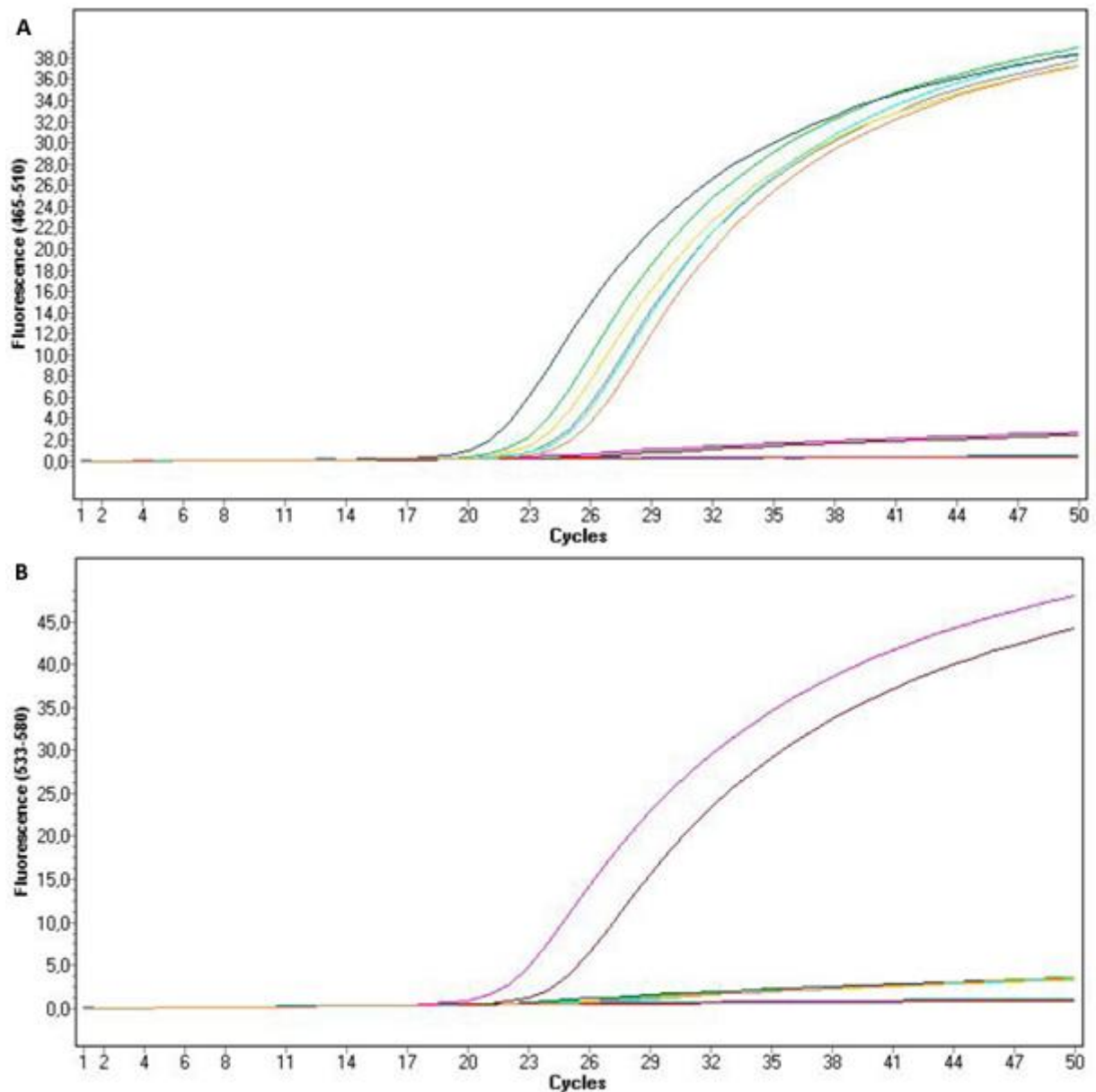


Abbildung 18: Amplifikationskurven des qPCR-Optimierungs-Lauf zur Detektion des SNPs s12 mit den Primern S+R und 5 mM MgCl₂. Gezeigt sind im FAM-Kanal (Bild A) die Kurven jener fünf Proben, die die Wildtyp-Sequenz aufweisen und im YAK-Kanal (Bild B) die Kurven von zwei Proben, die an der Position des SNPs s12 eine Mutation aufweisen. Mastermix-Kontrolle (MMK) und Wasserkontrolle (WK) sind negativ, der Lauf ist valide.

— C1: MMK — C2: WK — C3: Y111 (PK Fam) — C4: Y777 (PK Yak) — C5: Y781
 — C6: 002-0785 — C7: 002-0785 — C8: 002-3001 — C9: MNG3126 — C10: 002-2540

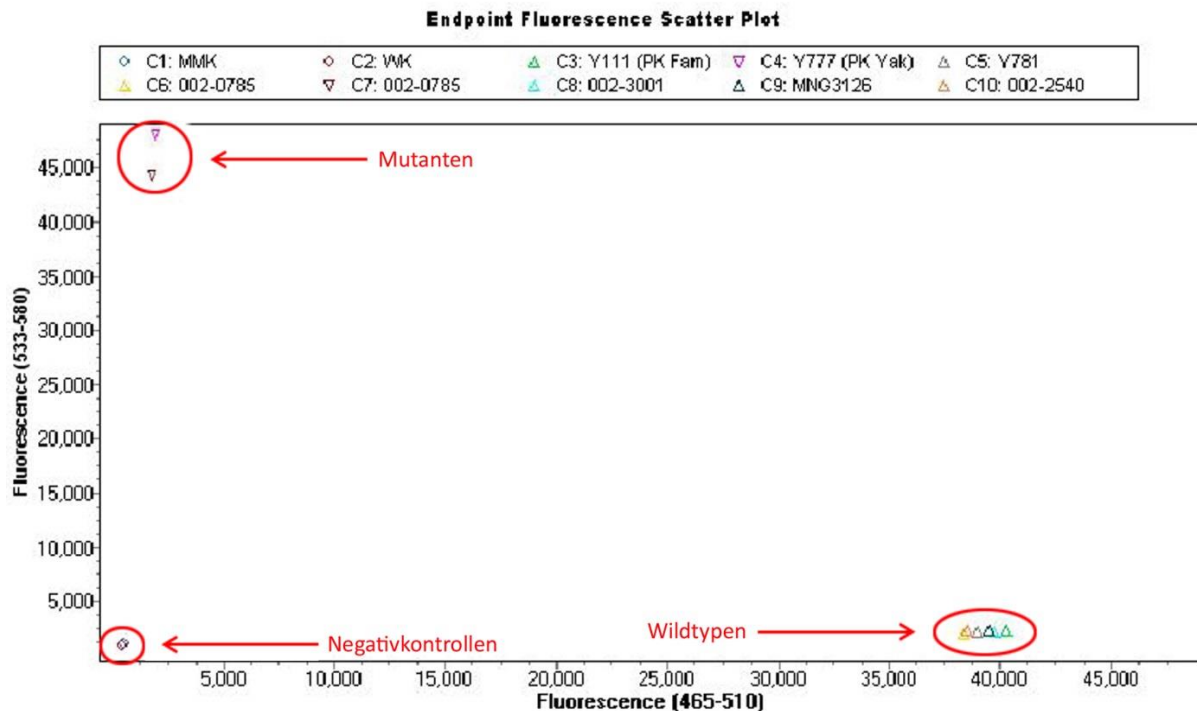


Abbildung 19: Scatter Plot des qPCR-Optimierungs-Laufs zur Detektion des SNPs s12 mit den Primern S+R und 5 mM MgCl₂. Entlang der y-Achse ist der YAK-Kanal (Fluoreszenz 533-580), nach rechts der FAM-Kanal (Fluoreszenz 465-510) aufgetragen. Die mitgeführten Proben werden ihrem Genotyp entsprechend links oben (Mutanten) bzw. rechts unten (Wildtypen) gruppiert. Die beiden Negativkontrollen, Mastermix- (MMK) und Wasserkontrolle (WK), befinden sich am Ursprung.

Zudem kann eine Tabelle im PDF-Format erstellt werden, aus der Werte wie die Endpunkt-Fluoreszenz in beiden Kanälen, Genotyp und Score exakt abgelesen werden können (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Auszug aus dem PDF-Dokument des qPCR-Optimierungs-Lauf zur Detektion des SNPs s12 mit den Primern S+R und 5 mM MgCl₂. Aus der Tabelle können Werte wie Endpunkt-Fluoreszenz in beiden Kanälen (Allel X = FAM-Kanal; Allel Y = YAK-Kanal), Genotyp (Call) und Score exakt abgelesen werden.

Subset Name		s12S+R INV 5mg MgCl					
Results							
Inc	Pos.	Sample Name	Endpoint Fluorescence		Call	Score	Status
			Allele X	Allele Y			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	MMK	0,54	1,08	Negative		
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	WK	0,45	0,88	Negative		
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	Y111 (PK Fam)	40,24	2,39	WT	0,90	
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	Y777 (PK Yak)	2,67	48,08	Mut	0,92	
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	Y781	39,00	2,13	WT	0,89	
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	002-0785	38,36	2,09	WT	0,89	
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	002-0785	2,44	44,29	Mut	0,92	
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	002-3001	39,71	2,24	WT	0,90	
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	MNG3126	39,52	2,33	WT	0,90	
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	002-2540	38,49	2,35	WT	0,90	

2.4.4. PCR-Optimierung

In dieser Arbeit wurden sowohl konventionelle als auch Real Time-basierte Assays (Abschnitt 2.4.4.1 und 2.4.4.4) am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (IMB) optimiert – von der technischen Assistentin Astrid Thomas vom IMB oder zum Erlernen der Technik der qPCR unter ihrer Anleitung. Beispielsweise wurden das konventionelle und das Real Time-basierte Assay zur *pla*-Detektion etwa zu gleichen Teilen von Astrid Thomas und der Verfasserin dieser Dissertation erledigt. Das Assay zur Detektion von *HLA* etablierte Astrid Thomas nahezu gänzlich allein. Die Assays zur Detektion von SNPs auf Basis von Real Time- und konventionellen PCRs wurden wieder zu nahezu gleichen Teilen von beiden optimiert. Das Ansetzen von PCRs mit alter DNA als Template im aDNA-Labor ebenso wie deren nachfolgendes Prozessieren am IMB inklusive einer etwaigen Gelelektrophorese wurden jedoch ausnahmslos von der Verfasserin dieser Dissertation durchgeführt.

Bei der Optimierung beider Arten von PCR-Assays wurden grundsätzlich künstlich hergestellte DNA-Konstrukte für die Gene *pla* und *HLA* (siehe Anhang 3) bzw. DNA von Bakterien-Stämmen verwendet (siehe Tabelle 7). Konnten Läufe aufgrund der Zusammensetzung des Mastermixes mit und ohne UDG prozessiert werden, wurden beide Möglichkeiten getestet, um einen möglichen negativen Effekt des Enzyms zu detektieren. Ebenso wurde mit dem fakultativ zusetzbaren Bovinen Serum Albumin (BSA; Ambion/ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verfahren. Der PCR-Beschleuniger wurde nach Fertig-Etablierung eines Assays in einem abschließenden Lauf zugefügt, um zu zeigen, dass sich auch das BSA nicht negativ auf das Ergebnis der PCR auswirkt.

2.4.4.4. Optimierung Real Time-basierter Assays

Die Optimierung Real Time-basierter Assays umfasste PCRs auf die Genorte *pla* (Abschnitt 2.4.4.4.1) und *HLA* (Abschnitt 2.4.4.4.2) sowie die SNPs s12, s545, s19, s87 und den weiteren Genlokus *napA* (Abschnitt 2.4.4.4.3)

2.4.4.4.1 *pla*

Als Primer und als LNA-Sonde für die Amplifikation eines 70 bp großen Fragments des *pla*-Gens mittels qPCR wurden *Y.-pest_F*, *Y.-pest_R* und *Y._pest_TM* verwendet. Sonde und Primer wurden über TibMolbiol (Berlin, Deutschland) bezogen, ihre Sequenzen befinden sich in Anhang 4. Hinsichtlich ihrer Effizienz wurden fünf Mastermixe miteinander verglichen (siehe Tabelle 9). Weitere Alternierungen hinsichtlich der Konzentration von Magnesiumchlorid, Primern, Sonden, BSA und der optimalen Annealing-Temperatur sind Tabelle 9 zu entnehmen. Die einzelnen Schritte der Optimierung sind in Anhang 6 aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht über die veränderten Komponenten und Konzentrationen während der Optimierung der qPCR zur *pla*-Detektion.

Veränderbare Komponente	Alternierung
Mastermix	<ul style="list-style-type: none"> • LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche, Mannheim, Deutschland) • LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes (Roche, Mannheim, Deutschland) • LC480® Probe Master (Roche, Mannheim, Deutschland) • Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with Rox (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) • LightCycler® TaqMan Master (Roche, Mannheim, Deutschland)
Magnesiumchlorid	<ul style="list-style-type: none"> • 3 mM bis 6 mM in Schritten von 1mM
Primer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 µM • 0,25 µM • 0,4 µM • 0,5 µM • 0,6 µM • 0,75 µM • 0,8 µM • 1 µM
Sonde	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 µM • 0,125 µM • 0,2 µM • 0,25 µM • 0,25 µM • 0,3 µM • 0,375 µM • 0,4 µM
Annealing-Temperatur (AT)	<ul style="list-style-type: none"> • 56 °C bis 62 °C in 2 °C-Schritten
BSA	<ul style="list-style-type: none"> • 0,04 mg/ml • 0,4 mg/ml • 1 mg/ml • 1,5 mg/ml • 2 mg/ml bis 6 mg/ml in 1 mM-Schritten

Zur Bestimmung des linearen Bereichs wurden Konzentrationen des *pla*-Konstrukts von 10.000 Kopien bis zu einer Kopie eingesetzt. Nach Ende der Validierung wurde das optimierte Protokoll wie das konventionelle *pla*-Assay hinsichtlich Sensibilität durch eine Probit-Analyse und Spezifität über den Detektionsversuch in einem Spezifitäts-Panel getestet. Bei der Probit-Regressions-Analyse wurden pro Konzentrationsstufe eingesetzten *pla*-Konstrukts fünf Reaktionen analysiert (Fünffachansatz), um rechnerisch einen Detektionsgrenzwert zu generieren. Relevant für diese Analyse ist, ob eine Sequenz detektiert werden kann oder nicht. Die Probit-Berechnungen in dieser Arbeit wurden von Dr. Markus Antwerpen vom IMB mittels des PC-Programms „minitab“, Version 15 durchgeführt, in das die Werte aus Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** eingegeben wurden. Zur Bestimmung der Spezifität wurde je 1 ng DNA von verschiedenen Bakterien in die PCR eingesetzt. Das Positiv-Panel enthielt DNA von 22 *Y. pestis*-Stämmen und 30 bereits bestätigten klinischen humanen Pestproben (Riehm *et al.* 2011), das negativ-Panel DNA von 41 klinisch relevanten Bakterien und 29 *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen. Beide Panels zusammen werden als Spezifitäts-Panel bezeichnet.

Schritte in der Etablierung dieser PCR für den Einsatz mit alter DNA bildeten abschließend das Testen der Auswirkung des Poolens von Erst- und Zweitluat sowie der Einsatz des REPLI-g-Kits zur Gesamtgenom-Amplifikation. Hinsichtlich des Vermischens eines Erst- und Zweitluats einer Probe bestand die Vermutung, dass sich dadurch die DNA-Konzentration erhöhen würde. Dazu wurden die Extrakte zweier Individuen aus Manching-Pichl (MP17-I und MPS1-I) verwendet, die nach Extraktionsmethode 2 (siehe Abschnitt 2.3.2 in diesem Kapitel) extrahiert und in qPCR-Läufen nach

dem optimierten Protokoll (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.1.7) bereits beide jeweils *pla*-positiv getestet worden waren.

Ein anderer Versuch zur Optimierung der *pla*-PCR bestand im Einsatz des REPLI-g Mini-Kits (Qiagen) zur Gesamtgenom-Amplifikation von kleinem oder wertvollem Probenmaterial. Typischerweise sollen in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l bis zu 10 μ g DNA erhalten werden, wobei die durchschnittliche Produktlänge zwischen zwei kb und 100 kb rangieren soll. Einheitliche DNA soll amplifiziert werden, unabhängig von der Quantität der Template-DNA. Das Kit wurde für aufgereinigte genomische DNA sowie DNA aus frischem oder getrocknetem Blut, aus Mundschleimhautabstrichen, aus frischem oder gefrorenem Gewebe und Zellen konzipiert. Genutzt wird dazu die Multiple Displacement Amplification (MDA)-Technologie zusammen mit einer sanften alkalischen Denaturierung der DNA. Die generierte DNA soll ohne weitere Aufreinigung in nachfolgende Anwendungen eingesetzt werden können und gut geeignet sein für SNP-Typisierungen mittels TaqMan®-Primern und Sonden sowie Sequenzierungen (Qiagen Download 2013).

Eingesetzt wurden in zwei unabhängigen Versuchen die in Tabelle 10 angegebenen Proben. Dabei handelt es sich sowohl um solche, die in vorangegangenen qPCRs auf den Genort *pla* amplifizierbare Produkte geliefert haben, als auch solche, die darin negativ waren. Es sollte überprüft werden, ob sich der CT-Wert durch den Einsatz des REPLI-g-Kits verbessern lässt bzw. ob überhaupt ein positives Ergebnis erzielt werden kann.

Tabelle 10: Proben für die Versuche zur Gesamtgenom-Amplifikation mittels REPLI-g (Qiagen). „(+)“ kennzeichnet ein positives qPCR-Ergebnis in einem vorangegangenen Lauf auf den Genort *pla* ohne Verwendung des Kits.

Versuch 1		Versuch 2	
B1	(+)	B3 (1)	(+)
B2	(+)	A120 (8)	(+)
A119		A58 (8)	(+)
A166	(+)	A72 (1)	
A60		MPS1-I (1)	(+)
		MP17-I (1)	(+)

Vorgegangen wurde wie im Handbuch des Herstellers beschrieben. 2,5 μ l DNA wurden mit 2,5 μ l D1-Puffer vermischt und nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 5 μ l N1-Puffer vermengt, wodurch die DNA denaturiert wurde. Der nachfolgend angesetzte Mastermix beinhaltete die einzelnen Komponenten in den in Tabelle 11 angegebenen Volumina (Qiagen 2011b).

Tabelle 11: Einfacher Ansatz für die Gesamtgenom-Amplifikation mittels REPLI-g.

Reagenz	Volumen [μ l] x 1
Nuklease-freies Wasser	10
REPLI-g Mini-Reaktions-Puffer	29
REPLI-g Mini-DNA-Polymerase	1
Denaturierte DNA	10
gesamt	40

Die Proben wurden den Herstellerangaben entsprechend bei 30 °C für zehn bis 16 Stunden inkubiert und anschließend zum Inaktivieren der REPLI-g Mini-DNA-Polymerase drei Minuten bei 65 °C erwärmt. In qPCRs auf den Genort *pla* wurden 3 μ l von 1:20 verdünnter amplifizierter DNA eingesetzt (Qiagen 2011b), das Protokoll laut Tabelle 23 wurde entsprechend angepasst.

2.4.4.4.2 HLA

Das in dieser Dissertation entwickelte Assay zur Detektion des *HLA-DGA1*-Gens basiert auf einer vorhergehenden Arbeit von Mohammadi *et al.* (2004), deren PCR-Ansatz und Cycle-Bedingungen auf aDNA-Anforderungen angepasst werden sollten. Um mittels der qPCR ein 97 bp großes Fragment des *HLA*-Gens zu amplifizieren, wurden die Primer HLA fwd 2 und HLA rev 2 sowie die Sonde HLA_p1 verwendet (Sequenzen siehe Anhang 4). Hinsichtlich ihrer Effizienz wurden zwei Mastermixe miteinander verglichen (siehe Tabelle 12). Weitere Alternierungen hinsichtlich der Konzentration von Magnesiumchlorid, Primern, Sonden und der optimalen Annealing-Temperatur sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Übersicht über die veränderten Komponenten und Konzentrationen während der Optimierung der qPCR zur HLA-Detektion.

Veränderbare Komponente	Alternierung
Mastermix	<ul style="list-style-type: none"> Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with Rox (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) LightCycler® FastStart DNA Master Hybridisation Probes (Roche, Mannheim, Deutschland)
Magnesiumchlorid	<ul style="list-style-type: none"> 3 mM bis 6 mM in Schritten von 1 mM
Primer	<ul style="list-style-type: none"> 0,2 µM 0,3 µM 0,4 µM 0,6 µM
Sonde	<ul style="list-style-type: none"> 0,2 µM 0,4 µM 0,6 µM
Annealing-Temperatur (AT)	<ul style="list-style-type: none"> 60 °C 63 °C

Die einzelnen Schritte der Validierung sind Anhang 7 zu entnehmen. Nach Ende der Validierung wurde auch dieses optimierte Protokoll analog den Assays zur *pla*-Detektion einer Probit-Analyse unterzogen (siehe Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

2.4.4.4.3 SNPs

Im Falle von qPCRs hatte die Firma TibMolBiol jeweils einen Primer pro Richtung (S und A) nach Prüfung der eingesandten Primer (F und R) vorgeschlagen (Sequenzen befinden sich in Anhang 4). Das optimale Primer-Paar wurde stets durch die Kombination der Primer-Paare miteinander sowie kreuzweise ermittelt. Zur Generierung des optimalen Assays zur Detektion der SNPs s12, s545, s19, s87 und des Gens *napA* mittels qPCR wurden die von Roche genannten Kriterien angewandt: der Score sollte möglichst nahe am Maximalwert 1,0 liegen und der CT-Wert möglichst niedrig sein. Der Score ist durch den Algorithmus der Endpunkt-Genotypisierung definiert und beschreibt die Entfernung einer Probe vom Winkel-Mittelwert. Für jede Probe und die mitgeführten Standards wird der Winkel ihrer Lokalisation im Scatter Plot bestimmt. Die Verteilung aller Winkel wird in einem Histogramm dargestellt, wobei ein Winkel gegen die Anzahl der Proben mit diesem Winkel aufgetragen wird. Über die Verteilung wird eine Kurve gelegt und Kurven-Peaks werden bestimmt. Daraus werden die Peak-Winkel ermittelt. Standards müssen nicht notwendigerweise einen Score von 1,0 haben, da ihr individueller Winkel auch mit dem Gruppen-Mittel-Winkel verglichen wird (persönliche Mitteilung von Roche Diagnostics 2012a).

Diese von Roche genannten Kriterien wurden zur Optimierung um weitere ergänzt. Welche Kriterien zudem erfüllt sein sollten und worauf dieses Kriterium gründet, wird beispielhaft anhand eines qPCR-Optimierungs-Laufs zur Detektion des SNPs s12 gezeigt, in dem die optimale MgCl₂-Konzentration ermittelt werden sollte. Getestet wurden Konzentrationen von 3, 4, 5 und 6 mM. Die übrigen Komponenten, also Taq-Polymerase, Sonden- und Primer-Konzentration, waren bei allen vier PCR-

Ansätzen die gleichen: Eingesetzt wurden die Platinum-Taq (Invitrogen), 0,4 μM YAK- und 0,2 μM FAM-Sonde sowie 0,9 μM der beiden Primer. Die mitgeführten Proben sind in Tabelle 7 angegeben. Zur Auswertung wurden die vom Computer-Programm ausgegebenen Daten in Tabelle 13 übertragen. Aus den Score-Einzelwerten wurde ein Mittelwert (MW) gebildet. Zudem wurden in den Spalten „Endpunkt-Fluoreszenz“ und „CT“ jene Werte ermittelt und farblich gekennzeichnet, die ein Signal im „richtigen“ Kanal widerspiegeln. Hinter der hier verwendeten Nomenklatur „richtiger/s“ und „falscher/s“ Kanal bzw. Signal steckt Folgendes: Die Fluoreszenz der FAM-Sonde wird bei 465-510 nm gemessen, die der YAK-Sonde bei 533-580 nm. Die Fluoreszenzen der beiden Farbstoffe können allerdings in gewissem Maße auch in dem jeweils anderen, also „falschen“ Kanal hineinstrahlen. Dies wird als Crosstalk bezeichnet (persönliche Mitteilung von Roche Diagnostics 2012a). Nach Angaben der Firma Roche stellt dies jedoch keinen Fehler dar. Wenn nach einem Farb-Kompensationschritt (engl. *Colour Compensation*) im PC-Programm die Kurve der jeweils „falschen“ Sonde einer Gerade gleicht, ist die Messung korrekt (telefonische Mitteilung von Roche).

Tabelle 13: Automatisch ausgegebene Werte der qPCR in einem Lauf zur Optimierung des Assays für die Detektion von SNP s12 unter Einsatz von 3 mM MgCl_2 . Angegeben sind neben der Belegung auf der 96-Loch-Platte (Position) und dem Namen (Probe) die Endpunkt-Fluoreszenzen im FAM- (Allel X) und YAK-(Allel Y) Kanal, der Status (Call) der Probe als Negativprobe (N), Wildtyp (WT) oder Mutante (Mut), der Score und der CT im FAM- (465-510) und YAK- (533-580) Kanal. Für den Score ist in der untersten Zeile ein Mittelwert (MW) angegeben. Grau hinterlegt sind in den Spalten Endpunkt-Fluoreszenz und CT die Werte im „richtigen“ Kanal.

Position	Probe	Endpunkt-Fluoreszenz		Call	Score	CT	
		Allel X	Allel Y			465-510	533-580
A1	MMK	0,44	1,17	N			<5
A2	WK	0,43	1,05	N			<5
A3	Y111 (PK Fam)	29,42	1,87	WT	0,90	22,77	24,15
A4	Y777 (PK Yak)	1,68	38,46	Mut	0,92	21,6 (?)	21,74
A5	Y735	27,91	1,74	WT	0,89	24,30	25,35
A6	Y781	28,21	1,73	WT	0,89	23,48	23,80
A7	002-0785	1,4	34,38	Mut	0,92	22,91	23,99
A8	002-3001	26,36	1,64	WT	0,89	24,26	24,06
A9	MNG3126	27,97	1,78	WT	0,89	20,92	21,68
A10	002-2540	26,49	1,76	WT	0,90	25,01	25,30
	MW				0,90		

Ebenso wurde mit den Ergebnissen der anderen MgCl_2 -Kombinationen verfahren (Tabelle 14). Von den Werten im „richtigen“ Kanal wurde jeweils der niedrigste hohe (also „richtige“) und der höchste niedrige („falsche“) Wert bestimmt sowohl im FAM- als auch im YAK-Kanal sowie der insgesamt höchste Fluoreszenz-Wert pro Kanal.

Tabelle 14: Endpunktfluoreszenzen eines Optimierungslaufs zur Detektion des SNPs s12 unter Variation der MgCl_2 -Konzentration (3, 4, 5 und 6 mM). Angegeben sind für den FAM- und den YAK-Kanal jeweils die niedrigsten hohen („richtige“) und die höchsten niedrigen („falsche“) Werte sowie die absolut höchsten Werte, die obiger und anderen ähnlich aufgebauten Tabellen entnommen wurden (blau hinterlegte Werte in Tabelle 13).

Lauf	FAM		YAK		höchste FAM	höchste YAK
	niedrigster hoher	höchster niedriger	niedrigster hoher	höchster niedriger		
3 mM MgCl_2	26,36	1,68	34,38	1,87	29,42	38,46
4 mM MgCl_2	27,57	1,94	44,77	2,26	29,70	46,86
5 mM MgCl_2	38,36	2,67	44,29	2,39	40,24	48,08
6 mM MgCl_2	35,16	2,50	45,62	2,60	37,55	48,30

In einem weiteren Schritt wurden die Differenzen aus niedrigstem hohen und höchstem niedrigen Wert für jeden Kanal sowie der Quotient der höchsten Endpunkt-Fluoreszenz aus FAM- und YAK-Kanal gebildet. Die Differenz zwischen dem niedrigsten hohen und dem höchsten niedrigen Wert sollte möglichst hoch sein, um die verschiedenen Fluoreszenzen und damit das „richtige“ vom „falschen“ Signal sicher unterscheiden zu können. Den gleichen Grund hatte die Bestimmung des Quotienten aus den insgesamt höchsten Endpunkt-Fluoreszenz-Werten pro Kanal. Zudem sollten die Fluoreszenzen in beiden Kanälen möglichst hoch sein, um auch bei einer zu erwartenden geringen DNA-Ausgangsmenge in den historischen Proben noch ein Signal detektieren zu können. Dies ist durch Erhöhen der Sonden-Konzentrationen möglich. Zeitgleich sollten beide Signale gleich hoch sein, um die gleiche Ausgangslage für die beiden möglichen Ergebnisse zu schaffen. In der nachfolgenden Abbildung 20 sind diese Ergebnisse zusammen mit den besten CT- und Score-Werten zusammengefasst.

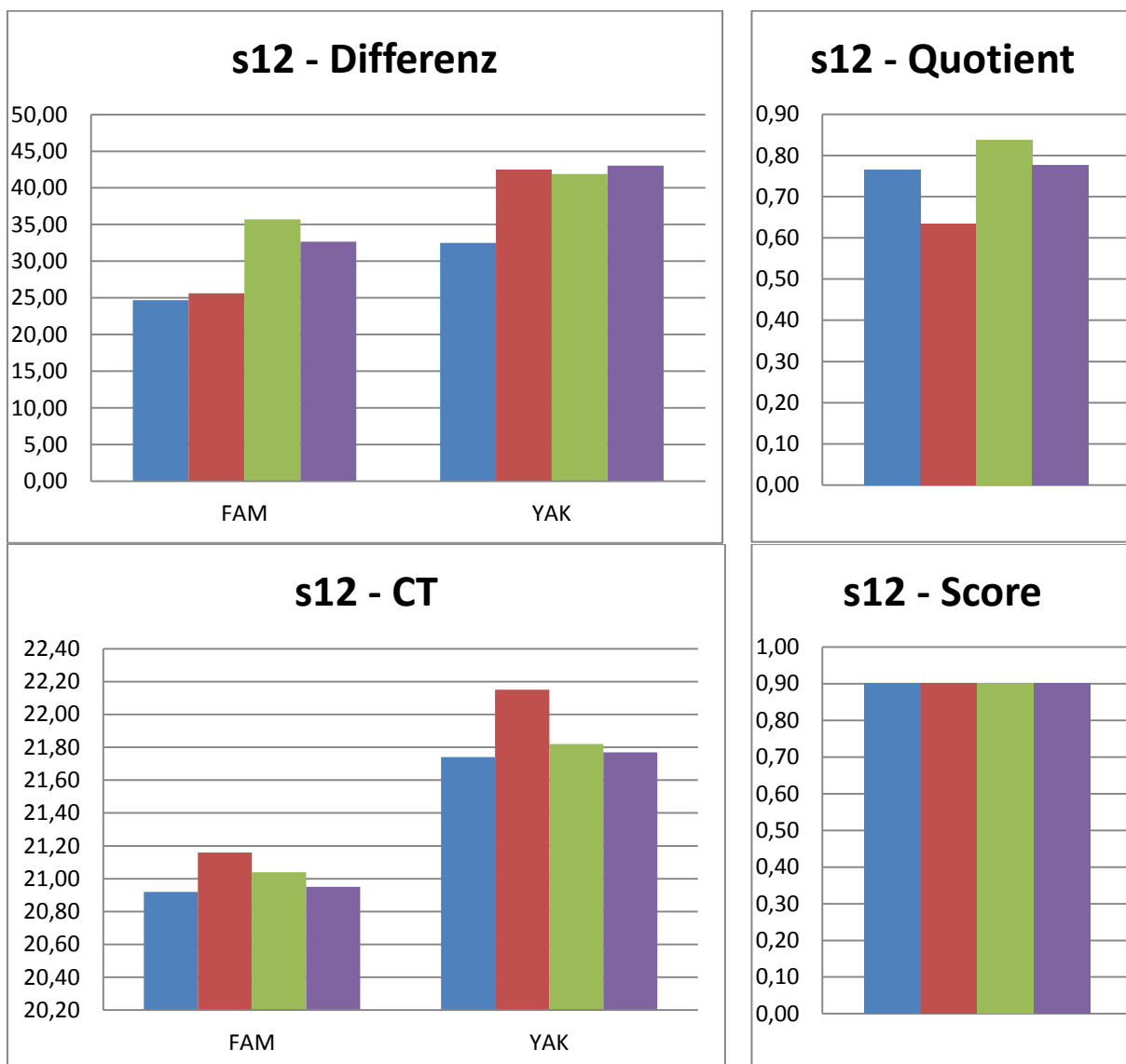


Abbildung 20: Vergleich der Optimierungsläufe zur Detektion des SNPs s12 unter Einsatz variierender MgCl₂-Konzentrationen (3, 4, 5 und 6 mM) in den Kategorien Differenz, Quotient, CT und Score.

- 3 mM MgCl₂
- 4 mM MgCl₂
- 5 mM MgCl₂
- 6 mM MgCl₂

Abschließend wurden die Kriterien mit absteigender Priorität folgendermaßen bewertet:

1. Score möglichst nahe an 1,0.
2. CT in beiden Kanälen möglichst niedrig, um den Wert 20,0.
3. Differenzen in beiden Kanälen möglichst groß.
4. Quotient der Endpunkt-Fluoreszenz nahe 1,0.

Da der Score in obigem Beispiel (siehe Abbildung 20) bei allen vier PCRs gleich war, entfiel hier dessen Bedeutung. Bei annehmbaren CT-Werten (die CTs variieren mit Ausnahme des Laufs mit 4 mM MgCl₂ nur geringfügig) sind die Differenzen in beiden Kanälen sowie der Quotient der Endpunkt-Fluoreszenzen am besten bei Zugabe von 5 mM MgCl₂. Mit dieser Konzentration wurden weitere Optimierungs-PCRs durchgeführt. Die einzelnen Schritte aller Optimierungen finden sich in Anhang 9.

2.4.4.1 Optimierung konventioneller Assays

Auf konventionelle Art wurde zunächst das Assay zur Detektion des *pla*-Lokus etabliert (Abschnitt 2.4.4.1.1). Nach Testen der aDNA-Extrakte mit dem optimierten Assay wurden weitere PCRs zur Detektion von SNPs und anderen Genloci optimiert (Abschnitt 2.4.4.1.2).

2.4.4.1.1 *pla*

Für die Optimierung des konventionellen Assays zur Detektion des *pla*-Gens wurde viel Zeit aufgebracht. Als Forward- und Reverse-Primer wurden *Y.-pest_F* und *Y._pest_R2* verwendet. Die Sequenzen sind in Anhang 4 ersichtlich. Bezüglich ihrer Effizienz wurden sechs verschiedene Mastermixe, die bereits alle für eine PCR erforderlichen Bestandteile in „prä-optimierten“ Konzentrationen (Qiagen 2010a) beinhalten, oder Taq-Polymerasen verglichen (siehe Tabelle 15). Weitere Alternierungen hinsichtlich der Konzentration von Magnesiumchlorid, der anfänglichen Denaturierungszeit, der Annealing-Temperatur (AT) und der PCR-Bedingungen sind Tabelle 15 zu entnehmen. Die einzelnen Schritte der Optimierung befinden sich in Anhang 5.

Tabelle 15: Übersicht über die veränderten Komponenten und Konzentrationen während der Optimierung der konventionellen PCR zur *pla*-Detektion.

Veränderbare Komponente	Alternierung
Mastermix	<ul style="list-style-type: none"> • Qiagen Multiplex PCR Master Mix® mit UDG (Qiagen, Hilden, Deutschland) • Qiagen Multiplex PCR plus Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland) • Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) • Qiagen HotStarTaq plus (Qiagen, Hilden, Deutschland) • AmpliTaq® Gold (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) • AmpliTaq® Gold Polymerase LD (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid	<ul style="list-style-type: none"> • 1,5 mM und • 1 mM-Schritten von 3 mM bis 5 mM
anfängliche Denaturierungszeit	<ul style="list-style-type: none"> • 2 Minuten • 5 Minuten • 10 Minuten • 15 Minuten
Annealing-Temperatur (AT)	<ul style="list-style-type: none"> • 2 °C-Schritten von 60 °C bis 68 °C in einer Gradienten-PCR
PCR-Bedingungen	<ul style="list-style-type: none"> • konventionelle • Touchdown-Protokoll

Zur Ermittlung der optimalen AT wurde eine Gradienten-PCR gefahren, die mit dem verwendeten Mastercycler® der Firma Eppendorf möglich ist. Dabei wird spaltenweise über den Thermoblock ein Temperaturgradient aufgebaut, der sich wie hier um 2° C pro Spalte unterscheidet. Dadurch kann in einem einzigen Experiment die optimale AT eines Primer-Paares ermittelt werden. Voraussetzung ist, dass so viele identische Reaktions-Reihen angesetzt wie Temperaturen programmiert werden. Außerdem wurden konventionelle Cycle-Bedingungen mit einem Touchdown-Protokoll verglichen.

Die Touchdown-PCR wird eingesetzt, um eine unspezifische Bindung der Oligonukleotide zu verhindern, die in einem Agarosegel als kleine Banden sichtbar werden. Das Prinzip beruht auf einem sukzessiven Absenken der AT um jeweils 1 °C in den ersten PCR-Zyklen, wobei über oder genau bei der AT, nicht aber unterhalb der AT der Primer gestartet wird (Don *et al.* 1991).

Nach Beendigung der Validierung wurde das optimierte Assay wie das *pla*-qPCR-Assay hinsichtlich Sensibilität (Anhang 10) und Spezifität getestet.

2.4.4.1.2 SNPs und andere Genloci

Fragmente der Genorte *pPCP1*, *caf1* und *napA* sowie die 17 SNP-überspannenden Fragmente wurden in einem konventionellen PCR-Ansatz amplifiziert. In die Optimierungsläufe wurden 1000, 100, zehn und eine Kopie(n) des EV76-Impf-Stammes in Triplikaten oder beginnend bei einer log-Stufe später 100, zehn und eine Kopie(n) eingesetzt. Zudem wurden eine Wasser- und eine Knochenmatrix-Kontrolle mitgeführt. Ziel eines jeden Assays war, ein PCR-Protokoll mit einem möglichst niedrigen Detektionslimit zu finden. Das heißt, die eine Kopie des EV76-Genoms sollte möglichst konstant in allen drei Ansätzen detektiert werden. Zudem sollte das Produkt auf einem Gel eine scharf abgegrenzte Bande ohne Nebenprodukte oder Primer-Dimere bilden. Aus diesem Grund wurde die Knochenmatrix mitgeführt. Da aDNA-Extrakte anders als bakterielle DNA aus einer Reinkultur neben der gewünschten bakteriellen und humanen Wirts-DNA auch DNA von anderen Bakterien und Stoffe wie Huminsäuren besitzen und sich daher mutmaßlich anders verhalten, wurde die Knochenmatrix als Kontrolle für ein sauberes Gel mitgeführt. Zeigte die Spur der Knochenmatrix keinerlei Schmier oder Banden, wurde die PCR als optimal bezüglich der eindeutigen Identifikation von positiven Signalen angesehen.

Für die Optimierung standen je Genort ein bis zwei Forward- und ein bis zwei Reverse-Primer zur Verfügung (siehe Anhang 4). In einem ersten PCR-Lauf wurden die Kopien in einem 50 µl-Ansatz – wie in Tabelle 16 gezeigt – gecycelt.

Tabelle 16: Initiales Protokoll zur Amplifikation von Fragmenten der Genorte *pPCP1*, *caf1* und *napA* sowie 17 SNP-überspannenden Fragmenten in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Tabelle zeigt PCR-Ansatz und Thermoprofil. Die Kopien wurden im ersten Lauf bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C oder 58 °C und in einem Fall (s463) 60 °C gecycelt. n. b. = nicht bestimmt

PCR-Ansatz			
Substanz	Hersteller	Konzentration	
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland	1x	
Forward-Primer	TibMolbiol, Berlin bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg	0,2 µM	
Reverse-Primer	TibMolbiol, Berlin bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg	0,2 µM	
2 µl Template-DNA			
Thermoprofil			
Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
PCR-Aktivierung	1 x	95	15 Min
Amplifikation	50 x	94	30 Sek
		56/58/60 (s463)	30 Sek
		72	60 Sek
Elongation	1x	72	10 Min
Kühlen	1 x	8	bis Analyse

Die nachfolgenden einzelnen Schritte der Optimierung befinden sich in Anhang 8.

3 Versuch der Detektion des F1-Antigens von *Yersinia pestis*

Der Versuch der Detektion des F1-Antigens stellt einen von molekulargenetischen Analysen unabhängigen Weg zum Nachweis des Erregers dar. In Abschnitt 3.1 werden zunächst die Charakteristika dieses Proteins beleuchtet. Anschließend wird in Abschnitt 3.2 das methodische Vorgehen zu seiner Detektion beschrieben.

3.1 Das *Yersinia pestis*-spezifische F1-Antigen

Das auf dem pFra-Plasmid befindliche *caf1*-Gen kodiert für das F1-Antigen von *Yersinia pestis* (z. B. Davis *et al.* 1996). „F1“ steht für „Fraktion 1“ (Suerbaum *et al.* 2009). Es handelt sich dabei um ein Kapselprotein (Gross 2009), das gelatineartig ist und das man sich als „bakterielles Haar“ vorstellen kann (Knight 2007). Die Kapsel besteht aus einem einzigen 15,6 kDa großen Protein, dem Caf1 (Suerbaum *et al.* 2009), das hochmolekulare Polymere aufbaut. Dadurch vermehrt das Bakterium seinen Durchmesser um das Doppelte (Knight 2007). Das Protein wird temperaturabhängig exprimiert. Bei einer Temperatur von 26 °C oder darunter – wie im Floh-Magen – wird es nicht exprimiert. Ausgebildet wird es erst bei 35 bis 37 °C, also im Säugerwirt (Knight 2007; Suerbaum *et al.* 2009; Bayliss 1980), nachdem das Bakterium von Monozyten oder nicht-aktivierten Makrophagen aufgenommen worden ist. In diesen können sie überleben, sich vermehren und exprimieren das F1-Antigen (Knight 2007). Die Expression des Proteins hat Auswirkungen auf das phänotypische Erscheinungsbild von *Yersinia pestis*-Kolonien: wird die Kapsel ausgebildet, erscheinen Kolonien glatt, andernfalls rau (Suerbaum *et al.* 2009). Die Kapsel ist sehr stabil und Bakterien können größere Mengen des Proteins in die Umgebung abgeben. Jedoch ist das Kapselmaterial an sich löslich in Wasser (Knight 2007) und freie Caf1-Untereinheiten sind wenig stabil (Zavialov *et al.* 2005). Nach dem Freiwerden aus phagozytischen Zellen limitiert das F1-Antigen zusammen mit Yersinia Outer Proteins (Yops) eine weitere Phagozytose (Gross 2009; Suerbaum *et al.* 2009). Dennoch ist die Rolle in der Pathogenese unklar, da F1-negative Stämme existieren, die in vielen Tiermodellen so virulent sind wie F1-positive Stämme (z. B. Friedlander *et al.* 1995; Davis *et al.* 1996). Das F1-Antigen wurde bereits in vorangegangenen Studien genutzt, um den Pesterreger in historischem Skelettmaterial nachzuweisen (Pusch *et al.* 2004; Bianucci *et al.* 2008; Hänsch *et al.* 2010; Kacki *et al.* 2011; Malou *et al.* 2012).

3.2 Methodisches Vorgehen

In ihrer Bachelorarbeit hat Sara Fischersworing (2012) Versuche unternommen, das F1-Antigen in historischem Knochen- und Zahnmaterial des Fundorts Manching-Pichl nachzuweisen. Darüber hinausgehend wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation zusammen mit der Präparatorin Sandy Reh von der SAPM weitere Anstrengungen zur Detektion des Proteins unternommen, falls ein nach einer bestimmten Methode extrahierter Extrakt aufgrund dessen nicht-vorhandenen oder geringen Restvolumens nicht mit den vorgesehenen Tests analysiert werden konnte. Insgesamt wurden drei Verfahren zur Extraktion von Proteinen aus historischem Knochen- und Zahnmaterial (Abschnitt 3.2.1) sowie drei kommerziell erhältliche und ein am Institut Pasteur in Madagaskar produzierter Test (Abschnitt 3.2.2) miteinander verglichen. Nachfolgend werden zunächst die verschiedenen Extraktionsmethoden beschrieben, später wird auf die verschiedenen Tests eingegangen. Tabelle 17 gibt an, welches Skelettelement welchen Individuums dem jeweiligen Extraktionsprotokoll unterzogen wurde. Anders als bei den molekulargenetischen Analysen wurde hier hauptsächlich Knochen statt Zahn eingesetzt, um Zähne für die bereits erfolgreich angelaufenen molekularen Untersuchungen zu sparen.

Tabelle 17: Eingesetzte Skelettelemente von Individuen aus Manching-Pichl in verschiedenen Protokollen zur Protein-Extraktion. Versuche 1-4 = verschiedene Varianten nach Bianucci *et al.* (2008); Versuch 5 = Malou *et al.* (2012); Versuch 6 = Wiechmann *et al.* (1999). „I“ bezeichnet die Anzahl der Einsätze des jeweiligen Skelettelements in den Versuch

Individuum	Skelettelement	Versuch 1/2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
S1-I	Rippe	I	I		I	I
S1-I	Femur	II	II		I	I
S1-I	distaler Phalange			I	I	I
S1-I	Rippe & Femur			I		
17-I	Rippe				I	I
17-I	Zahn	II	II		I	I
17-I	Wirbel	I	I		I	I
59-I	Humerus	I	I	I	I	I

3.2.1 Probenvorbereitung und Protein-Extraktion

Die Vorbereitung der skelettalen Proben auf die Protein-Extraktion inklusive Probennahme und Herstellung von Probenmehl ist bei Fischersworrying (2012) beschrieben. Dabei wurden Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung ergriffen, die ähnlich denen für die Extraktion von DNA sind. Dies beinhaltete das Reinigen der Proben mit 0,4-prozentigem NaOCl und/oder UV-Bestrahlung jeder Seite für mindestens zehn Minuten (Fischersworrying 2012).

Bianucci *et al.* hatten mit dem von ihnen beschriebenen Protokoll Erfolg, in historischem Skelettmaterial mittels des madagasischen rapid diagnostic test (RDT) das F1-Antigen nachzuweisen (Bianucci *et al.* 2008). Es sieht durch Vortexen die Suspension von 50 mg Knochen- und 7,5 bis 13 mg Zahnmehl in 200 µl steriler Kochsalzlösung vor (Bianucci *et al.* 2008). Das Protokoll in der Bachelor- (Fischersworrying 2012) und der vorliegenden Arbeit wurde in modifizierter Version durchgeführt: verwendet wurden 200 mg Probenmehl und 400 µl sterile Kochsalzlösung. Die Suspensionen wurden drei Einfrier-/Auftau-Zyklen durch jeweils etwa halbminütige Inkubationen im Wasserbad bei ca. 80 °C und in Flüssigstickstoff unterzogen und nachfolgend im Ultraschallbad für 15 Minuten behandelt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben stets gevortext. Nach einem vierten Einfrier-/Auftau-Zyklus wurden die Proben 24 Stunden lang bei 4 °C inkubiert, um die übrigen Antigene löslich zu machen. Bei Raumtemperatur wurden diese anschließend bei 5.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert (Bianucci *et al.* 2008). Nach dieser Extraktionsmethode wurden insgesamt sechs Versuche unternommen, wobei bei einem Versuch die Inkubation im Ultraschallbad auf zehn mal eine Minute reduziert wurde und bei zwei anderen Versuchen die Inkubation im Ultraschallbad durch zehn Behandlungen mit einem Ultraschallhomogenisator für je eine Minute ersetzt wurde. Bei diesem letzten Versuch wurde die Probe zwischen den Behandlungen auf Eis gekühlt.

Bei der Extraktionsmethode wie bei Malou *et al.* (2012) beschrieben ist kein Probenvolumen angegeben. Daher wurden für eine Vergleichbarkeit mit der Methode nach Bianucci *et al.* (2008) 200 mg Probenmehl in 2 ml 500 mM EDTA (pH 8.0) für 24 Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Es folgten fünf je einminütige Behandlungen mit dem Ultraschallhomogenisationsstab, nach denen die Proben einige Minuten auf Eis gekühlt wurden. Einer Zentrifugation bei 17.900 rpm für 40 Minuten folgten bei Raumtemperatur 48 Stunden Dialyse in zwei Litern Puffer. Dieser bestand aus 50 mM Tris (pH 8.0) und 150 mM NaCl (Malou *et al.* 2012).

500 mg der Proben wurden bei der dritten Extraktionsmethode nach Wiechmann *et al.* (1999) für 48 Stunden bei 4 °C in 10 ml 4 M Guanidine-HCl/ 0,05 M Tris (pH 7,4) mit 0,05 mg/500 ml

Phosphoramidon inkubiert. Die geringere Konzentration des Enzym-Inhibitors zu den im Originalprotokoll angegebenen 2 mg/l war bedingt durch die damals vorhandene Menge des Proteins. Dazwischen wurden sie mehrmals zwei Minuten im Ultraschallbad behandelt und durch Vortexen resuspendiert. Am dritten Tag der Extraktion wurden die Proben bei 7.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert, um das Probenmehl zu beseitigen. Der Überstand (ca. 10 ml) wurde abgenommen und mittels 10 PGD-Röhrchen entsalzen. Es folgten 48 Stunden Dialyse in fünf Litern destilliertem Wasser zur Entfernung molekularer Überreste, die kleiner als 12 kDa sind (Wiechmann *et al.* 1999).

3.2.2 Vergleich von vier Tests zur Detektion des F1-Antigens von *Yersinia pestis*

Die in der Bachelorarbeit (Fischersworing 2012) hergestellten Protein-Extrakte wurden zunächst mit dem ABICAP® Multilayer Test Kit (Senova, Jena, Deutschland) getestet. Falls ausreichend Extrakt vorhanden war oder neuer angefertigt werden konnte, so wurden zu einem späteren Zeitpunkt in der vorliegenden Arbeit weitere Tests mit den Produkten miPROTECT® (Miprolab, Göttingen, Deutschland), BioThreat Alert™ (Tetracore, Rockville, MD, USA) und dem am Institut Pasteur in Madagaskar produzierten RDT durchgeführt. Allen diesen Tests gemeinsam ist die visuelle Detektion eines Ergebnisses durch Ablesen der Anzahl an gebildeten Linien. Eine Linie bedeutet stets, dass der Test zwar korrekt durchgeführt worden, aber negativ ist. Das Auftreten einer weiteren Linie zeigt ein positives Testergebnis an (Tetracore; miprolab; Chanteau *et al.* 2003). Die Teststreifen unterscheiden sich in ihrem Aussehen, den verwendeten Antikörpern, zum Teil in der Handhabung, in der Zeit bis zum Ablesen des Ergebnisses und ihrer Detektionsgrenze. Nachfolgend werden die einzelnen Tests kurz vorgestellt.

ABICAP®-Tests sind säulenbasierte Schnelltestsysteme, die nach zehn bis 30 Minuten ein Ergebnis liefern (Senova 2009; siehe Abbildung 21). Sie enthalten drei unterschiedlich beschichtete dreidimensionale Filter. Der erste ist mit einem Fänger-Antikörper gegen das F1-Antigen von *Y. pestis* beschichtet, der zweite durch Albumin blockiert und der dritte mit anti-Meerrettich-Peroxidase (engl. *anti-Horseradish-Peroxidase, anti-HRP*) beschichtet. Die Filter zwei und drei dienen als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Wird eine F1-Antigen-haltige Probe auf die Säule geladen, wird das Antigen durch spezifische Antikörper auf dem ersten Filter gefangen. Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers, der mit PolyHRP gekoppelt ist, wird der Immuno-Komplex vervollständigt. Zur Quantifizierung des Sandwich-Komplexes wird ausfällendes Tetramethylbenzidin (TMB) auf die Säule geladen. Die enzymatische Reaktion führt zu einer Blaufärbung der Filter-Oberfläche, wobei die optische Dichte proportional ist zur Konzentration von *Y. pestis* (Senova 2012).

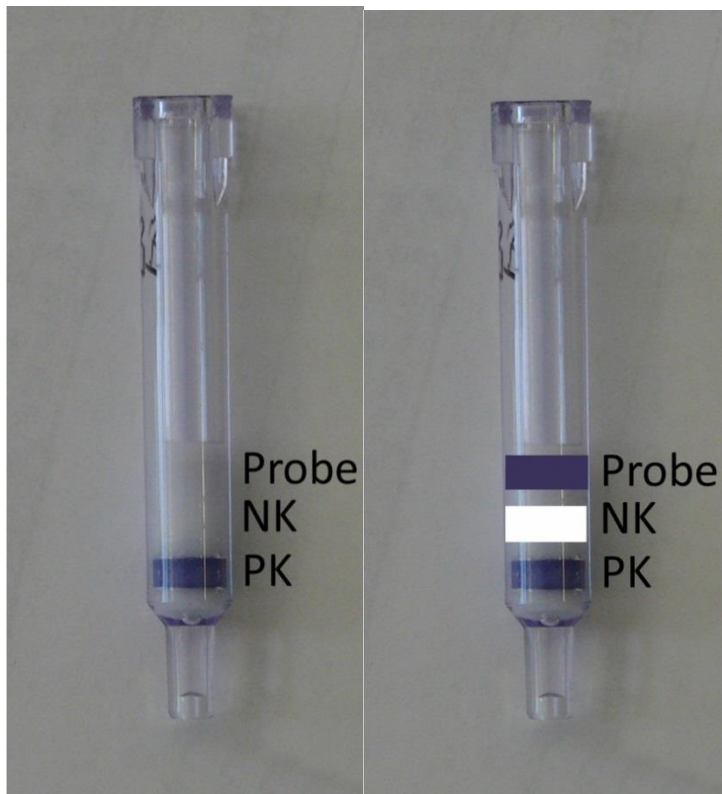


Abbildung 21: Negatives (links) und positives (rechts; Montage) Ergebnis des ABICAP®-Tests im Vergleich. Nach Ende der Test-Laufzeit von 30 Minuten zeigt lediglich eine Verfärbung im Bereich der Positivkontrolle (PK) ein negatives Ergebnis an (links), eine zusätzliche Verfärbung im Bereich der Probe ein positives (rechts). Die Negativkontrolle (NK), die die beiden potentiell positiven Ergebnisse voneinander abgrenzt, bleibt unverfärbt.

Die Schnelltests miPROTECT® und BioThreat Alert™ sind ähnlich in Prinzip und Anwendung. Für beide stellen die Hersteller zudem wenig Informationen bereit. miPROTECT® ist ein Schnelltest zum Nachweis biologischer Kampfstoffe in Umweltproben (miprolab). Laut Produktinformation nutzt der Tetracore-Test eine Kombination aus mono- und polyklonalen Antikörpern, die durch eine flüssige Probe rehydriert werden. Eine positive Probe reagiert mit dem Antigen-spezifischen markierten Antikörper-Konjugat und bildet eine Linie aus (Tetracore). Bei beiden Tests wurden 100 µl der Probe in eine Öffnung der Testkassette aufgetragen, die Lösung wanderte aufgrund von Kapillarkräften entlang der Membran in der Kassette und nach 15 (Tetracore) bzw. 20 Minuten (miprolab) wurde das Ergebnis abgelesen (siehe Abbildung 22; Tetracore; miprolab).

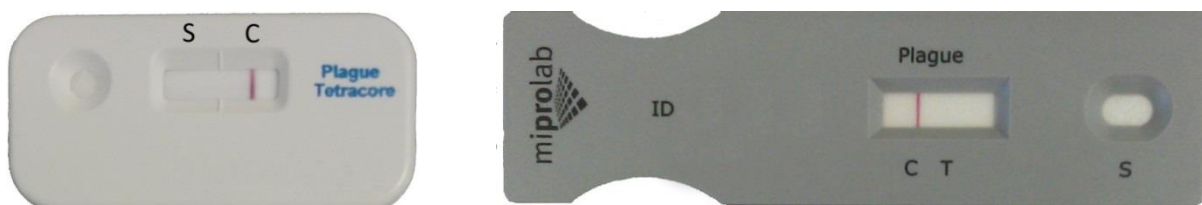


Abbildung 22: BioThreat Alert- (Tetracore; links) und miPROTECT-Tests (miprolab; rechts) zum Nachweis des *Yersinia pestis* spezifischen F1-Antigens. Die Probe wird in das Proben-Fenster pipettiert („S“ bei miprolab; ungekennzeichnet bei Tetracore) und wandert aufgrund von Kapillarkräften entlang der Membran in der Testkassette zu den Detektionsfenstern. Nach wenigen Minuten erscheint im Auslesefenster der Kontrollregion (C) eine Linie. Enthält die aufgebrauchte Lösung F1-Antigen, so erscheint im Bereich der Testregion („S“ bei Tetracore, „T“ bei miprolab) eine weitere Linie. Ist die Lösung negativ für das Antigen, erscheint keine weitere Linie. Tests sind nur gültig bei Erscheinen einer Linie im Kontrollfenster, die den korrekten Ablauf des Tests signalisiert.

Der am Institut Pasteur in Madagaskar produzierte „rapid diagnostic test“ (RDT) für Pest basiert auf einer einstufigen vertikalen Immunodurchflusschromatographie (Bianucci *et al.* 2008) und nutzt zwei monoklonale Antikörper (Mab B18-1 und Mab G6-18), die an zwei Epitope des F1-Antigens binden. Als Kontrollstreifen dient ein Ziege-anti-Maus-Immunglobulin G (engl. goat anti-mouse IgG). Der Teststreifen wird in einem Einweg-Falcon durchgeführt, nachdem 200 µl des Protein-Extrakts vorgelegt worden sind (Chanteau *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund der geringen Menge der erhaltenen Protein-Extrakte jedoch nur 150 µl eingesetzt werden. Nach zehn bis 15 Minuten wurde ausgewertet (Chanteau *et al.* 2003).

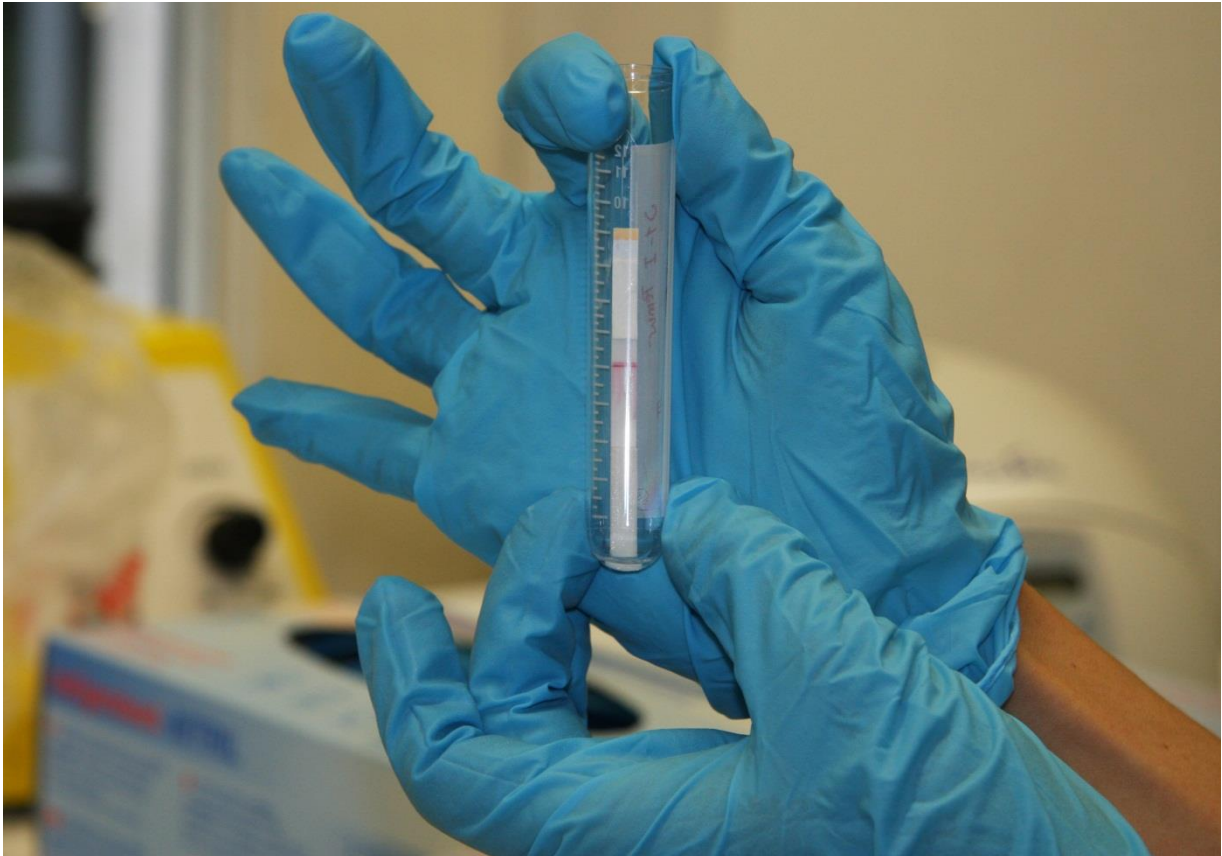


Abbildung 23: Bei dem am Institut Pasteur in Madagaskar produzierten RDT zeigt eine Kontrolllinie (rosa im Bild zu sehen) die korrekte Durchführung des Tests und durch das Fehlen einer zweiten Linie darunter ein negatives Ergebnis an.

V Ergebnisse

Nach der Beschreibung der Ergebnisse der verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden (Abschnitt 1) werden in diesem Kapitel die molekulargenetischen Resultate (Abschnitt 2) und die Ergebnisse der F1-Detektion (Abschnitt 3) vorgestellt.

1 Wahl der Extraktionsmethode

Um die geeignetste Extraktionsmethoden zu ermitteln (siehe Kapitel Methoden, Abschnitte 2.3.1 bis 2.3.4), wurden die erhaltenen aDNA-Extrakte in qPCRs auf den Genort *pla* eingesetzt und die erhaltenen CP-Werte sowie die kalkulierten *pla*-Kopien-Anzahlen miteinander verglichen (siehe Tabelle 18). Bewertet wurde jeweils der erste Lauf eines Extrakts in der *pla*-PCR mit 2 µl und in einem Fall 4 µl DNA-Einsatz. Der Einsatz von 4 µl war notwendig, da unter Verwendung von lediglich 2 µl kein positives Resultat erhalten werden konnte.

Tabelle 18: Vergleich der Effizienz verschiedener Extraktionsmethoden durch den Einsatz der erhaltenen DNA in qPCRs auf den Genort *pla*. *Zum Erhalt dieses qPCR-Ergebnisses wurden 4 µl statt 2 µl aDNA eingesetzt. Methode 1 = modifiziertes Protokoll laut Wiechmann & Grupe (2005), basierend auf Yang *et al.* (1998); Methode 2 = Rohland & Hofreiter (2007a, 2007b); Methode 3 = Rohland *et al.* (2010) und Rohland & Hofreiter (2007a); Methode 4 = QIAamp[®] DNA Investigator-Kit (Qiagen 2010b)

Individuum	Methode	gerundete CP-Werte des ersten gemessenen <i>pla</i> -qPCR-Laufs	kalkulierte <i>pla</i> -Kopien-Anzahl
MP17-I	1	28	919
	2	34	14
	3	29	420
	4	37*	1
MP26-I	1	neg	-
	2	neg	-
	3	neg	-
	4	n. t.	
MP59-I	1	32	44
	2	neg	-
	3	36	3
	4	38*	≤ 1
MPS1-I	1	36	3
	2	>40	≤ 1
	3	37	2
	4	n. t.	
B2	1	37*	≤ 1
	2	neg	-
	3	neg	-
	4	n. t.	

Es zeigt sich, dass bei den drei mehrfach *pla*-positiven Proben MP17-I, MP59-I und MPS1-I unter Verwendung von Methode 1 durchgängig die niedrigsten CT-Werte erreicht werden, was Ziel der Versuche war. Die CT-Werte von Methode 3 sind bei diesen Proben etwas schlechter als bei Methode 1 und nach Methode 2 nochmals höher bzw. nicht vorhanden (MP59-I nach Methode 2). Abgegrenzt von den ersten drei Extraktionsmethoden ist das vierte, Kit-basierte Verfahren zu bewerten, da hier aufgrund ungenügenden Zahnmehl nicht mehr alle Proben eingesetzt werden konnten. Die CT-Werte der beiden eingesetzten Proben (MP17-I und MP59-I) sind hier nochmals höher als bei den drei bereits genannten Extraktionsmethoden. Bei Probe MP26-I war unabhängig von der Extraktionsmethode nie das gesuchte Genfragment nachweisbar. In Probe B2 konnte nur bei einem Einsatz von 4 µl DNA in die Amplifikations-Reaktion ein CT-Wert ermittelt werden.

Die kalkulierte *pla*-Kopien-Anzahl korreliert mit den CT-Werten. Niedrige CT-Werte entsprechen einer hohen Anzahl von *pla*-Kopien, hohe einer niedrigen. Die höchste Kopien-Anzahl wurde in dieser Testreihe mit 919 Kopien nach Methode 1 in Probe MP17-I detektiert. Die niedrigsten Werte liegen bei ≤ 1 in allen Proben nach allen Extraktions-Verfahren.

2 Molekulargenetische Resultate

In dieser Arbeit wurden insgesamt 29 PCR-Assays etabliert (Abschnitt 2.1), mittels derer 234 Extrakte aus historischem Skelettmaterial untersucht wurden (Abschnitt 2.2).

2.1 PCR-Optimierungen

Zu Beginn der PCR-Optimierungen stand das Austesten, welchen Effekt das Poolen von Erst- und Zweiteluaten auf das PCR-Ergebnis hat. Diese Ergebnisse zeigt Abschnitt 2.1.1. Im darauf folgenden Abschnitt 2.1.2 wird der Nutzen des REPLI-g-Kits beschrieben. Zuletzt werden die Effekte der molekulargenetischen Protokolle dargestellt (Abschnitt 2.1.3 bis 2.1.6), bevor diese in Abschnitt 2.1.7 tabellarisch dargestellt werden.

2.1.1 Auswirkung des Poolens von Extrakten

In dieser Arbeit wurden versuchsweise jeweils Erst- und Zweiteluat der nach Extraktionsmethode 2 (Versuch 1) extrahierten Proben MP17-I und MPS1-I gepoolt, um die DNA-Konzentration zu erhöhen. In nachfolgenden qPCRs auf den Genort *pla* wurde die Auswirkung durch den Vergleich der CT-Werte vor und nach dem Vermischen der beiden Eluate eruiert (Tabelle 19). Anhand des niedrigeren CT-Werts zeigt sich, dass bei Probe MP17-I das Poolen zur Verbesserung des CTs führt, wohingegen bei MPS1-I kein Amplifikat mehr detektiert wird. Allerdings verbessert sich der CT-Wert bei MP17-I nur geringfügig in einem Maße, dass die messbare Veränderung auch durch Pipettier-Ungenauigkeiten bedingt sein kann.

Tabelle 19: Einfluss des Poolens von Extrakten auf CT-Werte in qPCRs auf den Genort *pla*. PCRs wurden jeweils mit 2 μ l DNA-Einsatz durchgeführt, die nach Extraktionsmethode 2 erhalten wurden. (1) und (2) kennzeichnen Erst- bzw. Zweiteluat, (1+2) den gepoolten Extrakt. Die CT-Werte der ersten PCR zeigen Ergebnisse vor dem Erstellen von DNA-Pools an. Zudem wurden unmittelbar vor dem Poolen der Extrakte Aliquots des jeweiligen Erst- bzw. Zweiteluats in die zweite PCR eingesetzt, um diese unter den gleichen Bedingungen zu amplifizieren wie die DNA-Pools.

Probe (Eluat)	CT-Wert 1. PCR	CT-Wert 2. PCR
MP17-I (1)	33,72	32,07
MP17-I (2)	32,69	33,61
MP17-I (1+2)	-	31,99
MPS1-I (1)	> 40	38,76
MPS1-I (2)	37,92	-
MPS1-I (1+2)	-	-

2.1.2 Bedeutung des REPLI-Kits

Unter Zuhilfenahme des REPLI-g-Kits (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.4.4.1) wurde in dieser Arbeit versucht, die gesamte vorhandene DNA in elf aDNA-Extrakten zu vervielfältigen. Tabelle 20 zeigt den via qPCRs auf das *pla*-Gen gemessenen Erfolg des Kits in Form von CT-Werten der behandelten Extrakte im Vergleich zu CT-Werten von nicht mit REPLI-g behandelten aDNA-Extrakten an. Nur in einem Fall (Probe MP17-I) war nach Einsatz des Kits überhaupt ein DNA-Amplifikat nachweisbar. In den anderen zehn Fällen konnte kein *pla*-Gen-Fragment mehr detektiert werden, obwohl einige der Extrakte zuvor nachweislich die Sequenz enthalten hatten (siehe auch Anhang 5).

Tabelle 20: Vergleich der CT-Werten von Extrakten vor und nach Einsatz des REPLI-g-Kits. Angegeben ist jeweils der erste qPCR-Lauf mit positivem Ergebnis. Soweit nicht anders vermerkt wurden in die qPCRs vor Einsatz des REPLI-g-Kits 2 µl DNA eingesetzt.

Probe (Eluat)	CT-Wert in qPCR nach REPLI-g	CT-Wert in qPCR vor REPLI-g
B1 (1)	-	38,1
B2 (1)	-	36,6 (4 µl)
A119 (1)	-	-
A166 (1)	-	> 40
A60 (1)	-	-
B3 (1)	-	34,7
A120 (8)	-	35,95
A58 (2)	-	39,04
A72 (1)	-	-
MPS1-I (1)	-	37,34
MP17-I (1)	35,55	27,54

2.1.3 PCR-Assays zur *pla*-Detektion

Konventionelle *pla*-PCR

Abbildung 24 zeigt das Gelbild des fertig optimierten PCR-Assays zur Detektion von *pla* auf konventionellem Weg. Dieser Assay erfüllt die an ihn gestellten Anforderungen. Er verfügt über ein geringes Detektionsniveau von einer Kopie, die DNA-Banden auf dem Gelbild sind sauber und in den Spuren mit den Knochen-Matrizes treten keine als Leitern sichtbare unspezifischen Produkte auf.

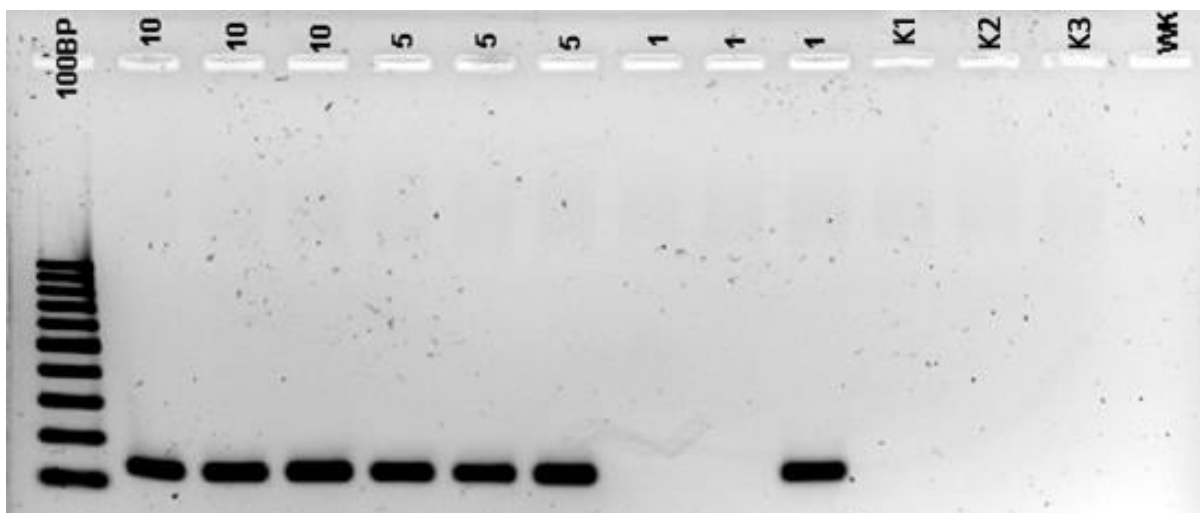


Abbildung 24: Gelbild des optimierten konventionellen PCR-Assays zur Detektion von *pla*. Das Produkt ist 133 bp groß. K1 bis K3 bezeichnen *Yersinia pestis*-negative Proben von einem neuzeitlichen Friedhof, in der vorliegenden Arbeit „Knochenmatrix“ genannt. Als Größenstandard ist links eine 100 bp-Leiter (Fermentas) aufgetragen.

Zudem wurde durch eine Probit-Analyse das Detektionsniveau der konventionellen *pla*-PCR ermittelt (berechnet durch Dr. Markus Antwerpen vom IMB; siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.4.4.1). Es liegt bei 4,24 Kopien mit einem Konfidenzintervall von 95 Prozent von 2,97 bis 8,28 Kopien.

Das optimierte Protokoll des konventionellen *pla*-Assays findet sich in Abschnitt 2.1.7 in diesem Kapitel.

Real Time-basierte *pla*-PCR

Ebenso aufwendig wie das konventionelle Assay zur Detektion des *pla*-Gens wurde die Real Time-basierte PCR zum Nachweis desselben Locus validiert. Die einzelnen Schritte sind Anhang 6 zu entnehmen. Ziel war, eine PCR zur *pla*-Detektion bei einem frühen CT-Wert zu entwickeln. Die Effekte der verschiedenen Optimierungsschritte zeigt Abbildung 25.

Der Platinum® Quantitative PCR SuperMix von Invitrogen führte deutlich zu den frühesten CT-Werten unter den fünf getesteten Mastermix-Chemien. Beim Titrieren von MgCl₂ zeigte eine Konzentrationen von 6 mM den größten Erfolg. Hinsichtlich der Annealing-Temperatur wurden weitere Experimente bei 60 °C durchgeführt. Bei einer Konzentration von 0,25 µM je Primer bzw. 0,1 µM Sonde wurden im Vergleich mit den Kontroll-Experimenten die frühesten CT-Werte erreicht. Das Titrieren von BSA verdeutlichte einen Trend: je mehr BSA, desto niedriger ist der CT-Wert in Läufen mit künstlichem *pla*-Konstrukt. Allerdings traten ab einer Konzentration von 4 mg/ml des PCR-Beschleunigers inhibitorische Effekte auf.

Nach Ende der Validationsarbeiten des Real Time-basierten PCR-Assays zur *pla*-Detektion wurde durch das Anfertigen einer Verdünnungsreihe in Triplikaten von 10.000 bis zu einer Kopie des künstlichen *pla*-Konstrukts die Linearität der PCR ermittelt. Abbildung 26 zeigt einen linearen Verlauf. Der R²-Wert der *pla*-qPCR liegt er bei 0,9948. Der R²-Wert einer Standardkurve sagt aus, wie gut experimentelle Daten zur Regressionsgeraden passen, also wie linear die Daten sind (Bio-Rad Laboratories 2006). Maximal möglich ist ein Wert von 1. Anzustreben ist ein R²-Wert von über 0,980 (Bio-Rad Laboratories 2006). Die Effizienz dieser PCR ist 1,953, was sehr nahe am idealen Amplifikations-Wert von 2 liegt. Ein Wert von 2 sagt aus, dass sich pro Zyklus die DNA verdoppelt (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.1). Dieser Wert ist jedoch nur theoretisch möglich, in der Realität weicht er aus einer Vielzahl von Gründen von diesem ab (McPherson & Møller 2006).

Das optimierte Protokoll des Real Time-basierten *pla*-Assays findet sich in Abschnitt 2.1.7 in diesem Kapitel.

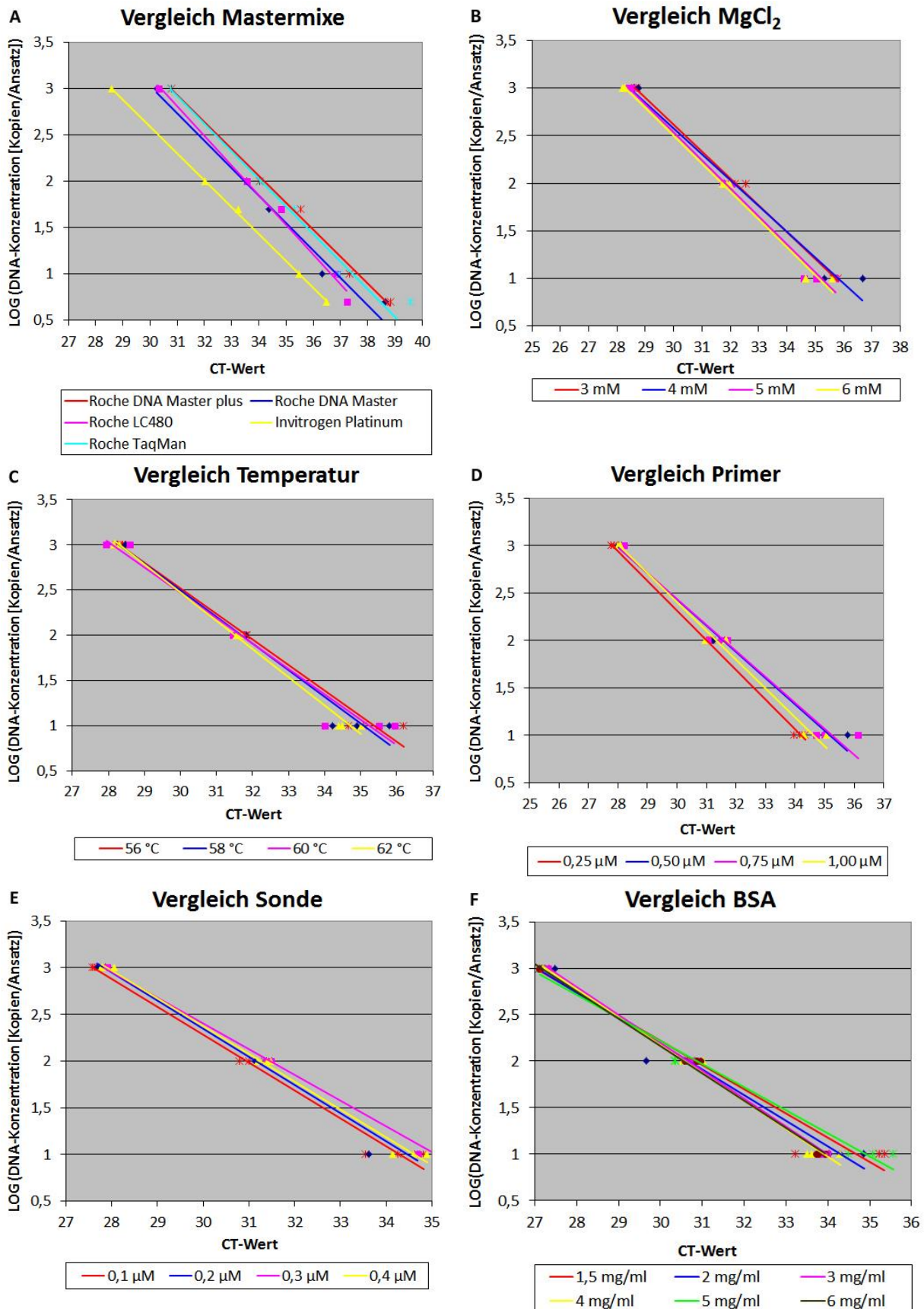


Abbildung 25: Effekte verschiedener Schritte zur Optimierung eines qPCR-Assays für die Detektion des *pla*-Gens. Gezeigt ist das Verhalten der PCR bei Verwendung von fünf verschiedenen Mastermixen (Bild A), bei verschiedenen Temperaturen (Bild C), bei Titration von Magnesiumchlorid (Bild B), Primern (Bild D), Sonde (Bild E) und BSA (Bild F). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind bei den Einzel-Abbildungen D (Primer), E (Sonden) und F (BSA) nur ausgewählte Konzentrationsstufen gezeigt. Als Template-DNA eingesetzt wurden verschiedene Kopien-Anzahlen des künstlichen *pla*-Konstrukts. Roche DNA Master plus = LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes (Roche, Mannheim, Deutschland), Roche DNA Master = LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche, Mannheim, Deutschland), Roche LC480 = LC480® Probe Master (Roche, Mannheim, Deutschland), Invitrogen Platinum = Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with Rox (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), Roche TaqMan = LightCycler® TaqMan Master (Roche, Mannheim, Deutschland).

Position Platte	DNA-Konzentration [Kopien/Reaktion]	CP- Wert
A2	10000	24.48
A3	10000	24.52
A4	10000	24.54
A5	1000	27.79
A6	1000	27.88
A7	1000	27.75
A8	750	28.23
A9	750	28.25
A10	750	28.27
B2	500	28.79
B3	500	29.01
B4	500	28.87
B5	250	29.96
B6	250	29.99
B7	250	29.88
B8	100	30.90
B9	100	31.14
B10	100	31.59
C2	75	31.69
C3	75	31.69
C4	75	31.71
C5	50	31.64
C6	50	32.00
C7	50	32.69
C8	25	32.35
C9	25	33.51
C10	25	33.93
D2	10	34.75
D3	10	34.51
D4	10	34.99
D5	5	35.26
D6	5	36.57
D7	5	35.63
D8	1	37.60
D9	1	negativ
D10	1	36.56

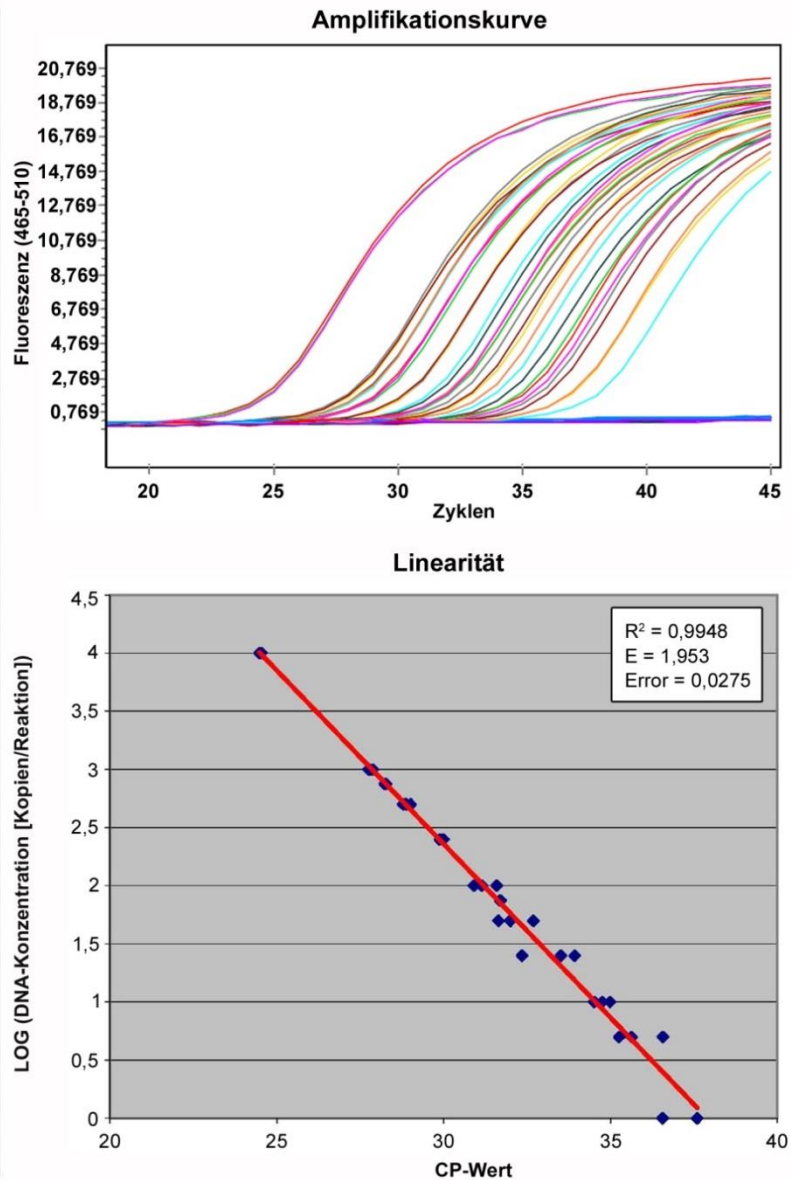


Abbildung 26: Linearität des Real Time-basierten PCR-Assays zur *pla*-Detektion. **A** Dargestellt sind die von der PC-Software automatisch ausgegebenen CP-Messwerte der qPCR je Well. Die PCR wurde je Verdünnungsstufe in Triplikaten durchgeführt. **B** Das Bild zeigt die zu den Werten in Bild A dargestellten korrespondierenden Amplifikations-Kurven. **C** Der Graph zeigt die Linearität der qPCR von 10.000 *pla*-Kopien bis hinunter zu einer.

Abbildung mit leichten Modifikationen aus Seifert *et al.* (2013) mit Genehmigung der Autoren

Die Spezifität beider *pla*-Assays wurde getestet, indem jeweils 1 ng DNA der Bakterien des Spezifität-Panels in die PCRs eingesetzt wurde. Tabelle 21 zeigt, dass beide PCRs nur das *pla*-Gen detektieren, wenn ein *Y. pestis*-Isolat vorliegt.

Tabelle 21: Spezifität beider *pla*-PCR-Assays. Die Spezifität des konventionellen wie des Real Time-basierten *pla*-Assays wurde durch das Einsetzen von DNA verschiedener Bakterien getestet. Prozessiert wurden 22 *Y. pestis*-Stämme, 30 bestätigte klinische Humanproben (Riehm *et al.* 2011), 41 klinisch relevante Bakterien und 29 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme.

b. k. P. = bestätigte klinische Probe

Art	Biovar/Biotyp	Herkunft	<i>pla</i> -qPCR	konventionelle <i>pla</i> -PCR
<i>Y. pestis</i>	Pestoides	G8786 Georgia	+	+
<i>Y. pestis</i>	Antiqua 1.ANT	Margaret	+	+
<i>Y. pestis</i>	Antiqua 1.ANT	CEB87-021 (343)	+	+
<i>Y. pestis</i>	Antiqua 1.ANT	NCTC_570 Bombay267	+	+
<i>Y. pestis</i>	Antiqua 1.ANT	NCTC_10029 13925/58	+	+
<i>Y. pestis</i>	Antiqua 2.ANT	Kuma	+	+
<i>Y. pestis</i>	Antiqua 2.ANT	Yokohama	+	+
<i>Y. pestis</i>	Antiqua	Kenya 129	+	+
<i>Y. pestis</i>	Medievalis	KIM	+	+
<i>Y. pestis</i>	Medievalis	Pestis Kurdistan Rodent 24	+	+
<i>Y. pestis</i>	Medievalis	Pestis Kurdistan Rodent 28	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	EV76, vaccine strain	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	NCTC_2028	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	NCTC_8775 139L	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	CEB02-417, Vietnam	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	Java10	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	K120-43 87/30	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	CEB02-107 (6/69)	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	Bara Banki 3	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	CEB02-455	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	M23	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	TS	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M401	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M402	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M403	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M404	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M406	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M407	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M408	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M409	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M410	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M411	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M412	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M413	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M414	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M415	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M418	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M421	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M422	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M423	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M424	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M425	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M426	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M427	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M429	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M431	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M432	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M433	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M435	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M437	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M438	+	+
<i>Y. pestis</i>	Orientalis	b. k. P., Madagaskar, M439	+	+

Fortsetzung Tabelle 21

Art	Biovar/Biotyp	Herkunft	pla-qPCR	konventionelle pla-PCR
<i>Acinetobacter baumannii</i>		DSM 7324	-	-
<i>Bacillus anthracis</i>		Vollum	-	-
<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 10987	-	-
<i>Bacillus globigii</i>		DSM 7264	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>		DSM 2046	-	-
<i>Brucella melitensis</i>		ATCC 23456	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>		NCTC 10744	-	-
<i>Burkholderia mallei</i>		ATCC_23344	-	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		ATCC_23343	-	-
<i>Burkholderia thailandensis</i>		DSM 13276	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>		ATCC 29482	-	-
<i>Candida albicans</i>		ATCC 36232	-	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>		ATCC 53592	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>		DSM 30039	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>		ATCC 12915	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>		DSM 795	-	-
<i>Coxiella burnetii</i>		Nine Mile	-	-
<i>Eikenella corrodens</i>		DSM 8340	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>		DSM 30053	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>		DSM 2570	-	-
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 11303	-	-
<i>Francisella tularensis</i>	ssp. <i>holarctica</i>	Isolat aus einem Patienten	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>		ATCC 10211	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 13883	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>		NCTC 10332	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>		DSM 12464	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>		DSM 9143	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		Isolat aus einem Patienten	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>		Isolat aus einem Patienten	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>		DSM 1897	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>		DSM 788	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC10145	-	-
<i>Salmonella typhi</i>		Isolat aus einem Patienten	-	-
<i>Serratia marcescens</i>		DSM 1636	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>		Isolat aus einem Patienten	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Toxin B-positiv	DSM 19041	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		DSM 1798	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		ATCC 5131	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		DSM 20566	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>		DSM 20565	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>		ATCC 15748	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y003	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y004	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y005	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y076	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y077	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y078	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y080	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y130	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y225	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y227	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y239	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y241	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y248	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y252	-	-

Fortsetzung Tabelle 21

Art	Biovar/Biotyp	Herkunft	<i>pla</i> -qPCR	konventionelle <i>pla</i> -PCR
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y259	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y260	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y250	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y428	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y711	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y716	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y718	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y719	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y724	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y728	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y731	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y732	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y734	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y735	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		Y781	-	-

Zudem wurde durch eine Probit-Analyse das Detektionsniveau der *pla*-qPCR ermittelt (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.4.4.1). Es liegt bei 3,62 Kopien mit einem Konfidenzintervall von 95 Prozent von 2,45 bis 8,28 Kopien.

2.1.4 Real Time basiertes Assay zur HLA-Detektion

Etwas weniger ausführlich, da nur ein Nebenaspekt der Arbeit, wurde das Assay zur Detektion des HLA-Lokus optimiert. Die einzelnen Schritte sind Anhang 7 zu entnehmen. Ziel war, eine PCR zu optimieren, die einen möglichst niedrigen CT-Wert liefert. Die Effekte verschiedener Optimierungsschritte zeigt Abbildung 27.

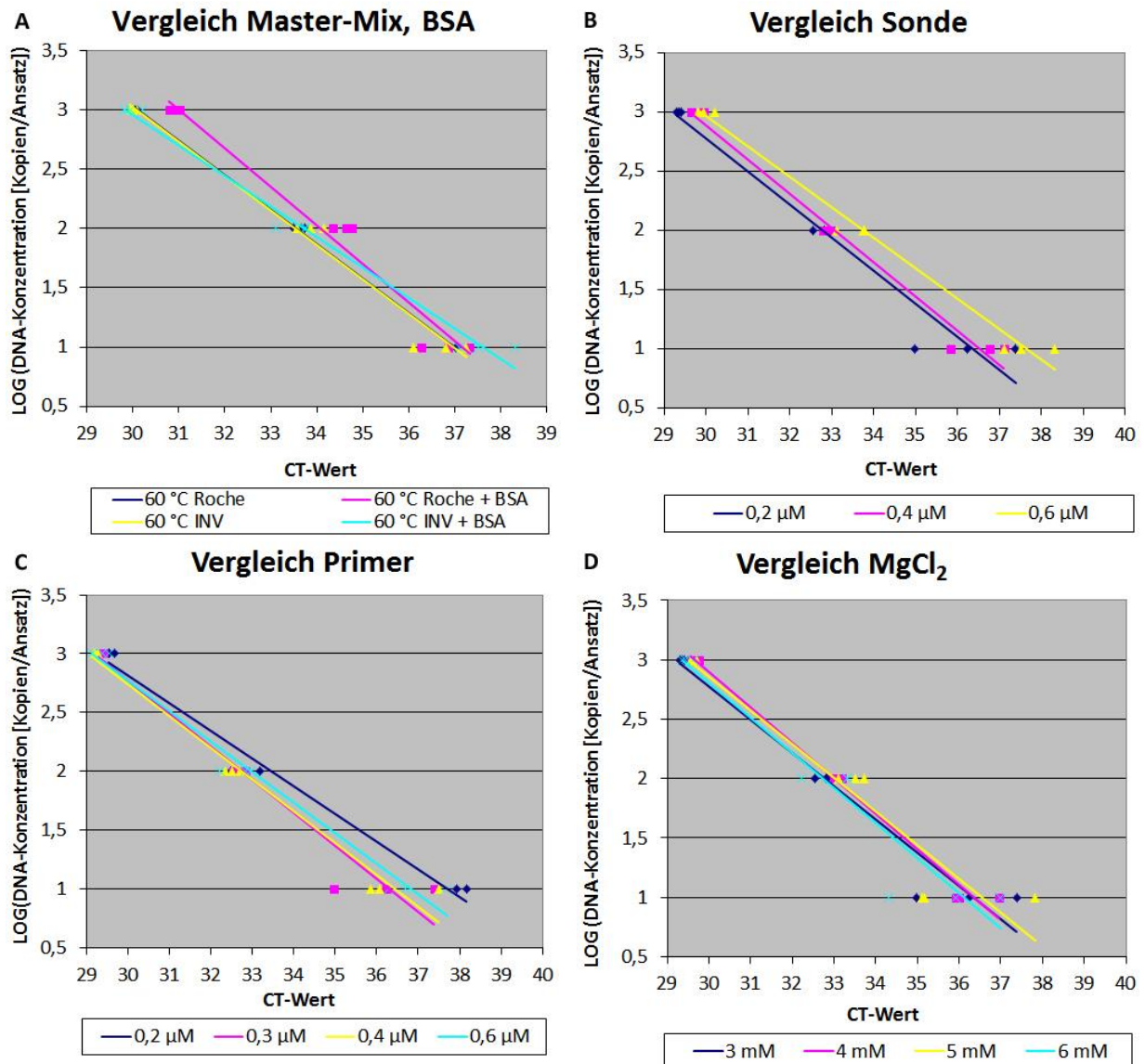


Abbildung 27: Effekte verschiedener Schritte zur Optimierung eines qPCR-Assays für die Detektion des *HLA*-Gens. Gezeigt ist das Verhalten der PCR bei Verwendung zweier verschiedener Mastermix-Chemien (Bild A), bei Titration der Sonde (Bild B), der Primer (Bild C) und von Magnesiumchlorid (Bild D). Als Template-DNA wurden verschiedene Kopien-Anzahlen des künstlichen *HLA*-Konstrukts eingesetzt.

Roche = LightCycler® FastStart DNA Master Hybridisation Probes (Roche, Mannheim, Deutschland), INV = Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with Rox (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland)

Die Mastermix-Chemie von Invitrogen (Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG) erreicht im Vergleich mit dem entsprechenden Produkt von Roche (Kit Roche LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes) einen früheren CT-Wert. Die Zugabe von BSA hat dabei keinen negativen Einfluss, die Reaktion verhält sich mit und ohne Enzym identisch. Der Einsatz von 0,2 µM Sonde liefert die besten CT-Werte, auch wenn die Amplitudenhöhe gegenüber den anderen Konzentrationen geringer ausfällt. Höhere Sonden-Konzentrationen führen zu schlechteren CT-Werten. Hinsichtlich der Konzentration des zugesetzten Magnesiumchlorids (MgCl₂) zeigen sich kaum Unterschiede. Da 6 mM MgCl₂ bereits im Mastermix von Invitrogen enthalten sind, was in einem 20 µl-Ansatz bei Verwendung von 10 µl Mastermix nach Formel 1 einer MgCl₂-Konzentration von 3 mM entspricht, wurde aus praktikablen Gründen mit dieser Konzentration fortgefahren.

$$K_{\text{End}} = \frac{V_{\text{St}} \cdot K_{\text{St}}}{V_{\text{An}}} = \frac{10 \mu\text{l} \cdot 6 \text{ mM}}{20 \mu\text{l}} = 3 \text{ mM}$$

Formel 1: Allgemeine Formel zur Berechnung der Endkonzentration einer Substanz angewandt auf die Ermittlung der MgCl_2 -Konzentration in einem PCR-Ansatz von 20 μl Volumen. K_{End} = End-Konzentration, V_{St} = Volumen der Stammlösung, K_{St} = Konzentration der Stammlösung, V_{An} = Volumen des Ansatzes

Die Verwendung von jeweils 0,3 μM Primer führt durchgängig zu einem niedrigeren CT-Wert als 0,4 μM , wenngleich auch hier die Unterschiede marginal sind. Größer sind die Differenzen im Vergleich zu den anderen beiden Vergleichskonzentrationen.

Zudem wurde durch eine Probit-Analyse das Detektionsniveau der *HLA*-qPCR ermittelt (berechnet durch Dr. Markus Antwerpen vom IMB; siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.4.1). Es liegt bei 12,19 Kopien mit einem Konfidenzintervall von 95 Prozent von 8,94 bis 21,08 Kopien.

Das optimierte Protokoll des Real Time-basierten *HLA*-Assays findet sich in Abschnitt 2.1.7 in diesem Kapitel.

2.1.5 Konventionelle PCR-Assays zur Typisierung

Die PCR-Assays zur Detektion von *napA*, *pPCP1*, *caf1-II*, s13, s14, s89, s463, s660, s920, s955, s1023, s1119 und s1195 waren bereits nach dem ersten Lauf fertig etabliert (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.4.1.2; siehe Anhang 8). Standen bei Assays bedingt durch die Verwendung zweier Primer-Paare zwei PCRs zur Wahl (s89, s463, s660, s1195), so fiel die Wahl auf die Primer, die bei möglichst niedrigem Detektionslimit und sauberer Gelbande erfahrungsgemäß am besten für eine nachfolgende Sequenzierung geeignet sind. Dies sind Fragmente einer Größe von über 100 bp.

Die übrigen PCRs wurden bei einer um 2 °C höheren Temperatur (s247, s826, s904, s1038) und anschließend oder gleich in einer Gradienten-PCR (*caf1-I*, s82, s247, s588, s826, s1038) wiederholt. In Gradienten-PCRs wurden dabei lediglich zehn Kopien in Dubletten und eine Kopie in Triplikaten zusammen mit den beiden Kontrollen gecycelt, da die vorangegangenen PCRs bereits gezeigt hatten, dass das Detektionslimit zwischen zehn und einer Kopie liegt. Die maximale Anzahl an PCR-Optimierungen belief sich somit auf vier Läufe (siehe Anhang 8).

Abbildung 28 zeigt nachfolgend exemplarisch ein Gelbild einer fertig etablierten konventionellen PCR. Diese erfüllt die anfangs gestellten Anforderungen ähnlich wie das Assay zur *pla*-Detektion bezüglich Detektionslimit, scharf abgegrenzten Banden und Abwesenheit unspezifischer Produkte in der Knochenmatrix.

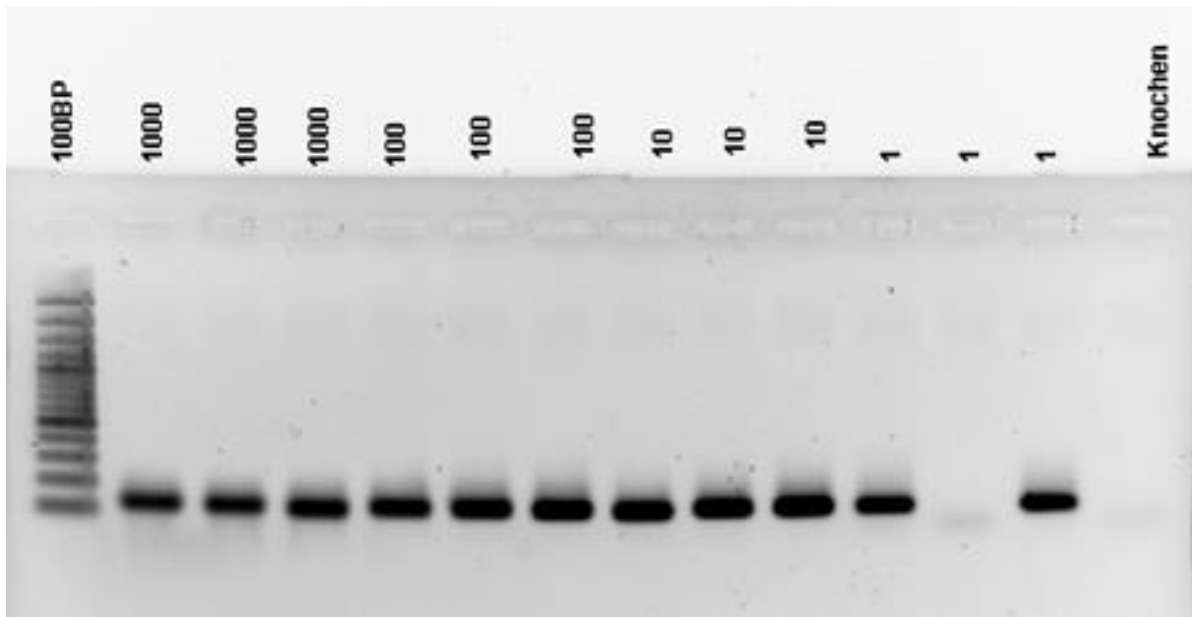


Abbildung 28: Gelbild einer Optimierung-PCR zur Detektion des SNPs s955. Das Produkt ist 122 bp groß.

Das optimierte Protokoll zur Detektion von SNPs auf konventionellem Weg findet sich in Abschnitt 2.1.7 in diesem Kapitel.

2.1.6 Real Time-basierte Assays zur Typisierung

Die Real Time-basierten PCRs zur Detektion der SNPs s12, s19, s87, s545 und *napA* wurden einzeln in mehreren Schritten validiert (siehe Anhang 9). Die Optimierung erfolgte durch die Alternierung der Konzentrationen von Reagenzien, deren Einfluss zwei Läufe zur Charakterisierung des SNPs s12 beispielhaft verdeutlichen (siehe Abbildung 29).

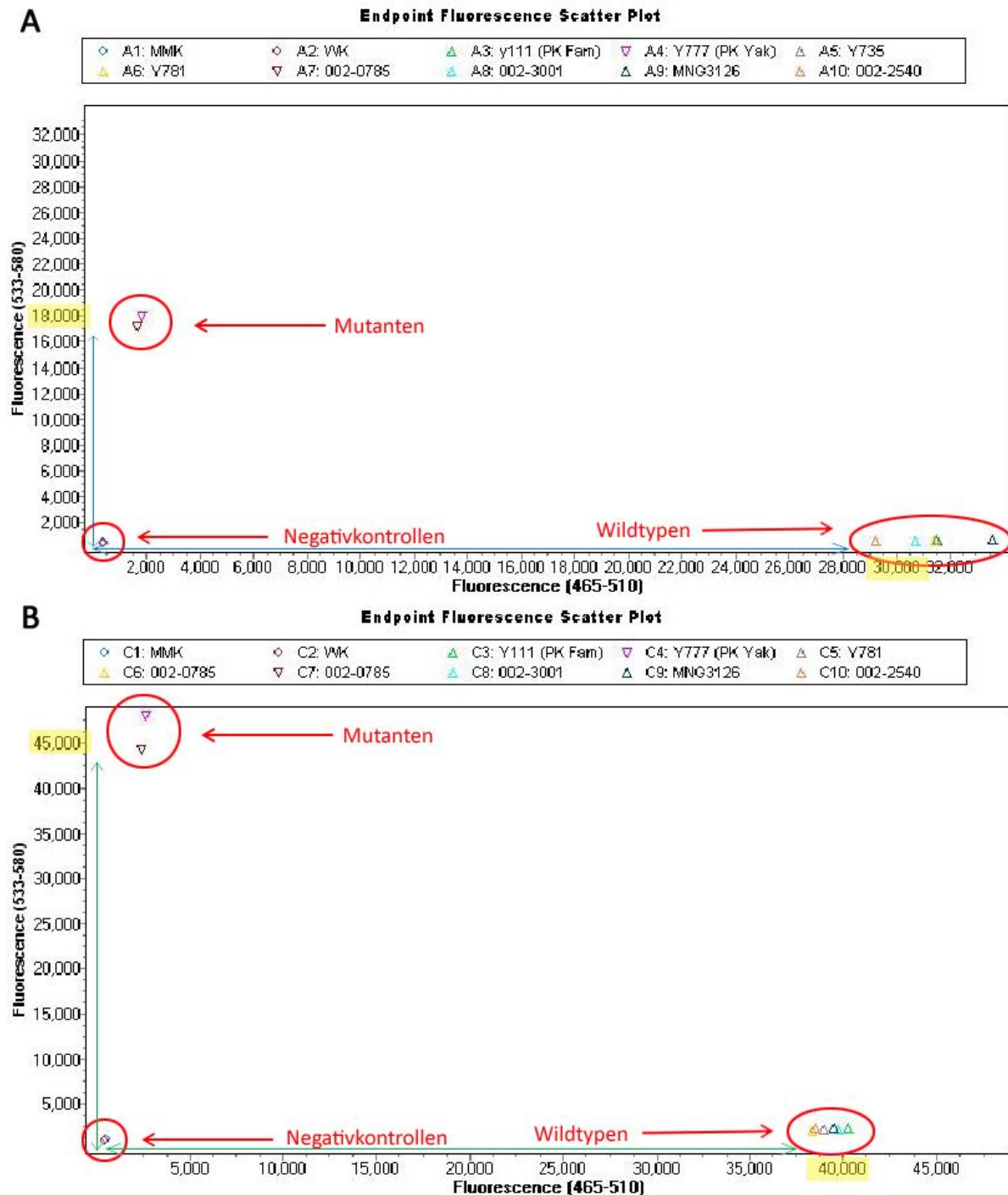


Abbildung 29: Optimiertes Assay (B) zur Typisierung von SNP s12 im Vergleich zu einem Anfangs-Experiment (A). Die Fluoreszenzen der Proben im optimierten Assay (B) erreichen im Gegensatz zu einem Vorgänger-Lauf (A) auf beiden Achsen einen nahezu gleich hohen Wert (blaue Pfeile in Bild A, grüne Pfeile in Bild B). Während die Fluoreszenzen bei Bild A bei etwa 18.000 und 30.000 Einheiten liegen, rangieren sie in Bild B bei 40.000 und 45.000 Einheiten (gelb hinterlegte Flächen in Bild A und B). Die PCR in Bild A beinhaltete 0,2 μ M jeder der beiden Sonden, die in Bild B 0,4 μ M YAK und 0,2 μ M FAM. Zudem unterscheiden sich die beiden PCRs durch die Konzentration des zugefügten $MgCl_2$. Bei PCR A sind die im Mastermix enthaltenen 3 mM zugesetzt, bei PCR B 5 mM.

Das optimierte Protokoll zur Detektion von SNPs auf Real Time-basiertem Weg findet sich in Abschnitt 2.1.7 in diesem Kapitel.

2.1.7 Optimierte PCR-Protokolle

In dieser Arbeit wurden insgesamt 29 PCR-Assays entwickelt, die auf die Anforderungen für die Analyse alter DNA optimiert sind. Nachfolgend werden alle diese Protokolle tabellarisch aufgeführt. Die Sequenzen der Primer und Sonden zur Detektion von *pla* und *HLA* befinden sich in Anhang 4. Tabelle 22 fasst für alle Typisierungs-Assays die am besten geeigneten Primer und Sonden bei ihrer jeweiligen Annealing-Temperatur und das zu erwartende Amplifikations-Produkt in- und exklusive Primer zusammen.

Tabelle 22: Eingesetzte Primer und Sonden für die optimierten Assays zur Typisierung von *Y. pestis*-DNA aus historischem Skelettmaterial. Die Sequenzen und Quellenangaben befinden sich in Anhang 4.

konv. = konventionell, q = qPCR

Branch	SNP	Assay	Bezeichnung	Konzentration von Primer/Sonde [μ M]	Amplicongröße (incl. Primer) [bp]	Amplicongröße exkl. Primer [bp]	Annealing-Temperatur [$^{\circ}$ C]
XI-3.ANT.a	s12	q	s12S	0,9	69	23	58
			s12R	0,9			
			s12 TM wt	0,2			
			s12 TM mut	0,4			
	s13	konv.	s13_fwd_IMB	0,2	122	73	56
s13_L4			0,2				
	s14	konv.	s14_fwd_IMB	0,2	121	76	56
			s14_U1	0,2			
	s247	konv.	s247_fwd	0,2	123	85	60
			s247_rev_IMB	0,2			
	s920	konv.	s920_fwd_mo	0,2	117	70	56
			s920_rev_IMB	0,2			
	s588	konv.	s588_fwd_IMB	0,2	122	81	62
			s588_rev_mo	0,2			
	s1119	konv.	s1119_fwd_IMB	0,2	131	75	56
			s1119_rev_IMB	0,2			
	s955	konv.	s955_fwd_mo	0,2	122	71	56
			s955_rev_IMB	0,2			
	s904	konv.	s904_fwd_IMB	0,2	125	84	56
			s904_rev_mo	0,2			
	s1038	konv.	s1038_fwd_IMB	0,2	127	71	62
			s1038_rev_IMB	0,2			
	s826	konv.	s826_fwd_IMB	0,2	120	76	64
			s826_rev	0,2			
	s1195	konv.	s1195_fwd_mo	0,2	126 (CO92) 174 (Proben)	76 (CO92) 118 (Proben)	56
			s1195_rev4_IMB	0,2			
	s1023	konv.	s1023_fwd_mo	0,2	120	69	56
			s1023_rev_IMB	0,2			

Fortsetzung Tabelle 22:

Branch	SNP	Assay	Bezeichnung	Konzentration von Primer/Sonde [μ M]	Amplicongröße (incl. Primer) [bp]	Amplicongröße exkl. Primer) [bp]	Annealing-Temperatur [$^{\circ}$ C]	
XI-3.ANT.a	s660	konv.	s660_fwd_mo	0,2	116	66	56	
			s660_rev	0,2				
3.ANT.a-0.ANT3.a	s545	q	s545 F	0,9	76	28	62	
			s545 A	0,9				
			s545 TM wt	0,4				
			s545 TM mut	0,45				
3.ANT.a-VIII	s19	q	s19S	0,9	78	38	58	
			s19A	0,9				
			s19TM mut	0,4				
			s19TM wt	0,3				
pPCP1	<i>pPCP1</i>	konv.	pPCP_fwd_IMB	0,2	135	89	58	
			pPCP_rev_IMB	0,2				
pMT1	<i>caf1-I</i>	konv.	caf1 F1	0,2	161	111	64	
			caf1 R1	0,2				
	<i>caf1-II</i>	konv.	YP caf A	0,2	177	135	58	
			L2	0,2				
VI-III	s82	konv.	s82_IMB_fwd_1	0,2	164	119	64	
			s82_IMB_rev_1	0,2				
VI-III	s463	konv.	s463_fwd_Mo	0,2	132	91	60	
			s463_rev_IMB alt	0,2				
VII-VI	s87	q	s87-f	0,2	95 (qPCR)	66 (qPCR)	56	
			s87-rev-seq	0,2				
			s87TM mut short	0,4				
			s87TM wt short	0,2				
		konv.	s87R	0,9	115	64	62	
			s87-f	0,9				
VII-VI	s89	konv.	s89_fwd_IMB	0,2	118	78	58	
			s89_rev_IMB	0,2				
	<i>napA</i>	q	napA S	0,9			60	
			napA R	0,9				
			napA mut	0,2				
			napA wt	0,3				
			konv.	napA S	0,2	141	100	56
				napA R	0,2			

Um das *pla*-Gen mittels einer Real Time-PCR zu detektieren, wurde das in Tabelle 23 beschriebene Protokoll als optimales ermittelt.

Tabelle 23: Optimiertes PCR-Protokoll zur Detektion eines Abschnitts des *pla*-Gens mittels Real Time-PCR in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Die Tabelle zeigt PCR-Ansatz und Thermoprofil. Die Sequenzen von Primern und Sonde befinden sich in Anhang 4.
n. b. = nicht bestimmt

PCR-Ansatz			
Substanz	Hersteller	Konzentration	
Platinum® Quantitative SuperMix-UDG	Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt	1 x	
MgCl ₂	Applied Biosystems, Life technologies, Darmstadt	6 mM	
BSA	Ambion/ Life Technologies, Darmstadt	0,4 mg/ml	
Forward-Primer „Y. pest R“	TibMolbiol, Berlin	0,25 μ M	
Reverse-Primer „Y. pest F“	TibMolbiol, Berlin	0,25 μ M	
Sonde „Y. pest TM“	TibMolbiol, Berlin	0,1 μ M	
2-4 μ l Template-DNA		n. b.	
Thermoprofil			
Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
Dekontamination	1 x	50	2 Min
PCR-Aktivierung	1 x	95	10 Min
Amplifikation	45 x	95	15 Sek
		60	30 Sek
Kühlen	1 x	40	30 Sek

Als optimales konventionelles PCR-Protokoll zur Detektion eines Abschnitts des *pla*-Gens stellte sich ein 50 μ l-Ansatz zusammen mit den Cycle-Bedingungen für eine Touchdown-PCR heraus (Tabelle 24).

Tabelle 24: Optimiertes konventionelles PCR-Protokoll zur Detektion eines Abschnitts des *pla*-Gens in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Die Tabelle zeigt PCR-Ansatz und Cycle-Bedingungen für eine Touch Down-PCR. Die Sequenzen der Primer befinden sich in Anhang 4.
n. b. = nicht bestimmt

PCR-Ansatz			
Substanz	Hersteller	Konzentration	
Multiplex PCR Master Mix	Qiagen, Hilden	1x	
UDG	Roche, Mannheim	0,01 U/ μ l	
BSA	Ambion/ Life technologies, Darmstadt	0,4 mg/ml	
Forward-Primer „Y. pest F“	TibMolbiol, Berlin	0,2 μ M	
Reverse-Primer „Y. pest R2“	TibMolbiol, Berlin	0,2 μ M	
2-4 μ l Template-DNA		n. b.	
Thermoprofil			
Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
Dekontamination	1 x	25	10 Min
PCR-Aktivierung	1 x	95	15 Min
Touchdown-Zyklen	2 x	94	30 Sek
		64	30 Sek
		72	60 Sek
	2 x	94	30 Sek
		62	30 Sek
		72	60 Sek
	46 x	94	30 Sek
		60	30 Sek
		72	60 Sek
	Finale Elongation		72
Kühlen		8	bis Analyse

Um mittels qPCR einen Abschnitt des *HLA*-Genlokus zu detektieren, wurde in dieser Arbeit das in Tabelle 25 dargestellte Protokoll entwickelt. Dasselbe Protokoll wurde zur Bestimmung des Vorliegens inhibierter DNA-Extrakte verwendet.

Tabelle 25: Optimiertes PCR-Protokoll zur Detektion eines Abschnitts des *HLA*-Genlokus und zur Feststellung der Inhibition eines aDNA-Extrakts mittels Real-Time-PCR in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Die Tabelle zeigt PCR-Ansatz und Cycle-Bedingungen. Für Inhibitionstests wurden dem PCR-Ansatz zusätzlich zur alten DNA 100 Kopien des *HLA*-Konstrukts zugegeben und das Volumen des PCR-Wassers entsprechend reduziert. Die Sequenzen von Primern und Sonde befinden sich in Anhang 4.

n. b. = nicht bestimmt

PCR-Ansatz			
Substanz	Hersteller	Konzentration	
Platinum® Quantitative SuperMix-UDG	Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt	1 x	
BSA	Ambion/ Life Technologies, Darmstadt	0,4 mg/ml	
Forward-Primer „HLA fwd 2“	TibMolbiol, Berlin	0,3 μ M	
Reverse-Primer „HLA rev 2“	TibMolbiol, Berlin	0,3 μ M	
Sonde „HLA probe 1“	TibMolbiol, Berlin	0,2 μ M	
2 μ l Template-DNA		n. b.	
bei Inhibitionstest: 2 μ l <i>HLA</i> -Konstrukt		100 Kopien	
Thermoprofil			
Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
Dekontamination	1 x	50	2 Min
PCR-Aktivierung	1 x	95	10 Min
Amplifikation	45 x	95	15 Sek
		60	30 Sek
Kühlen	1 x	40	30 Sek

Für die Typisierung *pla*-positiver aDNA-Extrakte mittels Real Time-PCRs an den Loci *s12*, *s19*, *s87*, *s545* und *napA* wurde das in Tabelle 26 dargestellte Protokoll entwickelt.

Tabelle 26: Optimiertes PCR-Protokoll zur Detektion der SNPs *s12*, *s19*, *s87*, *s545* und *napA* mittels Real Time-PCR in einem Gesamtvolumen von 12 bzw. 24 μ l. Die Tabelle zeigt PCR-Ansatz und Cycle-Bedingungen. In die verschiedenen Assays werden unterschiedliche $MgCl_2$ -Konzentrationen eingesetzt: 3 mM bei *s19*, 4 mM bei *napA*, 5 mM bei *s12* und 6 mM bei *s87* und *s545*.

*Die Annealing-Temperatur muss Primer-spezifisch und die Sonden-Konzentrationen müssen Sonden-spezifisch gewählt werden; siehe dazu Tabelle 22.

n. b. = nicht bestimmt

PCR-Ansatz			
Substanz	Hersteller	Konzentration	
Platinum® Quantitative SuperMix-UDG	Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt	1 x	
BSA	Ambion/ Life Technologies, Darmstadt	0,4 mg/ml	
$MgCl_2$		3-6 mM	
Forward-Primer	TibMolbiol, Berlin	0,9 μ M	
Reverse-Primer	TibMolbiol, Berlin	0,9 μ M	
Sonde mut	TibMolbiol, Berlin	0,2-0,45 μ M*	
Sonde wt	TibMolbiol, Berlin	0,2-0,4 μ M *	
2-4 μ l Template-DNA		n. b.	
Thermoprofil			
Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
Dekontamination	1 x	50	2 Min
PCR-Aktivierung	1 x	95	10 Min
Amplifikation	50 x	95	10 Sek
		58-62*	1 Min
Kühlen	1 x	40	30 Sek

Zur Typisierung auf konventionellem Weg ist das in Tabelle 27 gezeigte Protokoll am besten geeignet, mit dem 17 SNPs sowie die drei Genorte *pPCP1*, *caf* und *napA* detektiert werden können.

Tabelle 27: Optimiertes konventionelles PCR-Protokoll zur Detektion der Genorte *pPCP1*, *caf1* und *napA* sowie der 17 SNP-überspannenden Fragmente in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Tabelle zeigt PCR-Ansatz und Cycle-Bedingungen.

*Die Annealing-Temperatur muss Primer-spezifisch gewählt werden; siehe dazu Tabelle 22.

n. b. = nicht bestimmt

PCR-Ansatz			
Substanz	Hersteller	Konzentration	
Multiplex PCR Master Mix	Qiagen, Hilden	1x	
UDG	Roche, Mannheim	0,01 U/µl	
BSA	Ambion/ Life technologies, Darmstadt	0,4 mg/ml	
Forward-Primer	TibMolbiol, Berlin bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg	0,2 µM	
Reverse-Primer	TibMolbiol, Berlin bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg	0,2 µM	
2-4 µl Template-DNA		n. b.	
Thermoprofil			
Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
Dekontamination	1 x	25	10 Min
PCR-Aktivierung	1 x	95	15 Min
Amplifikation	50 x	94	30 Sek
		56-64*	30 Sek
		72	60 Sek
Elongation	1 x	72	10 Min
Kühlen	1 x	8	bis Analyse

Mit Ausnahme von drei PCR-Assays (s920, zweites Primer-Paar bei s82 und s660) konnte bei allen mindestens ein Mal die eine Kopie des EV76-Impf-Stammes detektiert werden. Abweichungen ergeben sich dadurch, dass statistisch gesehen die eine Kopie nicht immer von der Taq-Polymerase „erwischt“ wird.

2.2 DNA-Detektionen in historischem Skelettmaterial

Mittels der konventionellen PCR mit nachfolgender Farbmarkierungs-PCR zur Sequenzierung und der Real Time-basierten PCR wurden zwei Ziele verfolgt: der Nachweis von Fragmenten der Gene *pla* und *HLA* sowie die Genotypisierung *pla*-positiver Extrakte. Konventionelle PCRs wurden dabei aus Gründen der authentischen Ergebnisproduktion drei Mal durchgeführt, qPCRs vier Mal. Abgewichen wurde von diesem Vorgehen, falls für einen Genlocus sowohl ein konventionelles als auch ein Real Time-basiertes Assay zur Verfügung standen oder falls keine DNA mehr für Reproduktionen vorhanden war. Nachfolgend werden zunächst die Basen-Abweichungen in den aDNA-Sequenzen aufgeführt (Abschnitt 2.2.1), bevor auf die Ergebnisse der *pla*- und *HLA*-Detektionen (Abschnitt 2.2.2) und der weiterführenden Typisierung des Erregers (Abschnitt 2.2.3) eingegangen wird.

2.2.1 Basen-Abweichungen

In dieser Arbeit wurden 370 erfolgreiche Sequenzierungen durchgeführt. Die Anzahl der insgesamt durchgeführten Sequenzierungen liegt jedoch höher, da beim Fehlschlagen eines Versuchs bis zu zwei Mal je Richtung eine erneute Sequenzierung durchgeführt wurde. In drei Fällen von SNP-Detektionen wurde dennoch nur eine Reverse-Sequenz erhalten. Da die Reverse-Sequenz jedoch den SNP überlagerte, wurde dieses Ergebnis dennoch in die Auswertung mit aufgenommen. In weiteren drei Fällen wurde zwar ein *Y. pestis*-spezifisches Produkt erhalten, die beiden Fragmente überlagerten sich jedoch nicht und überdeckten auch nicht den Bereich des SNPs. Diese Sequenzen wurden von der Auswertung ausgenommen.

Jene 370 Forward- und Reverse-Sequenzen, die zur eindeutigen Detektion eines Gens oder SNPs führten, wurden auf Basen-Abweichungen hin untersucht. In lediglich 22 Sequenz-Contigs wurden insgesamt 49 Basen-Abweichungen festgestellt (Tabelle 28 und Anhang 14). Dabei ist zu unterscheiden zwischen Basen-Austauschen und Mischbasen und zu beachten, ob sie in einem Erst-, Zweit- oder Drittlauf auftreten. Bei Mischbasen ist die eindeutige Zuordnung eines Peaks zu einem

Basen-Buchstaben nicht möglich (siehe Abbildung 5), was durch einen weiteren Buchstaben als der vier gängigen gekennzeichnet wird. Die Nomenklatur der Mischbasen befindet sich in Anhang 12. In einigen Fällen wurde ein Basen-Fehler in der Forward-Sequenz durch die Reverse-Sequenz berichtigt und umgekehrt, was daher nicht berücksichtigt wird.

Tabelle 28: Häufigkeit und Art von Basenabweichungen in den *Yersinia pestis*-spezifischen Sequenzen der Individuen aus Aschheim, Manching-Pichl und Brandenburg. Bewertet wurden nur jene Sequenzen, die zur Detektion eines Gen-Abschnitts oder SNPs führten. Bei den blau hinterlegten Abweichungen handelt es sich um Basen-Austausche, bei den roten Feldern um Mischbasen.

* gibt den Anteil eines Basen-Abweichungs-Typs bezogen auf die insgesamt beobachteten 48 Basen-Abweichungen an

Fundort	A		MP				B		
Anzahl Sequenzen	4	1	8	1	1	1	6	22	
Eluat	1.	2.	1.	2.	1.+2.	3.	1.	gesamt	anteilig*
Basenabweichung									[%]
C zu viel	1							1	2,1
C → M	1							1	2,1
C → T	1	2		1			1	5	10,4
G → R	1		2				6	9	18,8
G → A	2	6	3		3			14	29,2
C → S			1			1		2	4,2
T → W						1		1	2,1
T → Y	1						1	2	4,2
A → C	1							1	2,1
C → Y							1	1	2,1
C → G		2						2	4,2
A → G		3						3	6,3
T → C		2						2	4,2
A → W	1							1	2,1
T → W			1					1	2,1
G → K			1					1	2,1
A → M			1					1	2,1
gesamt	9	15	9	1	3	2	9	48	100,4

Eine einzige Sequenz hat dabei stark auf die Gesamtanzahl der Basenabweichungen Einfluss genommen. In den 132 bp des Fragments zur Detektion des SNPs s463 aus Probe A58 befinden sich 15 Basen-Abweichungen. Es handelt sich dabei um eine aus einem Zweitluat gewonnene Sequenz. Weitere sechs Basen-Abweichungen finden sich in den anderen Zweit- und Drittluaten sowie der Sequenz eines gepoolten Extrakts. Zusammengenommen machen die Basen-Abweichungen in den Folge-Eluaten mit 21 Abweichungen fast die Hälfte aus (43,8 Prozent) – und das obwohl nur vier Sequenzen untersucht wurden. Die übrigen 27 Abweichungen verteilen sich auf 18 Sequenzen (56,3 Prozent).

Basen-Abweichungen und Mischbasen halten sich ebenso nahezu die Waage. Austausche haben unabhängig vom Eluat einen Anteil von 45,8 Prozent im Vergleich zu Mischbasen mit 52,1 Prozent. Am häufigsten unter den Austauschen ist die Substitution von G durch A (14).

2.2.2 *pla*-und HLA-Detektionen

In dieser Arbeit wurde versucht, DNA aus 58 Zähnen und einem Humerus von 49 Individuen zu extrahieren. Die Extrakte wurden zunächst mittels konventioneller PCR und qPCR auf die Anwesenheit des *Yersinia pestis*-spezifischen *pla*-Gens getestet. In *pla*-negativen Proben wurde versucht, einen humanen Locus zu amplifizieren. Gelingt dies nicht, wurden in einer weiteren PCR aDNA-Extrakte mit HLA-Kopien versetzt, um auf eine Inhibition der Extrakte zu testen (siehe Abbildung 12). Die Erfolge dieser verschiedenen Assays zeigt zusammenfassend nachfolgende Tabelle 29 (siehe auch Anhang 5):

Tabelle 29: Ergebnisse der *pla*-und HLA-Detektionen aus nach Methode 1 (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.3.1) extrahierten Ersteluaten. Bei den Individuen A58 und A120 wurde ein nach Methode 3 (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.3.3) erhaltener Extrakt getestet. A = Aschheim, MP = Manching-Pichl, B = Brandenburg, Ba = Basel, E = Extraktionskontrolle, pos = positiv, neg = negativ, n. t. = nicht getestet

Fundort	<i>pla</i> - (positive) Individuen	<i>pla</i> -positives Individuum	<i>pla</i> -Detektion mittels qPCR (70nt)	maximale <i>pla</i> -Kopien- anzahl pro 2 µl	<i>pla</i> - Detektion mittels konv. PCR (133 nt)	HLA- (positive) Individuen qPCR	HLA-Spike- (positive) Individuen qPCR
A	19 (8)					11 (4)	8 (8)
		A58	2/3	7	0/3	n.t.	n.t.
		A66	3/5	1	0/3	n.t.	n.t.
		A76	4/4	3	0/3	n.t.	n.t.
		A77	2/4	1	0/3	n.t.	n.t.
		A82	1/4	<1	1/3	n.t.	n.t.
		A105	3/4	6	0/3	n.t.	n.t.
		A120	3/3	314	2/3	n.t.	n.t.
		A166	1/4	<1	0/3	n.t.	n.t.
MP	21 (5)					16 (9)	7 (7)
		MP17-I	4/4	1120	3/3	n.t.	n.t.
		MP19-II	4/4	1400	3/3	n.t.	n.t.
		MP59-I	4/4	44	3/3	n.t.	n.t.
		MPS01-I	4/4	5	1/3	n.t.	n.t.
		MPS4-XX	4/4	335	4/4	n.t.	n.t.
B	3 (3)					0 (0)	0 (0)
		B1	1/4	≤ 1	neg	n.t.	n.t.
		B2	2/4	3	neg	n.t.	n.t.
		B3	4/4	11	2/3	n.t.	n.t.
Ba	6 (0)		neg			6 (3)	3 (3)
Σ	49 (15)					35 (16)	18 (18)

Auch die Folge-Eluate eignen sich zur Amplifikation des *pla*-Gens via qPCR (siehe Tabelle 30; siehe auch Anhang 10). Grundsätzlich ist zu beobachten, dass mit dem Grad des Folge-Eluats der CT-Wert steigt. Allerdings gibt es auch zwei Ausnahmen von dieser Regel. Bei Probe MPS1-I verhält es sich genau umgekehrt und bei Probe MP17-I, bei der Erst- und Zweiteluat je zwei Mal getestet wurden, lässt sich insgesamt kaum ein Unterschied in der Qualität der Folge-Eluate zum Erst-Eluat feststellen.

Tabelle 30: Die Qualität der Folge-Eluate ist ersichtlich aus den CT-Werten der qPCRs auf den Genort *pla*. Gezeigt sind nur jene Proben, deren Zweiteluat positiv waren, und maximal die CT-Werte aus zwei PCRs. Grau hinterlegt sind jene PCR-Läufe, in denen die Regel, dass mit dem Grad des Folge-Eluats der CT steigt, nicht erfüllt ist.

Probe	Extraktionsmethode	Versuch	Eluat	CT PCR 1	CT PCR 2
B3	1	1	1	34,70	34,68
			2	38,29	38,29
	1	3	1	35,19	
			2	37,17	
	1	4	1	35,07	
			2	37,46	
A058	1	1	1	38,26	
			2	39,04	38,30
	3	1	1	35,95	35,24
			2	38,40	
A120	1	1	1	31,27	
			2	33,68	
	1	2	1	31,01	
			2	35,04	
	1	3	1	31,21	
			2	34,86	
MP17-I	1	1	1	27,54	26,64
			2	30,81	
	2	1	1	33,72	32,07
			2	32,69	33,61
	2	2	1	33,49	
			2	32,28	
			2	33,62	33,16
			3	28,84	
			2	30,73	
			1	27,27	
MP19-II	1	1	1	27,64	27,98
			2	33,28	
	1	2	1	27,98	
			2	31,67	
MP59-I	1	1	1	32,07	32,33
			2	36,84	
	3	1	1	35,80	
			2	38,11	
	1	2	1	33,37	
			2	35,43	
			1	33,19	
MPS1-I	2	1	1	>40	38,76
			2	37,92	
			1	29,45	
MPS4-XX	1	1	1	29,45	
			2	33,55	
			1	28,93	
			2	32,50	

2.2.3 Typisierungen

Die Extrakte *pla*-positiver Individuen wurden in dieser Arbeit weitergehend typisiert. Der Erfolg war dabei abhängig vom CT-Wert des Extrakts in der qPCR auf *pla* (siehe Tabelle 31). Bis zu einem CT-Wert von 34,70 waren Extrakte sicher typisierbar, zwischen 34,96 und 36,84 war ein Erfolg fraglich und ab einem CT-Wert von über 36,84 in der *pla*-qPCR war nicht mehr mit einem Typisierungserfolg zu rechnen.

Tabelle 31: Der CT-Wert eines Extrakts in der *pla*-qPCR korreliert mit dem Erfolg einer weitergehenden Typisierung. Dargestellt sind die Werte für jene Proben, die weiter typisiert wurden. Maximal wurde ein Extrakt vier Mal in der qPCR mitgeführt. Die Aussage, ob ein Extrakt typisierbar war, wurde Tabelle 32 und Tabelle 33 entnommen.

Probe	Extraktions- methode	Versuch	Eluat	qPCR <i>pla</i>				typisierbar?
B3	1	1	1	34,70	34,68	34,62	35,78	ja
			2	38,29	38,29			nein
	1	2	1	36,31				ja
	1	3	1	35,19				ja
			2	37,17				nein
	1	4	1	35,07				ja
			2	37,46				nein
	A058	1	1	1	38,26			
3		1	1	34,96	35,61			nein
A066	1	1	1	37,46	36,59			nein
	3	1	1	37,29				nein
A076	1	1	1	37,29	38,33	37,96	38,15	nein
	3	1	1	39,10				nein
	1	1	1	37,96				nein
	1	2	1	36,57				nein
A077	1	1	1	>40	37,21			nein
A082	1	1	1	37,92				nein
A105	1	1	1	36,81	35,5	38,04		nein
	3	1	1	37,01				nein
	1	1	1	35,57				nein
A120	1	2	1	35,79				nein
	3	1	1	35,95	35,24	35,03		(ja)
	1	1	1	31,27				ja
	1	2	1	31,01				ja
A166	1	3	1	31,21				ja
	1	1	1	>40				nein

Fortsetzung Tabelle 31

Probe	Extraktions- methode	Versuch	Eluat	qPCR <i>pla</i>				typisierbar?
MP17-I	1	1	1	27,54	26,64	27,67	27,57	ja
			2	30,81				ja
			3	33,49				ja
			1+2	31,99				ja
	2	2	1	32,28				ja
			3	28,84				ja
			4	36,66				nein
			1	27,27				ja
MP19-II	1	1	1	27,64	27,98	26,84	27,95	ja
			2	33,28				ja
			1	27,98				ja
			2	31,67				ja
MP59-I	1	1	1	32,07	32,33	31,32	32,54	ja
			2	36,84				ja
			3	35,80				(ja)
			1	33,37				ja
			1	33,19				ja
MPS01-I	2	2	1	>40				nein
			3	36,52				nein
			1	35,97	35,34	36,23	35,83	nein
			1	35,82				(ja)
			1	35,61				(ja)
MPS4-XX	3	1	1	28,89	29,06	28,89	29,10	ja
			1	29,45				ja
			2	33,55				ja
			1	28,93				ja
			2	32,50				ja

Je nachdem, in welche Zeitstellung Individuen datieren, wurden verschiedene Typisierungs-Assays auf die Proben angewandt (siehe Abbildung 12 in Kapitel Methoden, Abschnitt 1). Nachfolgend werden die Ergebnisse getrennt nach Opfern der Justinianischen Pest (Abschnitt 2.2.3.1) und Verstorbenen während des Schwarzen Tods oder einer nachfolgenden Welle (Abschnitt 2.2.3.2) dargestellt.

2.2.3.1 Justinianische Pest

Individuen vom Fundort Aschheim, die positiv auf das Vorhandensein der *pla*-Sequenz getestet worden waren, wurden anschließend an fünf SNP-Positionen typisiert (Tabelle 32). Zudem wurde durch Feststellen einer Mutation im *napA*-Gen eine biochemische Eigenschaft ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 32.

Tabelle 32: Ergebnisse der Typisierung des in historischen Proben von Individuen des Fundorts Aschheim (A) enthaltenen *Y.pestis*-Stammes. Untersucht wurden fünf SNPs sowie eine Mutation im *napA*-Gen. Bezeichnungen wie „VII-VI“ geben an, auf welchem Abschnitt des Morrelli-Stammbaums (Morelli *et al.* 2010) sich die SNPs befinden. Grün hinterlegte Felder weisen ein positives Ergebnis aus, rot hinterlegte ein negatives. „a“ kennzeichnet das Vorliegen eines ancestralen Genotyps, „d“ verweist auf einen Genotyp, der „derived“ (abgeleitet) ist. Zahlen in Klammern sagen aus, in wie vielen Gesamtläufen ein Amplifikationsprodukt detektierbar war, dessen Sequenzierung zum Vorliegen einer eindeutigen Sequenz geführt hat (positive Versuche/Gesamtversuche).

n. t. = not tested

Probe	napA qPCR	napA konv.	s87 qPCR	s87 konv.	s89 konv.	s545 qPCR	s82 konv.	s463 konv.
			VII-VI			3.ANT.a-0.ANT3.a	VI-III	
A058	(0/1)	n. t.	(0/2)	(0/2)	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
A066	(0/1)	(0/1)	(0/3)	(0/2)	n. t.	(0/2)	(0/1)	(0/1)
A076	(0/2)	(0/3)	(0/4)	(0/4)	(0/2)	(0/4)	(0/3)	(0/3)
A077	(0/1)	(0/1)	(0/1)	(0/1)	n. t.	(0/1)	n. t.	n. t.
A082	(0/1)	(0/1)	(0/2)	(0/1)	n. t.	(0/1)	n. t.	n. t.
A105	(0/2)	(0/3)	(0/4)	(0/4)	(0/1)	(0/3)	(0/2)	(0/3)
A120	d (1/2)	d (2/3)	a (2/3)	a (2/4)	a (3/3)	a (4/4)	d (3/4)	d (3/3)
A166	n. t.	(0/1)	(0/1)	n. t.	n. t.	(0/1)	n. t.	n. t.
A167	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.

2.2.3.2 Black Death

Eine *pla*-positive Probe aus Brandenburg sowie fünf derartige aus Manching-Pichl wurden an 16 SNP-Genorten sowie an je einem Abschnitt des Gens *caf1* und am hier pPCP1 genannten Genort untersucht. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Ergebnisse der Typisierung des in historischen Proben von Individuen der Fundorte Manching-Pichl (MP) und Brandenburg (B) enthaltenen *Y.pestis*-Stammes. Untersucht wurden alle auf Branch 1 im Bereich XI-3.ANT.a liegenden 14 SNPs und je ein SNP der anderen beiden Äste sowie ein Fragment des *caf1*-Gens und ein als pPCP1 bezeichneter Genort. Bezeichnungen wie „XI-3.ANT.a“ geben an, auf welchem Abschnitt des Morrelli-Stammbaums (Morelli *et al.* 2010) sich die SNPs befinden. Grün hinterlegte Felder weisen ein positives Ergebnis aus, rot hinterlegte ein negatives. „a“ kennzeichnet das Vorliegen eines ancestralen Genotyps, „d“ verweist auf einen Genotyp, der „derived“ (abgeleitet) ist. Zahlen in Klammern sagen aus, in wie vielen Gesamtläufen ein Amplifikationsprodukt detektierbar war, dessen Sequenzierung zum Vorliegen einer eindeutigen Sequenz geführt hat (positive Versuche/Gesamtversuche). Bei einigen SNPs wurde ein Lauf ohne das Enzym UDG unternommen, was durch „^o“ gekennzeichnet ist.

Probe	<i>caf1</i> -positiv	pPCP1-Deletion	Branch 1														Branch 0	Branch 2
			s12	s14	s13	s247	s588	s660	s826	s904	s920	s955	s1023	s1038	s1119	s1195	s545	s19
			XI-3.ANT.a														3.ANT.a-0.ANT3.a	3.ANT.a-VIII
B3	komplett (1/2-4) ^o	ja (1/2)	a (2/3)	a (1/1)	a (3/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (1/3)	a (1/2)	a (1/3)	a (2/3)	a (1/4) ^{*o}	a (1/3)	a (1/3)	d (2/2)	a (1/4) ^o	d (2/3)	a (3/3)
MP17-I	komplett (2/3)	ja (3/3)	a (3/3)	a (3/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (3/3)	a (3/3)	a (3/3)	a (3/3)	a (3/4)	a (3/3)	a (3/3)	d (3/3)	a (3/3)	d (3/3)	a (3/3)
MP19-II	komplett (1/2-3)	ja (3/3)	a (2/3)	a (2/2)	a (3/3)	a (2/3)	a (1/3)	a (3/3)	a (3/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (3/3)	a (3/3)	d (3/3)	a (2/3)	d (3/3)	a (3/3)
MP59-I	teils	ja (4/4)	a (3/3)	a (2/3)	(0/3)	a (3/3)	a (3/3)	a (1/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (2/3)	a (1/3)	a (1/3)	d (1/2)	a (1/3)	d (1/3)	a (3/3)
MPS01-I		ja (2/2)	a (1/2)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	a (1/2)	(0/1)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/2)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
MPS4-XX	komplett (1/3)	ja (3/3)	a (3/3)	a (3/3)	a (2/3)	a (1/3)	a (2/3)	a (3/3)	a (4/4)	a (1/3)	a (1/3)	a (2/3)	a (3/3)	a (1/3)	d (3/3)	a (1/3)	d (3/3)	a (3/3)

Bei der Bestimmung des SNPs s1195 stellte sich sowohl bei den Proben aus Manching-Pichl als auch bei dem Extrakt des Brandenburger Individuums eine unerwartete Besonderheit in dem amplifizierten Fragment heraus (siehe Abbildung 30). Eine Abfolge von 16 Basen wiederholte sich sechs Mal, wobei sich in der ersten und letzten Abfolge jeweils eine Base im Vergleich zu den anderen unterschied.

```
AGAATGGAGACGATAACGGCCTT
TAATACCTCAGTCATC
TAATACCTCAATCATC
TAATACCTCAATCATC
TAATACCTCAATCATC
TAATACCTCAATCATC
TAATACCTCAATCATC
TAATACCTCAGTCATC
GCCAGTCATGCAGCTTGTTAACATAAAAAACCCATTATTGATCACAATATCCAATA
```

Abbildung 30: Wiederholung der Basenabfolge im Bereich des SNPs s1195 in aDNA-Extrakten.

3 F1-Antigen-Detektion

Mit der Detektion des F1-Antigens sollte ein von molekulargenetischen Ansätzen unabhängiger Weg beschritten werden, *Yersinia pestis* in historischem Skelettmaterial nachzuweisen. Dazu wurde versucht, das Protein aus Proben von drei *pla*-positiven Individuen des Fundorts Manching-Pichl nach drei verschiedenen Methoden zu extrahieren und der Extrakt wurde mittels vier verschiedener Teststreifen getestet. Bei einigen Proben wurde im Bereich der Testregion eine leicht rosafarbene Bande beobachtet, die für ein positives Ergebnis sprechen würde. Allerdings war diese Bande so schwach, dass sie nur bei ständiger Kippung des Teststreifens von einer horizontalen zu einer schrägen Position sichtbar war. Folglich wurden alle Teststreifen als negativ bewertet. Es bleibt festzuhalten, dass es trotz intensiver Bemühungen in keinem der insgesamt acht Extraktions-Versuche gelungen ist, das F1-Antigen in ausreichender Menge zu extrahieren. Eine Detektion des F1-Antigens war damit nicht möglich. Tabelle 34 gibt an, welches Proteinextraktions-Protokoll und welcher Teststreifen für die jeweilige Probe verwendet wurden und zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 34: Ergebnisse des Versuchs der F1-Antigen-Detektion von *Yersinia pestis* nach drei unterschiedlichen Extraktionsmethoden und mittels vier verschiedener Teststreifen. Die Ergebnisse setzen sich zusammen aus jenen der Bachelorarbeit von Sara Fischersworing (2012) und jenen dieser Arbeit. Bei mehreren Proben wurden leicht rosarote und damit positive Banden beobachtet, was durch ein „+“ gekennzeichnet ist. Allerdings gelang diese Beobachtung nur bei besonderer Haltung des Teststreifens gegen das Licht (siehe Text). Die Ergebnisse wurden daher wie die mit „neg“ gekennzeichneten Proben als negativ erachtet. * nach Bachelorarbeit erneut getestet; † in der Bachelorarbeit nicht in dem Versuch bearbeitet; DT = Detektionslimit; n. t. = not tested.

Extraktionsmethode	Versuch	Individuum	Skelettelement	Abicap [®] , Senova (DT: 0,25 ng/ml)	RDT, Madagaskar (DT: 0,5 ng/ml)	Plague BioThreat Alert [®] , Tetracore (DT: 35 ng/ml)	miPROTECT [®] , Miprolab (25 ng/ml)	
Methode 1 nach Bianucci <i>et al.</i> (2008)	½	MPS1-I	Rippe	neg	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	
			Femur*	neg	(+)	n. t., kein Extrakt	n. t., zu wenig Extrakt	
		MP17-I	Zahn*	neg	(+)	n. t., kein Extrakt	n. t., zu wenig Extrakt	
			Wirbel*†	n. t., zu wenig Extrakt	neg	n. t., kein Extrakt	n. t., zu wenig Extrakt	
		MP59-I	Humerus*†	n. t., zu wenig Extrakt	neg	n. t., kein Extrakt	n. t., zu wenig Extrakt	
	3	MPS1-I	Rippe	neg	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	
			Femur*	neg	(+)	neg	neg	
		MP17-I	Zahn*	neg	neg	neg	neg	
			Wirbel*†	n. t.	neg	neg	neg	
		MP59-I	Humerus*†	n. t.	(+)	neg	neg	
	4	MPS1-I	distaler Phalange	neg	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	
			Rippe & Femur	neg	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	
		MP59-I	Humerus	neg	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	
	Methode 2 nach Malou <i>et al.</i> (2012)	1	MPS1-I	Femur	neg	neg	neg	neg
				Rippe	neg	n. t.	neg	n. t.
distaler Phalange				neg	neg	neg	neg	
MP17-I			Rippe	neg	neg	neg	neg	
			Zahn	neg	neg	neg	neg	
			Wirbel	neg	neg	neg	neg	
MP59-I			Humerus	neg	neg	neg	neg	
Methode 3 nach Wiechmann <i>et al.</i> (1999)	1	MPS1-I	Rippe	neg	(+)	n. t., kein Extrakt	n. t., kein Extrakt	
			Femur	neg	(+)	neg	n. t.	
			distaler Phalange	neg	(+)	neg	neg	
		MP17-I	Rippe	neg	(+)	neg	n. t.	
			Zahn	neg	(+)	n. t.	neg	
			Wirbel	neg	neg	neg	neg	
		MP59-I	Humerus	neg	(+)	neg	neg	

VI Diskussion

Die Arbeit abschließend werden in diesem Kapitel die Ergebnisse kritisch diskutiert. Zunächst wird die Authentizität der erhaltenen Daten bewertet (Abschnitt 1). Unter einem methodischen Aspekt werden im folgenden Abschnitt 2 die optimierten Protokolle zur DNA-Extraktion und zum Nachweis von *Yersinia pestis*-DNA in Skeletten betrachtet. Die unter Zuhilfenahme derer generierten Daten werden in einem dritten Abschnitt (3) unter verschiedenen Blickwinkeln diskutiert. Die Gründe für das Fehlschlagen der Detektion des F1-Antigens sind Thema von Abschnitt 4. Zuletzt werden alle Punkte in Abschnitt 5 miteinander in Synthese gebracht.

1 Authentizität

Trotz dem bei der Analyse von alter DNA grundlegende Problemen wie Degradation (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4) und Inhibition (siehe Kapitel Diskussion, Abschnitt 2.2.4) berücksichtigt werden müssen, werden Kontaminationen bzw. deren Aufdeckung als die einzige Hauptsorge beim Studium von aDNA angesehen (Kolman & Tuross 2000). Da in dieser Arbeit nahezu ausschließlich DNA des Bakteriums *Yersinia pestis* analysiert wurde, scheinen Kontaminationen des Typs 1 (prä-Labor-Kontaminationen) sehr unwahrscheinlich (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 5). Das Bakterium hat in Mitteleuropa heute kein natürliches Nagetier-Reservoir mehr und kommt daher dort nicht mehr vor (Tikhomirov 1999; siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.2). Dennoch stellen Mikroorganismen der Grabstätte eine mögliche Kontaminationsquelle des Typs 1 dar (Gilbert *et al.* 2004), besonders dann, wenn universelle, nicht sehr spezifische Ansätze zur Detektion von bakterieller DNA benutzt werden. In der vorliegenden Arbeit ist dies jedoch nicht der Fall. Hier war ein sehr spezifischer Gen-Abschnitt das Ziel molekulargenetischer Screenings aller Proben. Allerdings wurden Teile des Target-Gens *pla* kürzlich im Ratten-Genom detektiert (Janse *et al.* 2013). Da der Nachweis des Pesterregers jedoch über die Detektion dieses Gens hinausging, ist nicht davon auszugehen, dass hier ein Rattengenom analysiert wurde, das neben dem *pla*-Gen noch bis zu 18 andere Loci mit dem *Y. pestis*-Genoms teilt. Dennoch ist die Pathogen-Erforschung aus Skelettmaterial generell erschwert durch die Kontamination mit verwandten, aber schlecht charakterisierten Umwelt-Mikroben (Tsangaras & Greenwood 2012). Um dieses Risiko auszuschließen, wurden potentielle Oberflächen-Kontaminationen durch das Anwenden der üblichen Dekontaminationsmaßnahmen für aDNA-Proben entfernt, also durch den Einsatz von Bleiche und Bestrahlung mit UV-Licht. Um die absolute Abwesenheit von Kontaminationen aus dem Umfeld der Bestattung sicher zu stellen, wäre es nützlich gewesen, auch Bodenproben aus der Nähe der analysierten Individuen zu untersuchen. In dieser Arbeit war dies nicht möglich, da während der Ausgrabungen keinerlei Bodenproben genommen wurden. Allerdings sprechen die negativen PCR-Ergebnisse vieler Individuen, die Seite an Seite mit Pest-positiven Individuen im selben (Massen-)Grab bestattet worden waren, dafür, dass eine Kontamination durch unbekannte Mikroorganismen aus dem Grab sehr unwahrscheinlich ist.

Die Hauptprobleme bei der Untersuchung mikrobieller DNA aus historischem Material sind ohnehin Kontaminationen des Typs 2 und 3 (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 5), also im Labor erworbene Kontaminationen. Entsprechend wurden in dieser Arbeit Maßnahmen ergriffen, um aus der vorhandenen DNA bestmögliche und authentische Ergebnisse zu generieren (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 1). Statt dabei jedoch wie Gilbert *et al.* moniert hatten, Authentizitätskriterien auf einer Liste abzuhaken, wurden ihrer Empfehlung folgend unter dem Aspekt der Glaubhaftigkeit alle erhältlichen Informationen zur vorliegenden aDNA-Studie kritisch bewertet (Gilbert *et al.* 2005a). Das Einhalten der Kriterien kann helfen, potentielle intra-Labor-Kontaminationen zu verhindern, nützt aber nichts, wenn es um die Aufdeckung von prä-Labor-Kontaminationen geht (Sampietro *et al.* 2007). Ihre Befolgung garantiert also keine authentischen Ergebnisse (Pääbo *et al.* 2004; Tsangaras & Greenwood 2012). Zudem ist laut Pääbo *et al.* (2004) die strikte Einhaltung aller Kriterien nicht gerechtfertigt, da nicht in jeder Studie alle Fehlerquellen vorkommen. Allen Kriterien zu folgen, halten Tsangaras & Greenwood (2012) bei Humanstudien für am wichtigsten, bei denen das

Kontaminationsrisiko am größten und die Unterscheidung zwischen Kontamination und endogener DNA am schwierigsten ist. In dieser Arbeit wurde lediglich ein humaner Locus untersucht und dies lediglich aus methodischen Gründen. Dennoch werden hier wie auch teils bereits in Seifert *et al.* (2013) beschrieben die von Cooper & Poinar (2000) publizierten klassischen Standardkriterien, die von Poinar (2003) und Willerslev & Cooper (2005) erweitert wurden, als Diskussions-Grundlage zu Hilfe genommen (Tabelle 35).

Tabelle 35: Umsetzung von publizierten Authentizitätskriterien in der vorliegenden Arbeit wie in Seifert *et al.* (2013).

Empfohlene Authentizitätskriterien nach Cooper & Poinar (2000), Willerslev & Cooper (2005), Poinar (2003)	Strategie in der vorliegenden Arbeit
Räumlich separierter prä-PCR-Arbeitsbereich mit nächtlicher UV-Bestrahlung und isolierter Belüftung, täglicher Reinigung mit Bleiche und Bewegungen nur vom prä- zum post-PCR-Bereich	Das neu aufgesetzte aDNA-Labor (siehe Abbildung 10) bietet die Möglichkeit der UV-Bestrahlung von Schutzkleidung, Verbrauchsplastikmaterial, Reagenzien, Workstations. prä- und post-PCR-Bereich befanden sich in unterschiedlichen Stadtteilen. Der aDNA-Bereich wurde zusätzlich dekontaminiert mittels Bleiche und DNA away (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 1). Es herrschte eine strikte Einbahnstraßen-Regelung für Personal, Material und aDNA.
Dekontamination von Reagenzien und Proben	Proben und Verbrauchsmaterial wurden mit NaOCl gereinigt und UV-bestrahlt. Die Oberfläche von Zäunen wurde nicht entfernt.
Extraktions- und Amplifikations-Negativkontrollen	8 Extrakte : 1 Extraktions-Kontrolle meistens 8 aDNA-Extrakte : 1 Wasser-Kontrolle (WK) meistens 8 aDNA-Extrakte : 1 Mastermix-Kontrolle (MMK) (oft weniger aDNA-Extrakte im Vergleich zu WK und MMK)
Positivkontrollen vermeiden	Positivkontrollen (PK) wurden mitgeführt. Zusätzlicher Mastermix für die PK wurde im aDNA-Labor vorbereitet, aber nur dieses Tube oder Well im post-PCR-Bereich des IMB für die Zugabe der PK geöffnet.
UNG-Behandlung zur Beseitigung von Deaminationsprodukten	Wurden routinemäßig vorab allen PCRs durchgeführt.
adäquates Molekül-Verhalten	Für <i>pla</i> -Detektionen wurde eine geringfügige inverse Korrelation von Amplifikationserfolg und Fragmentlänge festgestellt – eine Assoziation die angesichts weiterführender Typisierungen nicht haltbar ist (siehe Text).
Quantifizierung zur Ermittlung der Anzahl der Start-Moleküle	Die Anzahl der Start-Moleküle wurde für die <i>pla</i> -qPCR ermittelt, jedoch mehr aus methodischen Gründen denn zum Authentizitätsbeweis.
Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse vom gleichen und von verschiedenen Extrakt(en)	Konventionelle Pest-PCRs wurden drei Mal durchgeführt, Pest-qPCRs zwei bis vier Mal. Von einem Zahn angefertigte multiple Extrakte lieferten konstante Ergebnisse; von verschiedenen Zähnen angefertigte Extrakte führten nicht immer zu einem Amplifikationserfolg (siehe Anhang 10) bedingt vermutlich durch nicht oder nur bedingt für aDNA-Studien geeigneten Zähne.
Unabhängige Replikation von Ergebnissen durch unabhängige Forschergruppe	Reproduktion der Ergebnisse zum Fundort Aschheim durch Stephanie Hänsch & Barbara Bramanti, Universität Mainz Keine Reproduktion der Ergebnisse von den Individuen aus Manching-Pichl (MP) und Brandenburg (B); jedoch wurden MP-Individuen bereits in einer vorangegangenen Studie (Wiechmann <i>et al.</i> 2010) untersucht, was als unabhängige Reproduktion angesehen werden kann, da diese Arbeiten in einem anderen Labor durch eine andere Person mit teils anderen Methoden und DNA-Targets durchgeführt wurden.
Klonieren	Das direkte Sequenzieren aller PCR-Produkte wurde in dieser Arbeit als der effizientere Weg angesehen (siehe Text).

Fortsetzung Tabelle 35:

Empfohlene Authentizitätskriterien nach Cooper & Poinar (2000), Willerslev & Cooper (2005), Poinar (2003)	Strategie in der vorliegenden Arbeit
Biochemische Erhaltung	Der gute biochemische Erhaltungszustand des Knochen-Kollagens von drei exemplarisch untersuchten Individuen aus Manching-Pichl weist auf eine ausreichend gute Erhaltung hin, die auch einen DNA-Erhalt erlaubt (Hoke unpublished). Entsprechende Untersuchungen zu den Kollektiven Aschheim, Basel und Brandenburg wurden nicht durchgeführt.
Erhaltung assoziierte Überreste (Fauna)	Assoziierte Überreste, z. B. von Tieren, waren nicht verfügbar. Stattdessen wurde Human-DNA (<i>HLA</i>) amplifiziert.
Phylogenetischer Vergleich mit anderen Haplotypen	Mittels der Stati verschiedener SNPs wurden die Erreger unterschiedlicher Fundorte und Zeitstellungen in aktuelle phylogentische Stammbäume von <i>Yersinia pestis</i> (Morelli <i>et al.</i> 2010; Cui <i>et al.</i> 2008) eingeordnet und mit Ergebnissen anderer Forschergruppen zu anderen Fundorten verglichen.
Zeit-abhängige Schadens- und Diversitäts-Muster unterstützen die Antiquität mikrobieller Studien	DNA-Schäden entsprechen den Erwartungen für aDNA.

Getrennte Labore

Alle prä-PCR-Arbeiten mit aDNA wurden wie in Kapitel Methoden, Abschnitt 1 beschrieben in den neu aufgesetzten und nur für die Nutzung von aDNA vorgesehenen Laborräumen des ArchaeoBioCenters der LMU durchgeführt (siehe Abbildung 10). Post-PCR-Arbeiten wurden während dieser Dissertation in einem Gebäude (IMB) in einem anderen Stadtteil Münchens durchgeführt. Damit wurde der Forderung von Pääbo *et al.* (2004) entsprochen, dass sich das aDNA-Labor so weit entfernt als möglich von dem Labor befinden soll, in dem mit moderner DNA gearbeitet wird. Zusammen mit den auferlegten hygienischen Bestimmungen für das Personal, die Möglichkeit der UV-Bestrahlung von Schutzkleidung und der Einbahnstraßenregelung dürfte so die Möglichkeit einer Verschleppung von Amplifikaten und damit einer Maskierung authentischer Ergebnisse strikt entgegengewirkt worden sein. Obwohl die Bedeutung von Labortrennung und Einbahnstraßenprinzip für aDNA-Studien seit langem bekannt ist (z. B. Willerslev & Cooper 2005) und als wichtig erachtet wird (z. B. Burger & Bollongino 2010), wurden überraschenderweise nicht sehr viele Studien an Pathogenen aus historischem Skelettmaterial dementsprechend durchgeführt (Review in Tsangaras & Greenwood 2012), was zu Skepsis bezüglich der Validität von Studien geführt hat, auch jener, die *Y. pestis*-aDNA untersuchten (Gilbert *et al.* 2004).

Dekontamination

Das übliche für aDNA-Studien empfohlene Dekontaminations-Prozedere (Hofreiter *et al.* 2001b), wurde nicht nur auf Arbeits-Oberflächen und Gerätschaften vor und nach der jeweiligen Benutzung angewandt, sondern auch auf alle Reagenzien-Behälter und Plastikwaren. Ihre Oberflächen wurden mit Bleiche abgewischt und/oder mit UV-Licht bestrahlt. Daneben wurde BSA durch UV-Bestrahlung im Crosslinker für zehn Minuten oder bei 1,2 J/cm² dekontaminiert. Abgesehen davon ist die Kontamination von Reagenzien oder Plastikwaren mit *Y. pestis* oder unbekanntem Bakterien, die die *Y. pestis*-Target-DNA-Sequenz tragen, nicht bekannt.

Negativkontrollen

Während des ganzen Arbeitsprozesses im aDNA-Bereich wurden darüber hinaus Negativ-Kontrollen angefertigt und in PCRs mitgeführt (z. B. Willerslev & Cooper 2005), welche die Detektion von Kontaminationen erlauben, die aus dem aDNA-Arbeitsbereich stammen (Kemp & Smith 2010). Extraktions-Kontrollen, die während des Prozesses des DNA-Isolierens lediglich aus den verwendeten Chemikalien bestanden und wie eine echte Probe behandelt wurden, sollten in einer später durchgeführten PCR eine mögliche Kontamination während dieses Arbeitsschritts detektieren – sowohl in den Reagenzien als auch eine potentielle Kreuzkontamination durch den Mehl-Staub einer aDNA-Probe. Eine Mastermix-Kontrolle stellt sicher, dass die verwendeten PCR-Reagenzien nicht kontaminiert sind, eine Wasser-Kontrolle zudem die DNA-Freiheit des zum Volumenausgleich und

zum Verdünnen von Primern zugesetzten Wassers. Allerdings kommen Kontaminationen in Reagenzien nur auf niedrigem Niveau vor, weshalb sie nur sporadisch in Negativ-Kontrollen detektiert werden (Pääbo *et al.* 2004). Falsch-positive Ergebnisse sind schwer nachzuweisen (Kemp & Smith 2010). Einige argumentieren, dass negative Negativkontrollen leicht auf niedrigem Niveau vorkommende Labor-Kontaminationen verdecken können, bedingt durch einen noch wenig verstandenen Carrier-Effekt (Xu *et al.* 2009; Pääbo *et al.* 2004). Einige aDNA-Extrakte enthalten Substanzen wie Zucker oder mikrobielle DNA, die während der PCR als Transporter (Carrier) dienen können und so eine Amplifikation einer geringfügigen Kontamination erlauben (Pääbo 1991). Dadurch wird eine Kontamination amplifiziert, wenn solch ein Extrakt zugegeben wird, während sie in Blanko-Kontrollen nicht detektiert wird, auch wenn sie dort ebenfalls vorhanden ist (Pääbo *et al.* 2004). In ihren Empfehlungen sagen Cooper & Poinar (2000), dass die Kopien-Anzahl der Target-DNA bewertet werden sollte und dass bei Vorliegen von weniger als 1000 Start-Molekülen besonders bei Studien humaner aDNA die Möglichkeit einer sporadischen Kontamination nicht ausgeschlossen werden könne. Hingegen reicht laut Pääbo *et al.* (2004) bei Extrakten mit mehr als 1000 Start-Molekülen eine Amplifikation aus und nur bei unbekannter Anzahl oder weniger als 1000 Molekülen sind mindestens zwei Amplifikationen nötig.

Dieses Kriterium ist nicht unangefochten (Kemp & Smith 2010) und wird nicht häufig angewandt (Tsangaras & Greenwood 2012). Wenn auch die Ermittlung der Kopienanzahl zur Bestimmung der Authentizität nicht nötig sein mag (Tsangaras & Greenwood 2012), wurde in dieser Arbeit, die teils auf qPCR basiert, eine Quantifizierung der *pla*-Kopien unternommen und zwar um die Eignung eines Extrakts für weiterführende Typisierungen zu erkennen (siehe Abschnitt 2.2.3).

Wie jedoch bereits oben festgestellt, konnte in dieser Arbeit in vielen aDNA-Proben kein Amplicon detektiert werden (siehe Tabelle 29), was neben der Abwesenheit von unbekanntem Mikroorganismen für die Abwesenheit von Laborkontaminationen spricht. In dieser Arbeit wurden in den Proben B1 and MPS1-I (bei Letzterer nur im konventionellen PCR-Ansatz) sporadische, nicht reproduzierbare, positive *pla*-Signale detektiert (siehe Tabelle 29). Anstelle von einer Kontamination scheint das inkonsistente Ergebnis jedoch durch einen Extrakt bedingt zu sein, der eine sehr geringe Anzahl des Target-Moleküls beinhaltet (Pääbo *et al.* 2004), was durch die kalkulierte niedrige *pla*-Kopienanzahl in den beiden Extrakten gestützt wird (Tabelle 29). Für diese These sprechen auch die Ergebnisse der weiterführenden Typisierung, die unter anderem mit Probe MPS1-I unternommen wurde. Nur wenige andere Loci (*s12*, *s588*, *pPCP1*-Deletion) unterschiedlicher Länge (135 bp, 69 bp, 122 bp) konnten in dieser Probe amplifiziert werden. B1 wurde nicht weiter typisiert, da angesichts des späten CT-Werts der *pla*-qPCR ein diesbezüglicher Erfolg auszuschließen war (siehe Abschnitt 2.2.3).

Positivkontrolle

Obwohl wegen des zusätzlichen Kontaminationsrisikos davor gewarnt wird (Cooper & Poinar 2000; Poinar 2003), wurden in dieser Arbeit Positivkontrollen (PK) verwendet – allerdings in einer Weise, die eine Kontaminationen nicht aufkommen lassen sollten. Im aDNA-Bereich wurde ein zusätzlicher Mastermix für die Positivkontrolle angesetzt, alle Tubes/Wells verschlossen, in den post-PCR-Bereich transportiert und dort nur das vorgesehene Tube/Well für die Zugabe der PK geöffnet. Dieses Vorgehen wird auch von Kemp & Smith (2010) gerechtfertigt. Tubes/Wells, die aDNA enthielten, blieben unangetastet. Übereinstimmend mit aDNA-Experten (Kemp & Smith 2010) wurde nie eine Positivkontrolle in das aDNA-Labor eingeführt. Das Mitprozessieren einer PK hatte mehrere Gründe. Zum Einen konnte durch sie die Funktionalität einer PCR überprüft werden, wodurch das Ausbleiben einer Bande nicht fälschlicherweise als negatives Ergebnis gewertet werden konnte (Kemp & Smith 2010). Zum Anderen wurde in qPCRs die PK zum Quantifizieren der anfänglichen Anzahl der *pla*-Moleküle in aDNA-Extrakten verwendet (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.3.1), zum automatischen Ausgeben eines SNPs als Wildtyp oder Mutante (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.4.3.2) und zum Spiken von *pla*-negativen aDNA-Extrakten mit *HLA*-Konstrukt-Kopien zum Feststellen einer Inhibition (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.1). In letzterem Verfahren sehen auch Kemp & Smith (2010) einen Nutzen von PKs. Ihre Verwendung in qPCR-Experimenten war somit unumgänglich. Es ist festzuhalten, dass in keiner der Negativkontrollen (EK, WK, MMK) je ein Y.

pestis-spezifisches Amplifikationsprodukt detektiert wurde, weswegen von einer Kontamination durch Kontroll-DNA oder Amplifikate nicht auszugehen ist.

Primer

Was sich weiterhin kontaminationsvermeidend auswirkt, jedoch nicht in den Authentizitätskriterien genannt wird, ist der erstmalige Einsatz der in dieser Arbeit verwendeten Primer sowohl im aDNA-Labor des ArchaeoBioCenters als auch im IMB. Hintergedanke ist der, dass so noch keine Amplicons in den Laboren vorhanden waren, die verschleppt werden hätten können und so wieder das authentische Signal maskiert hätten. Eingeschränkt wird diese Aussage jedoch dadurch, dass bevor aDNA mittels der Primer amplifiziert wurden, im IMB erst optimierte Assays entwickelt wurden, in denen logischerweise die gleichen Primer benutzt wurden. Dafür, dass jedoch keine Amplifikat-Verschleppung stattgefunden hat, sprechen die vielen negativen Negativkontrollen sowie die vielen negativen aDNA-Proben.

Mehrfache Reproduktion

Um weiterhin Kontaminationen auszuschließen, wurden in dieser Arbeit mehrere Versuche unternommen, die *Yersinia pestis*-spezifischen Fragmente in demselben und in anderen Extrakten eines oder zweier Zähne eines Individuums nachzuweisen (siehe Anhang 11). Die Reproduktion von Ergebnissen aus mehreren Extrakten eines Zahnes ist in dieser Arbeit weitgehend geglückt (siehe Tabelle 29 bzw. Anhang 11), die Reproduktion aus Extrakten unterschiedlicher Zähne jedoch nicht zwingend. Derartige Fehlversuche können dadurch bedingt sein, dass bei Vorliegen nur geringer Mengen des Template-Moleküls in einer Probe auch Extrakte nur sporadisch die Ziel-DNA enthalten (Pääbo *et al.* 2004; siehe Tabelle 29 bzw. Anhang 110). Die Notwendigkeit der Verwendung mehrerer Extrakte war hier alleine wegen des hohen DNA-Verbrauchs für die Reproduktionsversuche gegeben. Kemp & Smith (2010) weisen jedoch darauf hin, dass auch Ergebnisse, die von Kontaminationen stammen, reproduziert werden können. Da in dieser Arbeit jedoch überwiegend DNA von *Yersinia pestis* untersucht wurde, das in Deutschland nicht mehr vorkommt (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.2), ist dies auszuschließen. Neben der Möglichkeit der Detektion von Kontaminationen und dem Nachweis des Ziel-Moleküls bei Vorliegen nur geringer Mengen kann durch Reproduktionen der fehlerhafte Einbau von Nukleotiden detektiert werden (Pääbo *et al.* 2004; siehe Tabelle 28 bzw. Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel).

Klonieren

In diesem Zusammenhang wird oft das Klonieren von Amplifikationsprodukten empfohlen (Cooper & Poinar 2000; Willerslev & Cooper 2005), um in den Amplicons eine Heterogenität zu detektieren (Pääbo *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurde bewusst auf das Klonieren verzichtet und das aus folgenden Gründen: Erstens zielte ein Teil dieser Arbeit, die *pla*-Detektion, auf die schnelle Diagnose von *Y. pestis*, für die das Erkennen von Schadens-induzierten Fehlern einzelner Basen nicht von Bedeutung ist. Falls welche vorlagen bzw. um ihre Anzahl klein zu halten, beinhalteten PCR-Ansätze grundsätzlich das Enzym Uracil-DNA-Glycosylase sowie einen Inkubationsschritt vor dem eigentlichen PCR-Cycle-Prozess, die zusammen zum Entfernen von Uracil aus dem DNA-Strang führen (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 1). Darüber hinaus wurde es sowohl für die *pla*-Detektionen als auch für die Typisierungen als ausreichend erachtet, jede Probe und jeden weiterdeterminierenden Locus mehrere Male unter Verwendung von UDG zu amplifizieren und zu sequenzieren, um eine Falsch-Interpretation zu vermeiden. Die geringe Anzahl der beobachteten Basenabweichungen (siehe Tabelle 28) gibt diesem Vorgehen Recht. Zweitens wurde die Effektivität des Klonierens zur Detektion von Kontaminationen und Fehlern aufgrund von DNA-Schäden kürzlich in Frage gestellt. Es würde kein zusätzliches Vertrauen in die Authentizität von Sequenzen herbeiführen (Kemp & Smith 2010). Pruvost *et al.* (2008) fanden, dass das direkte Sequenzieren eines PCR-Produkts ein verlässliches Ergebnis liefere, das effizienter sei als das Sequenzieren von 20 Klonen. Winters *et al.* (2011) schlussfolgerten nach einer ausgiebigen vergleichenden Studie von geklonten und direkten Sequenzen, dass Klonieren nur von Fall zu Fall als Mittel zur Authentifikation genutzt werden sollte, besonders wenn die Methode unnötig Zeit und Geld verschlingt.

Reproduktion in unabhängigem Labor

Neben der mehrmaligen Reproduktion von Ergebnissen im eigenen Labor wird auch die Bestätigung der Resultate in einem unabhängigen Labor gefordert (Gilbert *et al.* 2004; Poinar 2003), beginnend

bei der Extraktion über die Amplifikation bis hin zur Sequenzierung (Poinar 2003), um intra-Labor-Kontaminationen aufzudecken (Willerslev & Cooper 2005; Gilbert *et al.* 2004). Zur Bestätigung der Ergebnisse des Fundorts Aschheim wurden Stephanie Hänsch und Barbara Bramanti von der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz gebeten, als Referenzlabor zu fungieren. Für die Ergebnisse aus der Zeit des Schwarzen Todes und einer nachfolgenden Welle, also für die Fundorte Manching-Pichl (MP) und Brandenburg (B) wurde auf eine unabhängige Ergebnis-Reproduktion verzichtet. aDNA-Experten (Kemp & Smith 2010; Pääbo *et al.* 2004) haben bereits angemerkt, dass das hinzuziehen eines Referenzlabors nur nötig ist, wenn neue oder unerwartete Ergebnisse erhalten werden. Dies ist für die Individuen aus MP und B nicht der Fall. Die Ergebnisse sind kongruent mit denen anderer Forschergruppen von anderen Fundorten (siehe Tabelle 39). Zudem wurden MP-Individuen bereits in einer vorangegangenen Studie (Wiechmann *et al.* 2010) untersucht, was als unabhängige Reproduktion angesehen werden kann, da diese Arbeiten in einem anderen Labor und durch eine andere Person mit teils anderen Methoden und DNA-Targets durchgeführt wurden.

Adäquates Molekülverhalten

Ein für Authentizität sprechendes Kriterium soll außerdem das adäquate Verhalten der Moleküle aus historischem Skelettmaterial sein. Bedingt durch die Degradation von DNA ist die Amplifikation langer Fragmente in aDNA-Studien über 1000 bp restringiert (Poinar 2003), kurze Fragmente würden demnach für das Vorhandensein echter aDNA-Moleküle sprechen (Pääbo *et al.* 2004). Diese Empfehlung stammt Kemp & Smith (2010) zufolge aus der Studie von Pääbo *et al.* (1988), in der die DNA-Fragmente aus einem 7500 Jahre alten Gehirngewebe überwiegend nur 50 bis 200 bp groß waren. In einigen in dieser Arbeit untersuchten Individuen gelang die Detektion des 70 bp großen *pla*-Fragments öfter als die Amplifikation des 133 bp großen *pla*-Fragments (z. B. MPS01-I, B1, B2, B3, A120; siehe Tabelle 29). Auch in den Arbeiten von Schünemann *et al.* (2011) und Bos *et al.* (2011), die sich mit der gesamtgenomischen Detektion des Pesterreger in Individuen aus East-Smithfield befassten, wurden kurze DNA-Fragmente von unter 60 bp festgestellt.

Für die weiterführenden Typisierungs-PCRs mit Fragmentgrößen von 116 bis 164 bp im konventionellen Ansatz und 67 bis 78 bp in der qPCR lässt sich in dieser Arbeit ein derartiger Zusammenhang jedoch nicht mit Sicherheit feststellen, da für die wenigsten Loci (lediglich *napA*, *s87*) ein Assay zur Detektion eines kurzen und eines langen Fragments entwickelt wurde (siehe Tabelle 32). Eine Aussage, ob die Amplifikation kürzerer Fragmente öfter möglich wäre, ist demnach nicht möglich, genauso wie in den meisten anderen Studien, wie Kemp & Smith (2010) feststellten. Die geringe angenommene aDNA-Fragmentlänge beachtend wurden keine Assays entwickelt, die 200 bp überschreiten. Daher kann auch die Amplifikation noch längerer Fragmente in den hier untersuchten Proben gelingen. Die Amplifikation langer Fragmente von 500 bis 1600 bp in aDNA-Extrakten ist durchaus möglich, besonders bei Proben aus Permafrost-Gebieten (zusammengefasst bei Pääbo *et al.* 2004).

Biochemische Erhaltung

Verschiedene Aspekte der Erhaltung wie die anderer Biomoleküle sind ebenfalls relevant für die Authentizität von aDNA-Ergebnissen (Poinar 2003). In dieser Arbeit wurde diesem Aspekt wenig Platz eingeräumt. Es sei aber darauf verwiesen, dass Dipl.-Biol. Nadja Hoke im Rahmen ihrer Dissertation zum Thema „Evaluierung frühdiagenetischer Veränderungen an Knochenmaterial zur Validierung der Daten, gewonnen aus der Analyse stabiler Isotope“ (Hoke unpublished) drei Individuen aus Manching-Pichl (MP 54-II, MP 59-I, and MP 68-I) exemplarisch untersucht und einen guten biochemischen Erhaltungszustand des Knochen-Kollagens festgestellt hat. In einem dieser Individuen (MP59-I) wurde in der vorliegenden Arbeit bei molekulargenetischen Untersuchungen DNA des Pest-Erregers nachgewiesen. Entsprechend korrespondiert hier das gut erhaltene Knochenkollagen mit der erfolgreichen DNA-Amplifikation (Hoke unpublished; siehe auch Seifert *et al.* 2013). Eine Aussage über das ganze Kollektiv zu treffen, ist logischerweise angesichts der sehr kleinen Stichprobe jedoch nicht möglich. Ähnliche Untersuchungen der Individuen aus Aschheim, Basel und Brandenburg wurden nicht vorgenommen. Laut Pääbo *et al.* (2004) kann das Bewerten der biochemischen Erhaltung auch überflüssig sein, wenn Proben offensichtlich gut erhalten sind. Dies trifft für die Proben aus Brandenburg zu, die sich in einem überwiegend guten Erhaltungszustand befanden (Dalitz *et al.* 2012). Hingegen waren die Individuen aus Aschheim schlecht erhalten (Staskiewicz

2007) und zu den Individuen aus Basel lagen für diese Arbeit keine Informationen zum Erhaltungszustand vor.

Erhaltung assoziierter Funde bzw. HLA-Untersuchungen

Ebenfalls nicht berücksichtigt werden konnte in dieser Arbeit der Erhalt von assoziierten Funden wie Tierknochen, da von den Ausgrabungsorten keine vorlagen. Stattdessen wurde mit dem *HLA*-Gen ein humaner Locus amplifiziert, allerdings mehr um Aussagen über eine mögliche Inhibition eines aDNA-Extrakts treffen zu können denn aus Authentizitätsgründen. Extrakte aller 34 Individuen, die negativ auf *pla* getestet worden waren, wurden in das auf aDNA-Bedingungen optimierte *HLA*-Assay (siehe Tabelle 25) eingesetzt. In insgesamt 16 Individuen war der humane Locus amplifizierbar, was zusammen mit den *pla*-positiven Individuen für einen guten DNA-Erhalt sprechen kann. In jenen 18 Individuen, in denen weder die gewünschte bakterielle noch die humane DNA amplifiziert werden konnte (siehe Tabelle 29), muss daher eine schlechtere Erhaltung oder eine stärkere Zerstörung der DNA angenommen werden. Allerdings ist die Schlussfolgerung aus den *HLA*-Ergebnissen auf einen guten DNA-Erhalt diskussionswürdig. Laut Pääbo *et al.* (2004) kommt humane DNA nahezu ubiquitär in Proben und der Laborumgebung vor. Die Individuen aus Manching-Pichl sind 1984/85 gehoben worden (Wiechmann *et al.* 2010), jene aus Aschheim 1997/98 (Gutsmiedl 2005), die aus Basel 2006 (Matt & Alder 2008) und jene aus Brandenburg im Herbst 2011 (Dalitz *et al.* 2012) und haben währenddessen und seitdem viele Hände durchlaufen, von denen sich Epithelien ablösen und auf Knochen und Zähne übertragen werden konnten. Da es nicht möglich war, all diese Bearbeiter zu typisieren, wurde in dieser Arbeit keine Methode angewandt, die eine Personalisierung der gefundenen humanen DNA erlaubt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierten *HLA*-Signale durch prä-Labor-Kontaminationen bedingt sind und nicht endogener Natur sind.

Zeit-abhängige Schadens-Muster

Bedingt durch die Degradation von DNA nach dem Tod eines Individuums, ist aDNA unter anderem gekennzeichnet durch Sequenzfehler (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4). Diese wurden auch bei der Untersuchung der Individuen in dieser Arbeit festgestellt (siehe Tabelle 28) und entsprechen den Erwartungen für aDNA.

Zieht man zusammenfassend alle relevanten Fakten in Betracht, so sollten die in dieser Arbeit getätigten Vorsichtsmaßnahmen intra-Labor-Kontaminationen verhindert haben. Die Ergebnisse, der Nachweis und die Typisierung von *Yersinia pestis* in den historischen Skelettelementen, können daher als authentisch angesehen werden.

2 Optimierung der Protokolle zur Extraktion und Amplifikation

Die nachfolgenden Abschnitte befassen sich mit dem Abwägen der verschiedenen DNA-Extraktions-Protokolle (Abschnitt 2.1) und der Diskussion der optimierten PCRs (Abschnitt 2.2).

2.1 Wahl der Extraktionsmethode

In dieser Arbeit wurden vier DNA-Extraktionsmethoden miteinander verglichen, darunter eine, die auf einem Kit basiert (siehe Tabelle 36). Da für diese vierte Methode nicht die gleiche Anzahl an Proben getestet werden konnte, wird sie getrennt von den drei anderen Extraktionsmethoden betrachtet.

Tabelle 36: Bewertung der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Extraktionsmethoden. Bewertung nach Schulnoten, wobei 1 die Bestnote ist.

Methode	nach	Bewertung
1	modifiziertes Protokoll laut Wiechmann & Grupe (2005), basierend auf Yang <i>et al.</i> (1998)	1
2	Rohland & Hofreiter (2007a, 2007b)	3
3	Rohland <i>et al.</i> (2010) und Rohland & Hofreiter (2007a)	2
4	QIAamp DNA Investigator-Kit (Qiagen, 2010b)	4

Die drei nicht auf der Verwendung eines Kits beruhenden Methoden nutzen eine Silika-Art, um DNA zu binden und beginnen mit dem Verdau des Probenmehls in einer Extraktionslösung, die aus EDTA und Proteinase K besteht. Diese zwei Chemikalien werden in der Literatur als die einzigen zwei Chemikalien genannt, die einen positiven Effekt auf die DNA-Ausbeute haben (Rohland & Hofreiter 2007b). Große Mengen EDTAs sind nötig, um einen Teil der Hydroxylapatit-Matrix von Knochen und Zähnen aufzulösen (Rohland & Hofreiter 2007a). Proteinase K verdaut Knochen-Proteine wie Kollagen (Rohland & Hofreiter 2007b). In den darauf folgenden Schritten aller drei Extraktionsprotokolle bindet DNA in Anwesenheit eines chaotropischen Salzes an die Silika-Matrix (Boom *et al.* 1990; Melzak *et al.* 1996; Mülhardt 2009). Methode zwei und drei nutzen dafür Guanidinthiocyanat (GuSCN), wohingegen der Bindepuffer PB des Kits laut Angaben des Herstellers Qiagen Guanidinihydrochlorid (GuHCl) beinhaltet. Der zugrundeliegende Mechanismus soll auf abgeschirmten intermolekularen elektrostatischen Kräften, Dehydrierung von DNA und Silika-Oberfläche und der Bildung von intermolekularen Wasserstoff-Bindungen zwischen DNA und Silika beruhen (Melzak *et al.* 1996). Nach dem Waschen mit einem Salz-Ethanol-Puffer wird die DNA in Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wie Wasser oder TE-Puffer eluiert (Mülhardt 2009).

Vergleicht man die drei getesteten Methoden, zeigt sich, dass die erste am erfolgreichsten *Y. pestis*-DNA extrahiert hat. Mittels dieser Methode wurde ein *pla*-positives Individuum mehr detektiert (B2) als mit den anderen beiden Methoden und die CP-Werte der *pla*-Positiven waren stets (leicht) besser. Mehrere Gründe können für die Überlegenheit von Methode eins verantwortlich gemacht werden. Zunächst einmal enthält die Extraktionslösung von Methode eins zusätzlich das Detergenz Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, kurz *SDS*). Starke Detergenzien begünstigen das Freiwerden von DNA, haben allerdings den Nachteil, dass sie die Gesamt-DNA-Ausbeute reduzieren, da sie alte DNA noch mehr beschädigen (Rohland & Hofreiter 2007a). Zum Zweiten wurden die Extraktionsansätze bei Methode eins bei 56 °C and 37 °C inkubiert, wohingegen die anderen beiden Extraktionen bei Raumtemperatur ausgeführt wurden. Auf den zusätzlichen optionalen Inkubationsschritt bei 37 °C, den Rohland & Hofreiter (Rohland & Hofreiter 2007a) für grobes Probenmehl empfehlen, wurde verzichtet, da in dieser Arbeit feines Probenmehl verwendet wurde. Generell verbessert sich bei temperierten Inkubationen der Verdau von Probenmehl, was zum Freiwerden von mehr DNA führt (Rohland & Hofreiter 2007a).

Für Methode 3 spricht das geringe Volumen an eingesetztem Zahnmehl von nur 250 mg, das in der *pla*-PCR zu positiven Ergebnissen führte, die verglichen mit Methode eins, bei der etwa 400 mg Probenmehl eingesetzt wurden, numerisch gesehen nur geringfügig schlechter sind (0,55-1,3 CT-Werte; 1-499 *pla*-Kopien). Rohland *et al.* (2010) stellten fest, dass das Zusetzen einer zu großen Menge an Knochenmehl zu einem bestimmten Volumen Extraktionspuffer negative Auswirkungen auf die DNA-Ausbeute hat. Dennoch ist das etwas schlechtere PCR-Ergebnis von Methode drei von Bedeutung, wenn sich der DNA-Gehalt einer Probe im Bereich des Detektionslimits befindet wie bei der Mehrheit der Aschheim-Proben und bei B2 (siehe Tabelle 29). Der positive Nebeneffekt bei Verwendung nur geringer Probenmengen liegt darin, dass der am Skelett aufgrund der Probenentnahme angerichtete Schaden reduziert ist (Rohland *et al.* 2010) oder dass mit einer vorhandenen Probe mehrere Extraktionen durchgeführt werden können. Dies ist dann von Bedeutung, wenn wie in dieser Arbeit große DNA-Mengen beispielsweise für Typisierungen benötigt werden.

Gerade aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Dissertation bei jeder Extraktion unabhängig von der Methode auch Zweiteluat angefertigt. Es zeigte sich, dass beim ersten Elutionsschritt nicht die gesamte DNA von der Matrix frei wurde. Wenn auch die Zweiteluat *pla*-positiver Individuen in der qPCR qualitativ schlechter sind als die Ersteluat, so liefern sie dennoch zufriedenstellende CT-Werte (siehe Tabelle 30 bzw. Anhang 11). In einem Fall (MP17-I) konnte sogar noch ein drittes Mal DNA eluiert werden, die zu einem positiven *pla*-Ergebnis geführt hat. Das Anfertigen eines Zweiteluats ist den Ergebnissen dieser Arbeit nach zu empfehlen, da die DNA-Quantität für nachfolgende Reaktionen erhöht werden kann, wenn auch bei der Qualität mitunter Abstriche gemacht werden müssen.

Zur Extraktion der verbleibenden Proben wurde das von Wiechmann & Grupe (2005) beschriebene Protokoll gewählt. Diesem Protokoll folgend konnte am erfolgreichsten DNA extrahiert werden. Es

enthält zudem die wenigsten Einzelschritte, ist dank des Einsatzes eines Kits leicht handhabbar und Kontaminationen scheinen weniger wahrscheinlich. Außerdem wird für die Extraktion nach dieser Methode nur eine Standard-Labor-Ausrüstung benötigt und mit EDTA, SDS und Proteinase K nur drei extra Chemikalien, die nicht mit dem Kit mitgeliefert werden. Die mit dem Kit zur Verfügung gestellten Silika-Membranen statt selbstgemachter Silika-Suspensionen zu nutzen, reduziert zusätzlich das Risiko, eine nachfolgende PCR durch geringe Reste Silika-Partikel zu inhibieren (Boom *et al.* 1990; Höss & Pääbo 1993), wenn auch diese Gefahr durch eine Zentrifugation des Extrakts vor Einsetzen eines DNA-Aliquots in eine PCR-Reaktion überwunden werden kann. Höss & Pääbo (1993) empfehlen dazu zwei Minuten bei 12.000 rpm. Insgesamt scheint ein geeignetes Extraktionsprotokoll für die vorliegenden Proben gefunden worden zu sein. Dennoch kann aber wie Rohland & Hofreiter (2007a) schreiben bei anderen Proben eine andere Extraktion möglicherweise bessere Resultate liefern.

Hinsichtlich der Verwendung des Investigator-Kits zur Extraktion von alter DNA lässt sich feststellen, dass die Methode bei Anwendung auf historisches Probenmaterial an sich funktioniert. Die beiden getesteten Proben lieferten ein positives Ergebnis in der qPCR auf *pla*. Zu Gute halten muss man dem Kit weiterhin, dass es mit maximal 100 mg Zahnmehl mit dem geringsten Materialeinsatz auskommt, was die Größe der zu entnehmenden Probe und damit die Zerstörung des Skeletts bei der Entnahme einer Knochenprobe statt eines Zahns zu diagnostischen Zwecken reduzieren würde. Vergleicht man jedoch die CTs mit denen der anderen drei Extraktionsmethoden, so liefert das Kit die schlechtesten Werte (siehe Tabelle 18). Entsprechend kann jeweils nur maximal eine Kopie des Gen-Fragments nachgewiesen werden. Daher eignet sich das Kit in der Form nicht für eine Verwendung zur Extraktion von DNA des Pesterregers aus archäologischem Skelettmaterial, wo ein niedriger CT und korrespondierend eine hohe Kopienanzahl für den Nachweis der Erregers entscheidend sind. Da Mitochondrien im Vergleich zum *pla*-Gen etwa zehn Mal häufiger pro Zelle vorkommen (2000 Mitochondrien/Zelle laut Koolman *et al.* 2003 vs. 186 Kopien des *pla*-Gens/Zelle laut Parkhill *et al.* 2001), ist das Kit möglicherweise besser zum Nachweis humaner mitochondrialer Loci in Skelettmaterial geeignet. Das Kit zeigt eventuell auch einen besseren Erfolg, wenn es z. B. im Zuge der Identifizierung eines unbekanntes Toten im Bereich der Forensik für Material eingesetzt wird, das keinen oder kaum diagenetischen Prozessen ausgesetzt war. Dennoch müsste hier bei einem Fehlschlagen einer DNA-Extraktion in einem zweiten Versuch auf eines der oben beschriebenen, nicht Kit-basierten Verfahren (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.3.1 oder 2.3.3) ausgewichen werden statt die Abwesenheit von DNA zu folgern.

2.2 PCR-Optimierungen

Warum auf das Poolen von Extrakten verzichtet werden sollte und vom Einsatz des REPLI-g-Kits abzuraten ist, wird in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben. Der daran anschließende Abschnitt 2.2.3 befasst sich mit den Vorzügen der hier entwickelten *pla*-Assays, die weiteren Abschnitte 2.2.4 und 2.2.5 mit den optimierten *HLA*- und SNP-Assays. Generelle Bemerkungen zu den konventionellen wie Real Time-basierten PCR-Assays behandelt Abschnitt 2.2.6 bevor in Abschnitt 2.2.7 eine Strategieempfehlung für die Analyse alter DNA auf *Yersinia pestis* gegeben wird.

2.2.1 Vermeidung des Poolens von Extrakten

Exemplarisch waren die Erst- und Zweiteluete zweier Proben zu jeweils einem Pool vereint worden. Hintergedanke war, dadurch eine größere Menge geeigneter DNA für PCRs zu erhalten. Allerdings hatte dieser Schritt nicht den gewünschten positiven Einfluss auf die Qualität des Erbmaterials erbracht: nur in einem Pool konnte die Ziel-Sequenz noch bei einem gleichwertigen CT nachgewiesen werden, in dem anderen war das Target nicht mehr detektierbar (siehe Tabelle 19). Die Stichprobengröße ist mit lediglich zwei Proben natürlich sehr gering, um eine allgemeine Warnung vor diesem Schritt auszusprechen. Das Poolen hat nachvollziehbar nur dann keinen negativen Einfluss auf den PCR-Erfolg, wenn Extrakte mit einem ähnlichen Anfangs-CT vereint werden (Probe MP17-I; siehe Tabelle 19). Bei divergierendem CT hingegen scheint der bessere Extrakt durch den

schlechteren so verdünnt zu werden, dass der DNA-Gehalt das Detektionslimit unterschreitet. Allerdings wurde bei diesen Versuchen zu Beginn der Arbeit mit der Probe MPS1-I eine Probe eingesetzt, die sich nachträglich als nur bedingt für nachfolgende Typisierungen geeignet herausgestellt hat (siehe Tabelle 33). Allerdings ist die durch die Ergebnisse gewonnene Warnung vor dem Poolen kongruent mit einer anderen Arbeit. Auch Rohland & Hofreiter (2007a) geben zu bedenken, dass durch das Poolen von DNA zwar die Gesamt-DNA-Menge steigt, die Konzentration im Extrakt jedoch sinkt, da das zweite Eluat vergleichsweise geringere DNA-Mengen enthält. Eine wirkliche Erhöhung der DNA-Konzentration wäre wahrscheinlich durch den Einsatz von Centricons (Merck Millipore, Billerica, USA) wie bei Extraktionsmethode 1 realisierbar, wodurch die Flüssigkeitsmenge reduziert wird.

2.2.2 Eignung des REPLI-g-Kits für die Amplifikation alter DNA

In elf Extrakten von Individuen verschiedener Fundorte war versucht worden, mittels des REPLI-g-Kits die enthaltene Gesamt-DNA zu amplifizieren, um durch eine erhöhte DNA-Menge letztendlich die PCR zu optimieren. Dabei wurden überwiegend Extrakte verwendet, in denen durch eine vorangegangene qPCR die Anwesenheit des *pla*-Gens bereits gezeigt worden war. Jedoch befanden sich unter den Test-Extrakten auch drei *pla*-negative. Sie wurden mitgeführt, um zu überprüfen, ob durch die Enzyme des Kits potenziell vorhandene sehr kurze DNA-Fragmente so verknüpft werden können, dass eine Detektion ermöglicht wird.

Letztlich hatte der Einsatz des REPLI-g-Kits maximal in einem Fall Erfolg. In Probe MP17-I war auch nach dem Versuch noch DNA detektierbar, wenn auch bei einem wesentlich schlechteren CT von rund 36 verglichen mit dem Ausgangs-CT von rund 28 (siehe Tabelle 20). Der CT spiegelt eine hohe *pla*-Kopien-Anzahl in dem Extrakt wider (siehe Tabelle 29). Der Extrakt scheint bei der Durchführung der REPLI-g-Versuche nicht zu sehr verdünnt worden zu sein, als dass das Detektionsniveau unterschritten worden wäre. Anders scheint es sich bei den übrigen ursprünglich *pla*-positiven Extrakten zu verhalten, bei denen genau das geschehen zu sein scheint.

Wenn auch enttäuschend, so ist das Ergebnis nicht allzu verwunderlich. Das REPLI-g-Kit ist nicht explizit für den Einsatz von historischen Proben geeignet, als Ausgangsmaterialien werden andere genannt (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.3.4). Zudem soll laut Hersteller das Kit bei Applikation auf DNA geringer Qualität wie degradiertes DNA oder DNA aus altem Gewebe zu keinen verlässlichen Daten führen (Qiagen Download 2013). Bei alter DNA aus historischem Skelettmaterial ist jedoch von Degradation auszugehen (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4). Zudem ist nicht bekannt, ob die eingesetzte aDNA in einer Konzentration von über 10 ng vorlag, für die das Kit optimiert ist, da die aDNA-Konzentrationen in dieser Arbeit nicht gemessen wurden. Es ist zudem nicht davon auszugehen, dass DNA-Fragmente von mehr als 2 kb Größe in den Extrakten vorlagen, da die Größe von zu erwartenden aDNA-Fragmenten in der Literatur mit 150 bp (Pääbo *et al.* 1989) angegeben wird. Es wurden dennoch Versuche mit diesem Kit unternommen, da laut Hersteller bei ausreichender Qualität der DNA auch geringere DNA-Mengen in die Reaktion eingesetzt werden können (Qiagen 2011b). In vorangehenden konventionellen wie quantitativen PCRs war die Amplifikation des Targets *pla*-Gen mit einer Größe von 70 bp bzw. 133 bp bei einigen Proben bereits möglich gewesen und Sequenzierungen der Produkte hatten keinerlei Basenabweichungen gezeigt. Besser für den Einsatz von alter DNA ist möglicherweise das REPLI-g® FFPE-Kit von Qiagen geeignet (Qiagen 2011a), auch wenn hier das Ausgangsmaterial wieder ein anderes ist als alte DNA, nämlich Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes (FFPE) Gewebe. Dennoch passt eine Fragmentlänge von 500 bp genomischer DNA, für welche sich das Kit laut Herstellerangaben am besten eignet (Qiagen 2011a), besser zu der erwarteten Fragmentgröße von alter DNA.

Alternativ kann zur Gesamtgenomamplifikation auf die bereits angesprochene Next-Generation-Sequencing-Methode zurückgegriffen werden, mit der bereits Erfolge bei der Amplifikation von *Y. pestis*-DNA aus Skelettmaterial erzielt wurden (Bos *et al.* 2011; Schünemann *et al.* 2011).

2.2.3 *pla*-Assay

Zum Erhalt eines optimalen PCR-Protokolls für die Detektion des *pla*-Gens sowohl auf konventionellem Weg als auch Real Time-basiert wurden in dieser Arbeit verschiedene kommerziell erhältliche PCR-Chemien und Cycle-Bedingungen wie Gradient-Cycling und Touchdown-PCR getestet. Das Ziel, ein Protokoll zu etablieren, das effizient, spezifisch sowie sensibel ist und auf einem Gel Amplifikate ohne unspezifische Produkte liefert, wurde erreicht (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.1.3). Erstaunlicherweise eignet sich für die konventionelle PCR auf einen Locus mit nur einem Primer-Paar der Multiplex-Mastermix von Qiagen am besten.

Darüber hinaus detektiert der hier etablierte qPCR-Ansatz eines der kürzesten Produkte unter den bisher publizierten *Y. pestis-pla*-Detektions-Ansätzen (Drancourt *et al.* 1998; Raoult *et al.* 2000; Wiechmann & Grupe 2005; Hänsch *et al.* 2010; Wiechmann *et al.* 2010; Nguyen-Hieu *et al.* 2010; Tran *et al.* 2011c; McKeough (2001 bzw. 2002) arbeiteten nach einem leicht modifizierten Protokoll von Drancourt *et al.* (1998) und Raoult *et al.* (2000), genaue Informationen sind zu der Arbeit der Australier jedoch nicht erhältlich wie bereits festgestellt von Benedictow (2010); siehe Abbildung 31). Nur Schönemann *et al.* (2011) amplifizierten in ihrer qPCR ein noch kürzeres Fragment von nur 52 bp. Jedoch ist dieses Fragment upstream des *pla*-Gens lokalisiert.

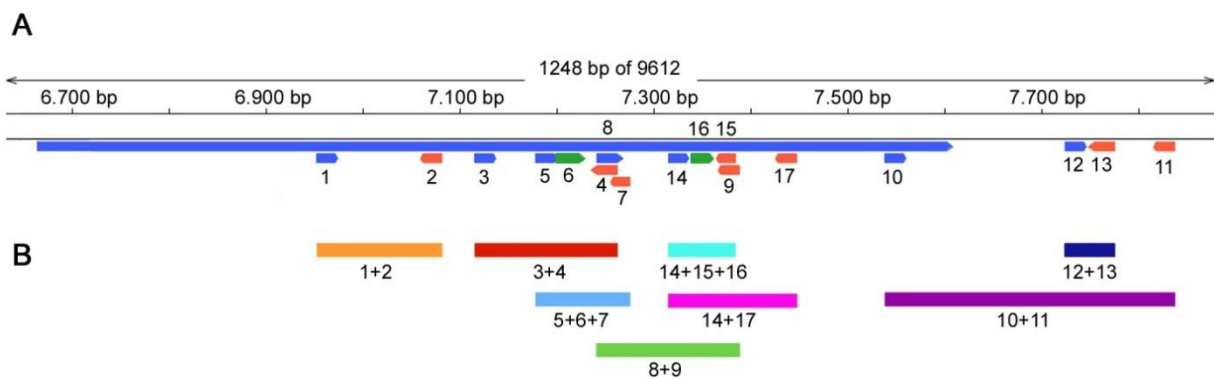


Abbildung 31: *pla*-Primer und -Sonden aller bisherigen aDNA-Studien.

A Der lange blaue Pfeil repräsentiert das 938 bp große *pla*-Gen, das auf dem 9612 bp großen Plasmid pPCP1 an den Positionen 6665-7603 lokalisiert ist (Genbank AL109969; Parkhill *et al.* 2001). Kleine blaue Pfeile repräsentieren Forward-Primer, kleine rote Reverse-Primer. Sonden sind grün markiert. Zahlen unterhalb von kleinen Pfeilen zeigen an, in welchen Studien diese zur *pla*-Detektion eingesetzt wurden: 1+2: Wiechmann *et al.* (2010); 3+4 und 8+9: Raoult *et al.* (2000); Wiechmann & Grupe (2005); Wiechmann *et al.* (2010); Hänsch *et al.* (2010); 5+6+7: Nguyen-Hieu *et al.* (2010); Tran *et al.* (2011a); 10+11: Drancourt *et al.* (1998); 12+13: Singleplex-Ansatz von Schönemann *et al.* (2011); 14+15+16 und 14+17: vorliegende Arbeit bzw. Harbeck *et al.* (2013) und Seifert *et al.* (2013).

B Verschiedenfarbige Balken kennzeichnen die Größe des Amplicons, das durch die in den unterschiedlichen aDNA-Studien beschriebenen Primer-Kombinationen erhalten wurde.

Solch ein kurzes Fragment wurde aus zwei Gründen als Zielsequenz gewählt. Zum Einen sollen beim Design eines Sonden-Assays die Amplicons so kurz wie möglich gehalten werden (Eurogentec Download 2012) und zum Zweiten liegen 70 bp oft bereits an der oberen Grenze der durchschnittlichen Fragmentlänge vieler alter Extrakte (Noonan *et al.* 2005; Rasmussen *et al.* 2010; Briggs *et al.* 2009). Die geringe Größe des hier vorgestellten Amplicons mit nur 70 bp ist vermutlich für den höheren Detektionserfolg verglichen mit der konventionellen Methode verantwortlich (Tabelle 29). Das in dieser Arbeit etablierte konventionelle *pla*-Assay zielt mit 133 bp ebenfalls auf eines der kürzesten Fragmente der bisher publizierten *pla*-Gen-Detektionen. Nur in einer anderen Studie (Wiechmann *et al.* 2010) wurde mit 130 bp mit dem Primer-Paar YP14F/YP13R ein noch kleineres Fragment amplifiziert.

Schönemann *et al.* (2011) haben bereits Real Time-PCRs zur Detektion des *pla*-Gens und teilweise dessen flankierender Spacer-Regionen beschrieben. Allerdings basierten sowohl der Single- als auch der Multiplex-Ansatz auf der Interkalation von SYBR® Green in die DNA. Bei dieser Technik interkaliert SYBR® Green in jede amplifizierte doppelsträngige DNA, wodurch „Primer-Dimere oder unspezifische Produkte die Quantifikation verzerren“ können (Eurogentec Download 2012).

Nguyen-Hieu *et al.* (2010) beschrieben einen anderen Ansatz basierend wie in dieser Arbeit auf TaqMan[®]-Sonden zur Detektion von *pla* in einer Multiplex-PCR zur Detektion von sieben Pathogenen in alten Proben, wobei eine Konfrontation mit einer unspezifischen Interkalation von SYBR[®] Green in DNA naturgemäß nicht gegeben ist. Allerdings wurde für dieses Assay kein Detektionslimit bestimmt, weswegen dem durchweg negativen Screening-Ergebnis auf *Y. pestis* von mehr als 1000 Proben – übrigens ungenannter Quellen – nicht vertraut werden kann. Der in dieser Arbeit vorgestellte Assay ist durch den Einsatz von Locked Nucleic Acid (LNA)-Sonden noch weiter verbessert. Diese Sonden sind modifizierte TaqMan[®]-Sonden, die von Exiqon (Vedbaek, Denmark) entwickelt wurden und eingesetzt werden können, „wenn so spezifische als mögliche, hoch-affine Sonden“ benötigt werden (Eurogentec 2004). LNA-Basen in solchen Sonden ändern die Konformation der DNA-Helix und erhöhen die Stabilität der Duplex. Dadurch kann die Schmelztemperatur (engl. *melting temperature*, kurz T_M) der Duplex erhöht werden, was zu einer Reduktion der Sonden-Größe führt und wiederum die Spezifität der Sonde erhöht (Eurogentec 2004).

Beide in dieser Arbeit entwickelten *pla*-Assays ermöglichen die Detektion von nur vier Kopien des Gens und liegen demnach deutlich unter dem bisher publizierten Detektionslimit: Die Erstbeschreiber eines *pla*-Assays konnten mit ihrer PCR zehn *Y. pestis*-Zellen nachweisen (Hinnebusch & Schwan 1993). Nimmt man das Vorkommen von 186 pPCP1-Plasmid-Kopien an, so liegt das Detektionslimit dieses Assays bei 1860 *pla*-Kopien. Nach oben hin konnte in zwei Proben (MP17-I und MP19-II) die Maximalkopienzahl von 1120 bzw. 1400 Kopien detektiert werden, was 560 bzw. 700 *pla*-Kopien in 1 μ l aDNA-Extrakt entspricht.

Durch die CT-Werte der *pla*-qPCRs konnte zudem eine Aussage getroffen werden, ob sich ein aDNA-Extrakt für weitergehende Typisierungen eignet. Ab einem CT-Wert von über 36,84 war nicht mehr mit einem Typisierungserfolg zu rechnen (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.2.3). Durch diese Beobachtung und den Ausschluss derartiger Extrakte von weiteren Analysen wurde das Augenmerk auf erfolgversprechende Eluate gelegt und die Analysen insgesamt zeitsparend durchgeführt.

2.2.4 HLA-Assay

Die Etablierung eines qPCR-Assays zur Detektion von *HLA* basierte auf einer vorhergehenden Arbeit von Mohammadi *et al.* (2004), die auf die Anforderungen von aDNA angepasst wurde. Dazu wurden Primer entwickelt, die statt eines 216 bp großen Fragments ein 97 bp großes Amplicon generieren. Durch die geringere Fragment-Größe ist die neu entwickelte PCR an die für aDNA erwarteten, kurzen Fragmente angepasst. Hinsichtlich der Cycle-Bedingungen ist die Zyklen-Zahl im Vergleich zum ursprünglichen Assay um fünf erhöht, um die Amplifikations-Chancen zu steigern.

Das Assay wurde in dieser Arbeit zum Feststellen der Inhibition eines aDNA-Extrakts eingesetzt. Dies ist ein Mittel, um das Ausbleiben eines Ergebnisses bei der Untersuchung eines anderen Genorts aufgrund der Hemmung der PCR auszuschließen. In dieser Arbeit wurde diese Aussage über das Spiken von aDNA-Extrakten mit Kopien eines künstlich hergestellten Konstrukts des *Humanen Leukozyten Antigen*-Lokus getroffen. In anderen Studien wie in der von Schünemann *et al.* (2011) wurde mit dem *Cytochrom b*-Gen als Standard ein anderer Genort eines Mammuts untersucht.

Bleibt man bei der Verwendung des *HLA*-Lokus, so wäre er theoretisch durch den Einbau einer Mutation in das künstliche Konstrukt verbesserungswürdig. Gleiches gilt für das *pla*-Konstrukt. Da die Target-Sequenz jedoch sehr kurz ist, ist der Einbau eines Fehlers in die Sequenz praktisch jedoch nicht möglich ohne eine zweite Sonde zum vorliegenden qPCR-Assay hinzuzufügen. Allerdings verändert das Multiplexen mit Sonden oft die Kinetik einer PCR zusammen mit einer nicht gewünschten Verringerung der Sensitivität.

Der Einbau eines Fehlers in die künstliche Sequenz würde die Detektion eines verschleppten Amplicons in den aDNA-Arbeitsbereich erlauben. In dieser Arbeit wurde stattdessen auf das Hygieneregime zusammen mit der physischen Trennung der Arbeitsbereiche vertraut, in denen mit aDNA bzw. der Positivkontrolle gearbeitet wurde. Zudem war es nicht Ziel dieses Assays, Aussagen über den endogenen *HLA*-Genabschnitt in verschiedenen Skeletten zu erhalten, was ohnehin problembelastet ist (siehe Abschnitt 1 in diesem Kapitel). Stattdessen sollte die Inhibition eines

aDNA-Extrakte getestet werden, um das Ausbleiben eines Signals bei der Untersuchung eines *Yersinia pestis*-Abschnitts zu erklären.

2.2.5 SNP-Assays

Die Optimierung konventioneller PCR-Assays zur Detektion von SNPs und anderen Genloci hat dazu geführt, dass in den meisten Fällen die geringe Anzahl von einer Kopie nachgewiesen werden kann (siehe Anhang 8). Dies ist insofern relevant, als durch die Degradation und Fragmentierung der aDNA in den aDNA-Extrakten nur wenige Kopien erwartet werden. Lediglich bei der Detektion des SNPs s920 lag die Detektionsgrenze in den Optimierungsläufen bei zehn Kopien.

Im Gegensatz dazu setzte die Optimierung Real Time-basierter Assays zur SNP-Detektion durch den Einsatz von DNA verschiedener *Y. pestis*- bzw. *Y. pseudotuberculosis*-Stämme auf die Spezifität der PCR. In allen diesen Assays wurde jeweils der für die Spezies richtige SNP detektiert.

2.2.6 Generelle Bemerkung zu konventionellen PCRs vs. qPCRs

Sowohl die in dieser Arbeit entwickelten konventionellen als auch die Real-Time basierten PCRs führen zur Generierung verlässlicher Resultate wie der Vergleich beider Verfahren bei der Analyse desselben Locus zeigt (*napA*, s87; siehe Tabelle 32). Der Vorteil Real Time-basierter Verfahren ist klar in der Zeitersparnis nach dem Pipettieren der PCR zu sehen. Das konventionelle *pla*-Assay dieser Arbeit hatte eine Cycle-Zeit von 125 Minuten, das Real Time-basierte lediglich von grob 46 Minuten. qPCRs zur Typisierung der SNPs benötigen gut 70 Minuten, konventionelle 135 Minuten zum Cyclen. Das entspricht einer Zeitersparnis von jeweils etwa einer Stunde. Bei qPCRs ist nach diesem Schritt die Analyse zudem beendet, wohingegen sich bei konventionellen Assays Gelelektrophorese (ca. eine Stunde), Sequenzierung und Sequenzauswertung (jeweils ca. 15 Minuten für Forward- und Rückwärts-Sequenz) anschließen. Da qPCR-Reaktionsgefäße nach ihrer Prozessierung nicht mehr geöffnet werden müssen, entfällt hier außerdem die Möglichkeit der Kontamination durch die Verschleppung von Amplifikaten. Der Nachteil einer qPCR liegt darin, dass keine Sequenz erhalten wird wie bei der konventionellen PCR, wodurch keine Schlüsse auf die Qualität der DNA gezogen werden können.

2.2.7 Strategieempfehlung für die Analyse alter DNA auf *Yersinia pestis*

Folglich wird für die Analyse historischer Proben zum Nachweis und zur Typisierung von *Y. pestis*-DNA folgende Strategie empfohlen: aDNA-Extrakte sollten in das optimierte qPCR-Assay zur Detektion des *pla*-Gens (siehe Tabelle 23) eingesetzt werden. Bei Vorliegen eines negativen Ergebnisses sollte dem hier vorgestellten Studiendesign entsprechend (siehe Abbildung 12) durch den Amplifikationsversuch eines anderen Gen-Lokus einer anderen Spezies wie hier dem Menschen überprüft werden, ob der Extrakt überhaupt DNA enthält. Dazu kann das *HLA*-Assay dieser Arbeit (siehe Tabelle 25) verwendet werden, wengleich hier wie bei der Untersuchung eines jeden humanen Locus Einschränkungen bezüglich des Vorliegens tatsächlich endogener DNA zu machen sind (siehe Abschnitt 1 in diesem Kapitel). Falls auch dieses Ergebnis negativ ausfällt, muss mittels eines Inhibitionstests wie dem Spiken von aDNA-Extrakten mit *HLA*-Kopien (siehe ebenfalls Tabelle 25) festgestellt werden, ob das Fehlschlagen der PCR durch das Vorliegen von Inhibitoren im aDNA-Extrakt begründet ist.

Ist ein aDNA-Extrakt jedoch positiv für das *pla*-Gen, so ist dieses Ergebnis durch eine nachfolgende konventionelle PCR auf den *pla*-Lokus inklusive Sequenzierung und Auswertung der Sequenz zu bestätigen. Aus dem CT-Wert der *pla*-qPCR ist abzuleiten, ob sich der Extrakt für eine weitergehende Typisierung eignet (siehe Abschnitt 2.2.3 in diesem Kapitel). Die Grenze ist aus Erfahrungswerten der Arbeit mit dem jeweiligen Material zu ziehen. Bei den Proben dieser Arbeit lag sie bei einem CT von über 36,84. Bei darunter liegenden Werten sind konventionelle (siehe Tabelle 27) und/oder qPCR-basierte PCR-Assays (siehe Tabelle 26) anzuschließen. Bei unerwarteten Ergebnissen ist das Resultat einer qPCR durch eine Sequenz zu validieren.

Alle Ergebnisse sind wie für die Arbeit mit aDNA gefordert, unter aDNA-Bedingungen durchzuführen und zu reproduzieren (siehe Abschnitt 1 in diesem Kapitel). Entgegen der Empfehlung von aDNA-Experten ist jedoch das Mitführen von Positivkontrollen ratsam, wenn wie hier sichergestellt wird, dass sich dadurch keine erhöhte Kontaminationsgefahr ergibt. Auf keinen Fall dürfen rezente Positivkontrollen in ein aDNA-Labor eingebracht werden. Statt moderne Kontrollen zu verwenden, kann auf einen bereits positiv getesteten aDNA-Extrakt ausgewichen werden, sofern sich diese DNA nach längerer Lagerung bei -20 °C noch eignet. Positivkontrollen bieten den Vorteil, Gründe für fehlschlagende PCRs zu eruieren. Denkbar sind dabei – wie in dieser Arbeit festgestellt – Qualitätsmängel in Mastermixen oder Sonden. Andernfalls wird möglicherweise fälschlich von einem Negativbefund ausgegangen.

3 Analyse der DNA aus historischem Skelettmaterial

Hinsichtlich der Analyse der DNA aus historischem Skelettmaterial wird zunächst auf den allgemeinen DNA-Erhalt eingegangen (Abschnitt 3.1). Die Diskussion von Negativergebnissen (Abschnitt 3.2) hat neben der von positiven Resultaten (Abschnitt 3.3) ihre Berechtigung.

3.1 DNA-Erhalt

Der DNA-Erhalt in den untersuchten Individuen kann unter zwei Aspekten betrachtet werden: Nachweisbarkeit von DNA und Qualität der erhaltenen DNA (siehe Abbildung 32). In dieser Arbeit konnte in 15 Individuen DNA von *Yersinia pestis* nachgewiesen werden, in weiteren 16 Erreger-negativen Proben gelang die Amplifikation des humanen Lokus *HLA* (siehe Tabelle 29). Insgesamt war also in 31 von 49 Individuen DNA enthalten, was auf einen guten DNA-Erhalt in diesen Skeletten hindeuten kann. Der DNA-Erhalt ist dabei bei den Fundorten Aschheim und Basel mit Anteilen von 58 und 50 Prozent nahezu gleich gut, bei Manching-Pichl mit 67 Prozent besser und bei Brandenburg mit 100 Prozent komplett gegeben. Wie bereits erwähnt sind die Schlussfolgerungen aus den *HLA*-Ergebnissen jedoch nur mit Einschränkung zu werten, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die amplifizierte DNA exogener Natur ist (siehe Abschnitt 1 in diesem Kapitel).

Hinsichtlich der DNA-Qualität waren bei der Betrachtung der *Yersinia pestis*-spezifischen Sequenzen aus konventionellen PCRs 48 Basen-Abweichungen in 22 Sequenz-Contigs verschiedener Loci aufgefallen (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.2.1). 163 weitere Contigs sowie zwei Reverse-Sequenzen hingegen waren an keiner Position verändert. Damit waren 88 Prozent der Sequenz-Contigs identisch zu den Referenz-Sequenzen, was auf eine gute Qualität der erhaltenen DNA hindeutet. Waren Sequenzen verändert, so waren unter den Basen-Austauschen G→A-Transitionen am häufigsten, gefolgt von Transitionen von C→T (siehe Tabelle 28; Anhang 14). Dabei handelt es sich trotz unterschiedlichen Phänotyps beide Male um Deaminationsprodukte von Cytosin (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4), die daraus resultieren, dass nach einer Amplifikation jeder der beiden komplementären DNA-Stränge sequenziert werden kann. Eine C→T-Degradation kann als C→T beobachtet werden, aber auch als G→A, wenn der komplementäre Strang sequenziert wird. Das Ergebnis ist kongruent mit den Daten aus der Literatur, wonach die häufigste Form eines DNA-Schadens die Deaminierung von Cytosin zu Uracil darstellt (Lindahl 1993; Hofreiter *et al.* 2001a; Brotherton *et al.* 2007; siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4). In Extrakten stark degradierter aDNA ist etwa jedes zehnte bis 20. Cytosin von einer Deaminierung betroffen (Burger 2007). Dass in dieser Arbeit ihre Zahl deutlich darunter liegt, ist durch den Einsatz von UDG zu erklären, welches G/C→A/T-Missinkorporationen auf einfache Art eliminiert (Hofreiter *et al.* 2001a). Andere Veränderungen in alter DNA wie sie auch in dieser Arbeit beobachtet wurden (siehe Tabelle 28), sollen Fehler der Polymerase bei der Inkorporation darstellen (Brotherton *et al.* 2007; siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4).

Bezüglich der Verwendung von Folge-Eluaten muss man ihren Vorteil, mindestens doppelt so viel DNA für Experimente zur Verfügung zu haben, abwägen gegen die möglichen negativen Folgen, die aus der Missinterpretation von Basen-Austauschen resultieren können (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4). Es empfiehlt sich daher, Folge-Eluate lediglich zur Bestätigung von Ergebnissen aus

Ersteluaten zu verwenden, eine Aussage beispielsweise über das Vorliegen einer Mutation jedoch nicht mit ihnen zu begründen. Grundsätzlich ist das Anfertigen von Folge-Eluaten von Vorteil, was durch die vielen Austausch-freien Sequenzen gezeigt wurde.

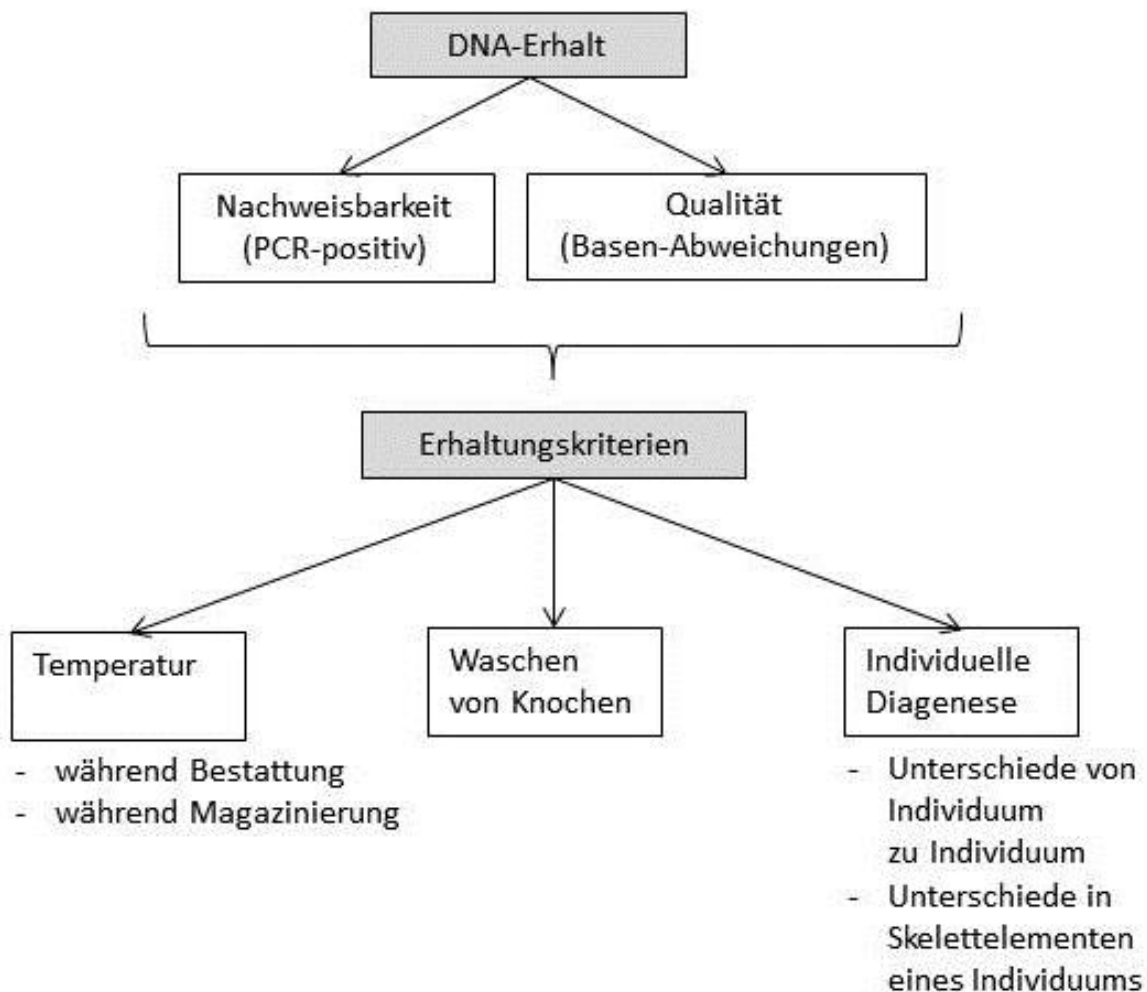


Abbildung 32: Der DNA-Erhalt zeigt sich anhand der Nachweisbarkeit und der Qualität der DNA und ist durch verschiedene Erhaltungskriterien bedingt. Zu diesen zählen die Temperatur während der Bestattung und der Magazinierung, das Waschen von Knochen und eine individuelle Diagenese, sowohl von Individuum zu Individuum als auch in unterschiedlichen Skelettelementen.

Kriterien für den allgemeinen DNA-Erhalt sind die Temperatur, das Waschen von Knochen und individuelle diagenetische Prozesse (siehe Abbildung 32). Wie eingangs bereits erwähnt, können Schlüsse auf einen unterschiedlichen DNA-Erhalt nicht aus der Liegezeit gezogen werden (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4). Ausschlaggebend ist jedoch die Temperatur und dies in zweierlei Hinsicht. Die Umgebungstemperatur des Grabs während der Bestattungszeit dürfte für alle Fundorte nahezu identisch gewesen sein, da alle Orte in Deutschland bzw. Basel liegen. Daneben ist die Temperatur von Bedeutung, bei der die Skelette nach ihrer Ausgrabung aufbewahrt wurden. Pruvost *et al.* haben gezeigt, dass aDNA nach der Entnahme der Knochen aus der konservierenden Umgebung des ursprünglichen Milieus relativ schnell degradiert. Die Degradation soll dabei nicht die Konsequenz von Unterschieden im Fossilisierungsprozess sein, sondern durch Veränderungen der Makroumgebung und/oder der Handhabung und Aufbewahrung in naturhistorischen Sammlungen bedingt sein. Die Aufbewahrungsbedingungen sollen sich besonders dann nachteilig auswirken, wenn – wie in den meisten Fällen archäologischer Knochenfunde – die enthaltene DNA-Menge bereits niedrig ist. Eine sechsfache Verminderung der DNA-Quantität kann für das Fehlschlagen von PCRs verantwortlich gemacht werden (Pruvost *et al.* 2007). Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Individuen sind bereits vor einigen Jahrzehnten gehoben worden (siehe Kapitel Material). Günstig auf

den DNA-Erhalt der Individuen aus Aschheim hat sich möglicherweise ihre Aufbewahrung in einer Gruft unter dem neu errichteten Urnenhaus auf dem Gemeindefriedhof Aschheim ausgewirkt, in der die Skelette seit Juni 2006 untergebracht sind (Gemeinde Aschheim 2013).

Daneben haben Pruvost *et al.* gezeigt, dass ungewaschene Knochen sechs Mal mehr DNA enthalten und doppelt so viele authentische aDNA-Sequenzen enthalten als Knochen, die nach Standardprozeduren behandelt wurden. Durch Waschen kann der größte Teil der löslichen DNA gelöst worden sein (Pruvost *et al.* 2007). Um Details an Knochen bei einer morphologisch-anthropologischen Untersuchung zu erkennen, muss anhaftende Erde jedoch entfernt werden. Die Skelettelemente der Individuen aus Aschheim, Manching-Pichl und Basel kamen gewaschen im aDNA-Bereich an. An den Zähnen der Individuen aus Brandenburg haftete bei ihrem Eintreffen zur molekularen Untersuchung noch Erde. Zusammen mit der wenigen seit der Ausgrabung vergangenen Zeit kann dies möglicherweise für den sehr guten DNA-Erhalt verantwortlich gemacht werden.

Innerhalb der verschiedenen Untersuchungskollektive variiert auch der DNA-Erhalt in einzelnen Individuen untereinander. So lässt sich unter den Individuen aus Aschheim und Brandenburg jeweils nur ein Individuum über den *pla*-Nachweis hinaus weiter typisieren (A120 und B3). Bei den Individuen aus Manching-Pichl lieferten die Extrakte von MP17-I, MP19-II und MPS4-XX nahezu gleich gute Ergebnisse, während bei MP59-I an einem Locus Probleme (*caf1*) auftraten oder eine Amplifikation gänzlich fehlschlug (s13) und bei MPS1-I die Amplifikation nur weniger Loci funktionierte (s12, s588, pPCP1).

Erklärt werden kann dies durch die Fragmentierung von aDNA. Manche Stellen des Genoms scheinen dabei stärker von Fragmentierung betroffen zu sein als andere. In Probe MPS1-I gelang beispielsweise neben der Amplifikation eines kurzen Fragments (69 bp bei s12) auch die Amplifikation längerer Fragmente (122 bp bei s588 und 135 bp bei pPCP1), wohingegen die Detektion anderer kurzer (76 bp bei s545, 78 bp bei s19) und langer (117 bp bei s920 bis 174 bp bei s1195) Fragmente fehlschlug.

Obwohl Individuen von einem Fundort stammen und mitunter im selben Grab bestattet wurden, weshalb von gleichen Bedingungen für den DNA-Erhalt ausgegangen werden kann, kann der DNA-Erhalt von Individuum zu Individuum variieren. Salamon *et al.* (2005) haben dies für Katzen- und Hühnerknochen gezeigt. Die Qualität von DNA aus Zähnen soll gewöhnlich jedoch besser sein als die aus Knochen (Zierdt *et al.* 1996). Allerdings gibt es auch hier Unterschiede. Laut Burger und Bollongino (2010) sind Zähne mit geschlossenen Zahnwurzeln zu bevorzugen, vor allem Molaren. Wiechmann & Grupe (2005) wiesen bereits darauf hin, dass Zahnwurzelspitzen von subadulten Individuen eine weitere Öffnung hätten als die Adulter, weshalb diese Zähne möglicherweise empfänglicher für diagenetische Prozesse seien, die zu DNA-Degradation führen. Entsprechend repräsentieren diese Zähne ein schlechteres Untersuchungsmaterial.

Der DNA-Erhalt muss auch nicht in jedem Skelettelement identisch sein. Im Gegenteil: aDNA-Experten haben eine lokale Heterogenität des DNA-Erhalts in einem Knochen festgestellt (Pruvost *et al.* 2007; Schultes *et al.* 1997).

3.2 Bedeutung und Erklärung der Negativergebnisse

Trotz dem negative Ergebnisse für den Bearbeiter ein unbefriedigendes Resultat darstellen, sind sie aussagekräftig und essentiell für die Authentizität der gesamten Studie (siehe Abschnitt 1 in diesem Kapitel). Nachfolgend werden in einem ersten Abschnitt die möglichen Gründe für Negativergebnisse genannt (Abschnitt 3.2.1), bevor in weiteren Teilen auf die Bedeutung der Negativergebnisse für die einzelnen Untersuchungskollektive eingegangen wird (Abschnitte 3.2.2 bis 3.2.4).

3.2.1 Mögliche Gründe für Negativergebnisse

Trotz mehrmaliger Versuche (siehe Tabelle 29 bzw. Anhang 11) war es in insgesamt 34 Proben nicht möglich, das Fragment des *Y. pestis*-spezifischen *pla*-Gens nachzuweisen. Negativergebnisse können generell durch mehrere Ursachen begründet sein: Inhibition, Fehlschlagen der Extraktion, keine

Infektion mit *Yersinia pestis* oder Anwesenheit unterhalb des Detektionslimits im Blut oder durch diagenetische Prozesse bzw. Abwesenheit des Erregers in der Pulpahöhle (Abbildung 33).

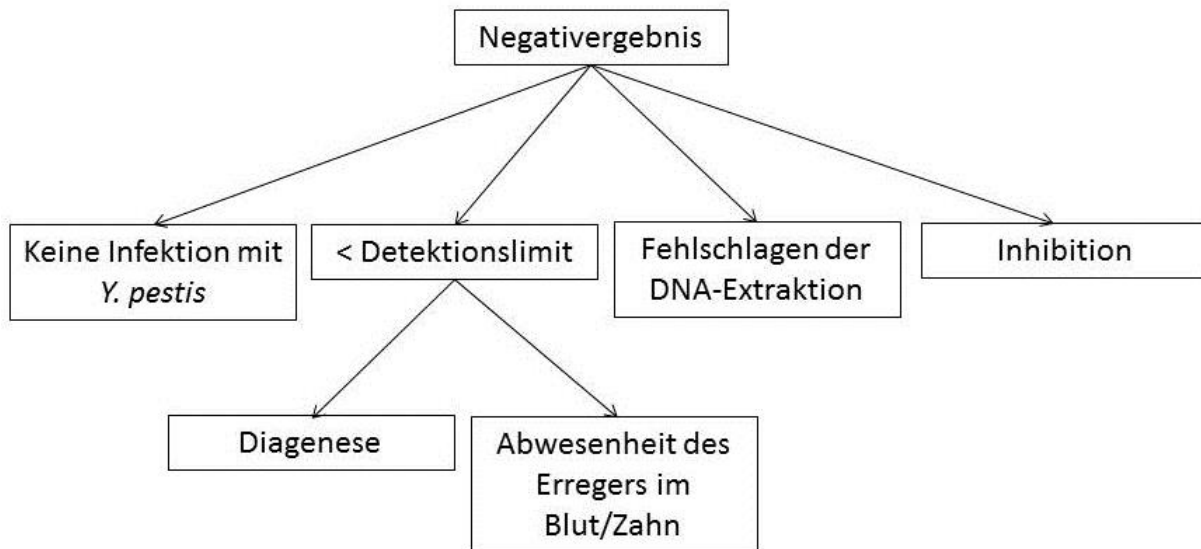


Abbildung 33: Mögliche Erklärungen für das Ausbleiben eines Detektionserfolgs.

Inhibition

Die Möglichkeit der Inhibition der aDNA-Extrakte wurde in der vorliegenden Arbeit durch Inhibitionstests ausgeschlossen (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.2.2 bzw. Anhang 5). Extrakte, die sich weder positiv auf das *pla*- noch auf das *HLA*-Gen testen ließen, wurden zusammen mit Kopien des *HLA*-Gens prozessiert. Das Ergebnis zeigte, dass keiner dieser Extrakte inhibiert war.

Fehlschlagen der Extraktion

Das Fehlschlagen der Extraktion ist insofern unwahrscheinlich, als die Extraktion bei einer Reihe von gleichzeitig prozessierten Proben – auch nach unterschiedlichen Methoden – erfolgreich war. Zwar war in dieser Arbeit in 18 Individuen neben dem *pla*-Gen auch das *HLA*-Gen nicht nachweisbar und es scheint demnach gar keine DNA extrahiert worden zu sein. Einschränkend muss man jedoch sagen, dass das *HLA*-Gen ein chromosomaler Locus ist und demnach nur zwei Mal pro Zelle vorkommt. Eine validere Aussage zum Fehlschlagen einer DNA-Extraktion ließe sich durch den (Nicht-)Nachweis mitochondrialer DNA treffen. Pro Zelle kommen durchschnittlich 2000 Mitochondrien vor, die insgesamt einen Anteil von 25 Prozent am Zellvolumen haben (Koolman *et al.* 2003).

keine Infektion mit *Yersinia pestis*

Als wahrscheinlichste Gründe für ein Negativergebnis kommen zwei Aspekte in Frage. Erstens, *Y. pestis* ist nicht nachweisbar, wenn der Verstorbene gar nicht mit dem Erreger infiziert war, sondern an einer anderen Krankheit oder altersbedingt gestorben ist. Auch während einer durch einen bestimmten Erreger verursachten Seuche sterben Menschen noch aufgrund anderer Leiden (Cohn & Alfani 2007; Prentice *et al.* 2004), eventuell auch vermehrt (Cohn & Alfani 2007). Der britische Mediziner John Shrewsbury (1970) nimmt an, dass neben der Pest eine weitere Seuche gewütet haben muss (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 5). Diese Theorie kam auch während der Epidemie in Surat 1994 auf (John 1994), als trotz dem Vorhandensein diagnostischer Möglichkeiten – aber deren teilweisem Fehlschlagen – an der Diagnose Pest gezweifelt und Alternativen vorgeschlagen wurde (Dar *et al.* 1994). Für die erste Pandemie nimmt August Hirsch (1881) an, dass gleichzeitig mehrere Krankheiten – namentlich die Blattern (Pocken) – geherrscht haben, die Beulenpest aber aus ihnen hervorrage. Die Annahme einer weiteren Krankheit ist deshalb denkbar, da selten eine „reine“ Epidemie einer einzigen Krankheit auftritt (Longrigg 1980). Auch Bergdolt (2000) ist der Ansicht, dass Cholera, Typhus, Polio, Diphtherie, Pocken und Grippe nur regional bedeutsam waren. Anders sehen dies Perry & Fetherston. Ihrer Ansicht nach haben Pocken, Malaria, Dysenterie, Grippe, Typhus und Syphilis einen signifikanten Beitrag zur Depopulation während der zweiten Pandemie beigetragen (Perry & Fetherston 1997).

In Italien soll zur Zeit des Schwarzen Todes zusätzlich Milzbrand oder eine andere epidemisch auftretende Infektionskrankheit grassiert sein (Vasold 2003). Milzbrand, verursacht durch *Bacillus anthracis* (Hahn 2009), kann jedoch keine derart hohen Bevölkerungsverluste anrichten wie für Europa vom 14. bis frühen 18. Jahrhundert beschrieben (Vasold 2003). Für eine weitere Krankheit wie Milzbrand spricht laut Vasold, dass von einem vorhergehenden unbekanntem Massensterben 1339/40 noch Erreger bestanden haben können (Vasold 2003) und dass von dem neuen Massensterben auch andere Wirbeltiere dahingerafft wurden (Krüger 1972), die für die Pest gewöhnlich unempfindlich sind (Vasold 2003). Andere Tiere als Ratten, Meerschweinchen und einige Affenarten können nur durch umständliche Labormethoden mit dem Pesterreger infiziert werden (Diedonné 1903). Eine Epidemie in Mailand im Jahr 1477, bei der die Kranken durchschnittlich nach 13 Tagen starben, haben heutige Gelehrte Thyphus zugeschrieben (Cohn & Alfani 2007). Laut Vasold haben Historiker die Pest auch immer wieder mal auf den Winter verlegt statt in den Sommer, in dem sich Flöhe in den mitteleuropäischen Breiten am raschesten fortpflanzen könnten und am beweglichsten seien, und dadurch mit dem im Winter grassierenden Fleckfieber oder anderen Krankheiten verwechselt (Vasold 2003). Fleckfieber ist eine durch Körper- bzw. Kleiderläuse übertragene Infektionskrankheit, verursacht durch *Rickettsia prowazekii* (Bogdan 2009). Der Erreger wurde in einem Massengrab des 18. Jahrhunderts im französischen Douai identifiziert (Nguyen-Hieu *et al.* 2010). Darüber hinaus sei die Pest oft für Lepra gehalten worden (Mollaret & Brossollet 1987 IN: Vasold 2003), weil „Historiker sich immer wieder auf ältere historiographische Darstellungen stützen“ und fast „zwangsläufig auch unrichtige Dinge übernommen“ werden (Vasold 2003). Cohn & Alfani (2007) erwähnen Syphilis als zweite meistgefürchtete Epidemie der Zeit zwischen der Mitte des 15. und dem 17. Jahrhundert, die sich allerdings durch eine lange Krankheitsdauer auszeichnet.

Anwesenheit unterhalb des Detektionslimits

Als zweiter wahrscheinlichster Grund für Negativergebnisse kommt ein Unterschreiten des Detektionsniveaus in Frage, entweder weil aufgrund diagenetischer Prozesse keine spezifische DNA mehr erhalten oder weil der Erreger nicht ins Blut gelangt ist.

Auf den Ablauf und die Folgen diagenetischer Prozesse ist bereits eingegangen worden (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 4). Die Aufbewahrung von Zähnen im Erdboden für nur sechs Wochen soll zu einer Abnahme der extrahierbaren endogenen DNA um 90 Prozent führen (Pfeiffer *et al.* 1999). Darüber hinaus finden sich bei Hinnebusch & Schwan (1993) Beweise für eine schnelle Degradation von *Y. pestis*-DNA: Nach fünfmonatiger Aufbewahrung fiel die Sensitivität des Assays zur Detektion von *pla* von 100 auf 90 Prozent bei der Untersuchung von Flöhen, die bei 22 °C gelagert wurden, und auf 55 Prozent bei Flöhen, die bei Raumtemperatur in Ethanol aufbewahrt wurden.

Um hunderte Jahre nach dem Tod das verursachende Bakterium in Skeletten nachweisen zu können, muss der Erreger naturgemäß in die Knochen und Zähne gelangt sein. Dies geschieht über den Blutweg. Bos *et al.* stellten bei ihrer Untersuchung von Pestopfern fest, dass Zähne mehr *Y. pestis*-DNA enthielten als Knochen, was mit den Erwartungen zu einem durch Blut übertragenen Pathogen übereinstimmt, dessen DNA wahrscheinlich in den vertrockneten Blutgefäßen der Pulpa überdauert (Bos *et al.* 2011). Die Anzahl an Möglichkeiten bei einer Pestinfektion, bei denen der Erreger nicht ins Blut gelangt, sind limitiert (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 3.1). Die im Zuge einer Beulenpest auftretende Bakteriämie ist in leichten Fällen reversibel (Butler 1983, 1994; Teissier *et al.* 1921b; Ohoto 1923 IN: Pollitzer 1954; siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 3.1). Es ist dann aber auch unwahrscheinlich, diese Erkrankten unter Pestopfern zu finden, wenn man annimmt, dass sie sich gänzlich von der Krankheit erholt haben.

Bei einer primären Lungenpest entsteht ebenfalls sekundär eine Bakteriämie. Da die Krankheit jedoch rasch voranschreitet und innerhalb von zwei bis vier Tagen nach Infektion zum Tod führt, ist fraglich, ob wirklich in jedem Fall die Zeit für die Entstehung einer Bakteriämie ausreicht. Bei allen anderen Unterformen der Pest – der primären Pestseptikämie und den schweren Stadien der sekundären Pestseptikämie sowie der aus ihnen folgenden sekundären Lungenpest – ist der Erreger ins Blut gelangt (siehe Abbildung 3). In Mäusen wurden bei einer Bakteriämie 10^4 bis maximal 10^7 *Y. pestis*-Zellen pro μ l Blut gezählt (Douglas & Wheeler 1943). Experimentell wurde auch gezeigt, dass die subkutane Inokulation von einer bis zehn lebensfähigen Bakterien in Mäuse und Meerschweinchen das Tier tötet, sobald die Bakterien eine kritische Masse von 10^6 Bakterien/ml Blut

erreicht haben (Butler 1983). Laut Norkina *et al.* werden bei einer Bakteriämie in einem Milliliter Blut durchschnittlich 10^6 bis 10^8 colony forming units (CFU) an *Y. pestis*-Zellen erreicht (Norkina *et al.* 1994 IN: Tomaso *et al.* 2007), also Kolonie-bildende Einheiten. Als eine koloniebildende Einheit werden mehrere Zellen bezeichnet, die zur Entstehung einer Kolonie führen. Der Begriff bezeichnet also nicht wie oft fälschlicherweise angenommen eine einzige Bakterienzelle, die eine einzelne Kolonie bildet (Heritage *et al.* 1996). Eine *Yersinia pestis*-Zelle kann bis zu 186 Kopien des pPCP1-Plasmids besitzen (Parkhill *et al.* 2001) und damit ebenso viele Kopien des darauf lokalisierten *pla*-Gens. Bei einem Tod durch Septikämie muss daher das Bakterium aufgrund der hohen Erregerlast im Blut anhand des *pla*-Gens nachweisbar sein.

Allerdings ist laut Gilbert *et al.* nicht garantiert, dass *Y. pestis* bei einer systemischen Infektion in den Zahn gelangt (Gilbert *et al.* 2004). Sie führen eine Arbeit von Aboundharam *et al.* (2000) an, in der es gelungen ist, DNA des Bakteriums *Coxiella burnetii* in Zahnpulphöhlen von fünf von zehn Meerschweinchen 15 bis 20 Tage nach intraperitonealer Injektion der Bakterien nachzuweisen. Allerdings waren bei keinem Tier Blutkulturen und Zahnhöhlen gleichzeitig PCR-positiv. Gilbert *et al.* schlussfolgerten, dass keine direkte Beziehung zwischen Bakteriämie und Kolonisation der Pulpa besteht und dass *Y. pestis* zwar nicht in den Zähnen ihrer untersuchten Individuen anwesend war, die Infektion aber den Tod verursacht hat (Gilbert *et al.* 2004). Ob jedoch wie im Fall des Q-Fieber-Erregers ebenfalls keine Korrelation bei der Krankheit Pest besteht, ist für *Y. pestis* nicht gezeigt worden. Stattdessen ist eine wahrscheinlichere Erklärung für das Fehlschlagen des Pest-Nachweises durch die Gilbert-Gruppe die starke Fragmentierung der DNA, durch die die Amplifikation von 148 bis 300 bp großen *pla*-Fragmenten verhindert wurde. Dies wird dadurch gestützt, dass Schünemann *et al.* (2011) und Bos *et al.* (2011) später in Individuen vom Friedhof East Smithfield *Y. pestis* detektieren konnten. Gilbert *et al.* (2004) hatten ebenfalls unter anderem zwei Skelette dieses Fundorts untersucht. Schünemann *et al.* (2011) stellten in ihrer Studie fest, dass die DNA-Fragmente lediglich 36 bp lang waren. Dies erklärt ein Fehlschlagen größerer Fragmente, falls es sich in der Gilbert-Studie um tatsächliche Pest-Opfer gehandelt hat.

Die Möglichkeit, dass der Erreger zwar ins Blut gelangt ist, aber mittels der Assays in dieser Arbeit nicht detektiert werden konnte, ist auszuschließen. Die Assays zum Nachweis des *pla*-Gens haben beide ein Detektionslimit von vier Kopien, was deutlich unter der Anzahl der Kopien des pPCP1-Plasmids mit dem darauf befindlichen Gen pro Bakterienzelle liegt (siehe oben). Die in dieser Arbeit etablierten Assays sind also so sensibel, dass minimale Mengen ausreichen, um noch zu einem Detektionserfolg zu führen.

Ungeachtet der im Folgenden Einzeldiskussionen der jeweiligen Fundorte ist festzuhalten, dass sich Aussagen über die tatsächliche Belastung mit einem Bakterium nur aus einem Positivbefund treffen lassen oder wie McCormick (2007) formulierte: „(...) *the absence of evidence is not evidence of absence*“.

3.2.2 Aschheim

Trotz dem die Detektion des Pesterregers in Individuen aus Aschheim generell gelungen ist, so blieben doch viele Proben ohne positives Ergebnis. Insbesondere war es in dieser Arbeit nicht möglich, die für die Individuen A166 und A167 publizierten positiven Ergebnisse (Garrelt & Wiechmann 2003; Wiechmann & Grupe 2005) reproduzierbar oder überhaupt zu bestätigen (Tabelle 37). Bei den beiden handelt es sich um die skelettalen Überreste zweier Frauen, die in einem Doppelgrab bestattet worden waren. Die eine Frau (Grab 167) verstarb im juvenilen Alter, die andere (Grab 166) in der adulten Altersklasse. Anhand von mitochondrialen HVRI-Analysen gaben Wiechmann & Grupe (2005) den Hinweis auf das Vorliegen einer möglichen Mutter-Kind-Verbindung zwischen den beiden, wofür auch ihr jeweiliges Alter zum Todeszeitpunkt spreche.

Betrachtet man die Ergebnisse von Wiechmann & Grupe (2005) genauer, so lässt sich die Abweichung des Ergebnisses im Vergleich zu dieser Studie erklären. In der älteren Studie waren aus mehreren Zähnen (zwei bei A166, vier bei A167) beider Individuen DNA-Extraktionen angestrebt worden. Es ließ sich jedoch nicht in jedem Zahn die *Y. pestis*-spezifische *pla*-Sequenz nachweisen (Tabelle 37). Im Gegenteil: Bei A166 war dies nur aus Zahn 26 möglich, bei A167 nur aus Zahn 16. Bei

A167 war somit die Detektion des Pesterreger-Gens aus drei Zähnen nicht möglich, bei A166 aus einem (Wiechmann & Grupe 2005).

Tabelle 37: Unterschiedliche Amplifikationserfolge in dieser Arbeit und der Studie von Wiechmann & Grupe 2005. (1) und (2) geben die Extraktionsversuche an, x/y die Anzahl der Positivergebnisse bezogen auf die Gesamtversuche. *nur Ersteluate bewertet; †3. Extraktionsmethode nach Rohland *et al.* (2010) und Rohland & Hofreiter (2007a)

Individuum (Altersklasse)	diese Arbeit			Wiechmann & Grupe (2005)	
	Zahn	qPCR	konv. PCR	Zahn	konv. PCR
166 (adult)	27	1/4*	0/3*	26	2/7
				17 (1) + (2)	0/7
167 (juvenil)	23	0/4**	0/3**	47	0/4
				16 (1) + (2)	4/7
				46	0/3
				36	0/3

Die Analysen humaner mitochondrialer wie nukleärer DNA des Individuums 167 hatte anders als bei Individuum 166 zudem zu inkonsistenten Ergebnissen geführt, was auf einen schlechteren DNA-Erhalt schließen lässt. Dass in der vorliegenden Arbeit bei diesen beiden Individuen daher das *pla*-Gen nicht oder nur inkonsistent via qPCR nachgewiesen werden konnte, passt demnach ins Bild. Aus dem wenigen zu Beginn dieser Arbeit vorhandenen Zahnmaterial scheinen zufällig jene Zähne ausgewählt worden zu sein, die keine oder wenig Erreger-DNA enthielten oder Erbmaterial unterhalb des Detektionslimits. Auch Gilbert *et al.* (2004) halten es aufgrund der Natur der DNA-Degradation für unwahrscheinlich, dass *Y. pestis*-DNA in fast allen Zähnen eines infizierten Individuums erhalten ist. Von der juvenilen Frau aus Grab 167 wurde zudem aus dem Zahn 23 DNA extrahiert. Eckzähne sind aufgrund der Vorliegens von lediglich einer Wurzel nur bedingt für aDNA-Analysen geeignet. Außerdem kann der bereits genannte Grund hineinspielen, dass Zähne subadulter Individuen empfänglicher für diagenetische Prozesse sind (Wiechmann & Grupe 2005; siehe Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel).

Da die ersten Ergebnisse für diese beiden Individuen nicht vielversprechend waren, gleichzeitig aber Extrakte anderer Individuen des Gräberfelds Aschheim-Bajuwarenring Aussicht auf Erfolg stellten, wurde auf DNA-Extraktionen aus weiteren Zähnen der beiden Frauen verzichtet. Dies geschah auch im Hinblick auf die während der Arbeit anlaufenden Gesamtgenom-Sequenzierungen, für die Material gespart werden sollte.

Abgesehen von diesen beiden Individuen konnte auch in anderen Aschheimer Skeletten keine Pest-DNA nachgewiesen werden, auch wenn sie im selben Grab bestattet worden waren wie Pest-positive Individuen. Für den schlechteren DNA-Erhaltungsgrad der Individuen ist neben den bereits genannten allgemeinen Punkten (siehe Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel) der generelle Erhaltungszustand der Skelette des Fundorts Aschheim eine Erklärung. Bei der anthropologisch-morphologischen Untersuchung wurde eine unvollständige Erhaltung der meisten Skelette und eine starke Fragmentierung festgestellt. Die Knochenoberfläche zeigte zudem Zeichen erheblicher Erosion, was sich durch die Lokalisation der Nekropole an der östlichen Grenze der Münchner Schotterebene erklären ließ. In Schotter bestattete Knochen sind über Jahrhunderte langsamem Abschleifen ausgesetzt, was sie zu Staub zermahlen kann. Ein hoher Grundwasserspiegel wie er für Aschheim charakteristisch ist, kann darüber hinaus eine feuchte Grabumgebung schaffen, die die Knochenstruktur zerstört. Glücklicherweise war das Cranium, aus dem Proben in Form von Zähnen entnommen wurden, besser erhalten als das Postcranium (Staskiewicz 2007).

3.2.3 Manching-Pichl

In dieser Arbeit wurden zum Teil jene Individuen nochmals untersucht, die in den Vorgängerarbeiten bereits positive Ergebnisse erzielt hatten (Wiechmann *et al.* 2010; Garrelt & Wiechmann 2003; Garrelt 2002). Grund dafür war eine nach der Pesterreger-Detektion geplante Typisierung. Dennoch konnten Daten nur in drei von zehn Fällen reproduziert werden (siehe Tabelle 38).

Tabelle 38: Vergleich der Amplifikationserfolge des *pla*-Gens in Individuen aus Manching-Pichl in dieser Arbeit und der Diplomarbeit von Christina Garrelt (2002). x/y gibt die Anzahl der Positivergebnisse bezogen auf die Gesamtversuche an. *Gewertet sind PCRs unter Einsatz jeweils des ersten Eluats nach der Extraktionsmethode von Wiechmann & Grupe (2005) mit Ausnahme von MPS4-XX; diese Probe wurde von Dr. Ingrid Wiechmann nach Rohland *et al.* (2010) und Rohland & Hofreiter (2007a) extrahiert.

Individuum	Alter	diese Arbeit		Garrelt (2002)*
		qPCR*	konv. PCR*	
MP17-I	11 a	4/4	3/3	1/4
MP22	20-22 a	0/4	0/3	1/4
MP26-I	fa	0/4	0/3	1/4
MP34-I	fa	0/4	0/3	4/4
MP44-III	5 a	0/4	0/3	1/4
MP73-I	20-25 a	0/4	0/3	1/4
MPS1-I	8 a	4/4	1/3	4/4
MPS3-IIIX	12-14 a	0/4	0/3	1/4
MPS4-VI	10 a	0/4	0/3	1/4
MPS4-XX	15 a	4/4	4/4	3/4

Gründe für die Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Studien können – wie bei den Aschheimer Individuen ersichtlich (siehe Abschnitt 3.2.2 in diesem Kapitel) – aus unterschiedlich gut geeignetem Material für aDNA-Analysen resultieren (siehe Abschnitt 3.1 in diesem Kapitel). Unterschiedliche Zähne können unterschiedliche Mengen des Erregers beherbergen. Dies zeigt sich im Kollektiv Manching-Pichl beispielsweise an Individuum MP17-I, das in der Vorgängerstudie schwach positiv getestet worden war, nur in einer von vier PCRs war die Probe positiv. In der aktuellen Arbeit war die Probe dieses Individuums hingegen eine der *pla*-positivsten der ganzen Arbeit.

Mit Ausnahme des Individuums MP34-I wurden darüber hinaus in beiden Studien stets Zähne verwendet. In der vorliegenden Arbeit stand für Analysen dieses Skeletts jedoch nur noch Knochenmaterial, ein Stück der Diaphyse des vollständigen Humerus, zur Verfügung. Für aDNA-Analysen eignet sich laut Burger & Bollongino zwar jede Art von Knochenkompakta, insbesondere Diaphysen von Langknochen. Dennoch gibt es dabei Unterschiede. Gut erhaltene Proben, also schwere und harte Knochen, eignen sich gut. Morphologisch vollständige Knochen sollen auch molekular besser erhalten sein als fragmentierte (Burger & Bollongino 2010). Wegen der unterschiedlichen Materialeignung ist eventuell auch die Auswahl von jenen Individuen, die in einer Vorgängerstudie bereits zu positiven Ergebnissen geführt hat, irreführend. Womöglich hätten auch in der Vorgängerstudie *pla*-negative Individuen in dieser Arbeit zu einem positiven Ergebnis geführt.

3.2.4 Basel

Die in dieser Arbeit erzielten negativen Ergebnisse der sechs Basler Individuen passen ebenfalls zu den Resultaten einer früheren Untersuchung von Dr. Ingrid Wiechmann aus dem Jahr 2007 (Wiechmann 2012, Email vom 1.8.2012). Damals wurden je zwei Zähne von drei Individuen aus den Gräbern 9, 32 und 64 unter Verwendung des Primerpaars YP12D/YP12R von Raoult *et al.* (2000) untersucht. Weder in den drei PCRs, die mit den aDNA-Extrakten aus den jeweils ersten Zähnen durchgeführt wurden, noch in den zwei PCRs der zweiten Zähne ließ sich in der Vorgängerarbeit die *pla*-Sequenz nachweisen. In den als Negativkontrollen mitgeführten Extraktions- und PCR-Kontrollen hatte sich ebenfalls kein Amplifikat nachweisen lassen (Wiechmann 2012, Email vom 1.8.2012). Da dort jedoch aufgrund der Reglements für die Arbeit im aDNA-Labor keine Positivkontrolle mitgeführt worden ist, lässt sich nicht prüfen, ob die PCRs an sich funktioniert haben.

Man könnte annehmen, dass die Basler Individuen dennoch an einer durch *Yersinia pestis* verursachten Pest verstorbenen sind, sich der Erreger wegen diagenetischer Prozesse jedoch nicht mehr nachweisen lässt.

Die Individuen des Massengrabs datieren ins 14./15. Jahrhundert wie ^{14}C -Untersuchungen gezeigt hatten (siehe Tabelle 4). Diese Datierung passt zum Beginn des Schwarzen Todes und wäre ein Indiz für das Vorliegen der Pest, wenngleich diese im Bericht von Matt & Alder zu dieser Zeit nicht erwähnt wird. Jedoch war die Pest bereits in der Mitte des Jahres 1349 in Basel und Umgebung (Lechner 1884; Koelbing 1984; Buess 1956; siehe Kapitel Material, Abschnitt 4 bzw. Kapitel Diskussion, Abschnitt 3.3.2.2.1).

Aufgrund des Fehlschlagens eines Pest-Nachweises muss auch hier in Betracht gezogen werden, dass andere Gründe zum gleichzeitigen Bestatten von Menschen in einem Massengrab geführt haben können. Tödliche Verletzungen beispielsweise durch kriegerische Auseinandersetzungen wurden für die Basler Individuen jedoch ausgeschlossen (Matt & Alder 2008). Möglich ist auch, dass die Basler an einer anderen Krankheit gestorben sind. Der Probensendung der in dieser Arbeit untersuchten Zähne war ein Schreiben beigelegt mit Betreff „Pest-TBC-Untersuchung“. Eine Tuberkulose-Erkrankung als Todesursache und Grund für ein gleichzeitiges Bestatten mehrerer Individuen in einem Massengrab anzunehmen, ist jedoch ebenfalls unwahrscheinlich. Die Tuberkulose, die beim Menschen meistens durch *Mycobacterium tuberculosis* verursacht wird, ist eine chronisch verlaufende Infektionskrankheit, die durch ein häufiges Auf- und Ab der Krankheitsprogression und -remission gekennzeichnet ist. Trotz dem es schnell verlaufende Formen der Krankheit gibt, die „galoppierende Schwindsucht“ (Bange *et al.* 2009), sterben Betroffenen individuell und nicht alle zur gleichen Zeit, was keinen Grund für eine gleichzeitige Bestattung liefern würde.

3.3 Pest-Nachweise

In den folgenden Abschnitten wird auf die als Pest-positiv identifizierten Individuen getrennt nach Justinianischer Pest (Abschnitt 3.3.1) und zweiter Pandemie (Abschnitt 3.3.2) eingegangen.

3.3.1 Die Pest in Aschheim im 6. Jahrhundert

Obwohl in mehreren Individuen des Fundorts Aschheim das *Y. pestis*-spezifische *pla*-Gen sowohl mittels konventioneller als auch qPCR nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 29), war die durchgehende Typisierung des Erregers nur in Probe A120 möglich (siehe Tabelle 32). Mit dem Nachweis des Pesterregers – auch in einem unabhängigen Referenzlabor im ArchaeoBioCenter-Labor und in Mainz – wurden damit hier wie bereits in Harbeck *et al.* (2013) dargelegt erstmals zweifelsfrei *Yersinia pestis* als Verursacher der Justinianischen Pest bewiesen. Die Debatte um das äthiologische Agens der ersten Pandemie kann damit als beendet angesehen werden. Im Folgenden wird die phylogenetische Positionierung des Erregers im Stammbaum von *Y. pestis* (Abschnitt 3.3.1.1) sowie dessen Bedeutung für vorhergehende Studien (Abschnitt 3.3.1.2) dargelegt. In den weiteren Abschnitten wird die Übereinstimmung der Aschheim-Ergebnisse mit einem Ursprung des Erregers in China (Abschnitt 3.3.1.3) sowie die Verbreitung der Pest nach Bayern (Abschnitt 3.3.1.4) diskutiert. Zuletzt wird in Abschnitt 3.3.1.5 auf die Bedeutung des Pest-Nachweises für frühmittelalterliche Mehrfachbestattungen eingegangen.

3.3.1.1 Phylogenetische Lokalisierung des Aschheimer Erregers

Die Extrakte jener acht reproduzierbar *pla*-positiven Individuen aus Aschheim wurden zur Typisierung an weiteren Stellen des Genoms untersucht, an fünf SNPs sowie an einer Mutationsstelle im *napA*-Gen.

Phylogenetische Positionierung anhand von SNPs

In dieser Arbeit konnte – wie bereits in Harbeck *et al.* (2013) beschrieben – der *Yersinia pestis*-Stamm, dessen DNA aus dem Aschheimer Individuum A120 isoliert wurde, durch die Feststellung des Status als „ancestral“ bzw. „derived“ an fünf SNP-Positionen (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.2.3.1) auf dem aktuellsten phylogenetischen Stammbaum (Cui *et al.* 2013) angenähert werden. Er liegt demnach auf Branch 0 entweder zwischen dem Verzweigungspunkt von Stamm MNG 2972 und dem Knoten N04, zwischen den Knoten N04 und N05, zwischen dem Knoten N04 und O.ANT1 oder

entlang eines der Unter-Äste von 0.ANT1 (Harbeck *et al.* 2013; siehe Abbildung 34). Im Vergleich zu dem mongolischen Stamm MNG 2972 unterscheidet sich der Erreger aus Aschheim jedoch an SNP s82. An dieser Position besitzt MNG 2972 einen ancestralen Status, der aDNA-Stamm ist derived (siehe Tabelle 32; Harbeck *et al.* 2013).

Im Vergleich mit dem Erreger der zweiten Pandemie – sowohl aus vorhergegangenen Studien als auch der Individuen in dieser Arbeit – zeigt sich, dass es sich bei dem Erreger aus Aschheim um einen anderen Stamm handelt. Er ist ursprünglicher als die Pathogene, die die zweite und auch die dritte Pandemie verursacht haben.

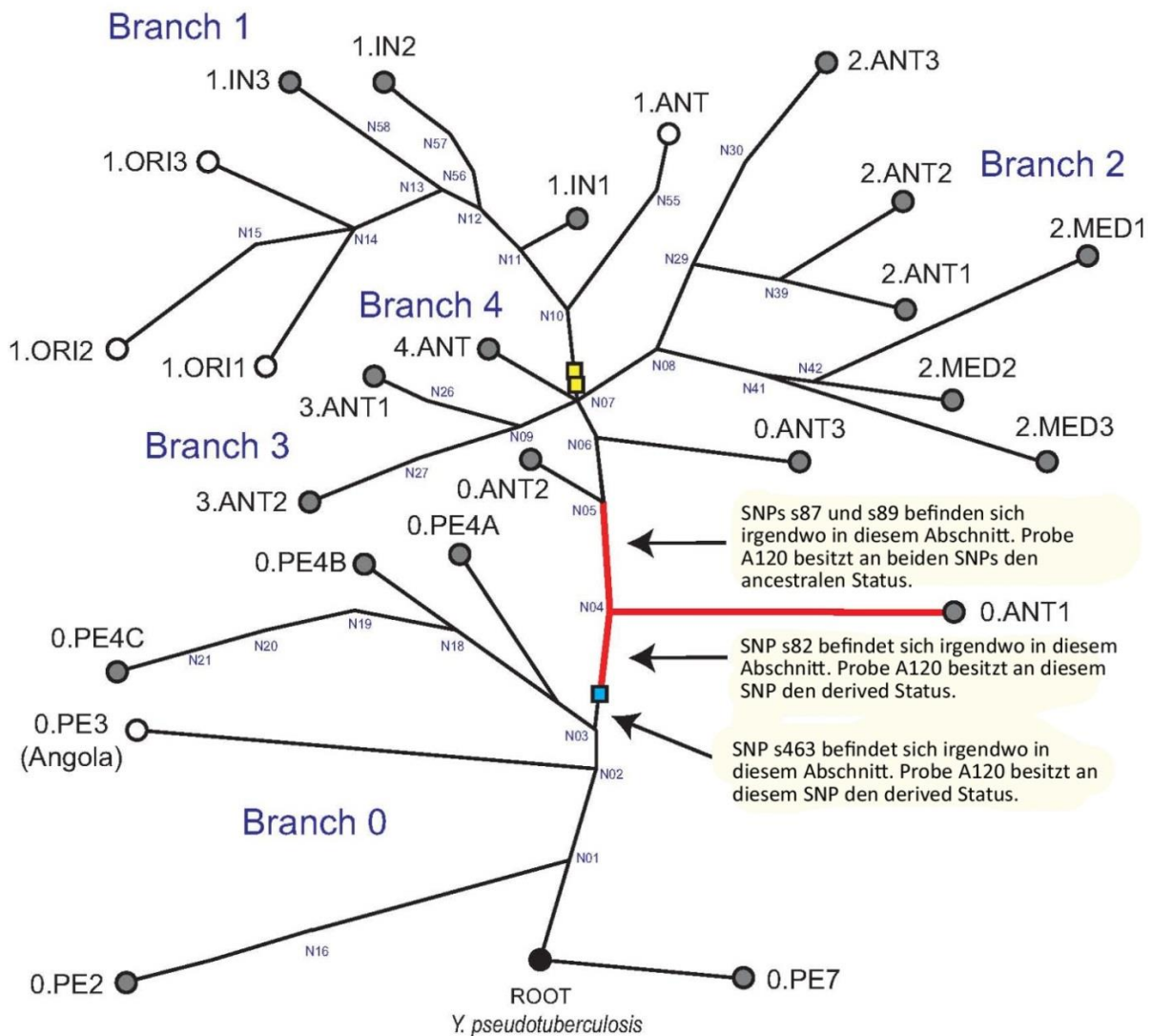


Abbildung 34: Lokalisation des Erregers aus der Aschheimer Probe A120 auf dem aktuellen phylogenetischen Stammbaum von Cui *et al.* (2013). Durch den ancestralen Status der Probe an den SNPs s545 (nicht gezeigt) und s87, s89 sowie des derived Status an den SNPs s82 und s463 lässt sich die isolierte Erreger-DNA auf Branch 0 entweder zwischen dem Verzweigungspunkt von Stamm MNG 2972 (blaues Kästchen) und dem Knoten N04, zwischen den Knoten N04 und N05, zwischen dem Knoten N04 und 0.ANT1 (rote Linien) oder entlang eines der Unter-Äste von 0.ANT1 (nicht gezeigt) einordnen. In gelb sind die phylogenetischen Positionen von Stämmen der zweiten Pandemie markiert, die aus historischem Skelettmaterial isoliert wurden (Hänsch *et al.* 2010; Bos *et al.* 2011). Der Stammbaum basiert laut Harbeck *et al.* (2013) auf den Abbildungen 1A und S3B in Cui *et al.* (2013).

Abbildung aus Harbeck *et al.* (2013) mit Erlaubnis der Autoren

napA

Darüber hinaus wurde im *napA*-Gen auf das Vorliegen einer G→A-Mutation an Position 1021 getestet, die für das *Microtus*-Biovar beschrieben wurde (Zhou *et al.* 2004; siehe Kapitel IV, Abschnitt 2.1.4). In Probe A120 liegt mit der Base Cytosin der ancestrale Typ vor, die Stelle ist also nicht mutiert. Zum Vergleich wurde die reproduzierbare Sequenz dieser Probe an die entsprechenden

Stellen von *Y. pestis*- und *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen sowie die Sequenz der Probe MP17-I aligniert, die hierfür in der PCR einmalig mitgeführt worden war (siehe Abbildung 35). Hingegen besitzen die vier hier verwendeten *Y. pseudotuberculosis*-Stämme und die Stämme Microtus 91001, Pestoides F sowie Angola diese Mutation. Der Angola-Stamm scheint aufgrund dieser Punktmutation unfähig zu sein, Nitrat zu reduzieren (Li *et al.* 2009). Eine Assoziation des Erregers in Probe A120 mit dem Mikrotus-Biovar oder dem *Y. pestis*-Vorfahren scheint demnach nicht gegeben zu sein.

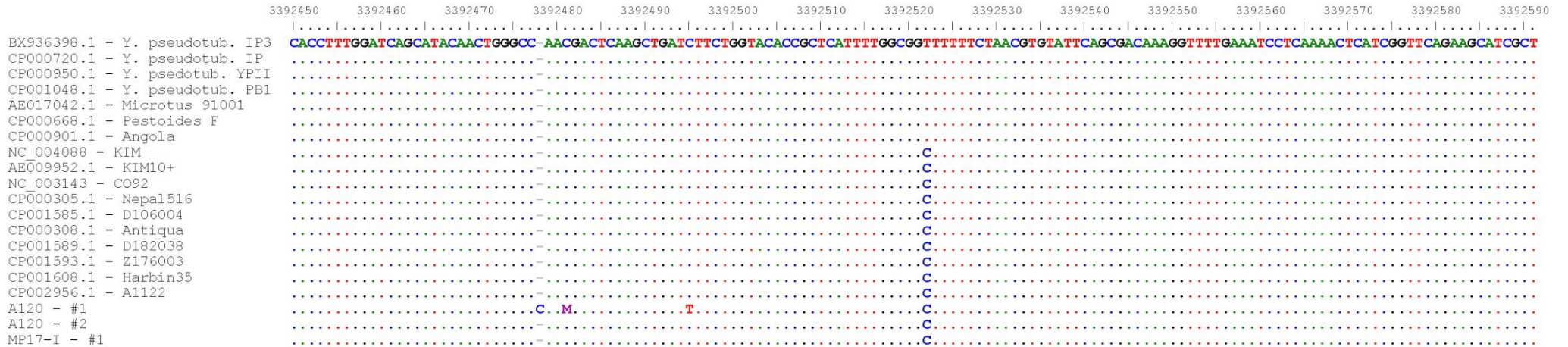


Abbildung 35: Vergleich der reproduzierbaren *napA*-Gen-Sequenz aus Probe A120 mit der Gensequenz in verschiedenen *Y. pestis*- und *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen. Sequenzen von Stämmen wurden über Genbank bezogen. Die Probe MP17-I war aus Vergleichsgründen einmalig in einer PCR mitgeführt worden. An Position 1021 des *napA*-Gens bzw. in der Abbildung an Position 3392522 befindet sich sowohl in dem Erreger aus Probe A120 als auch in dem aus Probe MP17-I sowie in diversen *Y. pestis*-Stämmen ein Cytosin (C). Es liegt keine Mutation zu Thymin (T) vor wie in Stämmen des *Microtus*-Biovars bzw. von *Y. pseudotuberculosis*. Die Sequenz von „A120 - #1“ weist zwei Mischbasen und eine vermeintliche Insertion auf, deren eindeutige Identität durch eine reproduktive Sequenz (A120 - #2) aber geklärt ist. Einige Stämme sind in der Abbildung verkürzt dargestellt. Es handelt sich um: BX936398.1 = *Y. pseudotuberculosis* IP32953, CP000720.1 = *Y. pseudotuberculosis* IP31758, CP000950.1 = *Y. pseudotuberculosis* YPIII.

Für den Erreger in Probe A120 bedeutet das Vorliegen des ancestralen, unmutierten Status an der untersuchten Stelle im *napA*-Gen, dass er die katalytische Untereinheit der periplasmatischen Nitrat-Reduktase (NAP) exprimieren konnte. Das Bakterium verfügte folglich über die Fähigkeit, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Damit wurde in dieser Arbeit eine biochemische Eigenschaft eines historischen Erregers entschlüsselt. Allerdings sei darauf verwiesen, dass auch der *Y. pseudotuberculosis*-Stamm IP32953 über diese Fähigkeit verfügt (Achtman *et al.* 2004), obwohl er an der korrespondierenden Region ein T und damit einen mutierten Zustand aufweist. Im *napA*-Gen besitzen verschiedene *Y. pseudotuberculosis*-Stämme jedoch diverse andere Mutationen.

Cui *et al.* haben kürzlich die Möglichkeit aufgeworfen, dass der Angola-Stamm (O.PE3) mit der Verbreitung der Justinianischen Pest von Afrika über ganz Europa assoziiert sein könnte. Sie begründen diese Hypothese mit mehreren Punkten. Erstens enthalte das Genom dieses Stamms eine außergewöhnlich hohe Anzahl an SNPs (Cui *et al.* 2013) – es sind mehr als 708 Genom-spezifische SNPs (Morelli *et al.* 2010). Diese sind laut Cui *et al.* möglicherweise während der zwei Jahrhunderte dauernden Epidemiewellen in Europa und Afrika entstanden. Zweitens geben die 95 Prozent-Konfidenzintervalle von Cui *et al.* für die Knoten N01 und N03, die den Angola-Stamm flankieren, ein Alter von 2775 v. Chr. bis 590 n. Chr. bzw. 932 v. Chr. bis 806 n. Chr. Jahren an, was mit dem Beginn der Pandemie im Jahr 541 überlappt. Drittens nehmen sie an, dass der Angola genannte Stamm tatsächlich im südwestafrikanischen Staat Angola isoliert wurde (Cui *et al.* 2013). Der ursprüngliche Isolationsort des Stamms ist jedoch unklar (Morelli *et al.* 2010) und der Stamm ist der einzige Respräsentant der molekularen Gruppe O.PE3 (Harbeck *et al.* 2013). Unabhängig von seinem Ursprung ist es möglich, dass Angola-ähnliche Stämme in die Justinianische Pest involviert waren. Bis sowohl weitere Angola-ähnliche Isolate als auch weitere Erreger aus der Zeit der Justinianischen Pest entdeckt und typisiert sind, bleibt dies jedoch nur eine Hypothese (Harbeck *et al.* 2013).

3.3.1.2 Bedeutung der Ergebnisse für frühere *Y. pestis*-Detektionen in aDNA

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit werden auch zuvor produzierte Ergebnisse (Wiechmann & Grupe 2005) bestätigt. Hingegen widersprechen die Resultate einer Studie von Bos *et al.*, in der *Yersinia pestis* als Verursacher der Pest des Justinian in Frage gestellt und sogar ausgeschlossen worden war. Dies basierte auf der Annahme, dass nur Stämme der Haupt-Äste eins und zwei humanpathogen seien, die Schätzungen von Bos *et al.* (2011) zufolge erst Ende des 13. bzw. zu Beginn des 14. Jahrhundert entstanden sind. In einer späteren Arbeit haben Bos *et al.* (2011) diese Behauptung revidiert. Die Arbeitsgruppe hatte auch für sich beansprucht, mit dem Genom des Erregers des Schwarzen Todes die älteste und längste authentische Sequenz eines alten Pathogens rekonstruiert zu haben (Schünemann *et al.* 2011). Wenigstens hinsichtlich des Alters haben die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit und der Studie von Harbeck *et al.* (2013) diese Studie mittlerweile abgelöst. Zudem haben Cui *et al.* kürzlich herausgefunden, dass die meisten *Y. pestis*-Linien beim Menschen eine Pest-Erkrankung hervorrufen können und vermuteten, dass diese Fähigkeit seit der Evolution des Erregers aus *Y. pseudotuberculosis* vor etwa 1500 bis 6400 Jahren bestanden habe. Sie schlussfolgerten, dass humanpathogene *Y. pestis*-Stämme lange vor dem Beginn der ersten Pandemie existierten (Cui *et al.* 2013).

Durch die phylogenetische Positionierung des in Aschheim für die Justinianische Pest verantwortlichen Stamms werden endgültig auch die Ergebnisse einer französischen Forschergruppe widerlegt, die bei der Untersuchung von Individuen aus dem französischen Sens aus dem 5. bis 6. Jahrhundert und Wien aus dem 7. bis 9. Jahrhundert als einzige eine Genotypisierung eines vermeintlichen Justinianische Pest-Erregers unternommen und ein Orientalis-Biovar identifiziert hatten (Drancourt *et al.* 2004; Drancourt *et al.* 2007). Diese Gruppe ist – mit Ausnahme der Untersuchungen an den Aschheimer-Individuen – die einzige, die bisher Opfer aus der Zeit der Justinianischen Pest untersucht hat (siehe Übersichten in Tsangaras & Greenwood 2012; Benedictow 2010).

Wie bereits in Harbeck *et al.* (2013) dargelegt war die Authentizität der Resultate der französischen Arbeitsgruppe bereits angezweifelt worden, da die Ergebnisse in einem mikrobiologischen Labor produziert, überaus hohe Erfolge erzielt (Prentice *et al.* 2004) und die für aDNA-Arbeiten geforderten

Anti-Kontaminationsmaßnahmen nicht befolgt wurden (Tsangaras & Greenwood 2012). Darüber hinaus wurde die Robustheit der Genotypisierungs-Methode in einer Studie (Drancourt *et al.* 2004) in Frage gestellt (Vergnaud 2005). Außerdem kann die Zuordnung zum Orientalis-Biovar nicht stimmen, da Isolate der 1.ORI-Gruppe erst vor etwa 200 bis 210 Jahren entstanden sein sollen (Morelli *et al.* 2010; Cui *et al.* 2013).

3.3.1.3 Alter und Ursprung des Erregers

Die archäologisch datierte Belegung des Gräberfelds von etwa 500 bis 700 n. Chr. (siehe Kapitel III, Abschnitt 1) und die ¹⁴C-Bestimmung von drei in dieser Arbeit untersuchten Individuen (siehe Kapitel Material, Abschnitt 1 bzw. Tabelle 4) passt zu den Daten von Cui *et al.* (2013): Für die drei Knoten N03 und N05 mit N04 dazwischen, in den die DNA des Aschheimer Erregers einzuordnen ist, geben sie in ihrer Abbildung S8 für die Altersschätzung 95 Prozent-Konfidenzintervalle an (Cui *et al.* 2013). Die Konfidenzintervalle für die Knoten N03 und N04, nicht jedoch das für N05, überlappen mit dem Beginn der ersten Pandemie im Jahre 541 n. Chr.

Was hingegen nicht mit historischen Daten übereinstimmt, ist der geographische Ursprung des Erregers der Justinianischen Pest. Die einzigen noch vorhandenen *Y. pestis*-Stämme, die dem gleichen Teil der globalen Phylogenie zugerechnet werden wie der Stamm aus A120 sind Mitglieder der Gruppe 0.ANT1, die nur in West-China vorkommen oder Stämmen aus der Mongolei (Riehm *et al.* 2012) entsprechen wie der MNG 2972. Historische Quellen hatten auf einen Ursprung in Afrika hingedeutet (Little 2007). Allerdings hatte Devignant bereits 1951 geschrieben: „*Variety II – perhaps the oldest – came from central Asia (Transbaikalia, Mongolia, Manchuria) and moved west with the Aryan invasions; it was the cause of the plague among Philistines. Later it appears to have followed the valley of the Nile into central Africa, leaving foci which still remain today. It is this variety also which, moving back toward the Mediterranean in the sixth century, is believed to have provoked the famous “Justinian plague” which spread throughout the Roman Empire. Since then, it seems to have disappeared from Europe and has remained isolated in Africa.*“ Auch wenn der Beginn der ersten Pandemie in Afrika angesiedelt wird, so verweist Devignant doch auf einen asiatischen Ursprung, wenn er die in der Bibel genannte „Pest der Philister“ am Ende des späten Bronzezeitalters um 1200 v. Chr. nennt (Sallares 2007; siehe Abschnitt 6 in diesem Kapitel). Auch Wu Lien-Teh *et al.* sprachen sich – entgegen der Neigung anderer Autoren – für einen asiatischen Ursprung aus und unterstützte die Meinung Paynes (1887), dass die afrikanische Pest möglicherweise eine Kolonie der asiatischen war (Wu Lien-Teh *et al.* 1936 IN: Pollitzer 1954).

Mit einem asiatischen Ursprung des Erregers der Justinianischen Pest wären alle drei Pandemien der Menschheitsgeschichte von in Asien entstandenen Stämmen verursacht worden. Der Ursprung der 1.ORI-Stämme, die die dritte Pandemie verursacht haben, wurde durch zwei kürzlich erschienene Studien in China angesiedelt (Morelli *et al.* 2010; Cui *et al.* 2013). Proben der zweiten Pandemie (Bos *et al.* 2011; Schünemann *et al.* 2011; Hänsch *et al.* 2010) wurden ebenfalls neben noch vorhandenen Stämmen aus China (Cui *et al.* 2013) in die Phylogenie eingeordnet.

3.3.1.4 Verbreitung der Justinianischen Pest nach Bayern

Aufgrund des Fehlens von historischen Quellen, die darauf hindeuten, dass die Justinianische Pest das heutige Bayern erreicht hat (Little 2007) ist der Nachweis des Pest-Erregers zur Zeit von Kaiser Justinian im Freistaat laut Harbeck *et al.* der einzige Beweis dafür, dass die Justinianische Pest die Alpen überquert und eine hier ansässige Bevölkerung befallen hat (Harbeck *et al.* 2013). In die gleiche Richtung geht der von dem Medizinhistoriker Justus Friedrich Carl Hecker 1829 zitierte Chronist Warnefrid (1723): „*Es ist bei der Seuche des Jahres 565 auffallend, daß sie die nördlichen Grenzen Italiens nicht überschritt, und die benachbarten Bojet und Allemannen unberührt ließ.*“ Weiter sagt Hecker (1829): „*doch waren die letztern schon früher von ihr heimgesucht worden.*“

Ob die Justinianische Pest größere Effekte in Nordeuropa und im Mittelmeerraum hatte, wird kontrovers diskutiert (Sallares 2007). Hecker zitiert den zeitgenössischen Historiker Prokop mit den Worten „*Von Syrien aus verbreitete sich die Pest zu den Persern, tief in die Länder von Mittelasien*

hinein, jenseits der Donau zu den deutschen, hunnischen und slavischen Völkern“ und gibt eine spätere Weiterverbreitung über das ganze weströmische Reich an. Laut Bergdolt hat die Pest im Winter 543 auch Reims und Trier erreicht (Bergdolt 2006; siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.2) – zwei Städte deutlich jenseits der Alpen. Sallares hält es auch für sehr wahrscheinlich, dass die in irischen Annalen erwähnte „blefed“ genannte Epidemie, die Irland 544 AD traf, das letzte Plätschern der ersten Welle der Justinianischen Pest auf ihrem Weg über Europa war (Sallares 2007). Außerdem erzählt der angelsächsische Benediktinermönch Beda Venerabilis (ca. 673-735) in seiner Arbeit „Life of St. Cuthbert“, dass der Heilige einst einen Tumor in der Leiste hatte und an derselben Krankheit litt, die „so viele in dieser Zeit in Britannien dahinraffe“ (zitiert von MacArthur 1957). Sallares hält diese Quelle für das beste Beweisstück für das Auftreten der Pest im anglo-sächsischen England (Sallares 2007).

Es gibt also sehr wohl Quellen, die für das Auftreten der Justinianischen Pest jenseits der Alpen sprechen. Angesichts der mehrfachen Bescheinigung des Vorkommens der Pest in Nord-Italien im sechsten Jahrhundert gibt Little eine mögliche Ausbreitungs-Route von Verona nach Süd-Bayern über den Brenner an (Little 2007). In einem „Conversations-Lexicon“ von 1817 heißt es, die deutschen Kriegsheere wären in Italien von der Pest ergriffen worden und hätten sie 555 nach Deutschland gebracht, „wo sie seit dieser Zeit an verschiedenen Orten ausbrach, z. B. im Jahr 565, besonders in Trier, 583, 590, wo sie auch in Rom wüthete“. Allerdings sind in dem „Conversations-Lexicon“ daran anschließend für die folgenden Jahrhunderte weitere Pestausbrüche in Teilen Deutschlands vermerkt, was der eingangs wiedergegebenen Schilderung widerspricht, Europa sei zwischen dem 8. und 14. Jahrhundert pestfrei gewesen (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.2). Zu berücksichtigen ist daher schließlich zum Einen, dass es sich um andere „Pesten“ gehandelt haben kann (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.1) – in dieser Periode sollen auch die Pocken geherrscht haben (Perry & Fetherston 1997) – und zum Anderen, dass Skelettmaterial aus der Zeit zwischen den beiden historischen Pandemien bisher nicht untersucht worden ist.

Damit bildet der Pestnachweis und die Typisierung des Erregers in Aschheim aktuell den ältesten und einzigen glaubhaften tiefergehenden tatsächlichen Beweis für die Anwesenheit des Pest-Bakteriums – überhaupt und weltweit.

3.3.1.5 Frühmittelalterliche Mehrfachbestattungen als Pest-Indikatoren

Durch den in dieser Arbeit erzielten Nachweis des Pesterregers in den frühmittelalterlichen Individuen aus Aschheim-Bajuwarenring rücken auch die Doppel- und Mehrfachbestattungen der Merowingerzeit im Gebiet der heutigen Grenzen der Bundesrepublik Deutschland in ein anderes Licht (Schneider 2008). In der Literatur werden nur Massengräber als Indikatoren einer hochinfektiösen Krankheit erwähnt (Little 2007; McCormick 2007). Dass während der ersten Pandemie solche angelegt wurden, ist belegt: Laut Gregor von Tours (539-594) gab es „so einen Mangel an Särgen und Grabsteinen, dass zehn oder mehr Körper im selben Grab beerdigt wurden“ (Little 2007). Laut Johannes von Ephesos hat Kaiser Justinian das Ausheben gigantischer Gruben befohlen, die 70.000 Tote aufnehmen können (McCormick 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen aber, dass auch Bestattungen von nur zwei oder drei Individuen zur gleichen Zeit – wie sie ab der Zeit um 600 selten, aber durchaus vorkommen (Menninger *et al.* 2004) – auf Epidemien hindeuten können. Dies steht im Widerspruch zur Meinung des deutschen Prähistorikers Rainer Christlein, der das alamannische Gräberfeld von Dirlwang bei Mindelheim untersuchte, auf dem ebenfalls zwei Doppelgräber identifiziert wurden. Ihm zufolge seien gleichzeitige Doppelbestattungen nur „schwer mit grassierenden Seuchen oder ähnlichen Zufälligkeiten zu erklären“. Nach der Durchsicht von etwa 80 analogen Fällen folgerte er aufgrund der deutlichen „Konzentration auf die Kombination Mann-Frau oder Mann-Mann“ sowie des anzunehmenden engen sozialen Konnex der in einer einzigen Grabgrube gleichzeitig Bestatteten, „daß in den Doppelgräbern eben meist die letzte Konsequenz germanischer Gefolgschaftstreue zu erblicken ist“ (Christlein 1971). Grundsätzlich kann die gleichzeitige Bestattung mehrerer Menschen auch andere Gründe haben. Für Mehrfachbestattungen von Männern werden in Sagas auch Verwandtschaft, Tod durch Erschlagen und gleichzeitiger Tod im Kampf genannt (Schneider 2008),

wobei tödliche Verletzungen nicht unbedingt am Knochen erkennbar sein müssen (Wahl *et al.* 1998). Heide Lüdemann kam zu dem Schluss, dass Mann-Frau-Bestattungen die häufigste Form von Mehrfachgräbern in der Merowingerzeit repräsentieren, gefolgt von Doppelgräbern von Frau und Kind (Lüdemann 1990).

Durch die für Aschheim gefundene Korrelation können jedoch möglicherweise andere potentielle Opfer der Justinianischen Pest identifiziert werden (Harbeck *et al.* 2013). 2002 wurde ebenfalls in Aschheim in einem „Am Wasserturm“ genannten Gebiet ein Teil eines weiteren frühmittelalterlichen Gräberfelds entdeckt. Das Gräberfeld wurde nicht vollständig ergraben, da ein Teil unter einem von einer Baumschule genutzten Gebiet liegt. Die Nekropole liegt 350 Meter vom Bajuwarenring entfernt. Unter den 24 merowingerzeitlichen Gräbern, die in die Zeit von vor 525/535 bis um 600 eingeordnet wurden, befanden sich auch hier eine Vierfach- und zwei Doppelbestattungen (Gutsmiedl 2010). Ein weiteres frühmittelalterliches Gräberfeld in der Nähe Aschheims liegt in Pliening. Bei den Gräbern 65/66 ist eine gleichzeitige Bestattung möglich, weswegen es sich um ein Doppelgrab handeln kann (Codreanu-Windauer 1997). 17 weitere Doppelgräber oder Doppelbestattungen des 6. bis 7. Jahrhunderts existieren in Altenerding (Landkreis Erding), einer Gemeinde in 22 Kilometern Entfernung von Aschheim. Hans Losert unterscheidet hier zwischen Doppelgräbern und Doppelbestattungen. In Ersteren sind zwei Individuen in einer Grube auf einer Ebene mit deutlichem Bezug zueinander beigesetzt. Gleichzeitigkeit soll dabei nicht erforderlich sein, wenngleich der zeitliche Abstand der einzelnen Beisetzungen meist nicht sehr groß sei. Bei Doppelbestattungen hingegen seien zwei Individuen gleichzeitig in einer gemeinsamen Grube beerdigt worden (Losert & Pleterki 2003). Außerdem wurden im Münchner Stadtteil Aubing laut Hermann Dannheimer „sechs oder sieben Beispiele“ für Doppelbestattungen auf dem frühmittelalterlichen Reihengräberfeld gefunden (Dannheimer 1998).

Interessant wäre darüber hinaus eine erneute Untersuchung der Individuen aus Sens aus dem 5. bis 6. Jahrhundert (Drancourt *et al.* 2004) sowie der zwölf Skelette aus Wien, die Drancourt *et al.* untersucht und fälschlicherweise dem Orientalis-Biovar zugeordnet hatten (Drancourt *et al.* 2004; Drancourt *et al.* 2007). Die Wiener Individuen waren innerhalb der Ruinen eines römischen Tempels bestattet worden und wurden durch eine Münze aus dem 5. Jahrhundert und eine ¹⁴C-Altersbestimmung auf das 7. bis 9. Jahrhundert datiert (Drancourt *et al.* 2007). Die Skelette beider Fundorte datieren in den für die Justinianische Pest relevanten Zeitraum.

Studien wie die hier vorliegende an Individuen solcher Fundorte würden das Verständnis der Verbreitung der Justinianischen Pest erhöhen.

3.3.2 Das große Sterben in Manching-Pichl und Brandenburg

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Individuen aus Manching-Pichl und Brandenburg in die Phylogenie von *Yersinia pestis* eingeordnet und mit den Resultaten von anderen Fundorten verglichen (Abschnitt 3.3.2.1). Darüber hinaus werden mögliche Verbreitungswege der Pest zu den jeweiligen Fundorten diskutiert (Abschnitt 3.3.2.2). Zuletzt wird die Datierung der Skelette mit evolutionären Daten in Einklang gebracht (Abschnitt 3.3.2.3).

3.3.2.1 Einordnung der Ergebnisse in die Phylogenie

Die Extrakte der fünf reproduzierbar *plA*-positiven Individuen aus Manching-Pichl bzw. des einen Skeletts aus Brandenburg wurden an weiteren Stellen des Genoms untersucht, um mehr über den Erreger in Erfahrung zu bringen. Diese Stellen sind ein Polymorphismus auf dem Virulenzplasmid pPCP1, ein Fragment des *caf1*-Gens auf Plasmid pFra sowie 16 SNPs. Unabhängig vom Fundort zeigen die Proben an allen untersuchten Loci den gleichen Genotyp.

pPCP1-Polymorphismus

Beim Test auf die Anwesenheit einer TT-Insertion im pPCP1-Plasmid (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.1.3) wurde übereinstimmend mit früheren bzw. bereits publizierten Ergebnissen (Schünemann *et al.* 2011; Wiechmann *et al.* 2010) in den Proben aus Manching-Pichl und Brandenburg ein TTT-Muster und damit keine Insertion gefunden. Moderne Stämme wie der zum

Orientalis-Biovar gehörende CO92 (GenBank AL109969.1) besitzen an den Positionen 8528-8532 hingegen fünf Ts.

Hinsichtlich der Spezifität der drei bzw. fünf Ts existieren unterschiedliche Aussagen. Laut Tran *et al.* wurden die fünf Ts nur im *Y. pestis* CO92-Stamm (Parkhill *et al.* 2001) und in keinem von 22 modernen und elf „alten“ Sequenzen gefunden, weshalb die fünf Ts spezifisch für den CO92-Stamm seien und kein Marker für den Orientalis-Biotyp (Tran *et al.* 2011b). In einer anderen Arbeit aus dem gleichen Jahr schreibt dieselbe Arbeitsgruppe, dass die TT-Insertion charakteristisch für den Orientalis-Biotyp sei und auch im CA88 gefunden wurde (Drancourt & Raoult 2011). Der Stamm CA88, ein aus einem Menschen 1988 in Kalifornien isolierter Stamm, gehört wie der CO92 zum Orientalis-Biovar und zum 1. ORI-Ast (Auerbach *et al.* 2007).

Unabhängig von der exakten Spezifität, ob nun Orientalis- oder CO92-spezifisch, können anhand dieses Unterschieds moderne Isolate von älteren unterschieden werden. Das Bakterium in dem hier untersuchten historischen Skelettmaterial repräsentiert folglich kein modernes Isolat.

caf1

Durch das Alignieren der Fragmente zweier PCRs auf das *caf1*-Gen wurde ein 332 bp langes Produkt erhalten, das an den Positionen 86056-86387 auf dem 96210 bp großen Plasmid pFra bzw. pMT1 lokalisiert ist. Durch den Nachweis wurde gezeigt, dass die historischen Stämme das Plasmid pFra besaßen. Dies ist insofern relevant, als bereits F1-negative *Y. pestis*-Stämme aus verschiedenen Tierarten (z. B. Meka-Mechenko 2004) und in einem Fall aus einem Menschen isoliert wurden (Winter *et al.* 1960). Auch der Stamm Angola besitzt die plasmid-kodierte Kapsel nicht (Eppinger *et al.* 2010). Zur Einstellung der Kapselbildung können die Deletion des Plasmids oder Mutationen im *caf1*-Operon führen (Anisimov *et al.* 2004). Der aus Ratten in Indonesien isolierte Stamm Java 9 beispielsweise besitzt weder F1 noch das pFra-Plasmid (Welkos *et al.* 1995). *Y. pestis*-Zellen sind dadurch nicht mehr immunologisch durch den Nachweis des F1-Antigens detektierbar (Anisimov *et al.* 2004), die Virulenz des Stamms ist aber nicht notwendigerweise reduziert (z. B. Friedlander *et al.* 1995; Davis *et al.* 1996). Die Häufigkeit F1-negativer Stämme wird in vielen Studien von Experten der Anti-Pest-Einrichtung der ehemaligen Sowjetunion zu epidemiologischen Ausbrüchen mit 15,8 Prozent unter den ungefähr sieben Prozent atypischen Varianten angegeben (Anisimov *et al.* 2004 geben hierfür drei in russisch verfasste Quellen an).

Phylogenetische Positionierung anhand von SNPs

Um eine phylogenetische Einordnung des Erregers aus den Skeletten vornehmen zu können, wurde die DNA an 16 SNP-Positionen typisiert. Bei der Probe MPS1-I aus Manching-Pichl gelang dies jedoch nicht durchgängig. Sie wird daher hier von der weiteren Diskussion ausgenommen.

Der Erreger aus den deutschen Proben wurde mit den in vorangegangenen Studien publizierten und aus Skeletten anderer Fundorte isolierten Stämmen verglichen, sofern Daten vorlagen (siehe Tabelle 39). Die relevanten SNPs aus der Arbeit von Hänsch *et al.* (2010) wurden deren Abbildung 3 entnommen, die von Bos *et al.* (2011) deren Tabelle S4. Im Vergleich zeigt sich, dass der „deutsche“ Erreger an allen untersuchten SNPs mit dem Erreger in drei Individuen (8291, 11972, 8124) vom Londoner East Smithfield-Friedhof übereinstimmt. Auch der SNP-Status der Individuen aus Hereford (Her) und Saint-Laurent-de-la-Cabrerisse (SLC) aus der Studie von Hänsch *et al.* (2010) entspricht dem des deutschen Erregers an den in beiden Studien untersuchten Loci. Abweichungen ergeben sich an SNP s12 durch den ancestralen Status der Erreger aus Deutschland, Her und SLC und dem derived Status der Erreger aus Bergen op Zoom (Ber) sowie einem Individuum (6330) aus London. Eine weitere Nicht-Übereinstimmung liegt bei s1195 zwischen den deutschen Proben (ancestral) und ES6330 (derived) vor. Da Hänsch *et al.* (2010) diesen (und weitere) SNP(s) nicht untersucht haben, kann hier über die Proben aus Her, Ber und SLC keine Aussage getroffen werden.

Tabelle 39: Vergleich des deutschen Erregers (MP/B für Manching-Pichl/Brandenburg) mit dem anderer europäischer Fundorte an SNP-Positionen. Grün hinterlegte Felder verweisen auf ein positives Ergebnis, rot hinterlegte auf das Fehlschlagen einer PCR. Ber = Bergen op Zoom, HER = Hereford, SLC = Saint-Laurent-de-la-Caberisse, ES = East Smithfield, n. t. = not tested, a = ancestral, d = derived

Sample	Branch 1														Branch 0						Branch 2							
	s12	s14	s13	s247	s588	s660	s826	s904	s920	s955	s1023	s1038	s1119	s1195	s2	s7	s11	s545	s87	s82	s29	s31	s81	s19	s17	s15	s18	s20
	XI-3.ANT.a														1.OR1.a-XIV	1.OR1.a-XIV	1.OR1.a-XIV	3.ANT.a-0.ANT3.a	VII-VI	VI-III	0.PE2b	ROOT-0.PE2a.a	? Root	3.ANT.a-VIII	3.ANT.a-VIII	3.ANT.a-VIII	3.ANT.a-VIII	VIII-2.MED3.a
MP/B	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	d	a				d						a				
Ber	d	a	a	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	a	a	a	n. t.	d	d	a	a		a	a	a	a	a
Her	a	a	a	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.		d	a	a		a			a	a
SLC	a	a	a												a	a	a	n. t.	n. t.	d	n. t.	n. t.		n. t.	a	n. t.	a	a
3 Ind. ES	a	a		a	a	a	a	a	a	a		d	a	a		a	d	d	d		a		a		a	a	a	
ES 6330	d			a									d	d	a			d	d	d		a		a		a	a	a

Die Erreger-DNA aus Deutschland kann folgendermaßen in den Morelli-Stammbaum (Morelli *et al.* 2010) eingeordnet werden: An den jeweils einzigen pro Ast (Branch) untersuchten SNPs s19 (Branch 2) und s545 (Branch 0) weisen die deutschen Proben einen ancestralen (s19) bzw. abgeleiteten (s545) Genotyp auf („derived“). Dadurch rückt die DNA an den Knoten 3.ANT1a (siehe Abbildung 36). Es kommt auf die SNPs zwischen diesem und dem Knoten XI an. Durch die Detektion eines derived Genotyps an SNP-Position s1119 und eines ancestralen Status aller anderen 13 SNPs zwischen 3.ANTa und XI kann der Bereich in zwei Abschnitte unterteilt werden. Zwischen dem Knoten 3.ANT1a und dem neuen Trennungspunkt liegt nur SNP s1119, nach dem neuen Trennungspunkt folgen die übrigen 13 ancestralen SNPs in weiterhin unklarer Reihenfolge (siehe Abbildung 36). Die deutsche Erreger-DNA ist also zu lokalisieren an dem neu festgelegten Trennungspunkt. Gleiches gilt für die drei Individuen aus East Smithfield mit identischem Genotyp. Da der Erreger der Individuen aus Her und SLC nicht an allen SNPs untersucht wurde, kann über ihre Lokalisation keine genaue Aussage getroffen werden.

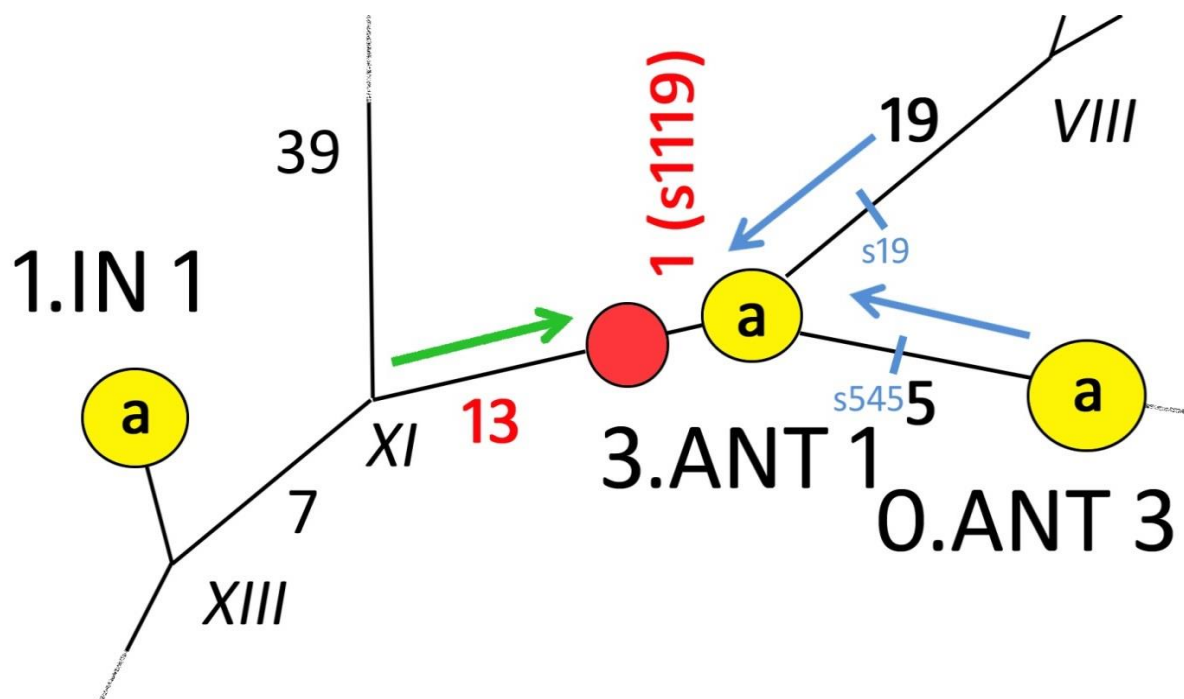


Abbildung 36: Lokalisation der Erreger-DNA aus MP, B, drei Individuen aus ES sowie vermutlich den Individuen aus Her und SLC in einem modifizierten phylogenetischen Stammbaum nach Morelli *et al.* (2010). Zahlen zwischen in römischen Zahlen bezifferten einzelnen Knoten geben die Anzahl der SNPs an, die sich in diesem Bereich befinden. Durch den ancestralen Genotyp an SNP-Position s19 und den derived Status an SNP s545 rückt die Erreger-DNA an den Knoten 3.ANT1a (blaue Pfeile). Der Abschnitt zwischen XI und 3.ANT1a wurden durch die Detektion des derived Status in SNP s1119 bei gleichzeitigem Vorliegen eines ancestralen Status in allen anderen SNPs (grüner Pfeil) neu unterteilt. Zwischen 3.ANT1a und dem roten Punkt befindet sich lediglich SNP s1119, zwischen dem roten Punkt und XI befinden sich die restlichen der ehemals 14 und nun 13 SNPs in unbekannter Reihenfolge. Die DNA des deutschen Erregers ist an der Position des roten Punkts zu lokalisieren.

Abbildung-Ausschnitt modifiziert nach Morelli *et al.* (2010).

Alternativ kann der deutsche Erreger auch auf dem aktuelleren Stammbaum von Cui *et al.* (2013) zwischen den Knoten N07 und N10 eingeordnet werden (siehe Abbildung 34). Der Cui-Stammbaum unterscheidet sich vom Morelli-Baum an dem in dieser Arbeit untersuchten Abschnitt zwischen Knoten 3.ANT1a und XI jedoch dadurch, dass bei Cui *et al.* der SNP s1195 (Position 2896636 im CO92-Genom) nicht vorkommt, da er sich in einer bekannten repetitiven Region befindet (Cui *et al.* 2013). Dafür sind in dem Abschnitt zwei andere SNPs hinzugekommen, s1252 und s1431 (Cui *et al.* 2013). Da die Untersuchungen dieser Arbeit ausgehend von dem damals aktuellsten Stammbaum von Morelli *et al.* (2010) geplant und durchgeführt wurden, ist naturgemäß eine Aussage an diesen beiden SNPs für die deutsche Erreger-DNA nicht zu treffen.

Aus den von Schünemann *et al.* (2011) im Supplementary-Teil veröffentlichten Daten geht ebenfalls die Identität dieser beiden SNPs nicht hervor. Cui *et al.* haben jedoch die East Smithfield-Individuen auf ihrem Stammbaum eingeordnet: Das Individuum 6330 ist drei SNPs nach der Abspaltung von Knoten N07 lokalisiert, die anderen drei einen SNP nach diesem Knoten (Cui *et al.* 2013). Da diese drei ihren Genotyp mit den Individuen aus Manching-Pichl und Brandenburg teilen, ist auch ohne Kenntnis des Status an den beiden neuen SNPs anzunehmen, dass auch der deutsche Erreger einen SNP nach dem Knoten N07 zu platzieren ist. An diesem Knoten, an dem sich die vier Äste vom Haupt-Ast 0 abspalten, haben Cui *et al.* (2013) eine „Big Bang“-Polytomie angenommen, also eine Vielfachverzweigung.

Besonderheit an SNP-Position s1195

Interessant ist das Ergebnis der Detektion des SNPs 1195, der an Position 2896636 im CO92-Genom (accession number NC_003143; Morelli *et al.* 2010) in einem Bereich liegt, den Cui *et al.* kürzlich als repetitive Region R0664 an den Positionen 2896594-2896641 (48 bp) beschrieben haben (Cui *et al.* 2013). In deren aktuellen Stammbaum wird der SNP jedoch nicht mehr berücksichtigt. Wie in Abbildung 37 ersichtlich ist, besteht ein repetitives Element aus 16 Basen und wird beispielsweise im CO92-Genom drei Mal und in der Sequenz der historischen Proben sechs Mal wiederholt, wobei die elfte Position durch verschiedene Basen besetzt sein kann (siehe auch Abbildung 30). Die Sequenz aus dem historischen Skelettmaterial zeigt eine 100-prozentige Identität zur Sequenz des Harbin35-Stamms (accession number CP001608), der zum Medievalis-Biovar gehört.

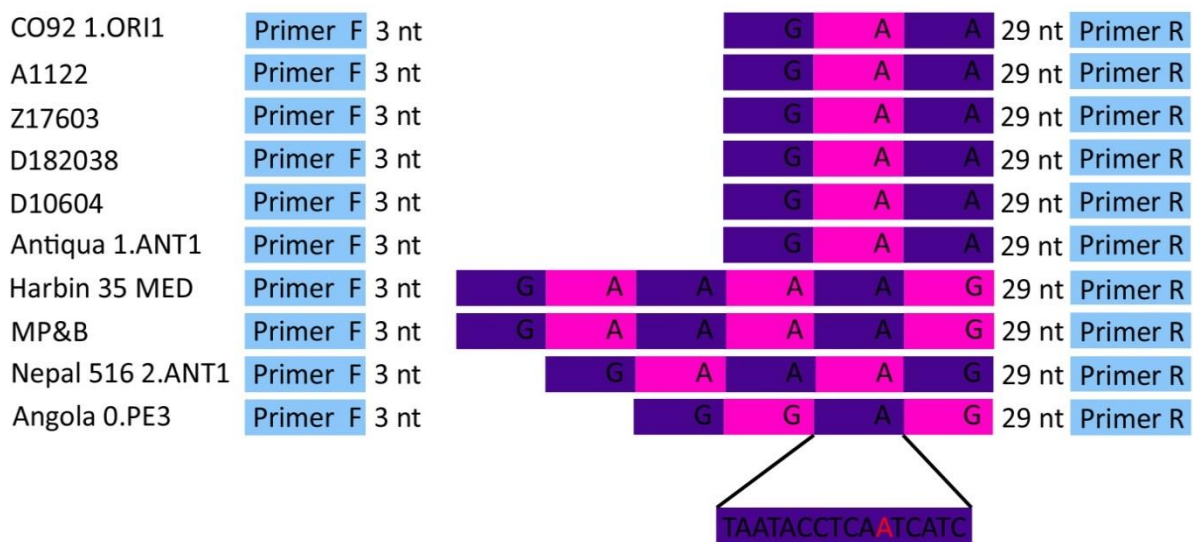


Abbildung 37: Vergleich verschiedener *Y. pestis*-Stämme und DNA-Sequenzen aus historischem Skelettmaterial in einem über dem SNP s1195 liegenden Bereich. Eine repetitive Abfolge von 16 Basen, die sich in einer Base (rot gekennzeichnetes A) unterscheidet, findet sich in verschiedenen Stämmen in unterschiedlicher Anzahl (rosa und lila Kästchen). Die sich unterscheidende Base in einer derartigen repetitiven Sequenz ist jeweils angegeben. Die Anzahl der Basen nach dem Forward-Primer (3 Nukleotide = 3 nt) bzw. vor dem Rückwärts-Primer (29 nt) ist stets identisch.

MP&B = Manching-Pichl & Brandenburg

Es wurde versucht, diese repetitive Region unter publizierten Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) zu finden, indem die Forward- und Reverse-Primer von VNTRs sowie die in dieser Arbeit verwendeten s1195-Primer mittels des Programms CodonCode Aligner (Version 4.0.4) gegen das CO92-Genom aligned wurden. Die Region entspricht jedoch keinem der 85 VNTRs in den Studien von Le Flèche *et al.* (2001), Adair *et al.* (2000) und Klevytska *et al.* (2001).

3.3.2.2 Ausbreitung

Über die Ausbreitung der Pest existieren bereits Theorien, die sich mit dem Weg des Erregers zu Fundorten in Frankreich, England und den Niederlanden beschäftigen (Abschnitt 3.3.2.2.1). In Abschnitt 3.3.2.2 wird gezeigt, welchen Weg die Krankheit zu den deutschen Fundorten genommen haben kann.

3.3.2.2.1 Bisherige Erkenntnisse aus anderen Studien

Zusammengenommen sind demnach in allen bisher tiefgehend untersuchten und unangezweifelten Individuen aus historischer Zeit zwei Erreger-Stämme detektiert worden. Hänsch *et al.* (2010) hatten geschlossen, dass – nach der Einschleppung mehrerer Genotypen aus Zentralasien nach Europa über die üblichen Handelswege im und nach dem 14. Jahrhundert – die Erreger über zwei Infektionswellen verbreitet wurden. Nach Süd-Europa war der Schwarze Tod historischen Dokumenten zufolge von Asien aus importiert worden. Er erreichte Marseilles im November 1347 und verbreitete sich von dort aus sowohl über Land auch als über das Meer weiter nach West-Frankreich bis er zu Beginn des Jahres 1348 Narbonne und Carcassonne erreichte (Hirsch 1881 und Benedictow 2004 IN: Hänsch *et al.* 2010). Diese Verbreitung war vermutlich verantwortlich für eine Pest-Epidemie im zwischen diesen beiden Orten gelegenen SLC (Hänsch *et al.* 2010). Die Pest verbreitete sich zu Beginn des Jahres 1348 in Frankreich weiter nordwärts. Es wird angenommen, dass sie im Sommer 1348 von Frankreich aus über Schifffahrt und Handel nach England exportiert wurde (Shrewsbury 1970). Die meisten Toten aus Hereford in der Studie von Hänsch *et al.* (2010) stammen laut Radiokarbondatierung aus der Zeit von calAD 1281 bis 1389 und damit entweder aus der Zeit des von Hatcher (1977) genannten ersten, zweiten oder dritten Pestausbruchs von 1349, 1361 bzw. 1369 (Hänsch *et al.* 2010, Supplementary Text S1). Der Anspruch von Schünemann *et al.* (2011), mit den Individuen des Friedhof East Smithfield in London sicher datierte Opfer der ersten mittelalterlichen Pest-Pandemie 1348-1350 in London detektiert zu haben, passt zur Verbreitung des Erregers. London liegt im Osten Englands, Hereford an der Grenze zu Wales. Beide Orte können 1348 vom englischen Weymouth aus infiziert worden sein (Karte 1 in Benedictow 2010).

Historische Aufzeichnungen deuten laut Hänsch *et al.* (2010) darauf hin, dass der Schwarze Tod die südlichen Niederlande 1349 von Frankreich oder England aus erreicht hat und dass die nördlichen Niederlande von Friesland aus 1350 infiziert wurden. Durch die Unterscheidung des in Bergen op Zoom gefundenen Erregers in SNP s12 von dem in England und Frankreich gefundenen schien Hänsch *et al.* eine Infektion der Niederlande über diese beiden Länder jedoch unwahrscheinlich. Stattdessen soll der Erreger entweder über Norwegen, das im Mittelalter extensiv mit England und den Hansestädten entlang der deutschen Nordseeküste handelte, über eine dieser Hansestädte oder über einen aus historischen Quellen nicht unmittelbar offensichtlichen Ort Friesland infiziert haben. Friesland ist eine der nördlichsten Provinzen der Niederlande. Als Datum für die Infektion der nördlichen Niederlande von Friesland aus wird das Jahr 1350 angegeben (Benedictow 2004 IN: Hänsch *et al.* 2010). Über den Handel, den Bergen op Zoom mit den nördlichen Niederlanden betrieb, erreichte der Erreger möglicherweise die Provinzen im Süden und damit Bergen op Zoom (Hänsch *et al.* 2010).

3.3.2.2.2 Verbreitungswege der Pest zu den Detektionsorten dieser Arbeit

Nachdem in dieser Arbeit auch der Nachweis des Pesterregers in Individuen aus Manching-Pichl und Brandenburg geführt worden ist, stellt sich die Frage, wie der Erreger an diese Orte gelangt ist. Für die Verbreitung der Pest zu den Detektionsorten müssen die zwei verschiedenen Zeitstellungen beachtet werden. Zunächst wird auf die früher datierenden Opfer aus der Nähe Ingolstadts und damit den Weg der Pest nach Bayern eingegangen (Abschnitt 3.3.2.2.2.1), bevor ein möglicher Weg während des Dreißigjährigen Kriegs beschrieben wird (Abschnitt 3.3.2.2.2.2).

3.3.2.2.1 Weg nach Manching-Pichl

Problematisch bei dem Versuch, den Ausbreitungsweg der Pest nach Manching-Pichl nachzuvollziehen, ist der Mangel (Lechner 1884) oder die Qualität des Quellenmaterials (Hoeniger 1882). Darüber hinaus nennt Höniger ein weiteres Problem: „Die wenigen Reflexionen, die sich in den Berichten deutscher Chronisten über die Pest finden, weisen fast sämtlich auf eine gemeinsame Quelle hin und kehren ausnahmslos bei allen späteren Abschreibern wieder.“ Der Übertragung der Pest von Italien aus nach Deutschland stellen sich die Alpen als Hindernis für den Verkehr entgegen (Vasold 2003). Dennoch werden nachfolgend die drei bisher angenommenen Verläufe der Pest über die Alpen genannt (zusammengefasst bei Kiessling 2005; siehe Abbildung 38).

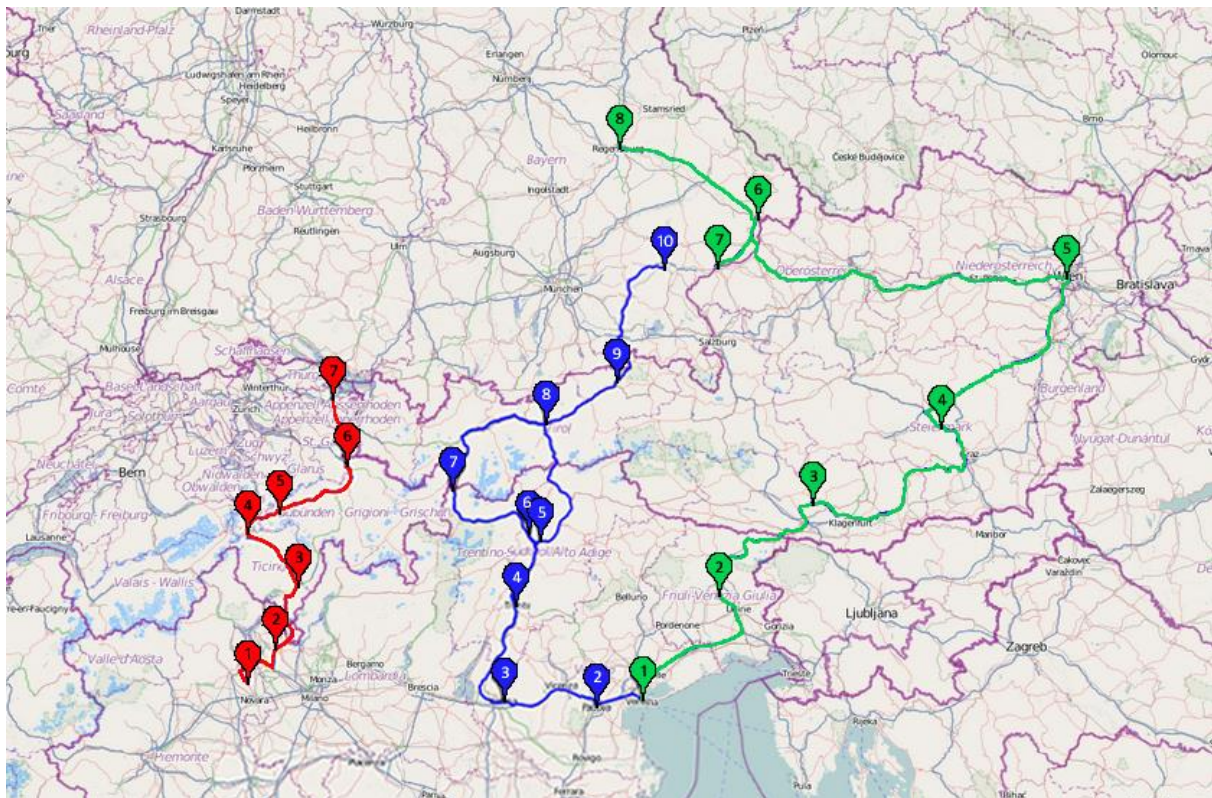


Abbildung 38: Grobe Skizzierung der drei angenommenen Verbreitungswege der Pest über die Alpen. Die drei Wege sind durch die Farben rot, blau und grün voneinander zu unterscheiden. Die entsprechenden verschiedenfarbigen Fähnchen markieren Städte, Pässe oder Täler auf den jeweiligen Routen:

rot	blau	grün
1 = Momo	2 = Padua	1 = Venedig
2 = Varese	3 = Verona	2 = Friaul
3 = Bellinzona	4 = Trient	3 = Kärnten
4 = St.-Gotthard-Pass	5 = Bozen	4 = Steiermark
5 = Disentius	6 = Etschtal	5 = Wien
6 = Pfafers	7 = Vinschgau/Reschenpass	6 = Passau
7 = St. Gallen	8 = Innsbruck	7 = Braunau am Inn
	9 = Oberes Inntal	8 = Regensburg
	10 = Mühldorf am Inn	

Karte aus OpenStreetMap, Montage: Seifert

Erstens soll die Pest von Venedig aus über Friaul die Bundesländer Kärnten und Steiermark erreicht haben (Lechner 1884; grüne Strecke in Abbildung 38). Die Präsenz der Pest in Wien ist durch die Neuburger Annalen, welche ihre Anwesenheit von Ende Mai bis Ende September belegen, und die Mattseer Annalen bezeugt (Belege bei Hoeniger 1882). Von Wien aus soll die Pest laut Konrad von Megenberg nach Bayern weitergezogen sein (Hoeniger 1882). Die Mattseer Annalen (Annales Matseenses) nennen auch die Anwesenheit der Pest in Passau, Braunau am Inn, München und Landshut, allerdings ohne Datierung (Belege bei Hoeniger 1882). Belege für die Pest in Braunau, München und Landshut für das Jahr 1348 sowie Regensburg, welches die Pest im Sommer 1350

verseucht haben soll (Hoeniger 1882), sind durch die jeweilige Stadtgeschichtsforschung inzwischen angezweifelt worden (Vasold 2003; Bergdolt 2000).

Der zweite Weg der Pest nimmt seinen Ausgangspunkt von Trient aus (blaue Strecke in Abbildung 38). Dieses soll wiederum von Venedig aus über Padua und Verona und dann das Etschtal oder über Valsugana infiziert worden sein (Lechner 1884). Von Trient aus soll die Pest weiter das Etschtal hinaufgelangt sein nach Bozen, von wo aus sie zwei Wege genommen haben soll. Den ersten im September 1348 über das obere Etschtal oder den Vinschgau, von wo aus sie über den Reschenpass ins obere Inntal gelangte. Den zweiten über das Eisacktal und den Brenner ins mittlere und untere Inntal, über das sie nach Mühldorf am Inn kam. Ob die Pest dort im Sommer 1348 oder 1349 angekommen war, wird diskutiert (Lechner 1884; Hoeniger 1882). Am 29. Juni sollen in dieser als ersten nördlich der Alpen betroffenen Stadt erste Opfer beerdigt worden sein (Bergdolt 2000). Der Nachweis des Pest-Wegs über den Brenner ist jedoch nicht gesichert, aber der Weg über den Vinschgau und den Reschen nordwärts, da Goswin von Marienberg im oberen Vinschgau bereits 1348 Symptome beschreibt (Kiessling 2005). Der Medizinhistoriker Karl Lechner hält den Weg über den Brenner und das Inntal für wahrscheinlich, da der Inn als Wasserstraße eine Haupthandelsstraße war. Von Hall aus soll ein reger Schiffsverkehr mit Niederbayern bestanden haben (Lechner 1884). Alternativ führt Kiessling ab Bozen einen Weg über das Eisack- und das Pustertal an (Kiessling 2005). Ihren dritten Weg soll die Pest von Westen her durch das Rhonethal in die Schweiz genommen haben (Hoeniger 1882; Lechner 1884; rote Strecke in Abbildung 38). In Momo, Gallarate, Varese und Bellinzona wütete die Pest der Chronik eines Novareser Notars zufolge 1347 (Lechner 1884). Von Bellinzona – je nach Autor – über den St.-Gotthard-Pass (Kiessling 2005) bzw. den Lukmanierpass (Lechner 1884) wurden der Vorderrhein, die Klöster Disentis und Pfäfers erreicht und von dort aus eventuell St. Gallen (Lechner 1884; Kiessling 2005).

Von Südwesten aus soll die Pest ebenfalls in die Schweiz gekommen sein. Allerheiligen 1347 war sie in Marseilles, im Januar 1348 in Avignon. Aufwärts über das Rhôneetal soll sie den Genfer See erreicht haben und von dort aus zum Einen nach Norden in die Schweiz gelangt und zum Anderen nach Südosten entlang der Rhône vorgedrungen sein. In Bern muss die Pest früh im Jahr 1349 geherrscht haben, im September 1349 war sie in Zürich sowie im Aargau und Thurgau, in der Mitte des Jahres in Basel und Umgebung. Einer Interpretation der oberrheinischen Chronik nach herrschte im Sommer 1349 ein großes Sterben und einer Konstanzer Chronik nach im Winter. Lechner schien es, als wäre der vom Rhôneetal und Burgund ausgehende Flügel der östlichen Verbreitung mit dem aus Italien über den Lukmanierpass kommenden am Oberrhein und an der oberen Donau zusammengetroffen (Lechner 1884). Er nennt neben den drei Wegen über die Alpen noch einen weiteren, nicht über das Gebirge führenden Weg der Pest von Ungarn aus nach Niederösterreich und Mähren und stellt fest, dass es nach der Alpenüberquerung nur episodenhafte Nachrichten über die Verbreitung der Krankheit gibt (Lechner 1884).

Wie genau die Pest nach Pichl kam, wird jedoch nicht festzustellen sein. Für die Ausbreitung der Pest nach dem Weg über den Alpenhauptkamm gibt es nur wenige gesicherte Belege (Kiessling 2005), da das Spätmittelalter zumindest in Mitteleuropa eine an schriftlichen Zeugnissen arme Zeit war (Vasold 2003). Hinzu kommt, dass mit neun Zehnteln die Mehrheit der Bevölkerung auf dem Land lebte, hierzu die Untersuchungen laut Vasold (2003) aber gänzlich fehlen. Daneben wird immer mehr auf „weiße Flecken“ (Kiessling 2005) aufmerksam gemacht, auf pestfreie Gebiete, gerade in den Städten Süddeutschlands (Vasold 2003). Hoeniger relativierte bereits 1882: *„Die landläufige Annahme geht dahin, dass der sogenannte ‚schwarze Tod‘ bis 1350 eine pandemische Verbreitung in Europa mit Ausnahme von Russland erlangt habe. Ruhigere Beobachter bezeugen es freilich ausdrücklich, dass die Pest nicht nach allen Punkten der bewohnten Erde gedungen sei.“* Diese Haltung erwähnt auch Vasold (2003) und verweist auf Niederstätter (2001): *„Manche Gegenden blieben von der ersten Pestwelle gänzlich verschont, wie etwa die Reichsstadt Nürnberg, Teile Flanderns, Brabants und des Hennegaus oder Landschaften in Zentralfrankreich, ohne daß ein Grund dafür bekannt ist.“* Stichhaltige Überlieferungen zu Pestinfektionen im heutigen Bayern – abgesehen von der Gegend um die Donau – sind sehr dünn gesät, was laut Raphael Matthias Krug darauf schließen lasse, dass das Gebiet in größerem Maße als bisher gedacht von der Pest 1349-51 verschont geblieben war (Krug 2006). Hoeniger (1882) macht für die Verschonung mancher Orte ihre abgelegene, vom Verkehr

wenig berührte Lage verantwortlich. Jedoch ist auch „an grossen, weiten Gebieten (...) der erste Ansturm des schwarzen Todes vorübergegangen“.

Neben den vielen bei Vasold (2003) erwähnten Städten wird auch für Ingolstadt ein Ausbleiben der Pest in den Jahren 1348/1349 angenommen, das in elf Kilometer Entfernung von Pichl liegt. Vasold (2003) zitiert hier die Arbeit von Siegfried Hofmann (2006), in der in der zweiten Hälfte des 14. Jahrhunderts eine Stadterweiterung, aber keine Seuche genannt wird. Darüber hinaus ist den Rechnungsbüchern des Kloster Scheyern des 14. Jahrhunderts nichts zu entnehmen, was auf direkte Pestverluste im Gebiet der Scheyerschen Grundherrschaft schließen lässt (Toch 2000). Pichl liegt in einem der zwei Schwerpunktgebiete des Scheyerschen Besitzes, dem zwischen Donau, Lech und Isar (Kießling 2005) und wäre damit zu dieser Zeit ebenfalls verschont geblieben. Am Auftreten der Seuche und an Massensterben müsse man laut Vasold (2003) zweifeln, wenn es keine Hinweise auf brach liegende Felder gäbe, weil Arbeitskräfte zu deren Bearbeitung fehlen, auf leer stehende Häuser, auf gestiegene Einnahmen bei der Kirche für Totenläuten und Kosten für Gräber. Zu der Annahme der Verschonung Pichls während der ersten Pestwelle passt auch die Datierung der unter der St. Leonhard-Kirche bestatteten Individuen auf das Ende des 15. Jahrhundert (Albrecht & Mayr 1991; siehe Tabelle 4 bzw. Kapitel Material, Abschnitt 1) aufgrund derer allein es sich nicht um Opfer des eigentlichen Schwarzen Todes handeln kann.

Schwache Hinweise auf die Pest für die Gegend um Pichl finden sich erst zu einer späteren Zeit. Auch wenn Epidemien wie Pest im nahen Ingolstadt auch im 14. und 15. Jahrhundert vermutet werden, werden sie erst nach 1472 in den Quellen exakter fassbar (Hofmann 2006). In Ingolstadt wurde Ende des 15. Jahrhunderts die dem Pestpatron Sebastian geweihte Sebastianskirche gebaut (Kuhn 1940). Im 5. Jahrhundert bzw. um 680 etablierte sich in Rom ein Kult um den heiligen Sebastian als Protektor gegen die Pest (Bergdolt 2006, 2000). Auch Hofmann (2006) vermutet für Ingolstadt einen Zusammenhang zwischen der Pest im Jahr 1495 und der Anlage eines Friedhofs und dem Bau der Sebastianskirche.

3.3.2.2.2 Weg nach Brandenburg

Den Weg der Pest nach Brandenburg zu klären, scheint etwas leichter möglich zu sein. Bei den Toten aus Brandenburg an der Havel handelt es sich Dalitz *et al.* (2012) zufolge um Soldaten des Dreißigjährigen Krieges.

Der Dreißigjährige Krieg, der im Frühjahr 1618 begann (Vasold 1991), war ein überwiegend in Deutschland und Böhmen ausgetragener Religions-, Stände- und Staatenkonflikt (Harenberg 2003). Traten zu Beginn des 17. Jahrhunderts bedingt durch die geringen Temperaturen seit Ende des 16. Jahrhunderts, die dadurch geringen Ernteerträge und die wiederum dadurch hervorgerufenen Hungersnöte Pest, Fleckfieber, Pocken und Masern auf, so herrschten in den Jahren unmittelbar vor Ausbruch des Krieges vermehrt andere Krankheiten als Pest, nämlich Fleckfieber, Pocken, Ruhr und „hitzige Fieber“. Während des Kriegs wurden Heere zu Trägern und Überträgern von Infektionskrankheiten. Als Schweden in den Dreißigjährigen Krieg intervenierte, wurden seine Truppen in den 1630er Jahren von grassierenden Seuchen stark beeinträchtigt, besonders von Pest und Ruhr (Vasold 1991).

Isotopen-Untersuchungen an den drei Söldnern hatten ergeben, dass sie aus den Regionen Schweden/Finnland/Baltikum stammten, wodurch die Vermutung gestützt wurde, dass es sich bei ihnen um Soldaten des schwedischen Heeres gehandelt hat, die in der Stadt einquartiert worden waren (Dalitz *et al.* 2012). Beides passt zu den Überlieferungen: Truppen wurden zwischen 1626 und 1631 Truppen einquartiert und 1631 wird Brandenburg von schwedischen Truppen besetzt (Kunkel *et al.* 2003; siehe Kapitel Material, Abschnitt 3). Dass für die Zeit zwischen 1625 und 1627 sowie 1631 schwere Pestwellen überliefert sind (Geiseler & Hess 2008 IN: Dalitz *et al.* 2012), passt zu der Detektion des Pest-Erregers in den drei Individuen. Allerdings ist nicht zu klären, ob die Männer auf ihrem Weg in die Stadt oder in der Stadt selbst erkrankten. Denn Epidemien herrschten nicht nur am Ort des Kampfgeschehens, sondern überall in Deutschland. 1625 traten in Rostock, Wismar, Schwerin und Neubrandenburg Fleckfieber und Ruhr sowie später Pest auf. Auch in Magdeburg und Osnabrück brach die Pest aus (Vasold 1991).

3.3.2.3 Datierung

Interessant ist daneben der zeitliche Kontext. Die Proben aus Manching-Pichl und Brandenburg sind in allen untersuchten Loci identisch – trotz eines zeitlichen Abstands in der Datierung von grob 200 Jahren. In Deutschland scheint es demnach über etwa zwei Jahrhunderte hinweg nur einen Erregerstamm gegeben zu haben.

4 Fehlschlagen der F1-Antigen-Detektion

Unabhängig von den molekulargenetischen Untersuchungen sollte in dieser Arbeit ein alternativer Nachweis des Pest-Erregers über die Detektion seines Kapselantigens erfolgen. Proteine haben neben DNA laut Schmidt-Schultz & Schultz (2004) unter den biologischen Molekülen das größte Potential für das Studium der Vergangenheit. Allerdings existieren beispielsweise für humane Knochen-Proteine unterschiedliche Erhaltungs-Chancen aufgrund unterschiedlicher Affinitäten zum Hydroxylapatit (Masters 1987).

Weder in dieser Arbeit noch in der vorangehenden Bachelorarbeit von Sara Fischersworing (2012) war es möglich, das F1-Antigen in drei zuvor mittels PCR *pla*-positiv getesteten Individuen aus Manching-Pichl nachzuweisen. Mehrere Gründe können dafür verantwortlich sein: die Abwesenheit des F1-Antigens und die Anwesenheit des F1-Antigens bei gleichzeitigem Fehlschlagen der Extraktion oder Detektion (siehe Abbildung 39).

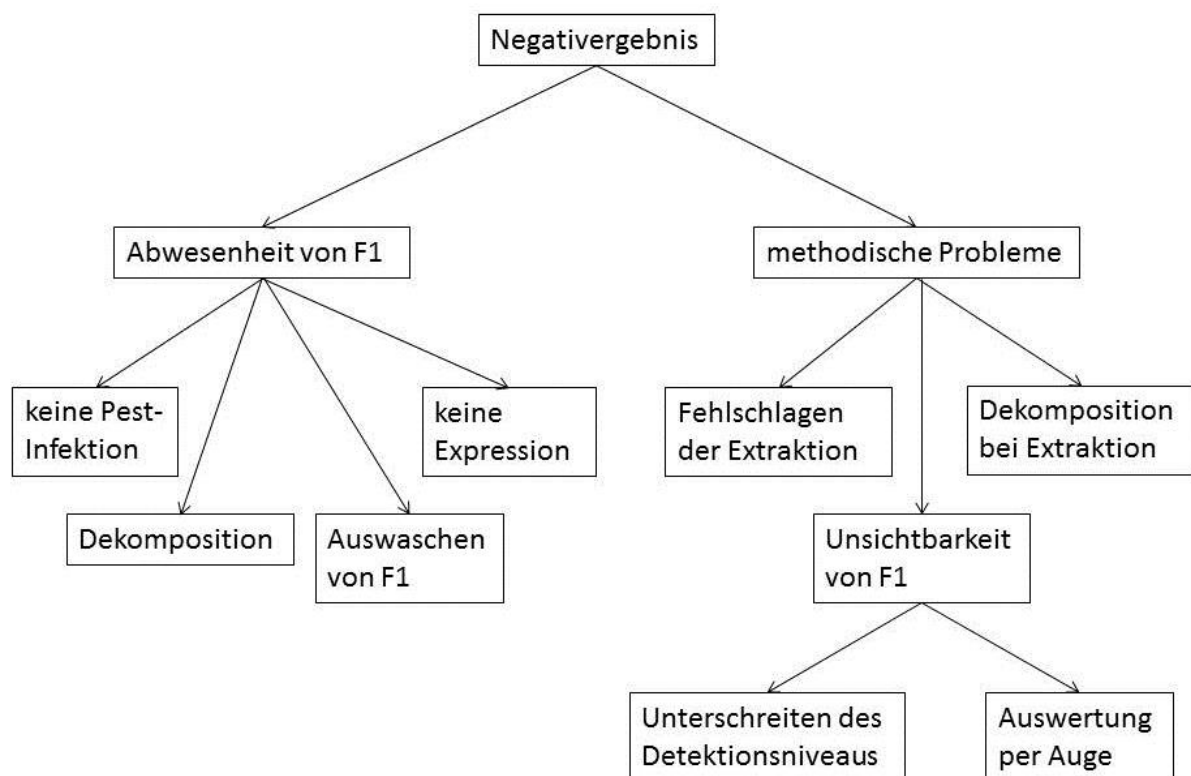


Abbildung 39: Mögliche Gründe für das Ausbleiben einer F1-Antigen-Detektion in *pla*-positiv getesteten Individuen.

Falls das F1-Antigen in den drei Individuen vorhanden war, so sind möglicherweise methodische Unsicherheiten in der Versuchsdurchführung für die Nicht-Nachweisbarkeit verantwortlich. Die größten zu überwindenden Probleme bei der Protein-Extraktion sind laut Schmidt-Schultz & Schultz (2004), wie man die Dekomposition der Proteine während des Extraktionsprozesses verhindern kann und wie man die Proteine vom Hydroxylapatit ablöst. Die verschiedenen Protein-Extraktions-Protokolle wurden in der Bachelorarbeit und der vorliegenden Arbeit in modifizierter Weise angewandt. Das Verhältnis von Probenmehl zu Kochsalzlösung in Protokoll 1 ist nicht vergleichbar zu dem im Originalprotokoll angegebenen, wodurch eine schlechtere Vermischung gegeben ist. Ob

mittels Methode 3 das F1-Antigen extrahierbar wäre, ist aufgrund der Durchführung nicht zu sagen, da hier zu wenig Enzym-Inhibitor verwendet wurde.

Als letzter Grund für die Nicht-Detektion ist denkbar, dass das Antigen zwar extrahiert wurde, auf den Teststreifen aber kein Signal sichtbar war. Dies ist dann denkbar, wenn das jeweilige Detektionsniveau des Streifens unterschritten wurde. Das Produkt von Senova kommt mit 0,25 ng/ml mit der geringsten Protein-Menge aus. Dieses niedrige Detektionsniveau unterstreicht, dass es sich bei den vermeintlich sichtbaren positiven Signalen bei der Verwendung des rapid diagnostic test (RDT) aus Madagaskar, der über ein schlechteres Detektionsniveau von 0,5 ng/ml verfügt, nicht um authentische Signale handeln kann (siehe Tabelle 34). Der Detektionsgrenzwert wäre demnach anders als Bianucci *et al.* (2008) vermuten nicht ausreichend für eine vorläufige retrospektive Diagnose einer Pestinfektion in menschlichen Überresten. Nicht zuletzt entpuppte sich das optische Auslesen der Banden auf den Teststreifen als schwierig, da wie in Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 3 beschrieben potenzielle Banden nur durch ständiges Kippen des Streifens detektiert werden konnten und so schwach waren, dass sie für das bloße Auge nicht mit Sicherheit erkennbar waren. Abhilfe für dieses Problem könnte die Verwendung einer optischen Messanordnung schaffen, einem Photometer wie ihn die Firma Senova zur Auswertung des ABICAP[®]-Tests anbietet (Senova 2009).

Ein Fehlschlagen der F1-Detektion ist auch durch die Abwesenheit des Proteins erklärbar. Hierfür kommen vier Möglichkeiten in Frage. Erstens, es lag keine Pestinfektion vor. Dies ist für die drei getesteten Individuen auszuschließen, da mit dem Nachweis des *Y. pestis* spezifischen *pla*-Gens per PCR die Anwesenheit des Erregers gezeigt wurde. Da Proteinen in Skeletten allgemein eine gute Erhaltung zugeschrieben wird (z. B. Wiechmann *et al.* 1999), sollte ein Nachweis also möglich sein. Zweitens, das wasserlösliche Protein (Knight 2007) wurde vor der Extraktion ausgewaschen. Die Individuen aus Manching-Pichl trafen in gewaschenem Zustand in den Laboren ein, Bianucci *et al.* hatten hingegen an Knochen anhaftende Erde lediglich mit einer Bürste entfernt (Bianucci *et al.* 2008). Da jedoch auch bei einem Zahn eine Protein-Extraktion versucht wurde, scheint das Auswaschen unwahrscheinlich. Es wird angenommen, dass das Protein wie die DNA des Erregers im Blut des Infizierten vorkommt und nach dessen Tod in den Resten vertrockneter Blutgefäße im Knochen und der Zahnpulpa erhalten bleibt (Bianucci *et al.* 2008). Da die Pulpa durch Dentin und den Zahnhalteapparat geschützt ist (siehe Abbildung 4), kommt ein Auswaschen des Proteins eher nicht in Frage. Zudem konnte aus einem anderen Zahn desselben Individuums, für das ein Zahn zur Protein-Extraktion entnommen wurde, DNA nachgewiesen werden. DNA ist ebenfalls wasserlöslich und wäre demnach beim Waschen ebenfalls weggespült worden. Drittens, das F1-Antigen ist liegemilieubedingt degradiert. Viertens, das F1-Antigen wurde nicht exprimiert, obwohl das dafür kodierende *caf1*-Gen vorhanden war (siehe Tabelle 33). Gelangt der Erreger bei einer primären Lungenpest direkt in die Lunge, wird das körpereigene Abwehrsystem umgangen. Eine Ausprägung der Kapsel ist nicht notwendig, da sich der Erreger nicht vor einer Phagozytose durch Monozyten oder nicht-aktivierte Makrophagen schützen muss (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 3.1). Dies widerspricht auch nicht dem molekulargenetischen Nachweis des Erregers, da auch bei einer primären Lungenpest eine Bakteriämie entstehen kann (Pollitzer 1954; siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 3.1).

Die hier präsentierten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen dreier Arbeitsgruppen (Pusch *et al.* 2004; Bianucci *et al.* 2008; Malou *et al.* 2012), denen die Detektion des F1-Antigens gelungen ist. Zwei von ihnen (Pusch *et al.* 2004 und Bianucci *et al.* 2008) haben ebenfalls und ausschließlich den Teststreifen aus Madagaskar für ihre Detektionen verwendet. Anders als in der vorliegenden Arbeit sind die positiven Signale dort allerdings so stark, dass sie auf einem Foto erfasst werden können. Darüber hinaus haben Bianucci *et al.* (2008) beschrieben, dass sie zur Verifizierung der Effektivität des Protokolls in vorangehenden Tests mit dem F1-Antigen gearbeitet haben und auch eine Quantifizierung der F1-Antigen-Menge in „alten“ Extrakten vorgenommen haben. Deswegen ist eine Kontamination mit rezenten Biomolekülen immerhin denkbar, wenn man auch berücksichtigen muss, dass beim Protein-Nachweis keinerlei Amplifikation stattfindet. Eine bei aDNA-Analysen so gefürchtete Verschleppung von Amplifikaten ist nicht möglich. Zur endgültigen Klärung des Sachverhalts wäre eine weitere systematische Untersuchung notwendig oder ein Ausweichen auf die von Malou *et al.* (2012) beschriebene Methode der iPCR.

5 Synthese der Ergebnisse

Diese Arbeit hatte das Ziel, DNA-Überreste des Pest verursachenden Bakteriums *Yersinia pestis* in Skelettmaterial aus verschiedenen Zeitstufen und von vier unterschiedlichen Fundorten in Europa nachzuweisen (siehe Kapitel Material). Dazu wurde methodisch zunächst das geeignetste DNA-Extraktionsverfahren ermittelt (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.3). Das Standard-Verfahren der Münchner Arbeitsgruppe „Anthropologie und Umweltgeschichte“ stellte sich unter den vier getesteten Protokollen als das geeignetste heraus (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 2.3.1 Protokoll 1 nach Yang *et al.*). Ein weiterer Meilenstein dieser Arbeit war die Etablierung eines „Fahrplans“ für die Detektion von *Y. pestis* in historischem Skelettmaterial (siehe Abbildung 12). Dazu wurden auf aDNA-Bedingungen abgestimmte PCR-Assays – sowohl konventioneller als auch Real Time basierter Art – zum Nachweis des *pla*-Gens von *Yersinia pestis* und des menschlichen *HLA*-Gens sowie zur weiterführenden Typisierung einer *pla*-positiven Probe validiert (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.1.7).

Angewandt auf das in dieser Arbeit zur Verfügung stehende Material konnte in Individuen von drei von vier Fundorten *Y. pestis* detektiert werden: Manching-Pichl und Aschheim in Bayern sowie Brandenburg an der Havel in Brandenburg. DNA des Pesterregers war hingegen in Individuen aus Basel nicht nachweisbar (siehe Kapitel Ergebnisse, Abschnitt 2.2.2). Damit ist in dieser Arbeit ein erneuter Beweis dafür erbracht, dass die Detektion des Bakteriums in Skeletten möglich ist.

Bei der Arbeit im neu aufgesetzten Labor des ArchaeoBioCenters der LMU (siehe Abbildung 10) mit dem wertvollen Material wurde strikt auf die Einhaltung von Kriterien geachtet, die die Authentizität der gewonnenen Daten gewähren sollen. Dazu gehörte die räumliche Trennung von Arbeitsschritten im aDNA-Labor und noch viel wichtiger die Trennung zwischen prä- und post-PCR-Bereich in unterschiedlichen Instituten in verschiedenen Münchner Stadtteilen. Zusammen mit dem bestehenden Hygieneregime für das Personal (siehe Kapitel Methoden, Abschnitt 1) wurde die Verschleppung von Amplifikaten verhindert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen vorhergehende Studien an zwei untersuchten Materialkomplexen, an Individuen aus Aschheim aus dem 6. Jahrhundert (Wiechmann & Grupe 2005) und Skeletten aus Manching-Pichl aus dem 15. Jahrhundert (Wiechmann *et al.* 2010). Da die Experimente im neu aufgesetzten ArchaeoBioCenter-Labor für die Analyse alter DNA durchgeführt wurden, kann dies bereits als unabhängige Ergebnisreproduktion angesehen werden. Weiteres Gewicht bekamen die Daten zu Aschheim durch eine zweite unabhängige Reproduktion der Ergebnisse im Mainzer Referenzlabor (siehe Harbeck *et al.* 2013).

Durch die Bestätigung früherer Ergebnisse hinsichtlich des Fundorts Aschheim, zusammen mit der in dieser Arbeit erstmalig durchgeführten weitergehenden Typisierung des Erregers, kann die Diskussion um das ätiologische Agens der Justinianischen Pest als beendet angesehen werden. *Yersinia pestis* wurde eindeutig als Todesursache von mehreren Individuen dieses Gräberfelds bewiesen. Damit wurde erstmals zweifelsfrei gezeigt, dass das Bakterium bereits im 6. Jahrhundert existierte. Darüber hinaus konnte die isolierte Erreger-DNA auf einem phylogenetischen Stammbaum eingeordnet werden. Bei dem Erreger der Justinianischen Pest handelt es sich demnach um einen Stamm, der sich sowohl von dem bzw. den Erregern der zweiten Pandemie als auch den Bakterien der dritten Pandemie unterscheidet. Er ist früher evolviert und repräsentiert einen ursprünglicheren Erreger-Typ (siehe auch Harbeck *et al.* 2013).

Komplett neue Daten lieferte die molekulargenetische Untersuchung der drei Söldner aus Brandenburg an der Havel. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit der Pest-Erreger in Individuen aus Brandenburg detektiert. Bisher existierte neben dem Befund aus Manching-Pichl in Deutschland nur ein weiterer positiver Pest-Nachweis in Stuttgart (Pusch *et al.* 2004). Einschließlich dieser Arbeit wurde deutschlandweit bisher in drei Bundesländern *Y. pestis* identifiziert, wobei die Individuen unterschiedlichen Zeitstellungen zugeordnet sind.

Neben dem reinen Nachweis konnte auch der Erreger aus Brandenburg an der Havel und Manching-Pichl weiter typisiert werden. Die in Individuen aus Manching-Pichl isolierte bakterielle DNA entspricht an den untersuchten Stellen extakt der des in Brandenburger Individuen befindlichen Stamms. Damit scheint in Deutschland über einen Zeitraum von circa 200 Jahren nur dieses

Pestbakterium existiert zu haben. Dieser Erreger ist darüber hinaus identisch mit dem aus drei Individuen des Londoner East Smithfield-Friedhofs isolierten Stamms. Bekanntlich ist die Pest zwischen der Zeit des Schwarzen Todes und dem 17. Jahrhundert nie gänzlich aus Europa verschwunden (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.2). Der identische Erreger-Befund über einen längeren Zeitraum und über mehrere Länder Europas hinweg deutet darauf hin, dass der 1347 eingeschleppte Erreger endemisch wurde und für die vielen Todesopfer über mehrere Jahrhunderte hinweg verantwortlich ist. Grundlage dafür kann eine Enzootie sein (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.1). In einem enzootischen Gebiet sind einige Ratten zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Pest infiziert. Aufeinanderfolgende Ausbrüche müssen daher nicht auf frische Importe von infizierten Ratten zurückzuführen sein (Hatcher 1977). Dass in anderen Individuen der zweiten Pandemie noch ein weiterer Erreger gefunden wurde, widerspricht dieser Ansicht nicht. Es ist davon auszugehen, dass durch Handel auf einem oder mehreren weiteren Weg(en) der Erreger aus Asien eingeschleppt worden ist. Hingegen spricht gegen die Annahme der Mutation des Pathogens in Europa zu einem zweiten Genotyp die Tatsache, dass das Bakterium heute in China vorkommt wie der Abbildung 2 von Morelli *et al.* (2010) zu entnehmen ist. Der Stamm hätte von Europa aus nach China zurückverschleppt werden müssen, was eine unwahrscheinliche Erklärungsmöglichkeit darstellt. In die gleiche Richtung ist die mögliche Annahme zu interpretieren, dass *Y. pestis* nach dem 8. Jahrhundert nicht aus Europa verschwunden ist, sondern bis zum Wiederausbruch der Pest im 14. Jahrhundert in einem Nagetier-Reservoir endemisch geblieben ist und in Europa mutiert ist. Im Gegensatz zu diesen positiven molekulargenetischen Ergebnissen ist in dieser Arbeit eine unabhängige Bestätigung des Pesterregers mittels des Nachweises des F1-Antigens nicht gelungen, obwohl anderen Arbeitsgruppen mit diesem Verfahren Erfolg hatten. Die Methodik zur Isolation des Proteins wurde in der Münchner Arbeitsgruppe „Anthropologie und Umweltgeschichte“ erstmals in einer Bachelorarbeit angewandt, deren Ergebnisse in diese Arbeit einfließen. Vermutlich bestehen in diesem Feld noch methodische Unsicherheiten, die in folgenden Arbeiten beseitigt werden müssten. Letztlich hat diese Arbeit einen Beitrag zur Klärung der Evolution von *Y. pestis* geleistet. Das Wissen über die Krankheitsursache ist unter anderem für das Abschätzen der Möglichkeiten von Bedeutung, ähnliche zeitgenössische Krankheiten zu kontrollieren (Gilbert *et al.* 2004). Heutzutage existieren Protokolle zur Diagnose, Behandlung und Prävention der Krankheitsübertragung (WHO 2009), aber diese wissenschaftlichen Ressourcen wären nicht effektiv, wenn eine wiederaufkommende humane Pest-Pandemie eine andere Ätiologie aufwiese (Gilbert *et al.* 2004). Dies ist gerade angesichts des Wiederaufkommens der Pest (Drancourt *et al.* 2006; Chanteau *et al.* 1998) und der sich ausbildenden Resistenzen gegen Antibiotika seitens der Bakterien (Galimand *et al.* 1997; Guiyoule *et al.* 2001) bei vergleichsweise langsamer Entwicklung neuer Antibiotika essentiell für die Behandlung dieser Krankheit, die längst nicht der Vergangenheit angehört (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.2).

6 Ausblick

Was zu tun bleibt nach der eindeutigen Identifikation von *Yersinia pestis* als Verursacher der ersten Pandemie während der Regierungszeit von Kaiser Justinian ist die Erstellung einer Gesamtgenom-Sequenz des aus Aschheim-Individuen gewonnenen Erregers ähnlich zu der Sequenz des Bakteriums (Bos *et al.* 2011), das den Schwarzen Tod im 14. Jahrhundert verursacht hat. Gleiches gilt für den Erreger aus den Individuen aus Manching-Pichl. Durch einen Vergleich dieser vollständigen Sequenzen kann möglicherweise die Evolution und Verbreitung des Erregers genauer geklärt werden.

Weiter wäre interessant, Individuen auf die Anwesenheit des Pestbakteriums zu untersuchen, die noch vor die Justinianische Pest datieren. Laut Hirsch lässt sich nicht entscheiden, ob mit dem Ausbruch der Pest in der zweiten Hälfte des 6. Jahrhunderts die Krankheit erstmals allgemein in Europa verbreitet wurde oder ob sie hier schon früher epidemisch geherrscht hat (Hirsch 1881). Für die Pest von Athen, auch bekannt als Pest des Thukydides, ist ebenfalls die Beulenpest im Gespräch (Cunha 2004). Doch bei diesem Seuchenausbruch verhält es sich wie bei der ersten und zweiten Pandemie: es gibt zahlreiche Alternativen (Cunha 2004). Auch die bereits genannte Pest der Philister (siehe Kapitel Diskussion, Abschnitt 3.3.1.3) könnte die Pest gewesen sein. Wie weit man eventuell zeitlich zurückgehen kann, zeigt sich bei Hirsch. Ihm zufolge lässt sich die Geschichte der Beulenpest

„bis weit in das Alterthum, nachweisbar bis in das Ende des 2. oder den Anfang des 3. Jahrhunderts vorchristlicher Zeitrechnung zurückverfolgen“ (Hirsch 1881). Er verweist auf das 44. Buch der Collectaneen des Oribasius, in dem sich eine den Schriften des Rufus entnommene Notiz befindet, dass die Zeitgenossen des Dionysios – der während oder vor 280-277 v. Chr. gelebt haben muss – einer Krankheit als „*pestilentes bubones maxime letales et acuti*“ gedenken. Schilderungen nach gäbe es keine Zweifel über den Charakter der Krankheit.

Rein zeitlich wäre die Existenz der Pest immerhin denkbar, da Cui *et al.* mit der Abspaltung *Yersinia pestis* von *Y. pseudotuberculosis* vor etwa 1.500 bis 6.400 Jahren (Cui *et al.* 2013) ein recht großes Intervall angegeben, das noch dazu vor die Justinianische Pest datiert. Schon damals sollen humanpathogene *Y. pestis*-Stämme existiert haben (Cui *et al.* 2013). Oder aber es verhält sich wie eingangs dieser Arbeit beschrieben (siehe Kapitel Einleitung, Abschnitt 1.1): Es war nicht die Pest und das Wort „Pestilenz“ musste für jegliche Art der Seuche herhalten.

VII Literaturverzeichnis

- Aboudharam, G., La Scola, B., Raoult, D. & Drancourt, M. (2000). Detection of *Coxiella burnetii* in the dental pulp during experimental bacteremia. *Microbial Pathogenesis*, 28, 249–254.
- Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P., Wirth, T., Diehl, I. & Kusecek, B. *et al.* (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 17837–17842.
- Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A. & Carniel, E. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 14043–14048.
- Albrecht, E. & Mayr, H. (1991). *2000 Jahre Manching. Von der Keltenstadt zur modernen Marktgemeinde. Gemeindechronik, herausgegeben von der Gemeinde Manching*. Selbstverlag, Manching.
- Alder, C. & Matt, C.P. (2007). Fundbericht 2006: Elisabethenstraße (A) 14, Elisabethenkirche. In: *Jahrbuch der schweizerischen Gesellschaft für Ur- und Frühgeschichte Annuaire de la Societe Suisse de Prehistoire et d'Archeologie Annuario della Societa Svizzera di Preistoria e d'Archeologia (Band Volume 90)* (ed. Archäologie Schweiz). Reinhardt Druck, Basel.
- Allen, P. (1979). The "Justinianic" plague. *Byzantion*, 49, pp. 5–20.
- Anisimov, A.P., Lindler, L.E. & Pier, G.B. (2004). Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Rev*, 17, 434–464.
- Auerbach, R.K., Tuanyok, A., Probert, W.S., Kenefic, L., Vogler, A.J. & Bruce, D.C. *et al.* (2007). *Yersinia pestis* Evolution on a Small Timescale: Comparison of Whole Genome Sequences from North America. *PLoS ONE*, 2, e770.
- Bange, F.-C., Hahn, H., Kaufmann, S.H.E. & Ulrichs, T. (2009). Mykobakterien. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Mit 157 Tabellen* (ed. Hahn, H., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. & Suerbaum, S.). Springer, Heidelberg.
- Bayliss, J.H. (1980). The extinction of bubonic plague in Britain. *Endeavour*, 4, 58–66.
- Benedictow, O.J. (1992). *Plague in the late medieval Nordic countries. Epidemiological studies*. Doktorarbeit. 2nd edn. Middelalderforlaget, Oslo.
- Benedictow, O.J. (2004). *The Black Death 1346-1353. The complete history*. Boydell, Woodbridge.
- Benedictow, O.J. (2010). *What disease was plague? On the controversy over the microbiological identity of plague epidemics of the past*. Brill, Leiden; Boston.
- Ben-Gurion, R. & Shafferman, A. (1981). Essential Virulence Determinants of Different *Yersinia* Species Are Carried on a Common Plasmid. *Plasmid*, 5, 183–187.
- Bergdolt, K. (1989). *Die Pest 1348 in Italien. 50 zeitgenössische Quellen*. Manutius-Verlag, Heidelberg.
- Bergdolt, K. (2000). *Der Schwarze Tod in Europa. Die Große Pest und das Ende des Mittelalters*. 5th edn. C.H. Beck, München.
- Bergdolt, K. (2006). *Die Pest. Geschichte des Schwarzen Todes*. C. H. Beck, München.
- Bianucci, R., Rahalison, L., Massa, E.R., Peluso, A., Ferroglio, E. & Signoli, M. (2008). Technical note: A rapid diagnostic test detects plague in ancient human remains: An example of the interaction between archeological and biological approaches (southeastern France, 16th–18th centuries). *Am J Phys Anthropol*, 136, 361–367.
- Bio-Rad Laboratories (2006). Real-Time PCR. Applications Guide.
- Biotium (2012). GelRed & GelGreen. Environmentally safe and ultra-sensitive nucleic acid gel stains for replacing EtBr.
- Biraben, J.N. (1975). *Les hommes et la peste en France et dans les pays européens et méditerranéens. Tome I: La peste dans l'histoire*. Mouton & Co and Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales, Paris.
- Blanc, M.M.G. & Baltazard, M. (1941a). Recherches expérimentales sur la peste ; l'infection le la puce de l'homme : *Pulex irritans* L. *Maroc Médical*, 217, 81.

- Blanc, M.M.G. & Baltazard, M. (1941b). Recherches expérimentales sur la peste. L'infection du pou de l'homme : *Pediculus corporis* de Geer. *Maroc Médical*, 39.
- Bogdan, C. (2009). *Rickettsiaceae (Rickettsia, Orientia), Anaplasmataceae (Anaplasma, Ehrlichia, Neorickettsia)* und *Coxiellaceae*. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Mit 157 Tabellen* (ed. Hahn, H., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. & Suerbaum, S.). Springer, Heidelberg.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E. & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol*, 28, 495–503.
- Bos, K.I., Schünemann, V.J., Golding, G.B., Burbano, H.A., Waglechner, N. & Coombes, B.K. *et al.* (2011). A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature*, 478, 506–510.
- Bos, K.I., Stevens, P., Nieselt, K., Poinar, H.N., DeWitte, S.N. & Krause, J. *et al.* (2012). *Yersinia pestis*: New Evidence for an Old Infection. *PLoS ONE*, 7, e49803.
- Brandes, W. (2005). Die Pest in Byzanz nach dem Tode Justinians (565) bis 1453. In: *Pest. Die Geschichte eines Menschheitstraumas* (ed. Meier, M.). Klett-Cotta, Stuttgart, pp. 201–224.
- Briggs, A.W., Good, J.M., Green, R.E., Krause, J., Maricic, T. & Stenzel, U. *et al.* (2009). Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes. *Science*, 325, 318–321.
- Brotherton, P., Endicott, P., Sanchez, J.J., Beaumont, M., Barnett, R. & Austin, J. *et al.* (2007). Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Research*, 35, 5717–5728.
- Brubaker, R.R. (1972). The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 57, 111–158.
- Brubaker, R.R. (1991). Factors Promoting Acute and Chronic Diseases Caused by *Yersiniae*. *Clin Microbiol Rev*, 4, 309–324.
- Brubaker, R.R., Beesley, E.D. & Surgalla, M.J. (1965). *Pasteurella pestis*: Role of Pesticin I and Iron in Experimental Plague. *Science*, 149, 422–424.
- Buess, H. (1956). Die Pest in Basel im 14. und 15. Jahrhundert. In: *Basler Jahrbuch 1956* (ed. Steiner, G. & Staehelin, A.). Helbing & Lichtenhahn, Basel, pp. 45–71.
- Burger, J. (2007). Paleogenetik. In: *Einführung in die Archäometrie* (ed. Wagner, G.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Burger, J. & Bollongino, R. (2010). Richtlinien zur Bergung, Entnahme und Archivierung von Skelettproben für palaeogenetische Analysen. *Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie*.
- Butler, J.M. (2005). *Forensic DNA typing. Biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd edn. Elsevier Academic Press, Burlington.
- Butler, T. (1983). *Plague and other Yersinia infections*. Plenum Medical Book Co., New York.
- Butler, T. (1994). *Yersinia Infections: Centennial of the Discovery of the Plague Bacillus*, 19, 655–661.
- Byrne, J.P. (2012). *Encyclopedia of the Black Death*. ABC-CLIO, Santa Barbara, Calif.
- Campos, P.F., Craig, O.E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E. & Gilbert, M.T.P. (2012). DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it? *Ann Anat*, 194, 7–16.
- Cantey, J.R. (1974). Plague in Vietnam: Clinical observations and treatment with kanamycin. *Arch. Intern. Med.*, 133, 280–283.
- Carmichael, A.G. (1993). Bubonic Plague. In: *The Cambridge world history of human disease* (ed. Kiple, K.F.). Cambridge University Press, Cambridge [etc.], pp. 628–631.
- Chain, P.S.G., Carniel, E., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Stoutland, P.O. & Regala, W.M. *et al.* (2004). Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 13826–13831.
- Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E.A., Grange, T. & Geigl, E.-M. *et al.* (2010). An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *PLoS ONE*, 5, e13042.
- Chanteau, S., Rahalison, L., Ralafiarisoa, L., Foulon, J., Ratsitorahina, M. & Ratsifasoamanana, L. (2003). Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*, 361, 211–216.

- Chanteau, S., Ratsifasoamanana, L., Rasoamanana, B., Rahalison, L., Randriambeloso, J. & Roux, J. *et al.* (1998). Plague, a Reemerging Disease in Madagascar. *Emerg Infect Dis*, 4, 101–104.
- Christie, A.B. (1969). *Infectious Diseases: Epidemiology and Clinical Practice*. 3rd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Christlein, R. (1971). *Das alamannische Gräberfeld von Dirlewang bei Mindelheim*. M. Lassleben, Kallmünz.
- Clouse, M. (2002). The Black Death Transformed: Disease and Culture in Early Renaissance Europe.: Samuel K Cohn Jr. London and New York: Arnold and Oxford University Press, 2002, pp. 318, US\$65.00 (HB) ISBN: 0-340-70646-5. *International Journal of Epidemiology*, 31, 1280–1281.
- Codreanu-Windauer, S. (1997). *Pliening im Frühmittelalter. Bajuwarisches Gräberfeld, Siedlungsbefunde und Kirche*. Verlag Michael Lassleben, Kallmünz/Opf, Bamberg.
- Cohn, S.K. (2002). *The black death transformed. Disease and culture in early Renaissance Europe*. Oxford University Press, London, New York.
- Cohn, S.K. (2005). Review of O. J. Benedictow, The black death 1346–1353: the complete history 2004. *The New England Journal of Medicine*, 352, 1054–1055.
- Cohn, S.K. & Alfani, G. (2007). Households and Plague in Early Modern Italy. *Journal of Interdisciplinary History*, 38, 177–205.
- Conversations-Lexicon (1817). *oder Encyclopädisches Handwörterbuch für gebildete Stände. O bis Q*. Macklot, Stuttgart.
- Cooper, A. & Poinar, H.N. (2000). Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, 289, 1139.
- Cowal, L., Grainger, I., Hawkins, D. & Mikulski, R. (2008). *The Black Death cemetery, East Smithfield, London*. Museum of London Archaeology Service, London.
- Cui, Y., Li, Y., Gorgé, O., Platonov, M.E., Yan, Y. & Guo, Z. *et al.* (2008). Insight into Microevolution of *Yersinia pestis* by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. *PLoS ONE*, 3, e2652.
- Cui, Y., Yu, C., Yan, Y., Li, D., Li, Y. & Jombart, T. *et al.* (2013). Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 577–582.
- Cunha, B.A. (2004). The cause of the plague of Athens: plague, typhoid, typhus, smallpox, or measles? *Infectious Disease Clinics of North America*, 18, 29–43.
- Cunha, B.A. (2009). Plague and Other *Yersinia* Infections. URL http://www.merckmanuals.com/professional/infectious_diseases/gram-negative_bacilli/plague_and_other_yersinia_infections.html.
- Dalitz, S., Grupe, G. & Jungklaus, B. (2012). Das kleinste Massengrab Brandenburgs. Drei Tote aus dem Dreißigjährigen Krieg auf der Dominsel der Stadt Brandenburg an der Havel. In: *21. Jahresbericht, Neue Folge, 2011 - 2012* (ed. Historischer Verein Brandenburg (Havel) e.V.), pp. 67–78.
- Dannheimer, H. (1998). *Das bajuwarische Reihengräberfeld von Aubing Stadt München*. Konrad Theiss Verlag, Stuttgart.
- Dar, L., Thakur, R., Dar, V.S. & John, T.J. (1994). India: Is it plague? *The Lancet*, 344, 1359.
- Davis, K.J., Fritz, D.L., Pitt, M., Welkos, S.L., Worsham, P.L. & Friedlander, A.M. (1996). Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 120, 156–163.
- Devignat, R. (1951). Variétés de l'espèce *Pasteurella Pestis*. Nouvelle hypothèse.
- Diedonné, A. (1903). Pest. In: *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen* (ed. Kolle, W. & Wassermann, A. von), pp. 511–514.
- D'Irsay, S. (1926). Notes on the origin of the expression 'Atra mors'. In: *A Notable Case of Finger-reckoning in America: Extrait D'Isis No. 26 (vol. VIII, 2)* (ed. Cajori, F.). Société anonyme M. Weissenbruch, pp. 328–332.
- Don, R., Cox, P., Wainwright, B., Baker, K. & Mattick, J. (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 19, 4008.
- Douglas, J.R. & Wheeler, C.M. (1943). Sylvatic plague studies. II. The fate of *Pasteurella pestis* in the flea. *J Infect Dis*, 72, 18–30.

- Drancourt, M. & Raoult, D. (2002). Molecular insights into the history of plague. *Microb Infect*, 4, 105–109.
- Drancourt, M. & Raoult, D. (2011). Genotyping *Yersinia pestis* in historical plague. *Lancet*, 11, 894–895.
- Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O. & Raoult, D. (1998). Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 12637–12640.
- Drancourt, M., Houhamdi, L. & Raoult, D. (2006). *Yersinia pestis* as a telluric, human ectoparasite-borne organism. *Lancet*, 6, 234–241.
- Drancourt, M., Roux, V., La Dang, V., Tran-Hung, L., Castex, D. & Chenal-Francisque, V. *et al.* (2004). Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and Plague Pandemics. *Emerg Infect Dis*, 10, 1585–1592.
- Drancourt, M., Signoli, M., La Dang, V.B.B., Roux, V., Tzortzis, S. & Raoult, D. (2007). *Yersinia pestis* Orientalis in Remains of Ancient Plague Patients. *Emerg Infect Dis*, 13, 332–333.
- Eichhorn, M. (2005). *Langenscheidt dictionary of biology English. English-German, German-English = Langenscheidt Fachwörterbuch Biologie Englisch : Englisch-Deutsch, Deutsch-Englisch*. 1st edn. Langenscheidt, Berlin, New York.
- Eisen, R.J., Bearden, S.W., Wilder, A.P., Monteneri, J.A., Antolin, M.F. & Gage, K.L. (2006). Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. *PNAS*, 103, 15380–15385.
- Engelkirk, P.G. & Duben-Engelkirk, J.L. (2008). *Laboratory diagnosis of infectious diseases. Essentials of diagnostic microbiology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Eppinger, M., Worsham, P.L., Nikolich, M.P., Riley, D.R., Sebastian, Y. & Mou, S. *et al.* (2010). Genome Sequence of the Deep-Rooted *Yersinia pestis* Strain Angola Reveals New Insights into the Evolution and Pangenome of the Plague Bacterium. *Journal of Bacteriology*, 192, 1685–1699.
- Eurogentec (2004). *Your One-Stop-Shop Real-Time PCR Supplier*.
- Eurogentec (Download 2012). qPCR guide.
- Ferber, D.M. & Brubaker, R.R. (1981). Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect Immun*, 31, 839–841.
- Filippov, A.A., Solodovnikov, N.S., Kookleva, L.M. & Protsenko, O.A. (1990). Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. *FEMS Microbiology Letters*, 67, 45–48.
- Fischersworing, S. (2012). *Nachweis des F1-Antigens in Knochenfunden des 14. Jahrhunderts*.
- Friedlander, A.M., Welkos, S.L., Worsham, P.L., Andrews, G.P., Heath, D.G. & Anderson Jr., G.W. *et al.* (1995). Relationship Between Virulence and Immunity as Revealed in Recent Studies of the F1 Capsule of *Yersinia pestis*. *Clinical Infectious Diseases*, 21, S.178-S.181.
- Gage, K.L. & Kosoy, M.Y. (2005). Natural History of Plague: Perspectives from More than a Century of Research. *Annu Rev Entomol*, 50, 505–528.
- Galimand, M., Guiyoule, A., Gerbaud, G., Rasoamanana, B., Chanteau, S. & Carniel, E. *et al.* (1997). Multidrug Resistance in *Yersinia pestis* Mediated by a Transferable Plasmid. Brief Report. *N Engl J Med*, 337, 677–680.
- Garrelt, C. (2002). Molekulargenetische Untersuchung der Bestatteten eines vermuteten Pestfriedhofs des 14. Jahrhunderts (Manching-Pichl). Diplomarbeit.
- Garrelt, C. & Wiechmann, I. (2003). Detection of *Yersinia pestis* DNA in early and late Medieval Bavarian burials. In: *Decyphering ancient bones. The research potential of bioarchaeological collections* (ed. Grupe, G. & Peters, J.). M. Leidorf, Rahden [Germany], pp. 247–254.
- Geiseler, U. (2008). Pest. In: *Brandenburg an der Havel. Lexikon zur Stadtgeschichte* (ed. Geiseler, U. & Hess, K.). Lukas, Berlin, pp. 281 f.
- Geiseler, U. & Hess, K. (eds.) (2008). *Brandenburg an der Havel. Lexikon zur Stadtgeschichte*. Lukas, Berlin.
- Gemeinde Aschheim (2013). Geschichte von Aschheim und Dornach. URL <http://www.aschheim.de/503360949309a5501/geschichte/index.html>.
- Genetics Home Reference (2011). HLA-DQA1. URL <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HLA-DQA1>.

- Gilbert, M.T.P., Bandelt, H.-J., Hofreiter, M. & Barnes, I. (2005a). Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol*, 20, 541–544.
- Gilbert, M.T.P., Binladen, J., Miller, W., Wiuf, C., Willerslev, E. & Poinar, H. *et al.* (2006a). Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis. *Nucleic Acids Research*, 35, 1–10.
- Gilbert, M.T.P., Cuccui, J., White, W., Lynnerup, N., Titbal, R.W. & Cooper, A. *et al.* (2004). Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims. *Microbiology*, 150, 341–354.
- Gilbert, M.T.P., Hansen, A.J., Willerslev, E., Turner-Walker, G. & Collins, M. (2006b). Insights into the processes behind the contamination of degraded human teeth and bone samples with exogenous sources of DNA. *Int. J. Osteoarchaeol*, 16, 156–164.
- Gilbert, T.P., Rudbeck, L., Willerslev, E., Hansen, A.J., Smith, C. & Penkman, K.E. *et al.* (2005b). Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, 32, 785–793.
- Gill, C.A. (1928). *The Genesis of Epidemics and the Natural History of Disease: An Introduction to the Science of Epidemiology Based upon the Study of Epidemics of Malaria, Influenza, and Plague*. William Wood and Company, New York.
- Gottfried, R.S. (1983). *Black Death. Natural and Human Disaster in Medieval Europe*. Simon & Schuster, New York.
- Gross, U. (2009). *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2nd edn. Thieme, Stuttgart.
- Grupe, G. (1986). Umwelt und Bevölkerungsentwicklung im Mittelalter. In: *Mensch und Umwelt im Mittelalter* (ed. Herrmann, B.). Deutsche Verlagsanstalt (DVA), Stuttgart.
- Grupe, G., Christiansen, K., Schröder, I. & Wittwer-Backofen, U. (2012). *Anthropologie. Ein einführendes Lehrbuch*. 2nd edn. Springer, Berlin; Heidelberg.
- Guilyoule, A., Gerbaud, G., Buchrieser, C., Galimand, M., Rahalison, L. & Chanteau, S. *et al.* (2001). Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg Infect Dis*, 7, 43–48.
- Gutsmiedl, D. (2005). Die justinianische Pest nördlich der Alpen? Zum Doppelgrab 166/167 aus dem frühmittelalterlichen Reihengräberfeld von Aschheim-Bajuwarenring. In: *Cum grano salis. Beiträge zur europäischen Vor- und Frühgeschichte. Festschrift für Volker Bierbrauer zum 65. Geburtstag* (ed. Paffgen, B.), Friedberg.
- Gutsmiedl, D. (2010). *Das frühmittelalterliche Gräberfeld Aschheim-Bajuwarenring. Dissertation*. Verlag Michael Lassleben, Kallmünz/Opf.
- Hänsch, S., Bianucci, R., Signoli, M., Rajerison, M., Schultz, M. & Kacki, S. *et al.* (2010). Distinct Clones of *Yersinia pestis* Caused the Black Death. *PLoS Pathog*, 6, e1001134.
- Haeser, H. (1865). *Lehrbuch der Geschichte der Medicin und der epidemischen Krankheiten*, Jena.
- Hagelberg, E., Sykes, B. & Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342, 485.
- Hahn, H. (2009). *Bacillus*. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Mit 157 Tabellen* (ed. Hahn, H., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. & Suerbaum, S.). Springer, Heidelberg.
- Hansen, A., Willerslev, E., Wiuf, C., Mourier, T. & Arctander, P. (2001). Statistical Evidence for Miscoding Lesions in Ancient DNA Templates. *Mol Biol Evol*, 18, 262–265.
- Harbeck, M., Seifert, L., Hänsch, S., Wagner, D.M., Birdsell, D. & Parise, K.L. *et al.* (2013). *Yersinia pestis* DNA from Skeletal Remains from the 6th Century AD Reveals Insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathog*, 9, e1003349.
- Harenberg, B. (2003). *Harenberg Kursbuch Bildung. Das erste interaktive Lexikon*. 1st edn. Harenberg, Dortmund.
- Hatcher, J. (1977). *Plague, population and the English economy, 1348-1530*. Macmillan, London.
- Hecker, J.F.C. (1829). *Geschichte der Heilkunde. Nach den Quellen bearbeitet*. Theodor Christian Friedrich Enslin, Berlin.
- Heritage, J., Evans, E.G.V. & Killington, R.A. (1996). *Introductory microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge [England], New York.

- Herrmann, B. (1990). *Prähistorische Anthropologie. Leitfaden der Feld- und Labormethoden*. Springer, Berlin, New York [etc.].
- Hinnebusch, B.J. (1997). Bubonic plague: a molecular genetic case history of the emergence of an infectious disease. *Journal of Molecular Medicine*, 75, 645–652.
- Hinnebusch, J. & Schwan, T.G. (1993). New Method for Plague Surveillance Using Polymerase Chain Reaction To Detect *Yersinia pestis* in Fleas. *J Clin Microbiol*, 31, 1511–1514.
- Hirsch, A. (1881). Beulenpest. In: *Handbuch der Historisch-Geographischen Pathologie. Erste Abtheilung: Die allgemeinen acuten Infectiouskrankheiten* (ed. Hirsch, A.). Ferdinand Enke, Stuttgart, pp. 349–384.
- Hirst, L.F. (1925). Plague Fleas with special Reference to the Milroy Lectures, 1924. *The Journal of Hygiene*, 24, 1–15.
- Hirst, L.F. (1953). *The Conquest of Plague: A Study of the Evolution of Epidemiology*. Clarendon Press, Oxford.
- Hoening, R. (1882). *Der schwarze Tod in Deutschland: ein Beitrag zur Geschichte des vierzehnten Jahrhunderts*. Eugen Grosser, Berlin.
- Hofmann, S. (2006). *Geschichte der Stadt Ingolstadt*. Donau Courier, Ingolstadt.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Haeseler, A. von & Pääbo, S. (2001a). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res*, 29, 4793–4799.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M. & Pääbo, S. (2001b). Ancient DNA. *Nat Rev Genet*, 2, 353–359.
- Hoke, N. (unpublished). Evaluierung frühdiagenetischer Veränderungen an Knochenmaterial zur Validierung der Daten, gewonnen aus der Analyse stabiler Isotope. Dissertation, München.
- Höss, M. & Pääbo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res*, 21, 3913–3914.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroglu, M. & Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res*, 24, 1304–1307.
- Huggett, J.F., Novak, T., Garson, J.A., Green, C., Morris-Jones, S.D. & Miller, R.F. *et al.* (2008). Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes*, 1, 70.
- Hull, H.F., Montes, J.M. & Mann, J.M. (1987). Septicemic Plague in New Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, 155, 113–118.
- Janse, I., Hamidjaja, R.A. & Reusken, C. (2013). *Yersinia pestis* Plasminogen Activator Gene Homolog in Rat Tissues. *Emerg Infect Dis*, 19, 342–344.
- Jawetz, E. & Meyer, K.F. (1944). The Behaviour of Virulent and Avirulent *P. Pestis* in Normal and Immune Experimental Animals. *Journal of Infectious Diseases*, 74, 1–13.
- Jelinek, T. (2012). *Kursbuch Reisemedizin. Beratung, Prophylaxe, Reisen mit Erkrankungen*. 1st edn. Thieme, Stuttgart.
- John, T.J. (1994). India: Is it plague? *The Lancet*, 344, 1359–1360.
- Jones, A.M., Mann, J. & Brazier, R. (1979). Human Plague in New Mexico: Report of Three Autopsied Cases. *Journal of Forensic Sciences*, 24, 26–38.
- Kacki, S., Rahalison, L., Rajerison, M., Ferroglio, E. & Bianucci, R. (2011). Black Death in the rural cemetery of Saint-Laurent-de-la-Cabrerisse Aude-Languedoc, southern France, 14th century: immunological evidence. *J Archaeol Sci*, 38, 581–587.
- Karlsson, G. (1996). Plague without rats: the case of fifteenth-century Iceland. *Journal of Medieval History*, 22, 263–284.
- Karran, P. & Lindahl, T. (1980). Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochemistry*, 19, 6005–6011.
- Kaufmann, A.F., Boyce, J.M. & Martone, W.J. (1980). Trends in Human Plague in the United States. From the Center for Disease Control. *J Infect Dis*, 141, 522–524.
- Keim, P.S. & Wagner, D.M. (2009). Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nat Rev Micro*, 7, 813–821.

- Kemp, B.M. & Smith, D.G. (2005). Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int*, 154, 53–61.
- Kemp, B.M. & Smith, D.G. (2010). Ancient DNA Methodology: Thoughts from Brian M. Kemp and David Glenn Smith on "Mitochondrial DNA of Protohistoric Remains of an Arikara Population from South Dakota". *Hum Biol*, 82, 227–238.
- Keyes, D.C. (2005). *Medical response to terrorism. Preparedness and clinical practice*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Kiessling, R. (2005). Der schwarze Tod und die weißen Flecken. Zur Großen Pest von 1348/49 im Raum Ostschwaben und Altbayern. *Zeitschrift für bayerische Landesgeschichte*., 68, 519–539.
- Kitamura, H., Iwamoto, C., Sakairi, N., Tokura, S. & Nishi, N. (1997). Marked effect of DNA on collagen fibrillogenesis in vitro. *Int J Biol Macromol (International journal of biological macromolecules)*, 20, 241–244.
- Kitchin, P.A., Szotyori, Z., Fromholz, C. & Almond, N. (1990). Avoidance of false positives. *Nature*, 344, 201.
- Knight, S.D. (2007). Structure and Assembly of *Yersinia pestis* F1 Antigen. In: *The genus Yersinia. From genomics to function* (ed. Perry, R.D. & Fetherston, J.D.). Springer, New York.
- Koelbing, H.M. (1984). Zur Geschichte der Pest in der Schweiz. In: *Jahrbuch für Solothurnische Geschichte* (ed. Historischer Verein des Kantons Solothurn). Walter-Verlag AG Olten, pp. 5–12.
- Kohn, G.C. (2008). *Encyclopedia of plague and pestilence. From ancient times to the present*. 3rd edn. Facts on File, New York.
- Kolman, C.J. & Tuross, N. (2000). Ancient DNA analysis of human populations. *Am. J. Phys. Anthropol*, 111, 5–23.
- Koolman, J., Röhm, K.-H. & Wirth, J. (eds.) (2003). *Taschenatlas der Biochemie*. 3rd edn. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Kramer, A., Falke, D. & Miksits, K. (2009). Epidemiologie der Infektionskrankheiten. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Mit 157 Tabellen* (ed. Hahn, H., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. & Suerbaum, S.). Springer, Heidelberg.
- Krug, R.M. (2006). Es ist doch zum Jungsten ein end daran. Die Augsburger Steuerbücher im Spätmittelalter (1346-1430) als Medium städtischer Verwaltung. Dissertation.
- Krüger, S. (1972). Krise der Zeit als Ursache der Pest? Der Traktat De mortalitate in Alamannia des Konrad von Megenberg. In: *Festschrift für Hermann Heimpel. Zum 70. Geburtstag Am 19. September 1971* (ed. Max-Planck-Institut für Geschichte). Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.
- Kuhn, H. (1940). Die Erbauungszeit der Sebastianskirche. *Sammelblatt des Historischen Vereins Ingolstadt*, 58, 18–20.
- Kunkel, W., Röhring, K.-H., Alert, M., Bauer, G. & Kusior, W. (2003). Zeittafel der Geschichte von Brandenburg (Havel). In: *Chronik der Stadt Brandenburg* (ed. Arbeitskreis Stadtgeschichte im Brandenburgischen Kulturbund e. V. gefördert von der Robert-Bosch-Stiftung). Verlag Bernd Neddermeyer GmbH (VBN), Berlin.
- Kwok, S. & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237–238.
- Lamb, H.H. (1989). *Klima und Kulturgeschichte. Der Einfluss des Wetters auf den Gang der Geschichte*. Rowohlt-Taschenbuch-Verl., Reinbek bei Hamburg.
- Lang, M. (2004). Der Vrsprung aber der Pestilentz ist nicht natürlich, sondern übernatürlich ...": Medizinische und theologische Erklärung der Seuche im Spiegel protestantischer Pestschriften 1527-1650. In: *Die leidige Seuche. Pest-Fälle in der Frühen Neuzeit* (ed. Ulbricht, O.). Böhlau, Köln, pp. 133–180.
- Lathem, W.W., Price, P.A., Miller, V.L. & Goldman, W.E. (2007). A Plasminogen-Activating Protease Specifically Controls the Development of Primary Pneumonic Plague. *Science*, 315, 509–513.
- Lechner, K. (1884). *Das große Sterben in Deutschland in den Jahren 1348 bis 1351 und die nachfolgenden Pestepidemien bis zum Schlusse des 14. Jahrhunderts*. Verlag der Wagner'schen Universitäts-Buchdruckerei, Innsbruck.
- Leonard, J.A., Shanks, O., Hofreiter, M., Kreuz, E., Hodges, L. & Ream, W. et al. (2007). Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research. *J Archaeol Sci*, 34, 1361–1366.

- Lepper, P.M. & Trautmann, M. (2009). Sepsis. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Mit 157 Tabellen* (ed. Hahn, H., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. & Suerbaum, S.). Springer, Heidelberg, pp. 780–786.
- Li, Y., Cui, Y., Hauck, Y., Platonov, M.E., Dai, E. & Song, Y. *et al.* (2009). Genotyping and Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: Insights into the Worldwide Expansion of Central Asia Plague Foci. *PLoS ONE*, 4, e6000.
- Life Technologies (2011). Real-time PCR: Understanding Ct. Application Note Real-Time PCR.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709–715.
- Little, L.K. (2007). Life and afterlife of the first plague pandemic. In: *Plague and the end of antiquity. The pandemic of 541-750* (ed. Little, L.K.). Cambridge University Press, New York, pp. 3–32.
- Longrigg, J. (1980). The Great Plague of Athens. *History of Science*, 18, 209–225.
- Losert, H. & Pleterski, A. (2003). *Altenerding in Oberbayern. Struktur des frühmittelalterlichen Gräberfeldes und "Ethnogenese" der Bajuwaren*. Scřipvaz-Verlag; Zalořba ZRC, Berlin, Bamberg, Ljubljana.
- Lottspeich, F. & Engels, J.W. (2012). *Bioanalytik*. 3rd edn. Springer Spektrum Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Lüdemann, H. (1990). Mehrfachbelegte Gräber im Frühen Mittelalter. Ein Beitrag zum Problem der Doppelbestattungen. phil. Diss., Würzburg.
- MacArthur, W. (1957). Historical Notes on Some Epidemic Diseases connected with Jaundice. *British Medical Journal*, XIII, 146–149.
- Malou, N., Tran, T.-N.-N., Nappez, C., Signoli, M., Le Forestier, C. & Castex, D. *et al.* (2012). Immuno-PCR - A New Tool for Paleomicrobiology: The Plague Paradigm. *PLoS ONE*, 7, e31744.
- Masters, P. (1987). Preferential preservation of noncollagenous protein during bone diagenesis: implications for chronometric and stable isotope measurements. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51:, 51, 3209–3214.
- Matt, C.P. & Alder, C. (2008). Beitrag "2006/24 Elisabethenstrasse (A) 14, Elisabethengottesacker". In: *Jahresbericht 2006 mit Beiträgen der Basler Denkmalpflege* (ed. Archäologische Bodenforschung des Kantons Basel-Stadt), Basel, pp. 37–40.
- McCormick, M. (2007). Towards a molecular history of the Justinianic Plague. In: *Plague and the end of antiquity. The pandemic of 541-750* (ed. Little, L.K.). Cambridge University Press, New York.
- McKeough, A. (2001). Ring-a-ring-a-rosy: The Plaque Revisited. In: *Barriers, Borders, Boundaries. Program and Abstracts of the 2001 Australian Archaeological Association Annual Conference* (ed. Aboriginal and Torres Strait Islander Studies Unit, U.o.Q.), p. 73.
- McKeough, A. (2002). Ring-a-ring-a-rosy: Can DNA Analysis identify the presence of the Plaque Bacillus in Archaeological remains? *Australian Archaeology*, 55, 48.
- McPherson, M.J. & Møller, S.G. (2006). *PCR*. 2nd edn. Taylor & Francis, New York.
- Meka-Mechenko, T.V. (2004). F1-Negative Natural *Y. pestis* Strains. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 529, 379–381.
- Melzak, K.A., Sherwood, C.S., Turner, R.F.B. & Haynes, C.A. (1996). Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J Colloid Interface Sci*, 635–644.
- Menninger, M., Scholz, M., Stork, I. & Wahl, J. (2004). Im Tode vereint: eine außergewöhnliche Doppelbestattung und die frühmittelalterliche Topografie von Giengen a.d. Brenz-Hürben, Kreis Heidenheim. In: *Archäologische Ausgrabungen Baden-Württemberg 2003* (ed. Biel, J.). Theiss, Stuttgart.
- miproLab. miPROTECT Plague. Rapid test for the detection of *Yersinia pestis*. technisches Datenblatt.
- Mohammadi, T., Reesink, H.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M. & Savelkoul, P.H. (2004). Real-time amplification of HLA-DQA1 for counting residual white blood cells in filtered platelet concentrates. *Transfusion*, 44, 1314–1318.
- Mollaret, H.M. & Brossollet, J. (1987). *Alexandre Yersin. Der Mann, der die Pest besiegte*. Benziger, Zürich.
- Morelli, G., Song, Y., Mazzoni, C.J., Eppinger, M., Roumagnac, P. & Wagner, D.M. *et al.* (2010). Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. *Nat Genet*, 42, 1140–1143.

- Morris, C. (1971). Review Article: The Plague in Britain. *Hist. J*, 14, 205–215.
- Mrevlishvili, G.M. & Svintradze, D.V. (2005a). Complex between triple helix of collagen and double helix of DNA in aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 35, 243–245.
- Mrevlishvili, G.M. & Svintradze, D.V. (2005b). DNA as a matrix of collagen fibrils. *Int J Biol Macromol (International journal of biological macromolecules)*, 36, 324–326.
- Mülhardt, C. (2009). Das Werkzeug. In: *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics* (ed. Mülhardt, C.). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 47–83.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263–273.
- NCBI (2013). HLA-DQA1 major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 [Homo sapiens (human)]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3117>.
- Nguyen-Hieu, T., Aboudharam, G., Signoli, M., Rigeade, C., Drancourt, M. & Raoult, D. *et al.* (2010). Evidence of a Louse-Borne Outbreak Involving Typhus in Douai, 1710-1712 during the War of Spanish Succession. *PLoS ONE*, 5, e15405.
- Niederstätter, A. (2001). *Österreichische Geschichte. Fürst und Land im Spätmittelalter*. Ueberreuter, Wien.
- Noonan, J.P., Hofreiter, M., Smith, D., Priest, J.R., Rohland, N. & Rohland, N. *et al.* (2005). Genomic Sequencing of Pleistocene Cave Bears. *Science*, 309, 597–599.
- Norkina, O.V., Kulichenko, A., Gintsburg, A., Tuchkov, I., Popov, Y. & Aksenov, M. *et al.* (1994). Development of a diagnostic test for *Yersinia pestis* by the polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol*, 76, 240–245.
- Ohoto, O. (1923). *Japan. med. World*, 3.
- Okazaki, M., Yoshida, Y., Yamaguchi, S., Kaneno, M. & Elliott, J. (2001). Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials*, 22, 2459–2464.
- Pääbo, S. (1986). Molecular Genetic Investigations of Ancient Human Remains. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 441–446.
- Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 1939–1943.
- Pääbo, S. (1991). Amplifying DNA from archeological remains: a meeting report. *Genome Research*, 1, 107–110.
- Pääbo, S., Gifford, J.A. & Wilson, A.C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7,000-year-old brain. *Nucleic Acids Res*, 16, 9775–9788.
- Pääbo, S., Higuchi, R.G. & Wilson, A.C. (1989). Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem*, 264, 9709–9712.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J. & Rohland, N. *et al.* (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*, 38, 645–679.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T. & Prentice, M.B. *et al.* (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 413, 523–527.
- Payne, J.F. (1887). Plagues Ancient and Modern. or, The Black Death and the Sweating Sickness. In: *Saint Thomas's Hospital Reports. New Series* (ed. Gulliver & Clutton). J. & A. Churchill, New Burlington Street, London, pp. 103–128.
- Perry, R.D. & Fetherston, J.D. (1997). *Yersinia pestis* - Etiologic Agent of Plague. *Clin Microbiol Rev*, 10, 35–66.
- Pfeiffer, H., Hühne, J., Seitz, B. & Brinkmann, B. (1999). Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med*, 112, 142–144.
- Philip, W.M. & Hirst, L.F. (1917). A report on the Outbreak of the Plague in Colombo, 1914-16. *The Journal of Hygiene*, 23, 527–564.
- Pilli, E., Modi, A., Serpico, C., Achilli, A., Lancioni, H. & Lippi, B. *et al.* (2013). Monitoring DNA Contamination in Handled vs. Directly Excavated Ancient Human Skeletal Remains. *PLoS ONE*, 8, e52524.

- Poinar, H.N. (2003). The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *International Congress Series*, 575–579.
- Poland, J.D. & Barnes, A.M. (1979). Plague. In: *CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A : Bacterial, Rickettsial, and Mycotic Diseases* (ed. Steele, J.H. & Stoenner, H.). CRC Press, [S.l.], pp. 515–559.
- Pollitzer, R. (1954). *Plague*.
- Prentice, M., Gilbert, T. & Cooper, A. (2004). Was the Black Death caused by *Yersinia pestis*? *Lancet*, 4, 72.
- Prüfer, K., Stenzel, U., Hofreiter, M., Pääbo, S., Kelso, J. & Green, R.E. (2010). Computational challenges in the analysis of ancient DNA. *Genome Biology*, 11.
- Pruvost, M., Grange, T. & Geigl, E.-M. (2005). Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotech*, 38, 569–575.
- Pruvost, M., Schwarz, R., Bessa Correia, V., Champlot, S., Grange, T. & Geigl, E.-M. (2008). DNA diagenesis and palaeogenetic analysis: Critical assessment and methodological progress. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, 266, 211–219.
- Pruvost, M., Schwarz, R., Correia, V.B., Champlot, S., Braguier, S. & Morel, N. *et al.* (2007). Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 739–744.
- Pusch, C.M., Rahalison, L., Blin, N., Nicholson, G.J. & Czarnetzki, A. (2004). *Yersinia* F1 antigen and the cause of Black Death. *Lancet*, 4, 484–485.
- Qiagen (2010a). Multiplex PCR Handbook.
- Qiagen (2010b). QIAamp® DNA Investigator Handbook.
- Qiagen (2011a). REPLI-g FFPE Kit.
- Qiagen (2011b). REPLI-g Mini/Midi Handbook. For whole genome amplification from purified genomic DNA, blood, and cells.
- Qiagen (2012). QIAquick® Spin Handbook.
- Qiagen (Download 2013). REPLI-g Mini Kit Produkt-Details. For highly uniform whole genome amplification from small or precious samples. URL <http://www.qiagen.com/products/repligminikit.aspx#Tabs=t1>.
- Raoult, D., Aboudharam, G., Crubézy, E., Larrouy, G., Ludes, B. & Drancourt, M. (2000). Molecular identification by "suicide PCR" of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 12800–12803.
- Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., Pedersen, J.S., Albrechtsen, A. & Moltke, I. *et al.* (2010). Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*, 463, 757–762.
- Ratsitorahina, M., Chanteau, S., Rahalison, L., Ratsifasoamanana, L. & Boisier, P. (2000). Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar. *The Lancet*, 355, 111–113.
- Reuter, P. (2007). *Springer klinisches Wörterbuch*. 1st edn. Springer, Heidelberg.
- Riehm, J., Tserennorov, D., Kiefer, D., Stuermer, I.W., Tomaso, H. & Zöller, L. *et al.* (2011). *Yersinia pestis* in Small Rodents, Mongolia. *Emerg Infect Dis*, 17, 1320–1321.
- Riehm, J.M., Vergnaud, G., Kiefer, D., Damdindorj, T., Dashdavaa, O. & Khurelsukh, T. *et al.* (2012). *Yersinia pestis* Lineages in Mongolia. *PLoS ONE*, 7, e30624.
- Roche Diagnostics (2008). LightCycler 480 Instrument Operator's Manual. Software Version 1.5.
- Roche Diagnostics (2012a). Email bzgl. Score vom 30.05.2012.
- Roche Diagnostics (2012b). Quantifizierungsstrategien mit dem LightCycler 480 PCR-Analysesystem.
- Rohland, N. & Hofreiter, M. (2007a). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc*, 2, 1756–1762.
- Rohland, N. & Hofreiter, M. (2007b). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotech*, 42, 343–352.
- Rohland, N., Siedel, H. & Hofreiter, M. (2010). A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Mol Ecol Resour*, 10, 677–683.
- Roth, C. (2013). Formamid. Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006.
- Russel (1968). That Earlier Plague. *Demography*, 5, 174–184.

- Salamon, M., Tuross, N., Arensburg, B. & Weiner, S. (2005). Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 13783–13788.
- Sallares, R. (2007). Ecology, Evolution, and Epidemiology of Plague. In: *Plague and the end of antiquity. The pandemic of 541-750* (ed. Little, L.K.). Cambridge University Press, New York.
- Sampietro, M.L., Gilbert, M.T.P., Lao, O., Caramelli, D., Lari, M. & Bertranpetit, J. *et al.* (2006). Tracking down Human Contamination in Ancient Human Teeth. *Mol Biol Evol*, 23, 1801–1807.
- Sampietro, M.L., Lao, O., Caramelli, D., Lari, M., Pou, R. & Marti, M. *et al.* (2007). Palaeogenetic evidence supports a dual model of Neolithic spreading into Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 2161–2167.
- Sample, A.K., Fowler, J.M. & Brubaker, R.R. (1987). Modulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis* via plasmid-plasmid interaction. *Microbial Pathogenesis*, 2, 443–453.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463–5467.
- Schmidt-Schultz, T.H. & Schultz, M. (2004). Bone protects proteins over thousands of years: Extraction, analysis, and interpretation of extracellular matrix proteins in archeological skeletal remains. *Am. J. Phys. Anthropol*, 123, 30–39.
- Schneider, T. (2008). Mehrfachbestattungen von Männern in der Merowingerzeit. *Zeitschrift für Archäologie des Mittelalters*, 36, 1–32.
- Schünemann, V.J., Bos, K., DeWitte, S., Schmedes, S., Jamieson, J. & Mitnik, A. *et al.* (2011). Targeted enrichment of ancient pathogens yielding the pPCP1 plasmid of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, E746–E752.
- Schultes, T., Hummel, S. & Herrmann, B. (1997). Recognizing and overcoming inconsistencies in microsatellite typing of ancient DNA samples. *Ancient Biomolecules*, 1.
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H. & Aubrey, A.D. *et al.* (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Res*, 37, 3215–3229.
- Scott, S. & Duncan, C.J. (eds.) (2001). *Biology of plagues. Evidence from historical populations*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Scott, S. & Duncan, C.J. (2004). *Return of the Black Death. The world's greatest serial killer*. Wiley, Chichester, Hoboken, NJ.
- Sebbane, F., Gardner, D., Long, D., Gowen, B.B. & Hinnebusch, B.J. (2005). Kinetics of Disease Progression and Host Response in a Rat Model of Bubonic Plague. *Am. J. Pathol*, 166, 1427–1439.
- Seifert, L., Harbeck, M., Thomas, A., Hoke, N., Zöller, L. & Wiechmann, I. *et al.* (2013). Strategy for sensitive and specific detection of *Yersinia pestis* in skeletons of the Black Death pandemic. *PLoS ONE*, 8.
- Senova (2009). 3D-Immunfiltration.
- Senova (2012). ABICAP Multilayer Test Kit for the detection of *Yersinia pestis* F1 antigen. Instructions.
- Shrewsbury, J.F.D. (1970). *A History of Bubonic Plague in the British Isles*. University Press, Cambridge.
- Simond, P. (1898). La propagation de la peste. *Annales de l'Institut Pasteur*, 625–687.
- Smith, C.I., Chamberlain, A.T., Riley, M.S., Cooper, A., Stringer, C.B. & Collins, M.J. (2001). Not just old but old and cold? *Nature*, 410, 771–772.
- Smith, C.I., Chamberlain, A.T., Riley, M.S., Stringer, C. & Collins, M.J. (2003). The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol*, 45, 203–217.
- Sodeinde, O.A. & Goguen, J.D. (1988). Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infect Immun*, 56, 2743–2748.
- Sodeinde, O.A., Subrahmanyam, Y.V.B.K., Stark, K., Quan, T., Bao, Y. & Goguen, J.D. (1992). A Surface Protease and the Invasive Character of Plague. *Science*, 258, 869–1020.
- Staggs, T.M. & Perry, R.D. (1991). Identification and Cloning of a fur Regulatory Gene in *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology*, 173, 417–425.
- Staskiewicz, A. (2007). The early medieval cemetery at Aschheim-Bajuwarenring - a Merovingian population under the influence of pestilence? In: *Skeletal series and their socio-economic context* (ed. Grupe, G. & Peters, J.). M. Leidorf, Rahden/Westf.

- Stathakopoulos, D.C. (2004). *Famine and Pestilence in the Late Roman and Early Byzantine Empire: A Systematic Survey of Subsistence Crises and Epidemics*. Ashgate Publishing, Birmingham.
- Stiller, M., Green, R.E., Ronan, M., Simons, J.F., Du, L. & He, W. *et al.* (2006). Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 13578–13584.
- Suerbaum, S., Bockermühl, J. & Karch, H. (2009). Enterobakterien. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Mit 157 Tabellen* (ed. Hahn, H., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. & Suerbaum, S.). Springer, Heidelberg.
- Swearengen, J.R. (2012). *Biodefense. Research methodology and animal models*. 2nd edn. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Teissier, P., Tanon, L. & Gastinel, P. (1921a). Remarque sur l'épidémie de peste observée a l'hospital Claude Bernard (1). *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, 45, 139–144.
- Teissier, P., Tanon, L., Gastinel, P. & Reilly, I. (1921b). Valeur diagnostique de l'hémoculture dans la peste bubonique; fréquence de la bacillémie pasteuse. *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, 45, 136–138.
- Tetracore. *Plague BioThreat Alert™ Test Strip. Beipackzettel zum Produkt*.
- The Advisory Committee (1907). Reports on Plague Investigations in India. *Journal of Hygiene*, 7, 693–985.
- Thieman, W.J., Palladino, M.A. & Hopf, N.W. (2007). Die Geschichte der Gentechnik: Die Technik der rekombinanten DNA. In: *Biotechnologie* (ed. Thieman, W.J., Palladino, M.A. & Hopf, N.W.). Pearson Studium, München [u.a.].
- Thompson, J.A. (1906). On the Epidemiology of Plague. *Journal of Hygiene*, 6, 537–569.
- Tikhomirov, E. (1999). Epidemiology and Distribution of Plague. In: *Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control* (ed. Dennis, D.T., Gage, K.L., Gratz, N., Poland, J.D. & Tikhomirov, E.). WHO, Geneva.
- Toch, M. (2000). *Die ältesten Rechnungsbücher des Klosters Scheyern, 1339-1363*. C.H. Beck, München.
- Tomaso, H., Reisinger, E.C., Dahouk, S., Frangoulidis, D., Rakin, A. & Landt, O. *et al.* (2003). Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. *Fems Immunol Med Mic*, 38, 117–126.
- Tomaso, H., Thullier, P., Seibold, E., Guglielmo, V., Buckendahl, A. & Rahalison, L. *et al.* (2007). Comparison of Hand-Held Test Kits, Immunofluorescence Microscopy, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Flow Cytometric Analysis for Rapid Presumptive Identification of *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol*, 45, 3404–3407.
- Tran, T.-N.-N., Aboudharam, G., Raoult, D. & Drancourt, M. (2011a). Beyond ancient microbial DNA: nonnucleotidic biomolecules for paleomicrobiology. *Biotech*, 50.
- Tran, T.-N.-N., Raoult, D. & Drancourt, M. (2011b). *Yersinia pestis* DNA Sequences in Late Medieval Skeletal Finds, Bavaria. *Emerg Infect Dis*, 17, 955–957.
- Tran, T.-N.-N., Signoli, M., Fozzati, L., Aboudharam, G., Raoult, D. & Drancourt, M. *et al.* (2011c). High Throughput, Multiplexed Pathogen Detection Authenticates Plague Waves in Medieval Venice, Italy. *PLoS ONE*, 6, e16735.
- Tsangaras, K. & Greenwood, A.D. (2012). Museums and disease: Using tissue archive and museum samples to study pathogens. *Ann Anat*, 194, 58–73.
- Twigg, G. (1984). *The Black Death. A Biological Reappraisal*. 1st edn. Batsford Academic and Educational, London.
- Twigg, G. (1995). Bubonic Plaque: doubts and diagnoses. *J Med Microbiol*, 42, 383–385.
- van Loghem, J.J. (1918). The Plague of the 17th Century Compared with the Plague of Our Days. *organe de la Société Historique Néerlandaise des Sciences Médicales, Exactes et Naturelles*, 95–107.
- Vasold, M. (1991). *Pest, Not und schwere Plagen. Seuchen und Epidemien vom Mittelalter bis heute*. C.H. Beck, München.
- Vasold, M. (2003). Die Ausbreitung des Schwarzen Todes in Deutschland nach 1348. Zugleich ein Beitrag zur deutschen Bevölkerungsgeschichte. *Historische Zeitschrift*, 277, 281–308.
- Vergnaud, G. (2005). *Yersinia pestis* Genotyping. *Emerg Infect Dis*, 11, 1317–1319.

- Wahl, J., Wittwer-Backofen, U. & Kunter, M. (1998). Zwischen Masse und Klasse. Alamannen im Blickfeld der Anthropologie. In: *Die Alamannen* (ed. Archäologisches Landesmuseum Baden-Württemberg (Hrsg.)), Stuttgart, pp. 337–348.
- Welkos, S.L., Davis, K.J., Pilt, L.M., Worsham, P.L. & Friedlander, A.M. (1995). Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid pFra to the virulence of *Yersinia pestis*. In: *Yersiniosis: Present and future. 6th International Symposium on Yersinia, Rome, September 1994* (ed. Ravagnan, G. & Chiesa, C.). Karger, Basel, New York.
- White, T.D. & Folkens, P.A. (2005). *The Human Bone Manual*. Elsevier, Burlington.
- WHO. Plague. Health topics. URL <http://www.who.int/topics/plague/en/>.
- WHO (2000). *WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone. Chapter 3: Plague*.
- WHO (2009). *Operational Guidelines on Plague. Surveillance, Diagnosis, Prevention and Control*. World Health Organization.
- WHO (2010). Weekly epidemiological record, 85, 37–48.
- Wiechmann, I. (2012). Basler Massengrab. Email vom 1.08.2012, München.
- Wiechmann, I. & Grupe, G. (2005). Detection of *Yersinia pestis* DNA in Two Early Medieval Skeletal Finds From Aschheim (Upper Bavaria, 6th Century A.D.). *Am J Phys Anthropol*, 126, 48–55.
- Wiechmann, I., Brandt, E. & Grupe, G. (1999). State of Preservation of Polymorphic Plasma Proteins Recovered from Ancient Human Bones. *Int J Osteoarchaeol*, 9, 383–394.
- Wiechmann, I., Harbeck, M. & Grupe, G. (2010). *Yersinia pestis* DNA Sequences in Late Medieval Skeletal Finds, Bavaria. *Emerg Infect Dis*, 16, 1806–1807.
- Wiechmann, I., Harbeck, M., Grupe, G. & Peters, J. (in press). Ancient DNA-Labor des ArchaeoBioCenters, LMU München. In: *Documenta Archaeobiologicae 10* (ed. Grupe, G., McGlynn, G. & Peters, J.). M. Leidorf, Rahden.
- Willerslev, E. & Cooper, A. (2005). Review Paper. Ancient DNA. *Proc R Soc B*, 272, 3–16.
- Williams, P. & Wallace, D. (1989). *Unit 731. The Japanese army's secret of secrets*. Grafton, London.
- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M. & Koneman, E.W. (2006). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Estados Unidos.
- Winter, C.C., Cherry, W.B. & Moody, M.D. (1960). An Unusual Strain of *Pasteurella pestis* Isolated from a Fatal Human Case of Plague. *Bulletin of the WHO*, 23, 408–409.
- Winters, M., Barta, J.L., Monroe, C., Kemp, B.M. & Gilbert, M.T.P. (2011). To Clone or Not To Clone: Method Analysis for Retrieving Consensus Sequences In Ancient DNA Samples. *PLoS ONE*, 6, e21247.
- Worsham, P.L., McGovern, T.G., Vietri, N.J. & Friedlander, A.M. (2007). Plague. In: *Medical Aspects of Biological Warfare Textbooks of Military Medicine Series* (ed. Dembek, Z.F.). Government Printing Office, pp. 91–119.
- Wu Lien-Teh (1926). *A treatise on pneumonic plague. Publications of the League of Nations. Health*. League of Nations.
- Wu Lien-Teh, Chun, J.W.H., Pollitzer, R. & Wu, C.Y. (1936). *Plague. A manual for medical and public health workers.*, Shanghai.
- Wylie, J.A.H. & Stubbs, H.W. (1983). The Plague of Athens: 430–428 B.C. Epidemic and Epizoötic. *The Class. Q*, 33, 6.
- Xu, Z., Zhang, F., Xu, B., Tan, J., Li, S. & Jin, L. (2009). Improving the sensitivity of negative controls in ancient DNA extractions. *Electrophoresis*, 30, 1282–1285.
- Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dudar, J.C. & Saunders, S.R. (1998). Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. *Am J Phys Anthropol*, 105, 539–543.
- Zavialov, A.V., Tischenko, V.M., Fooks, L.J., Brandsdal, B.O., Aqvist, J. & Zav'Yalov, V.P. et al. (2005). Resolving the energy paradox of chaperone/usher-mediated fibre assembly. *Biochem J*, 389, 685–694.
- Zhou, D., Tong, Z., Song, Y., Han, Y., Pei, D. & Pang, X. et al. (2004). Genetics of Metabolic Variations between *Yersinia pestis* Biovars and the Proposal of a New Biovar, microtus. *J Bacteriol*, 186, 5147–5152.
- Ziegler, P. (1972). *The Black Death*.

- Ziegler, P. (2009). *The Black Death*. 1st edn. Harper Perennial Modern Classics, New York.
- Zierdt, H., Hummel, S. & Herrmann, B. (1996). Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Hum Biol*, 68, 185–199.

VIII Anhang

1 Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AD	Anno Domini	NaCl	Natriumchlorid
aDNA	ancient / alte DNA	NaOCl	Natriumhypochlorit
AT	Annealing-Temperatur	NAP	periplasmatische Nitrat-Reduktase
bp	Basenpaar(e)	<i>napA</i>	Gen für die katalytische Untereinheit der periplasmatischen Nitrat-Reduktase
<i>caf1</i>	capsular antigen fraction 1		
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat	n. Chr.	nach Christus
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat	n. t.	not tested, deutsch: nicht getestet
ddATP	Didesoxyadenosintri-phosphat	PCR	Polymerase Chain Reaction, deutsch: Polymerase-Ketten-Reaktion
ddCTP	Didesoxycytosintri-phosphat		
ddGTP	Didesoxyguanosintri-phosphat	<i>pla</i>	<i>plasminogen activator</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtri-phosphat	pMT	Plasmid mausletales Toxin
ddTTP	Didesoxythymidintri-phosphat	pPCP1	Plasmid Pesticin, Coagulase, Plasminogen-Aktivator
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat		
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat	q	quantitativ (Real Time)
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure /Deoxyribonucleic acid	RDT	rapid diagnostic test
		SAPM	Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie München
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphate		
dsDNA	doppelsträngige DNA	Sek	Sekunden
dTTP	Desoxythymintri-phosphat	SDS	sodium dodecyl sulfate, deutsch: Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
EtOH	Ethanol	TE	Tris-EDTA
GuHCl	Guanidinihydrochlorid	T _M	melting temperature, deutsch: Schmelztemperatur
GuSCN	Guanidiniumthiocyanat		
HCl	Chlorwasserstoff/ Salzsäure	TMB	Tetramethylbenzidin
<i>HLA</i>	<i>Humane(s) Leukozyten Antigen(e)</i>	UV	Ultraviolettstrahlung
IMB	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr	v. Chr.	vor Christus
kb	Kilobasen	VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
LC/LC480	LightCycler/ LightCycler 480	WHO	World Health Organization, deutsch: Weltgesundheitsorganisation
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität		
LNA	Locked Nucleic Acid	Y.	<i>Yersinia</i>
Min	Minuten		

2 Zahnschema

Zahnschema des humanen Dauergebisses. I = Incisivus, C = Caninus, P = Prämolare, M = Molar

Oberkiefer rechts								Oberkiefer links							
Quadrant I								Quadrant II							
M3	M2	M1	P2	P1	C	I2	I1	I1	I2	C	P1	P2	M1	M2	M3
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48								31							
47								32							
46								33							
45								34							
44								35							
43								36							
42								37							
41								38							
M3	M2	M1	P2	P1	C	I2	I1	I1	I2	C	P1	P2	M1	M2	M3
Quadrant IV								Quadrant III							
Unterkiefer rechts								Unterkiefer links							

3 Sequenzen der artifiziellen DNA-Konstrukte

pla

GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCA
TCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGGTACCGAGCTCGCGGCCGCAAGCAAGACTTTGGCATT
GGTGTGACATAATATCCAGCGTTAATTACGGTACCATAATAACGTGAGCCGGATGTCTTCTCACGGAAAGTAA
GATCTCTCATATAGTGCTCATCATTATCATGTGCCCGAACCCAGTCGCTGAATTTAAATAATGCATTTAACTCAA
AATCATTAATGCGATACTGGCCTGCAAGTCCAATATATGGCATAGAAAAGCGCTGGTTATAACCTATTACCACC
TGCGGCCGCAAGCTTGGATCCGAATTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGA

HLA

GGTACCTTGTACCAGTTTTACGGTCCCTCTGGCCAGTACACCCATGAATTTGATGGAGATGAGCAGTTCTACGT
GGACCTGGAGAGGAAGGAGACTGCCTGGCGGTGGCCTGAGTTCAGCAAATTTGGAGGTTTTGACCCGAGG
GTGCACTGAGAAACATGGCTGTGGCAAAACACAACCTGAACATCATGATTAACGCTACAACCTCTACCGCTGCT
ACCAGAGCTC

4 Primer und Sonden

Für die Validierung von PCRs verwendete Primer und Sonden.

Primer „Y.pest R2“ wird bei Tomaso *et al.* „YP pla R“ genannt (Tomaso *et al.* 2003)

Branch	SNP	Bezeichnung	Sequenz 5'-3' SNPs in Sonden sind rot hervorgehoben (xy) = length of primer/probe	Quelle	AT [°C]
	<i>pla</i>	Y.pest F	GACTGGGTTTCGGGCACATG (19)	diese Arbeit	61,0
		Y.pest R2	AGACTTTGGCATTAGGTGTG (20)	(Tomaso <i>et al.</i> 2003)	52,4
		Y.pest R	CGGATGTCTTCTCACGGA (18)	diese Arbeit	53,5
		Y.pest TM	6FAM-TGATGAGCACTA+TAT+G+A+GAG--BBQ (20)	diese Arbeit	43,9
	<i>HLA</i>	HLA fwd 2	GAATTTGATGGAGATGAGCAG (21)	diese Arbeit	52,0
		HLA rev 2	GCGGGTCAAAACCTCCAAAT (20)	diese Arbeit	59,9
		HLA probe 1	6FAM-TACGTGGACCTGGAGAGGAAGGAGACT--BBQ (27)	diese Arbeit	65,6
	<i>pPCP1</i>	pPCP_fwd_IMB	GGTTTGTGCTATTTTTGCCTG (22)	diese Arbeit	56,5
		pPCP_rev_IMB	ACCCCACTAACAATATAACCTACG (24)	diese Arbeit	59,3
		pPCP1_fwd_IMB_al	CTATTTTTGCCTGTCTGTTGCCGTG (25)	diese Arbeit	63,0
		pPCP1_rev_IMB_al	AACCTACGAGTTATATTTTCAAG (23)	diese Arbeit	53,5
	<i>caf1-I</i>	caf1 F1	AACCAGCCCCGATCACTCTTA (21)	(Hänsch <i>et al.</i> 2010)	59,8
		caf1 R1	ATCACCCGCGCATCTGTA (19)	(Hänsch <i>et al.</i> 2010)	58,8
	<i>caf1-II</i>	YP caf A	GGTGATCCCATGTACTTAACA (21)	(Tomaso <i>et al.</i> 2003)	55,9
		L2	TGAGCGAACAAGAAATCTG (21)	(Hänsch <i>et al.</i> 2010)	55,9
	<i>napA</i>	napA S	AGCGATGCTTCTGAACCGA (19)	diese Arbeit	56,7
		napA R	CACCTTTGGATCAGCATACAAC (22)	diese Arbeit	57,8
		napA mut	6FAM-TGGCGGCTTTTCTAACGT--BBQ (19)	diese Arbeit	58,1
		napA wt	YAK-TGGCGGTTTTTCTAACGTG--BBQ (20)	diese Arbeit	58,1
		napA F	GAAGAATCCCGGCAGCGA (18)	diese Arbeit	59,9
		napA A	CTGATCTTCTGGTACACTGCTCATT (25)	diese Arbeit	56,8
XI-3.ANT.a	s12	s12 S	CCCGATTGGTGATGACGAAGATT (23)	diese Arbeit	61,5
		s12 R	AGCGGTAGCTCCAGAGTGGTATC (23)	diese Arbeit	59,8
		s12 TM wt	FAM-AATCgCCCAGATgT-BBQ (14)	diese Arbeit	36,5
		s12 TM mut	YAK-AATCA ^A CCCAGATgT-BBQ (14)	diese Arbeit	30,0
		s12 F	CCCGATTGGTGATGACGAA (19)	diese Arbeit	
		s12 A	GTAGCTCCAGAGTGGTATCTTCAATG (26)	diese Arbeit	
	s13	s13_fwd_IMB	GTCTGCCAATGGATATTTCTG (21)	diese Arbeit	55,9
		s13_L4	CGAAAATGGGTGAAAAGCGAAAT(24)	(Hänsch <i>et al.</i> 2010)	60,8
	s14	s14_fwd_IMB	CATTAACAGCAATCCCATTAACCG (24)	diese Arbeit	59,3
		s14_U1	GGTGAGGTAGTCGTCGTTGTG (22)	(Hänsch <i>et al.</i> 2010)	58,6
	s247	s247_fwd	CAAATAATAGGCAGTCAGCCC (21)	diese Arbeit	55,0
		s247_rev_IMB	GCTCTCGGTGCTTACAGCGA (20)	diese Arbeit	61,4
	s588	s588_fwd_IMB	GTCGGTGAATAAGCTCACGAAG (22)	diese Arbeit	60,3
		s588_rev_mo	GATACCACTCGGCCAAAC (19)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	56,7
	s660	s660_fwd_mo	GTTGTGCTGCACTCTTGATG (20)	diese Arbeit	57,3
		s660_rev	GTCAGAAATAAAATCATAATCCCC (25)	diese Arbeit	53,8
		s660_rev_IMB	CAACATGCCTGATATTGTCAG (21)	diese Arbeit	55,9

Fortsetzung Primer und Sonden

Branch	SNP	Bezeichnung	Sequenz 5'-3' SNPs in Sonden sind rot hervorgehoben (xy) = length of primer/probe	Quelle	AT [°C]
	s826	s826_fwd_IMB	GCACTCAGTGGGGCGCTGAC (20)	diese Arbeit	65,5
		s826_rev	CGCTTTGTTCGGCTTTTCGTA (20)	diese Arbeit	60,0
	s904	s904_fwd_IMB	CGGCCTAATTCGGCGATAC (19)	diese Arbeit	
		s904_rev_mo	TCGGTATCGGTTTCCCATTTG (20)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	58,1
	s920	s920_fwd_mo	ATTAGCCAGTGCCGGAATC (20)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	55,6
		s920_rev_IMB	GTTAATATTTTACTGCCACTGACTGC (26)	diese Arbeit	60,1
	s955	s955_fwd_mo	GCCTTTTCTTTTTCGGTGAC (20)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	55,5
		s955_rev_IMB	GGTATTGTAGTAATGTCAGCTATGTAC (28)	diese Arbeit	62,2
	s1023	s1023_fwd_mo	TTGACGAACCCCACTTTTCC (20)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	58,5
		s1023_rev_IMB	GGTTCAGATTACGAGAAAATTAGAC (25)	diese Arbeit	58,1
	s1038	s1038_fwd_IMB	GCCTCATGACTTCCAACGCG (21)	diese Arbeit	65,5
		s1038_rev_IMB	CATTTGGAAATAGCGACGATCA (22)	diese Arbeit	56,5
	s1119	s1119_fwd_IMB	TTAATTAATGTTTTTTCATAAGGAGG (27)	diese Arbeit	54,3
		s1119_rev_IMB	ATTCATAACTAATAAACATTTGTGCGAG (28)	diese Arbeit	57,8
	s1195	s1195_fwd_mo	AGAATGGAGACGATAACGGC (20)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	55,0
		s1195_rev4_IMB	TATTGGATATTGTGATCAATAATGGG (26)	diese Arbeit	56,9
		s1195_rev3_IMB	GTAAAATAAATATTGGATATTGTGATC (28)	diese Arbeit	54,9
3.ANT.a- 0.ANT3.a	s545	s545 F	ATGCAGACCTGCTTCTGAAAG (22)	diese Arbeit	59,4
		s545 A	CCAGATAGTTAAGAAAGCTGTACGTG (26)	diese Arbeit	56,6
		s545 R	TGCACCAGATAGTTAAGAAAGCTGTA (26)	diese Arbeit	
		s545 TM wt	6FAM-CAGCGCAGTCTCCCCG--BBQ (16)	diese Arbeit	60,1
		s545 TM mut	YAK-TCAGCACAGTCTCCCCGACT--BBQ (20)	diese Arbeit	60,0
		s545 S	AGACCTGCTTCTGAAAGACTTG	diese Arbeit	
3.ANT.a- VIII	s19	s19 S	GGATGTGGATCGGGACTTTC (20)	diese Arbeit	56,8
		s19 A	CTTGTGGCAGATTGGCATCC (20)	diese Arbeit	59,4
		s19 TM mut	YAK--TGCTACGTGCTCACCATCTGG--BBQ (21)	diese Arbeit	60,8
		s19 TM wt	6FAM-TGCTGCGTGCTCACCATC--BBQ (18)	diese Arbeit	59,4
		s19 F	CGGGATGTGGATCGGGAC (18)	diese Arbeit	59,8
		s19 R	GATTTGAAAATCTTGTGGCAGATTG (25)	diese Arbeit	58,3
VI-III	s82	s82_IMB_fwd_1	GTGCGGCTGTCTTGTGGTC (20)	diese Arbeit	61,4
		s82_IMB_rev_1	GCGGATAGTTGTTGAGTAGCAGGC (25)	diese Arbeit	66,3
		s82_IMB_fwd_2	GCTTGTGTGCTGGCCTC (19)	diese Arbeit	58,8
	s463	s463_fwd_Mo	GCGCGATCAAAGGCAATAC (20)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	59,4
		s463_rev_IMB alt	CTCACCACCTCACAAGCGCTG (21)	diese Arbeit	63,7
		s463_fwd_IMB	CGAGAATATCGGCGCGGC (18)	diese Arbeit	60,5
		s463_rev_IMB	GTCTGGAGACCTCGGTCGCT (20)	diese Arbeit	63,5

Fortsetzung Primer und Sonden

Branch	SNP	Bezeichnung	Sequenz 5'-3' SNPs in Sonden sind rot hervorgehoben (xy) = length of primer/probe	Quelle	AT [°C]
VII-VI	s87	s87 F	AAAATAATCAGGATGTAGAAAAATGAAAG (29)	diese Arbeit	55,8
		s87-fwd-sequ	CAGGATGTAGAAAAATGAAAGCG (23)	diese Arbeit	56,1
		s87-rev-sequ	GGTAAATACCGCCTGAATATCG (22)	diese Arbeit	55,6
		s87 R	CGTAACCCGCCTCTGCTA (18)	diese Arbeit	56,7
		s87 TM mut short	YAK-TTAGACCCACGCAACCAAT--BBQ (19)	diese Arbeit	55,9
		s87 TM wt short	6FAM-TTAGCCCCACGCAACC-BBQ (16)	diese Arbeit	56,2
		s87 TM wt	6FAM-TTAGCCCCACGCAACCAA-BBQ (18)	diese Arbeit	60,2
		s87 TM mut	YAK-TTAGACCCACGCAACCAATATCAT-BBQ (24)	diese Arbeit	59,6
		s87 S	AAGCGATTGTATTTGCCTATCA (22)	diese Arbeit	54,5
		s87 A	ACCCGCCTCTGCTAATTCG (19)	diese Arbeit	59,1
	s89	s89 fwd_IMB	CTGAATGCGGATTGGCGTC (19)	diese Arbeit	58,8
		s89_rev_IMB	GCCAATTGTAGTGATTCACGG (21)	diese Arbeit	57,9
		s89_fwd_Mo	TTGGCGTCCCATAACTTTC (20)	(Morelli <i>et al.</i> 2010)	57,3
		s89_rev_IMB alt	AACCCGCCAATTGTAGTGATTC (22)	diese Arbeit	58,4

5 Optimierungsläufe der konventionellen *pla*-PCR

Optimierungsläufe der konventionellen *pla*-PCR. Rot geschrieben ist stets, was sich im Vergleich zum Vor-Experiment verändert hat

Taq/Mix			Primer [μ M]		Cycle-Bedingungen		Template	Ergebnis	Extra/Anmerkung
Name	Vol.	Endk.	F	R2					
Qiagen Multiplex plus PCR Master Mix	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 5 Min	1000, 100, 50, 25, 10 Kopien	1000 bis 25 Kopien sicher positiv, 10 Kopien schwach positiv	
					45x:	95 °C, 30 Sek 60 °C, 90 Sek 72 °C, 90 Sek			
						68 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			
Qiagen Multiplex PCR Master Mix (ohne UDG)	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	s.o.	1000 - 25 Kopien: positiv 10 Kopien: negativ	
					45x:	94 °C, 30 Sek 60 °C, 90 Sek 72 °C, 90 Sek			
						72 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			
Qiagen Multiplex plus PCR Master Mix	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 5 Min	25, 10, 5, 1 Kopie in Triplikaten	bei 25, 10 und 5 Kopien alle 3 Ansätze positiv, bei 1 Kopie 2 von 3 Ansätzen positiv	
					45x:	95 °C, 30 Sek 60 °C, 90 Sek 72 °C, 90 Sek			
						68 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			
Qiagen Multiplex PCR Master Mix (ohne UDG)	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	s.o.	bei 25, 10 und 5 Kopien alle 3 Ansätze positiv, bei 1 Kopie 1 von 3 Ansätzen positiv	
					45x:	94 °C, 30 Sek 60 °C, 90 Sek 72 °C, 90 Sek			
						72 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			

Fortsetzung Optimierungsläufe der konventionellen *pla*-PCR

Taq/Mix			Primer [μ M]		Cycle-Bedingungen		Template	Ergebnis	Extra/Anmerkung
Name	Vol.	Endk.	F	R2					
Qiagen Multiplex plus PCR Master Mix	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 5 Min	10, 5, 1 Kopie in Triplikaten	bei 10 Kopien: alle positiv bei 5 Kopien: 2/3 positiv bei 1 Kopie: 2/3 positiv	5 μ l statt 2 μ l Template
					45x:	95 °C, 30 Sek 60 °C, 3 Min 72 °C, 90 Sek			
						68 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			
Qiagen Multiplex PCR Master Mix (ohne UDG)	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	10, 5, 1 Kopie in Triplikaten	alle positiv	5 μ l statt 2 μ l Template
					45x:	94 °C, 15 Sek 60 °C, 3 Min 72 °C, 90 Sek			
						72 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			
s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	10, 5, 1 Kopie in Triplikaten, 3 Knochenmatrix-Proben	Kopien alle positiv Leitern bei den Knochenmatrix-Proben	
					45x:	94 °C, 30 Sek 60 °C, 3 Min 72 °C, 90 Sek			
						72 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			
s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	10, 5, 1 Kopie in Triplikaten, 3 Knochenmatrix-Proben	bei 10 und 5 Kopien alle 3 Ansätze schwach positiv, bei 1 Kopie 1 von 3 schwach positiv; Knochenmatrix-Proben: schwächere Leitern	
					45x:	94 °C, 30 Sek 60 °C, 90 Sek 72 °C, 90 Sek			
						72 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			

Fortsetzung Optimierungsläufe der konventionellen *pla*-PCR

Taq/Mix			Primer [μM]		Cycle-Bedingungen		Template	Ergebnis	Extra/Anmerkung
Name	Vol.	Endk.	F	R2					
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	46 μl	s.o.	s.o.	s.o.		94 °C, 2 Min	10, 5, 1 Kopie in Triplikaten	bei 10 und 5 Kopien alle 3 Ansätze positiv, bei 1 Kopie alle 3 negativ; generell: keine klaren Banden, schmierig	
					45x:	94 °C, 30 Sek 60 °C, 30 Sek 68 °C, 60 Sek			
						68 °C, 5 Min			
						8 °C, ∞			
Qiagen Multiplex PCR Master Mix(ohne UDG)	25 μl	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	s.o.	60 °C: 10 und 5 Kopien: alle positiv, 1 Kopie: 1/3 positiv; 62 °C: 10 und 5 Kopien: alle positiv (wenn auch eine bei den 5 Kopien nur schwach kommt), 1 Kopie: 1/3 positiv; 64 °C: bei 10 Kopien alle positiv, bei 5 Kopien 2/3 positiv, bei 1 Kopie: alle negativ; 66 °C: 2/3 der 10 Kopien positiv, Rest negativ; 68 °C: alle negativ; allgemein: je höher die Temp., desto mehr Primer-Wolken	
					45x:	94 °C, 30 Sek 60-68 °C, 30 Sek 72 °C, 60 Sek			
						72 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			
Qiagen HotStar plus mit 10x PCR-Puffer (End-K. 1x) dNTPs: je 200 μM	0,25 μl	0,25U/Reaktion	s.o.	s.o.		95 °C, 5 Min	s.o.	1,5 mM MgCl_2 : 10: 3/3, 5: 2/3, 1: 1/3; 3 mM MgCl_2 : alle pos., aber Schmier; 4 mM MgCl_2 : alle pos., aber starke Primer-Wolken; 5 mM MgCl_2 : 10 und 5: 3/3, 1: 2/3, aber Schmier	MgCl_2 [mM]: 1,5; 3; 4; 5
					45x:	94 °C, 30 Sek 60 °C, 30 Sek 72 °C, 60 Sek			
						72 °C, 10 Min			
						8 °C, ∞			

Fortsetzung Optimierungsläufe der konventionellen *pla*-PCR

Taq/Mix			Primer [μ M]		Cycle-Bedingungen		Template	Ergebnis	Extra/Anmerkung
Name	Vol.	Endk.	F	R2					
Qiagen Multiplex PCR Master Mix (ohne UDG)	25 μ l	1x	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	10, 5, 1 Kopie; 3 Knochenmatrix- Proben	10 Kopien: alle positiv; 5 Kopien: 2/3 positiv; 1 Kopie: alle negativ; Knochenmatrix-Proben: negativ, keine Leitern	
					2x:	94 °C, 30 Sek			
						66 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
					2x:	94 °C, 30 Sek			
						64 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
					2x:	94 °C, 30 Sek			
						62 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
					39x:	94 °C, 30 Sek			
60 °C, 30 Sek									
72 °C, 60 Sek									
	72 °C, 10 Min								
	8 °C, ∞								
s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.		95 °C, 15 Min	s.o.	10 und 5 Kopien: alle positiv; 1 Kopie: 2/3 positiv; Knochenmatrix-Proben: negativ, keine Leitern	
					2x:	94 °C, 30 Sek			
						64 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
					2x:	94 °C, 30 Sek			
						62 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
					41x:	94 °C, 30 Sek			
						60 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
						72 °C, 10 Min			
	8 °C, ∞								

Fortsetzung Optimierumläufe der konventionellen *pla*-PCR

Taq/Mix			Primer [μ M]		Cycle-Bedingungen		Template	Ergebnis	Extra/Anmerkung
Name	Vol.	Endk.	F	R2					
AmpliTag Gold bzw. AmpliTag Gold LD mit Gold Buffer (Endk.: 1x) dNTP + dUTP: 200 μ M/400 μ M UDG: 0,01U/ μ l	0,5 μ l	2,5 U/Reaktion	s.o.	s.o.		25 °C, 10 Min	s.o.	AmpliTag Gold: 10 und 5 Kopien: alle positiv; 1 Kopie: Leitern bei 2/3, 1/3 positiv; Knochenmatrix-Proben: negativ, keine Leitern AmpliTag Gold LD: 10 und 5 Kopien: alle positiv; 1 Kopie: alle (schwach) positiv, aber Leitern; Knochenmatrix-Proben: negativ, keine Leitern	MgCl ₂ [mM]: 3
						95 °C, 15 Min			
					2x:	94 °C, 30 Sek			
						64 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
					2x:	94 °C, 30 Sek			
						62 °C, 30 Sek			
						72 °C, 60 Sek			
					41x:	94 °C, 30 Sek			
						60 °C, 30 Sek			
	72 °C, 60 Sek								
	72 °C, 10 Min								
	8 °C, ∞								
Qiagen Multiplex PCR Mastermix mit UDG: 0,01 U/ μ l, Vol.: 0,5 μ l	25 μ l	1x	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	10 und 5 Kopien: alle positiv; 1 Kopie: 1/3 positiv; Knochenmatrix-Proben: negativ, keine Leitern	
mit UDG + BSA (0,4 mg/ml)								10 und 5 Kopien: alle positiv; 1 Kopie: 1/3 positiv; Knochenmatrix-Proben: 1/3 positiv keine Leitern; generell: Primerwolken in Negativen	
nur mit BSA 0,4 mg/ml								10 und 5 Kopien: alle positiv; 1 Kopie: 1/3 positiv; Knochenmatrix-Proben: 1/3 positiv keine Leitern; generell: Primerwolken in Negativen und Schmier oberhalb positiver Banden	

6 Optimierungsläufe der *pla*-qPCR

Optimierungsläufe der *pla*-qPCR. Rot geschrieben ist stets, was sich im Vergleich zum Vorversuch geändert hat. s. o. = siehe oben

Taq/Mix		UDG		Primer					Sonde [μM]	Cycling-Bedingung		Anmerkung	Template	Ergebnis
	Vol. [μl]	Konz.	Vol. [μl]		Konz. [μM]		Konz. [μM]							
Roche LightCycler FastStart DNA MasterPLUS HybProbe	4 μl	0,5U/20 μl	0,25	R	0,75	F	0,75	0,25		40 °C, 10 Min		1000, 100, 50, 10 5, 1 Kopie	am besten ist Invitrogen Platinum	
LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit	2 μl	s.o.								95 °C, 10 Min	5 mM MgCl ₂			
Roche LC480 Probes Master	10 μl	s.o.							45x:	95 °C, 15 Sek 60 °C, 45 Sek				
Invitrogen: Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG with Rox	10 μl	unbekannt		s.o.						40 °C, 30 Sek				
Roche Light Cycler TaqMan Master	4 μl	0,5U/20 μl	0,25	s.o.										
Invitrogen: Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG with Rox <i>(enthält 6mM MgCl₂)</i>	10 μl	unbekannt		s.o.						50 °C, 2 Min	10, 5 und 1 Kopie in Triplikaten; <i>Knochenmatrix je mit 5 und 10 Kopien; Knochenmark und Leber pur und mit Y777; Y777 pur</i>	Gel: alle 10 und 5 Kopien positiv, 1 Kopie negativ; pure Knochenmatrix negativ, aber evtl. mit Leiter; Knochenmatrix mit Konstrukt (schwach) positiv; pures Knochen- mark und Leber: Leitern mit tw. Banden der richtigen Größe; KM und Leber mit Y777: positiv; Y777 positiv		
										95 °C, 2 Min				
									45x:	95 °C, 15 Sek 60 °C, 45 Sek				
										40 °C, 30 Sek				
s.o.	10 μl	s.o.		s.o.					s.o.		4, 5, 6 mM MgCl ₂	10, 5 und 1 Kopie in Triplikaten	am besten sind insgesamt 6 mM MgCl ₂	

Fortsetzung Optimierungsläufe der *pla*-qPCR

Taq/Mix		UDG		Primer				Sonde	Cycling-Bedingung	Anmerkung	Template	Ergebnis
	Vol. [μl]	Konz.	Vol. [μl]		Konz. [μM]		Konz. [μM]	Sonde [μM]				
s.o.	s.o.	s.o.							50 °C, 2 Min	6 mM MgCl ₂	1000, 100, 10, 5, 1 Kopie in Triplikaten	
									95 °C, 2 Min			
									45x: 95 °C, 15 Sek 56/58/60 °C, 30 Sek			
									40 °C, 30 Sek			
s.o.	s.o.	s.o.							50 °C, 2 Min	s.o.	s.o.	Beste Temp.: 60°C
									95 °C, 2 Min			
									45x: 95 °C, 15 sec 56/58/60/62 °C, 30 Sek			
									40°C, 30 Sek			
s.o.	s.o.	s.o.							50 °C, 2 Min	3, 4, 5, 6 mM MgCl ₂	1000, 100, 10 Kopien in Triplikaten	beste Konz.: 6 mM
									95 °C, 2 Min			
									45x: 95 °C, 15 Sek 60 °C, 30 Sek			
									40 °C, 30 Sek			
s.o.	s.o.	s.o.		s.o.	0,25	s.o.	0,25	0,25	s.o.	6 mM MgCl ₂	s.o.	0,25 μM Primer ist am besten
					0,5		0,5					
					0,75		0,75					
					1		1					
	s.o.	s.o.		0,25	s.o.	0,25	0,125					
							0,25					
							0,375					
							0,5					

Fortsetzung Optimierungsläufe der *pla*-qPCR

Taq/Mix		UDG		Primer				Sonde [μM]	Cycling-Bedingung	Anmerkung	Template	Ergebnis
	Vol. [μl]	Konz.	Vol. [μl]		Konz. [μM]		Konz. [μM]					
s.o.	s.o.	s.o.		s.o.	0,2	s.o.	0,2	0,2	s.o.	s.o.	s.o.	0,2 μM Primer ist am besten, noch besser ist aber 0,25 μM Primer 0,1 μM Sonde ist am besten
					0,4		0,4					
					0,6		0,6					
					0,8		0,8					
				s.o.	0,25	s.o.	0,25	0,1				
								0,2				
								0,3				
								0,4				
s.o.	s.o.			s.o.	0,25	s.o.	0,25	0,1	s.o.	6 mM MgCl ₂	s.o.	
										<u>BSA:</u> 0, 0,04; 0,4, 1 mg/ml	s.o.	
s.o.										<u>BSA:</u> 1,5, 2-6 mg/ml	s.o.	je mehr desto besser
s.o.										<u>BSA:</u> 0,4, 2, 4 mg/ml	10 und 5 Kopien in Triplikaten, Knochenmatrix-Proben mit 0, 5 oder 10 Kopien	Knochenmatrix am besten mit 4 mg/ml
s.o.										<u>BSA:</u> 0,4, 2, 4 mg/ml	10 und 1000 Kopien in Triplikaten, Knochenmatrix-Pool mit 10 oder 1000 Kopien	am besten mit 0,4 mg/ml

7 Optimierungsläufe der HLA-qPCR

Optimierungsläufe der HLA-qPCR. Rot geschrieben ist stets, was sich im Vergleich zum Vorversuch geändert hat. s. o. = siehe oben

Taq/Mix			Primer [μ M]		Sonde	Cycle-Bedingungen		Template	Ergebnis	Extra/Anmerkung
Name	Vol.	Endk.	F	R						
Kit Roche LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes	2	1x	0,3	0,3	0,6		40 °C, 10 Min	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten		ohne BSA 0,5 U/ μ l UDG 3 mM MgCl ₂
						45 x:	95 °C, 10 Min			
							95 °C, 15 Sek			
							60 °C, 30 Sek			
	40 °C, 30 Sek									
s. o.			0,3	0,3	s. o.		40 °C, 10 Min	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten, Knochen- matrix		0,4 mg/ml BSA 0,5 U/ μ l UDG 3 mM MgCl ₂
						45x:	95 °C, 10 Min			
							95 °C, 15 Sek			
							63 °C , 30 Sek			
	40 °C, 30 Sek									
s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.		ohne BSA 0,5 U/ μ l UDG 3 mM MgCl ₂
s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		40 °C, 10 Min	s. o.		0,4 mg/ml BSA (0,16 μl) 0,5 U/ μ l UDG 3 mM MgCl ₂
						45x:	95 °C, 10 Min			
							95 °C, 15 Sek			
							60 °C, 30 Sek			
	40 °C, 30 Sek									
Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.	s. o.		BSA und MgCl ₂ : s.o.
s.o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.	s. o.		ohne BSA MgCl ₂ : 3mM
Kit Roche LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.		s. o.	s. o.		ohne BSA

Fortsetzung Optimierungsläufe der HLA-qPCR

Taq/Mix			Primer [μ M]		Sonde			Template	Ergebnis	Extra/Anmerkung
Name	Vol.	Endk.	F	R		Cycle-Bedingungen				
Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG	s. o.	s. o.	s. o.	s. o.	0,2 0,4		50 °C, 2 Min	s. o.		0,4 mg/ml BSA 3 mM MgCl ₂
							95 °C, 2 Min			
						45x:	95 °C, 15 Sek			
							60 °C, 30 Sek			
							40 °C, 30 Sek			
s. o.			s. o.	s. o.	0,2		s. o.	s. o.		4, 5, 6 mM MgCl ₂ 0,4 mg/ml BSA
s.o.	s. o.	s. o.	0,2 0,4 0,6	0,2 0,4 0,6	0,2		s.o.	s. o.		3 mM MgCl ₂ 0,4 mg/ml BSA

8 Optimierungsläufe konventioneller Typisierungs-PCRs

Optimierungsläufe für alle konventionellen Typisierungs-PCRs. Rot hervorgehoben ist jeweils das Endergebnis der Validierung. Primer sind teilweise abgekürzt angegeben. Die komplette Nomenklatur findet sich in Anhang 4. Standen bei einem Locus zwei Primer-Paare zur Verfügung, so bezeichnet das erstgenannte jeweils Mastermix 1 (MM1). „Gradient“ bedeutet, dass eine Gradienten-PCR mit den nachfolgend angegebenen Temperaturen durchgeführt wurde. Als Template wurde bei den PCRs verschiedene Kopien-Konzentrationen des Impfstamms EV76 verwendet.

Lokus	Primer	AT [°C]	Template	Versuche	detektiert bis
caf1-I	caf1F1/caf1R1	58; Gradient 56-64	1000, 100, 10,1 Kopie in Triplikaten + Knochen; 10 (2), 1(3) Kopien	II	1 Kopie (2/3)
caf1-II	YPcafA/L2	58	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (3/3)
napA	napA S/napA R	56	1000, 100, 10,1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (1/3)
pPCP1	pPCP1_fwd_IMB/(...)rev_IMB (...)fwd_IMB_al/(...)rev_IMB_al	58	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (3/3)
s13	s13_fwd_IMB/L4	56	1000, 100, 10,1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (1/3)
s14	s14_fwd_IMB/s14_U1	56	1000, 100, 10,1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (1/3)
s82	s82_IMB_fwd_1/s82_IMB_rev_1 s82_IMB_fwd_2/s82_IMB_rev_1	56; Gradient 56-64	1000, 100, 10,1 Kopie in Triplikaten + Knochen; Ausnahme bei Gradient: 10, 10, 1 (je 1 Kopie)	III	MM1: 1 Kopie (2/3) MM2: 10 Kopien (3/3)
s87	s87-fwd-sequ/s87-rev-sequ s87f/s87-rev-sequ	56	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	II	1 Kopie (2/3)
s89	s89_fwd_IMB/s89_rev_IMB s89_fwd_Mo/s89_rev_IMB alt	58	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (3/3) 1 Kopie (1/3)
s247	s247_fwd/s247rev_IMB	56; 60; Gradient 58-66	1000, 100, 10,1 Kopie in Triplikaten + Knochen; 100, 10,1 Kopie in Triplikaten + Knochen; Gradient: 10, 1 Kopie	III	1 Kopie (3/3)
s463	s463_fwd_IMB/(...)rev_IMB (...)_fwd_Mo/(...)rev_IMBalt	60	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	MM1: 1 Kopie (1/3) MM2: 1 Kopie (1/3)
s588	s588_fwd_IMB/s588_rev_mo	56 54-62	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen; Gradient: 10 (2), 1 (3) Kopien	II	1 Kopie (2/3)
s660	s660_fwd_mo/(...)rev s660_fwd_mo/(...)rev_IMB	56	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	MM1: 1 Kopie (2/3) MM2: 10 Kopien (3/3)
s826	s826_fwd_IMB/s826_rev	56; 64; Gradient 58-66	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	III	1 Kopie (2/3)
s904	s904_fwd_IMB/s904_rev_mo	56; 58	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	II	1 Kopie (1/3)
s920	s920_fwd_mo/s920_rev_IMB	56	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	10 Kopien (3/3)
s955	s955_fwd_mo/s955_rev_IMB	56	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (2/3)
s1023	s1023_fwd_mo/(...)rev_IMB	56	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	10 Kopien (2/3) 1 Kopie (1/3)
s1038	s1038_fwd_IMB/(...)rev_IMB	56; 60; Gradient 58, 60, 62, 64	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen; Gradient: 10 (2), 1 (3) Kopien	III	1 Kopien (3/3)
s1119	s1119_fwd_IMB/(...)rev_IMB	56	1000, 100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	1 Kopie (1/3)
s1195	s1195_fwd_mo/s1195_rev3_IMB s1195_fwd_mo/s1195_rev4_IMB	56	100, 10, 1 Kopie in Triplikaten + Knochen	I	MM1: 1 Kopie (2/3) MM2: 1 Kopie (1/3)

9 Optimierungsläufe Real Time-basierter Typisierung-PCRs

napA

Taq	Primer	Sonden		MgCl ₂ [mM]	Temperatur
		YAK [μM]	FAM [μM]		
INV	F+R	0,2	0,2	5	60 °C
	S+A				
	F+A				
	S+R				
INV	F+A	0,3	0,2	5	
	S+R				
	F+A	0,4	0,2	5	
	S+R				
INV	S+R	0,3	0,2	3	
				4	
				6	
INV	S+R	0,3	0,2	3	
				4	
				6	
INV	S+R	0,3	0,2	4	58 °C
				6	
INV	S+R	0,3	0,2	4	62 °C
				6	

s12

Taq	Primer	Sonden		MgCl ₂ [mM]	Temperatur	BSA
		YAK [μM]	FAM [μM]			
ABI GT	F+R	0,2	0,2		60 °C	
	S+A	0,2	0,2			
	F+A	0,2	0,2			
	S+R	0,2	0,2			
INV	F+R	0,2	0,2			
		0,3	0,3			
		0,4	0,4			
INV	S+R	0,2	0,2			
		0,3	0,3			
		0,4	0,4			
	S+A	0,2	0,2			
		0,3	0,3			
		0,4	0,4			
INV	S+R	0,4	0,2	3		
				4		
				5		
				6		
	S+A	0,4	0,2	3		
				4		
				5		
				6		
INV	S+R	0,4	0,2	5	58°C	
					62°C	
INV	S+R	0,4	0,2	5	58°C	0,4 mg/ml

s19

Taq	Primer	Sonden		MgCl ₂ [mM]	Temperatur
		YAK [μM]	FAM [μM]		
INV	F+R	0,4	0,2	5	
	S+A				
	F+A				
	S+R				
INV	F+R	0,4	0,3	5	
	S+A				
	F+A				
	S+R				
INV	S+A	0,4	0,3	3	
				4	
				6	
	S+R	0,4	0,3	3	
				4	
				6	
INV	S+A	0,4	0,3	3	58 °C
	S+R	0,4	0,3	3	
INV	S+A	0,4	0,3	3	62 °C
	S+R	0,4	0,3	3	

s87

Taq	Primer	Sonden		MgCl ₂ [mM]	Temperatur	
		YAK [μM]	FAM [μM]			
INV	F+R	0,4	0,2	5	60 °C	
	S+A					
	F+A					
	S+R					
INV	F+R	0,4	0,2	3		
				4		
				6		
INV	F+R	0,4	0,2	6		58 °C
INV	F+R	0,4	0,2	6		62 °C

s545

Taq	Primer	Sonden		MgCl ₂ [mM]	Temperatur	BSA	Anmerkung
		YAK [μM]	FAM [μM]				
ABI GT	F+R	0,2	0,2		60 °C		
ABI GT	S+A	0,2	0,2				
ABI GT	F+A	0,2	0,2				
ABI GT	S+R	0,2	0,2				
ABI GT	F+R	0,2	0,1				
ABI GT	F+A	0,2	0,1				
INV	F+A	0,2	0,1				
INV	F+A	0,2	0,1	3			
INV		0,2	0,1	4			
INV		0,4	0,2	5			
INV		0,4	0,2	6			
INV	F+R	0,4	0,2	3			
INV				4			
INV				5			
INV				6			
INV	F+A	0,4	0,2	3			
INV				4			
INV	F+A	0,4	0,2	6	58 °C		
INV					62 °C		
INV	F+A	0,4	0,2	6	62 °C	0,4 mg/ml	
INV		0,4	0,2				alte Charge
INV		0,4	0,2				neue Charge
INV		0,2	0,4				neue Charge
INV		0,4	0,2				neue Charge
INV		0,6	0,25				neue Charge
INV		0,4	0,2				alte Charge
INV		0,4	0,3				neue Charge
INV		0,45	0,4				neue Charge
INV	F+R	0,45	0,4				neue Charge

10 Probit-Regressions-Analyse

konventionelle *pla*-PCR

DNA-Konzentration [Kopien/Ansatz]	positiv/ Versuche
5,00	5/5
4,00	4/5
2,00	3/5
1,00	4/5
0,80	1/5
0,60	4/5
0,40	1/5
0,20	1/5
0,15	0/5
0,10	0/5

pla-Real Time-PCR

DNA-Konzentration [Kopien/Ansatz]	positiv/ Versuche
5,00	5/5
4,00	5/5
2,00	2/5
1,00	2/5
0,80	3/5
0,60	2/5
0,40	2/5
0,20	2/5
0,15	0/5
0,10	0/5

HLA-Real Time-PCR

DNA-Konzentration [Kopien/Ansatz]	positiv/ Versuche
25,00	5/5
12,50	5/5
10,00	4/5
7,50	4/5
5,00	2/5
2,50	1/5
1,00	2/5
0,75	2/5
0,50	1/5
0,25	0/5

11 *pla*- und *HLA*-Ergebnisse

Ergebnisse der PCRs auf die Genorte *pla* und *HLA* sowie des Inhibitionstests. Angegeben ist in den jeweiligen Ergebnis-Spalten die Anzahl positiver Detektionen zu Gesamtdetektionen. Je ein Extrakt mehr aus Aschheim (A066) und Brandenburg (B1) war versehentlich auf die Anwesenheit des *HLA*-Lokus getestet worden, obwohl sie positiv auf *pla* waren.

A = Aschheim, B = Brandenburg, Ba = Basel, MP = Manching-Pichl; UK = Unterkiefer, OK = Oberkiefer, M = Molar; Extraktionsmethoden: 1 = Protokoll nach (Yang *et al.* 1998) , 2 = Protokoll nach (Rohland & Hofreiter 2007b, 2007a) , 3 = Protokoll nach (Rohland & Hofreiter 2007a; Rohland *et al.* 2010), 4 = QIAamp[®] DNA Investigator Kit

Probe	Extraktionsmethode	Versuch	Eluat	Eluat (interne Nomenklatur)	Material	Individual- alter		<i>pla</i> qPCR	<i>pla</i> konv.	<i>HLA</i> qPCR	<i>HLA</i> - qPCR Inhibition
						biologisch	chronologisch	x/y positiv	x / y positiv	x/y positiv	x/y positiv
B1		1	1	1	Zahn, 16		31-37	1/4	0/3	0/1	1/1
								0/2	0/0	n. n.	n. n.
B2		1	1	1	Zahn, 17		22-24	2/4	0/3	n. n.	n. n.
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				3				0/2	0/0	1/1	n. n.
				4				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				3-2				0/3	0/0	1/1	n. n.
				4-2				0/2	0/0	n. n.	n. n.
				6				0/1	0/1	0/1	1/1
B3		1	1	1	Zahn, 36		18-20	4/4	2/3	n. n.	n. n.
				2				2/2	0/1	n. n.	n. n.
Ba04		1	1	8	Zahn, UK-M			1/1	0/0	n. n.	n. n.
				9				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				16				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				17				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				22				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				23				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				10				0/1	0/0	1/1	n. n.
				11				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				12				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				13				0/1	0/0	n. n.	n. n.
Ba40		1	1	24	Zahn, 45			0/1	0/0	1/1	n. n.
				25				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				26				0/1	0/0	0/1	
				27				0/1	0/0	n. n.	n. n.
Ba27		1	1	1	Zahn, 34			0/4	0/3	1/1	n. n.
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
Ba10		1	1	1	Zahn, 35			0/4	0/3	1/1	n. n.
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
Ba21		1	1	1	Zahn, 45			0/4	0/3	0/1	1/1
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
Ba67		1	1	1	Zahn, 35			0/4	0/3	0/1	1/1
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
A049		1	1	1	Zahn, 44			0/4	0/3	0/1	1/1
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
A056		1	1	1	Zahn, 26			0/4	0/3	0/1	1/1
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.

Fortsetzung *pla*- und *HLA*-Ergebnisse

Probe	Extraktionsmethode	Versuch	Eluat	Eluat (interne Nomenklatur)	Material	Individual- alter		<i>pla</i> qPCR	<i>pla</i> konv.	<i>HLA</i> qPCR	<i>HLA</i> - qPCR Inhibition						
						biologisch	chronologisch	x/y positiv	x /y positiv	x/y positiv	x/y positiv						
A058		1	1	1	1	Zahn, 27			1/1	0/1	n. n.	n. n.					
									2/2	0/1	n. n.	n. n.					
		3	1	1	8				2/3	0/3	n. n.	n. n.					
									0/1	0/0	n. n.	n. n.					
		1	1	1	10				Zahn, UK-M3	0/1	0/1	1/1	n. n.				
										0/1	0/0	n. n.	n. n.				
										1	2	1	14	0/1	0/0	1/1	n.n.
														0/1	0/0	n. n.	n. n.
1	1	1	1	Zahn, 28	0/4	0/3	1/1	n. n.									
					0/1	0/0	n. n.	n. n.									
A060		1	1	1	Zahn, 26			0/4	0/3	0/1	1/1						
								0/1	0/0	n. n.	n. n.						
A066		1	1	1	Zahn, 16			3/5	0/3	0/1	1/1						
								0/1	0/0	n. n.	n. n.						
		3	1	1				8	1/2	0/1	0/1	1/1					
									0/1	0/0	n. n.	n. n.					
A072		1	1	1	Zahn, 48			0/4	0/3	1/1	n. n.						
								0/1	0/0	n. n.	n. n.						
A076		1	1	1	Zahn, 17			4/4	0/3	n. n.	n. n.						
								0/1	0/0	n. n.	n. n.						
		3	1	1				8	1/1	0/1	n. n.	n. n.					
									0/1	0/0	n. n.	n. n.					
		1	1	1	10			Zahn, 27	1/1	0/1	n. n.	n. n.					
									0/1	0/0	n. n.	n. n.					
									1	2	1	14	1/1	0/0	n. n.	n. n.	
													0/1	0/0	n. n.	n. n.	
1	1	1	1	Zahn, 36	2/4	0/3	0/1	1/1									
					0/1	0/0	n. n.	n. n.									
A082		1	1	1	Zahn, 16			1/4	1/3	n. n.	n. n.						
								0/1	0/0	n. n.	n. n.						
		3	1	1				8	0/2	0/1	0/1	1/1					
									0/1	0/0	n. n.	n. n.					
		1	1	1	10			Zahn, UK-M	0/2	0/1	0/1	1/1					
									0/2	0/0	n. n.	n. n.					
									1	2	1	14	0/1	0/0	0/1	1/1	
													0/1	0/0	n. n.	n. n.	

Fortsetzung *pla*- und HLA-Ergebnisse

Probe	Extraktionsmethode	Versuch	Eluat	Eluat (interne Nomenklatur)	Material	Individual- alter		<i>pla</i> qPCR	<i>pla</i> konv.	HLA qPCR	HLA- qPCR Inhibition			
						biologisch	chronologisch	x/y positiv	x /y positiv	x/y positiv	x/y positiv			
A105		1	1	1	1	Zahn, 36			3/4	0/3	n. n.	n. n.		
									0/1	0/0	n. n.	n. n.		
		3	1	1	8				1/2	0/1	n. n.	n. n.		
									0/1	0/0	n. n.	n. n.		
		1	1	1	10				Zahn, OK-M3	1/1	0/1	n. n.	n. n.	
										0/2	0/0	n. n.	n. n.	
		1	2	1	14					1/1	0/0	n. n.	n. n.	
										0/1	0/0	n. n.	n. n.	
			2	15	0/1	0/0	n. n.	n. n.						
A119		1	1	1	1	Zahn, 27				0/4	0/3	1/1	n. n.	
										0/1	0/0	n. n.	n. n.	
A120		1	1	1	1	Zahn, 26			0/0	1/1	n. n.	n. n.		
									3/3	0/1	n. n.	n. n.		
		3	1	1	8				3/3	2/3	n. n.	n. n.		
									1/1	0/0	n. n.	n. n.		
		1	1	1	10				Zahn, 16	1/1	1/1	n. n.	n. n.	
										1/1	0/0	n. n.	n. n.	
		1	2	1	12					1/1	0/0	n. n.	n. n.	
										1/1	0/0	n. n.	n. n.	
					2					13	1/1	0/0	n. n.	n. n.
											1/1	0/0	n. n.	n. n.
		1	3	1	14					1/1	0/0	n. n.	n. n.	
										1/1	0/0	n. n.	n. n.	
			2	15	1/1	0/0	n. n.	n. n.						
					1/1	0/0	n. n.	n. n.						
4	1	1	20	Zahn, 26	0/1	0/0	0/1	1/1						
					0/1	0/0	n. n.	n. n.						
			2		21	0/1	0/0	n. n.	n. n.					
A166		1	1		1	1	Zahn, 27			1/4	0/3	n. n.	n. n.	
										0/2	0/0	n. n.	n. n.	
A167		1	1		1	1	Zahn, 23			0/0	0/1	kein Extrakt		
										0/2	0/2	n. n.	n. n.	
		3	1		1	8				0/4	0/3	0/1	1/1	
										0/1	0/0	n. n.	n. n.	
A197		1	1		1	1	Zahn, 26			0/4	0/3	0/1	1/1	
										0/1	0/0	n. n.	n. n.	
A205		1	1	1	1	Zahn, 16			0/4	0/3	0/1	1/1		
									0/1	0/0	n. n.	n. n.		
A278		1	1	1	1	Zahn, 47			0/4	0/3	1/1	n. n.		
									0/1	0/0	n. n.	n. n.		
A295		1	1	1	1	Zahn, 26			0/4	0/3	0/1	1/1		
									0/1	0/0	n. n.	n. n.		
MP03-I		1	1	1	1	Zahn, 55/65	i l	3a	0/4	0/3	0/1	1/1		
									0/1	0/0	n. n.	n. n.		
MP10-I		1	1	1	1	Zahn, 37	sa		0/4	0/3	1/1	n. n.		
									0/1	0/0	n. n.	n. n.		

Fortsetzung *pla*- und *HLA*-Ergebnisse

Probe	Extraktionsmethode	Versuch	Eluat	Eluat (interne Nomenklatur)	Material	Individual- alter		<i>pla</i> qPCR	<i>pla</i> konv.	<i>HLA</i> qPCR	<i>HLA</i> - qPCR Inhibition
						biologisch	chronologisch	x/y positiv	x/y positiv	x/y positiv	x/y positiv
MP17-I		1	1	1	Zahn, 36	i ll	11a	4/4	3/3	n. n.	n. n.
				2				1/1	1/1	n. n.	n. n.
				3				2/2	0/0	n. n.	n. n.
				4				2/2	0/0	n. n.	n. n.
				5				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				3+4				1/1	1/1	n. n.	n. n.
				3-2				1/2	1/1	n. n.	n. n.
				4-2				2/2	0/0	n. n.	n. n.
				6				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				7				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				20				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				21				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				22				1/1	0/0	n. n.	n. n.
23	1/1	0/0	n. n.	n. n.							
MP19-II		1	1	1	Zahn, 75	i l	6a	4/4	3/3	n. n.	n. n.
				2				1/1	1/2	n. n.	n. n.
				8				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				9				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				10				0/1	0/0	0/1	1/1
				11				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				12				0/1	0/0	1/1	n. n.
13	0/1	0/0	n. n.	n. n.							
MP22		1	1	1	Zahn, 26	fa	20- 22a	0/4	0/3	1/1	n. n.
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
MP26-I		1	1	1	Zahn, 26	fa? SA		0/4	0/3	1/1	n. n.
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				3				0/2	0/0		
				4				0/1	0/0	n. n.	n. n.
				6				0/2	0/0	0/1	1/1
				7				0/2	0/0	n. n.	n. n.
				MP34-I					1	1	1
2	0/1	0/0	n. n.		n. n.						
MP54-VI		1	1	1	Zahn, 46			0/4	0/3	0/1	1/1
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.
MP56-II		1	1	1	Zahn, 37			0/4	0/3	1/1	n. n.
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.

Fortsetzung *pla*- und *HLA*-Ergebnisse

Probe	Extraktionsmethode	Versuch	Eluat	Eluat (interne Nomenklatur)	Material	Individual- alter		<i>pla</i> qPCR	<i>pla</i> konv.	<i>HLA</i> qPCR	<i>HLA</i> - qPCR Inhibition				
						biologisch	chronologisch	x/y positiv	x /y positiv	x/y positiv	x/y positiv				
MP59-I		1	1	1	Zahn, 16	fm		4/4	3/3	n. n.	n. n.				
								1/1	0/1	n. n.	n. n.				
								2	1	1	3	0/1	0/0	0/1	1/1
										2	4	0/1	0/0	n. n.	n. n.
								3	1	1	6	1/1	1/1	n. n.	n. n.
										2	7	1/1	0/0	n. n.	n. n.
								1	2	1	16	1/1	0/0	n. n.	n. n.
										2	17	1/1	0/0	n. n.	n. n.
								1	3	1	18	1/1	0/0	n. n.	n. n.
										2	19	1/1	0/0	n. n.	n. n.
								4	1	1	20	1/1	0/0	n. n.	n. n.
										2	21	0/1	0/0	n. n.	n. n.
MP73-I		1	1	1	Zahn, 18	fa	20- 25a	0/4	0/3	1/1	n. n.				
								0/1	0/0	n. n.	n. n.				
MPS01-I		1	1	1	Zahn, 36	i ll	8a	1/1	0/1	n. n.	n. n.				
								0/2	1/2	n. n.	n. n.				
								2	1	1	3	2/2	0/0	n. n.	n. n.
										2	4	1/2	0/0	n. n.	n. n.
										3	5	0/1	0/0	n. n.	n. n.
										1+2	3+4	0/1	0/0	1/1	n. n.
								2	2	1	3-2	1/2	0/1	n. n.	n. n.
										2	4-2	0/2	0/0	n. n.	n. n.
								3	1	1	6	1/1	0/1	n. n.	n. n.
										2	7	0/1	0/0	n. n.	n. n.
								1	1	1	8	4/4	1/3	n. n.	n. n.
										2	9	0/1	0/0	n. n.	n. n.
								1	1	1	10	Zahn, UK- M (Milch- gebiss)			1/1
		2	11	0/1	0/0	n. n.	n. n.								
1	2	1	12	1/1	0/0	n. n.	n. n.								
		2	13	0/1	0/0	n. n.	n. n.								
MPS03-IIX		1	1	1	Zahn, 16	i ll	12- 14a	0/4	0/3	0/1	1/1				
								0/1	0/0	n. n.	n. n.				
MPS04-VI		1	1	1	Zahn, Inc.	i ll	10a	0/4	0/3	0/1	1/1				
								0/1	0/0	n. n.	n. n.				
MPS08- XXXI		1	1	1	Zahn, 16	j	15a	0/4	0/3	1/1	n. n.				
								0/1	0/1	n. n.	n. n.				
MPS09-II		1	1	1	Zahn, 33	fa		0/4	0/3	1/1	n. n.				
								0/1	0/0	n. n.	n. n.				
MPS09-VI		1	1	1	Zahn, 46	i l	6a	0/4	0/3	1/1	n. n.				
								0/1	0/0	n. n.	n. n.				
MPS12-I		1	1	1	Zahn, 16	j	15a	0/4	0/3	0/1	1/1				
								0/1	0/0	n. n.	n. n.				

Fortsetzung *pla*- und *HLA*-Ergebnisse

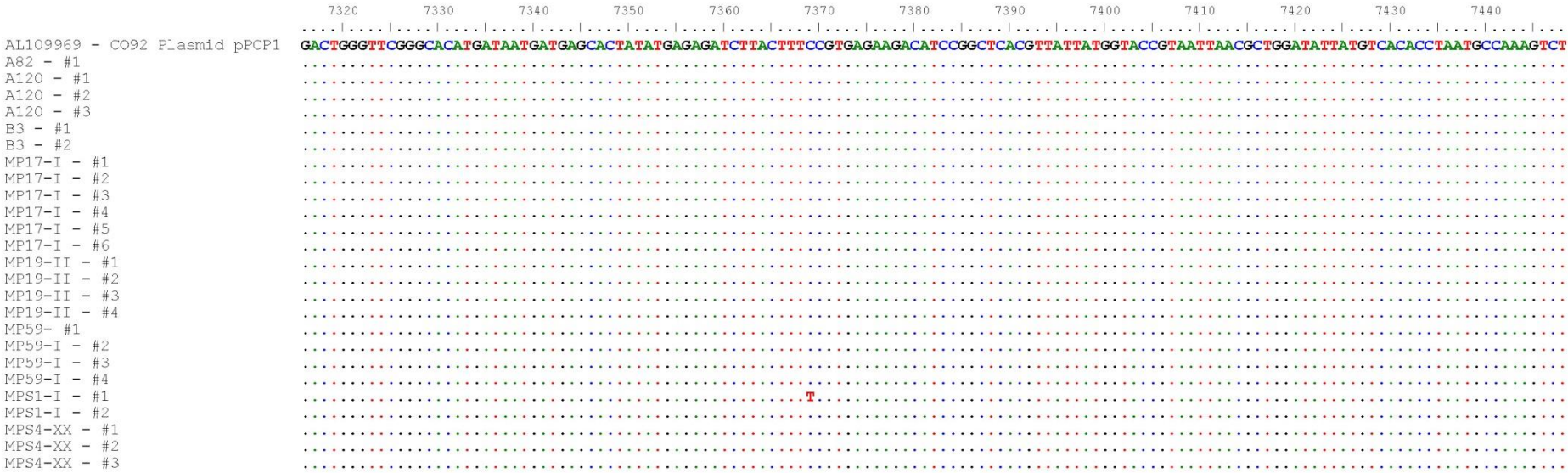
Probe	Extraktionsmethode	Versuch	Eluat	Eluat (interne Nomenklatur)	Material	Individual- alter		<i>pla</i> qPCR	<i>pla</i> konv.	<i>HLA</i> qPCR	<i>HLA</i> - qPCR Inhibition	
						biologisch	chronologisch	x/y positiv	x / y positiv	x/y positiv	x/y positiv	
MPS15-V		1	1	1	Zahn, 26	i l	6a	0/4	0/3	0/1	1/1	
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.	
MPS15-VII		1	1	1	Zahn, Can.	il	6a	0/4	0/3	0/1	1/1	
				2				0/1	0/0	n. n.	n. n.	
MPS4-XX		3	1	1	Ingr.	Zahn, ? Zahn, Präm.	j	15a	4/4	4/4	n. n.	n. n.
		1	1	1	10				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				2	11				1/1	0/0	n. n.	n. n.
		1	2	1	24				1/1	0/0	n. n.	n. n.
				2	25				1/1	0/0	n. n.	n. n.
E1		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E2		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E3		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E4		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E5		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E6		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
E7		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E8		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E9		2	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E10		2	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E11		3	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E12		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E13		1	1	1				0/4	0/3	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E14		1	1	1				0/4	0/0	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E15		1	1	1				0/2	0/0	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E16		1	1	1				0/2	0/0	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E17		1	1	1				0/2	0/0	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			
E18		1	1	1				0/1	0/0	0/1	1/1	
				2	2	0/1	0/0	n. n.	n. n.			

12 IUB Nucleotide Codes

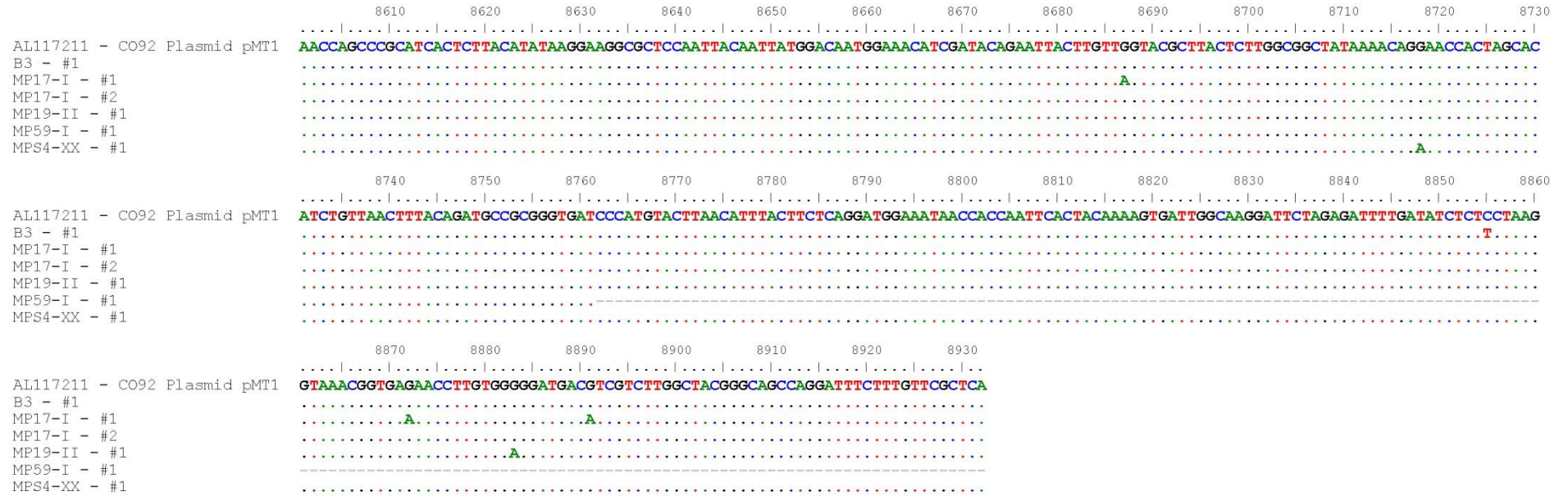
Code	Definition	Mnemonic
A	Adenosin	A
C	Cytosin	C
G	Guanin	G
T	Thymin	T
R	AG	puRin
Y	CT	pYrimidin
K	GT	Keto
M	AC	aMino
S	GC	Strong
W	AT	Weak
B	CGT	Not A
D	AGT	Not C
H	ACT	Not G
V	ACG	Not T
N	AGCT	aNy

13 Sequenzen je Genort

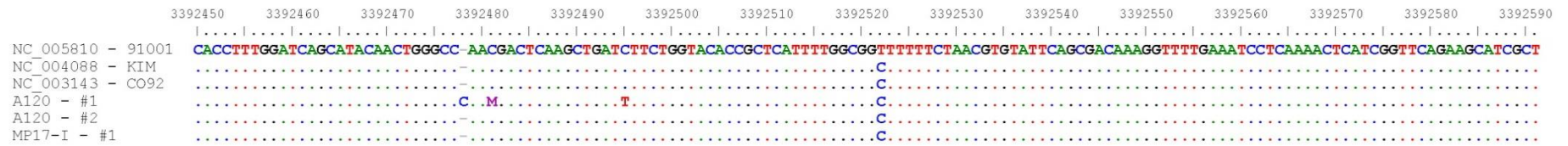
pla



caf1



napA



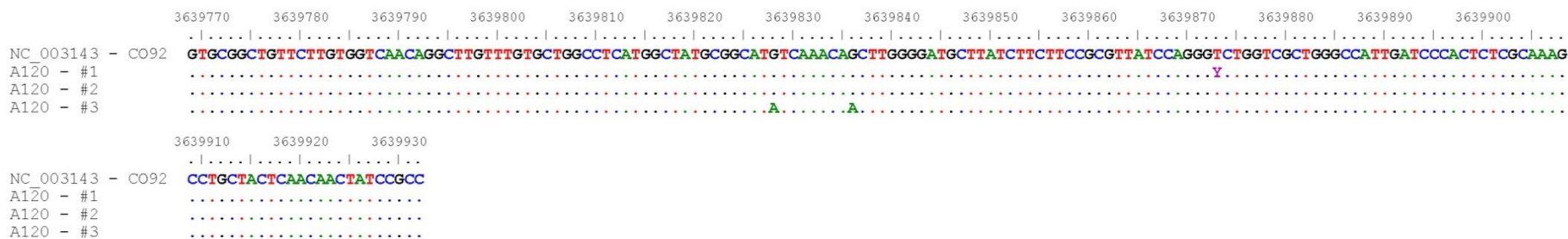
s13

	2453410	2453420	2453430	2453440	2453450	2453460	2453470	2453480	2453490	2453500	2453510	2453520	2453530
NC_003143 - CO92	G T C T G C C A A T G G A T A T T T C T G G C C T G T T G C G T C A T C A G T A A C C A C A G C A A A C G G G G T G A C T T C T G A A C C G G T A C C T G A T G T G G T T G T A A T A G C G A C C A A T T T C G C T T T T A C A C C C A T T T T C G												
B3 - #1G.....												
B3 - #2G.....												
B3 - #3G.....												
MP17-I - #1G.....												
MP17-I - #2G.....												
MP19-II - #1G.....												
MP19-II - #2G.....												
MP19-II - #3G.....												
MPS4-XX - #1G.....R.....												
MPS4-XX - #2G.....												

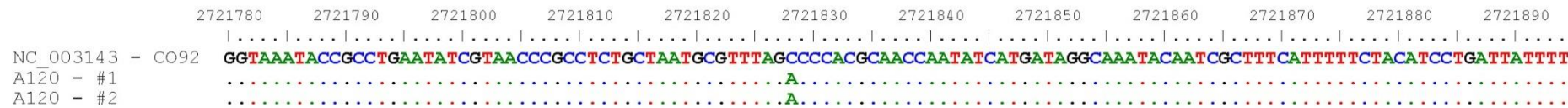
s14

	2934910	2934920	2934930	2934940	2934950	2934960	2934970	2934980	2934990	2935000	2935010	2935020
NC_003143 - CO92	C A T T A A C A G C A A T C C C A T T A A C C G T A A T G T T C C C T T C T T G G A T A G G T T C T A A T C C A T T C A C C A C T T T A A T T A A C G T T G A T T T G C C T G A G C C T G A A G G A C C C A A A C G A C G A C T A C C T C A C C											
B3 - #1G.....											
MP17-I - #1G.....											
MP17-I - #2G.....											
MP17-I - #3S.....W.....											
MP19-II - #1G.....											
MP19-II - #2G.....											
MP59-I - #1G.....											
MP59-I - #2G.....											
MPS4-XX - #1G.....											
MPS4-XX - #2G.....											
MPS4-XX - #3G.....											

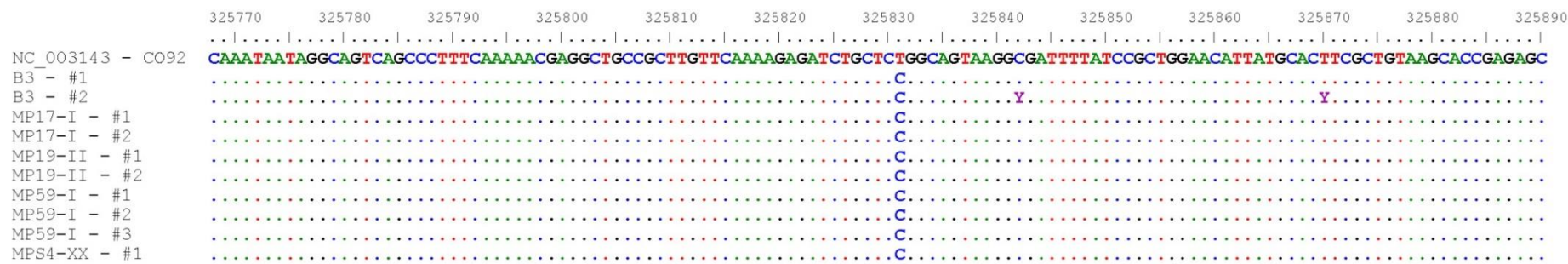
s82



s87



s247



s463

```
373610 373620 373630 373640 373650 373660 373670 373680 373690 373700 373710 373720 373730
NC_003143 - CO92 GGC GCG ATCAAAGGCAATACGCCGCCGCTGGATCAGCATCCAAATGGCGGATAATATGATAGACCCTAACAGGAAGAACAGATAGCGACCGAGGCTCCAGACGTGCCAACAGCGCTTGTGAGGTGGTGAG
A58 - #1 .....G..G...A..T.A.....GC.....G..A....C.....G..A.....T...A...C....G.....
A120 - #1 .....G..G...A..T.A.....GC.....G..A....C.....G..A.....T...A...C....G.....
A120 - #2 .....G..G...A..T.A.....GC.....G..A....C.....G..A.....T...A...C....G.....
A120 - #3 .....G..G...A..T.A.....GC.....G..A....C.....G..A.....T...A...C....G.....
```

s588

```
1512870 1512880 1512890 1512900 1512910 1512920 1512930 1512940 1512950 1512960 1512970 1512980
NC_03143 - CO92 GTCGGTGAATAAGCTCACGAAGCGCCATCACAATTATGAAATCGTCTTCTACTTTTGTATTATCAGCAGCTGATCTCTATCCCCTGATGTGGCATAACTTTGTTTGGCCGAGTGGGTATC
B3 - #1 .....G.....
B3 - #2 .....G.....
MP17-I - #1 .....G.....
MP17-I - #2 .....G.....
MP19-II - #1 .....G.....
MP59-I - #1 .....G.....
MP59-I - #2 .....A.....
MP59-I - #3 .....G.....
MPS1-I - #1 .....G.....
MPS4-XX - #1 .....G.....
MPS4-XX - #2 .....G.....
```

s660

	2098570	2098580	2098590	2098600	2098610	2098620	2098630	2098640	2098650	2098660	2098670	2098680
NC_003143	GTTGTGCTGCACCTTTGATGCGGTCTCGTGTGCTTCATCAAGCTTTACGCCCATTTGGTATTTCGCCATGTCGCTCGTCTCCTTTGATAAGGGGAATTATGATTTTATTTCTGAC											
B3 - #1C.....											
MP17-I - #1C.....											
MP17-I - #2C.....											
MP17-I - #3C.....											
MP19-II - #1C.....											
MP19-II - #2C.....											
MP19-II - #3C.....											
MP59-I - #1C.....											
MP59-I - #2C.....											
MPS4-XX - #1C.....											
MPS4-XX - #2C.....											
MPS4-XX - #3C.....											

s826

	3267060	3267070	3267080	3267090	3267100	3267110	3267120	3267130	3267140	3267150	3267160	3267170
NC_003143 - C092	GCACTCAGTGGGGCGCTGACATCAGCAAAGTGAACATATTCGGCGTAGATATCACTCACCAGCAGGTGAGCATCCGCAACGGGACAACAGTTTGGTGATACGAAAAGCCGACAAAGCGA											
B3 - #1G.....R.....											
MP17-I - #1G.....											
MP17-I - #2G.....											
MP17-I - #3G.....											
MP19-II - #1G.....											
MP19-II - #2G.....											
MP19-II - #3G.....											
MP59-I - #1G.....											
MP59-I - #2G.....											
MPS4-XX - #1G.....											
MPS4-XX - #2G.....											
MPS4-XX - #3G.....											
MPS4-XX - #4G.....											

s955

```
4243770 4243780 4243790 4243800 4243810 4243820 4243830 4243840 4243850 4243860 4243870 4243880
NC_003143 - C092 GCCTTTTCTTTTCGGTGACATTTCTCAAACCGAATGAAATGGTAATACAGTCAAAAAAATTATCAGGAAAGGTAAAGCTTCAGCATTGGCCTGTACATAGCTGACATTACCTACAATACC
B3 - #1
B3 - #2
MP17-I - #1
MP17-I - #2
MP17-I - #3
MP19-II - #1
MP19-II - #2
MP59-I - #1
MP59-I - #2
MPS4-XX - #1
MPS4-XX - #2
```

s1023

```
442390 442400 442410 442420 442430 442440 442450 442460 442470 442480 442490 442500
NC_003143 - C092 TTGACGAACCCACTTTTCGGCTTTTCTCTCCATTGATTTTCTGCTTTCTTTTCATTGATAGGTAATCCCCTGAAAAGTCGGTGTGCCATAAGTCTAATTTTCTCGTAATCTGAACC
B3 - #1
MP17-I - #1
MP17-I - #2
MP17-I - #3
MP19-II - #1
MP19-II - #2
MP19-II - #3
MP59-I - #1
MPS4-XX - #1
MPS4-XX - #2
MPS4-XX - #3
```

s1038

	545430	545440	545450	545460	545470	545480	545490	545500	545510	545520	545530	545540	545550
NC_003143 - CO92	GCCTCATGACTTCCAAC TGGTAAAGTGCATATCAATGAAGTCGCCTCGACCATGACC GATCCTTAAT-ATCTGGAACAATTTTATCCCGGTTTGCCACCGCAAATTGATCGTCGC TATTTCCAATG												
B3 - #1												
MP17-I - #1												
MP17-I - #2W.....C..G.....K.....												
MP17-I - #3												
MP19-II - #1												
MP19-II - #2												
MP19-II - #3												
MP59-I - #1T...YWM..G.....												
MP59-I - #2C..K.....												
MPS4-XX - #1K..S.M.....C..												

s1119

	1871410	1871420	1871430	1871440	1871450	1871460	1871470	1871480	1871490	1871500	1871510	1871520	1871530
NC_003143 - CO92	TTAATTAATGTTTTTTCATAAGGAGGAGGCGCTCTTCAGTTCGCTGCTGAAGGTGTGAAATAAGTTGAAAAGTTACATGACATGCTCGTTATAAGATAATTCTCGCACAAATGTTTATTAGTTATGAAT												
B3 - #1												
B3 - #2												
MP17-I - #1												
MP17-I - #2												
MP17-I - #3												
MP19-II - #1												
MP19-II - #2												
MP19-II - #3												
MP59-I - #1												
MP59-I - #2												
MPS4-XX - #1												
MPS4-XX - #2												
MPS4-XX - #3												

s1195

```

2896580 2896590 2896600 2896610 2896620 2896630 2896640 2896650 2896660 2896670 2896680 2896690 2896700 2896710 2896720
CP001680 - Harbin35 TATTGGATATTGTGATCAATAATGGGTTTTTATGTTAACCAAGCTGCATGACTGGCGATGACTGAGGTATTAGATGATTGAGGTATTAGATGATTGAGGTATTAGATGATTGAGGTATTAGATGACTGAGGTATT
NC_003143 - CO92 .....T.....
B3 - #1 .....R.....R.....R.....
MP17-I - #1 .....
MP17-I - #2 .....
MP17-I - #3 .....
MP19-II - #1 .....
MP19-II - #2 .....
MP59-I - #1 .....
MPS4-XX - #1 .....

2896730 2896740
CP001680 - Harbin35 AAAGGCCGTTATCGTCTCCATTCT
NC_003143 - CO92 .....
B3 - #1 .....
MP17-I - #1 .....
MP17-I - #2 .....
MP17-I - #3 .....
MP19-II - #1 .....
MP19-II - #2 .....
MP59-I - #1 .....
MPS4-XX - #1 .....

```

pPCP1

```

8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590
AF053945 - KIM ACCCCCACTAACAAATATAACCTACGAGTTATATTTTCAAGAAAAGCTGGCTATTTAACATAACGGCAATTTGTACGCACCCTGAAATGCGTTCAGCGCATCACGGCAACAGACAGGCAAAAATAGCAACAAACC
AL109969 - CO92 Plasmid pPCP1 .....TT.....
B3 - #1 .....R.....
MP17-I - #1 .....
MP17-I - #2 .....
MP17-I - #3 .....
MP19-II - #1 .....
MP19-II - #2 .....
MP19-II - #3 .....
MP59-I - #1 .....
MP59-I - #2 .....
MP59-I - #3 .....M.....
MPS1-I - #1 .....
MPS1-I - #2 .....
MPS4-XX - #1 .....
MPS4-XX - #2 .....
MPS4-XX - #3 .....

```

14 Basenabweichungen

Lokus	Individuum	Eluat	#	Abweichung: Position Soll → Position Ist
napA	A120	1	#1	3392477-3392478: zusätzliches C 3392481: C → M 3392495: C → T
pla	MPS1-I	2	#1	7369: C → T
pPCP1	B3	1	#1	8552: G → R
	MP59-I	1	#3	8480: C → M
caf	MP17-I	1+2	#1	86142: G → A 86327: G → A 86346: G → A
	B3	1	#1	86310: C → T
	MP19-II	1	#1	489: G → A
	MPS4-XX	1	#1	86173: G → A
s13	MPS4-XX	1	#1	2453500: G → R
s14:	MP17-I	3	#3	2934972: C → S 2934978: T → W
s82:	A120	1	#1	3639873: T → Y in Fwd-Sequenz
	A120	1	#3	3639828: G → A 3639836: G → A
s247:	B3	1	#2	325847: C → Y 325875: T → Y
s463:	A58	2	#1	373627: C → G 373630: C → G 373636: G → A 373639: C → T 373641: G → A 373648: A → G 373663: A → G 373660: G → A 373672: T → C 373690: A → G 373693: G → A 373702: C → T 373707: G → A 373711: T → C 373716: G → A
	A120	1	#3	373688: A → W 373699: G → R 373715: A → C
s588:	MP59-I	1	#2	1512889: G → A
s826:	B3	1	#1	3267140: G → R
s904:	MP59-I	1	#2	3806697: T → W
s920:	MPS4-XX	1	#1	3973756: G → R
s1038:	B3	1	#1	545513: G → R
	MPS4-XX	1	#1	545467: G → K 545471: C → S 545473: A → M
s1195:	B3	1	#1	3176524: G → R 3176531: G → R 3176586: G → R
	MP59-I	1	#1	3176602: G → V (nur Rev-Sequenz)

gibt an, um welche von mehreren Sequenzen es sich handelt; siehe Anhang 13

IX Danksagung

Mein Dank geht an Professor Dr. Gisela Grupe, dass ich dieses Thema in ihrer Arbeitsgruppe bearbeiten durfte und für die Bereitstellung von Proben in ihrer Funktion als Direktorin der Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie (SAPM).

Vielen Dank an Prof. Dr. Wolfgang Enard von der Ludwigs-Maximilians-Universität, der sich freundlicherweise spontan bereit erklärt hat, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Für Gutachten für ein Stipendium danke ich Prof. Grupe und Prof. Dr. Dr. Joris Peters von der SAPM sowie Dipl.-Biol. Andrea Grigat, damals Koordinatorin des Doktorandenprogramms des ArchaeoBioCenters. Danke an Dr. Michaela Harbeck, Konservatorin an der SAPM in München, für das Formulieren des Antrags auf ebendieses Stipendium und damit des Themas des Dissertationsprojekts. Letztlich ist mir durch ihrer aller Einsatz ein Stipendium des Freistaats Bayern nach dem Bayerischen Eliteförderungsgesetz (BayEFG) gewährt worden. Michaela Harbeck danke ich weiterhin für die Betreuung und zusammen mit Dr. Ingrid Wiechmann für die Erarbeitung einer Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (IMB). Danke auch an B. Sc. Sara Fischersworing, deren Ergebnisse aus ihrer Bachelorarbeit über das F1-Antigen in diese Arbeit einfließen und Sandy Reh von der SAPM für ihre Hilfe bei den Versuchen zur F1-Antigen-Detektion.

Danke an Dipl. phil. Cornelia Alder, ehemals Archäologische Bodenforschung des Kantons Basel-Stadt, und Dr. Bettina Jungklaus aus Berlin, die die Proben aus Basel und Brandenburg zur Verfügung gestellt haben. Bettina Jungklaus hat mir zudem dankenswerterweise ebenso wie Dr. Doris Gutmiedl-Schümann Fotomaterial bereitgestellt.

Danke an meine Mit-Doktoranden, darunter Dipl.-Biol. Nadja Hoke und besonders Dr. Ferdinand Neuberger für Tipps und die Beantwortung meiner formalen Fragen zur Abgabe der Dissertation.

Vielen Dank an Dr. Christian Schiller für diverse logistische und technische Hilfestellungen.

Vom IMB möchte ich drei Personen danken, die mich auf meinem Weg nicht nur begleitet, sondern auch unterstützt haben: PD Dr. Holger Scholz, Dr. Julia Riehm und Astrid Thomas. Holger Scholz war nicht nur der Chef am anderen Institut, sondern auch ein wertvoller Ratgeber. Julia Riehm hat auf Bundeswehrseite meine Betreuung übernommen, angefangen beim Durchlaufen der bürokratischen Strukturen und langen Wege des Militärs über die Konzeption von Experimenten bis hin zu ihrem offenen Ohr. Mein allergrößter Dank geht an diejenige, mit der ich die meiste Arbeitszeit Seite an Seite im Labor verbracht habe. Astrid Thomas, Technische Angestellte, hat mich von Anfang an unter ihre Fittiche genommen, mir den Ablauf im Institut und die für mich neue Technik der qPCR gezeigt, Ursachen für auftretende Probleme aufgrund ihrer langjährigen Erfahrung mit einem Blick erkannt, mich gelobt und motiviert. Vor allem aber hat sie sich mit mir über unsere Ergebnisse gefreut.

Nach der Pflicht zur Kür: Ohne den Rückhalt in meinem privaten Umfeld hätte ich die Doktorarbeit nicht in der Art vollenden können. Vielen Dank an meine engen Freunde Antonia Albrecht, Dipl.-Biol. Caroline Lang, Dipl. phys. oec. Leonhard Albrecht, Sandra Deffner, Dipl. chem. Karoline Wissmann fürs Zuhören, Mitfreuen, Mitschimpfen, fürs Dasein. Danke an Dr. Tobias Albrecht für seinen medizinischen Rat zum Verständnis körpereigener Abläufe. Danke an Corinna Albrecht, Klaus Huber und Prof. Dr. Dieter Seifert, dass ihr mir eure PCs für ein Programm geliehen bzw. mir noch einen zusätzlichen Computer organisiert habt. Danke an meinen Bruder Max Seifert für das fixe Lösen meiner Computer-, insbesondere Dateikonvertierungsprobleme. Vielen Dank an meine Lektoren Antonia Albrecht sowie Elfi und Dieter Seifert, die auch dann noch funktionierten, als die Rechtschreibfunktion meines Computers aufgrund zu vieler Fremdworte längst aufgegeben hatte.

Danke an Mama und Papa, dass ihr mich auch nach Volontariat und Studium noch während meiner Dissertation ideell wie finanziell unterstützt und stets Rückhalt geboten habt. Ich hatte in meiner Danksagung der Diplomarbeit vergessen, die Care-Pakete zu erwähnen – rückwirkend auch hierfür Danke für die kulinarische Verpflegung ;-).

Danke an meinen Freund Klaus, dass du mir mit Rat und breitem Kreuz beigestanden hast und vor allem danke für dein Verständnis, viele Dinge auf später zu verschieben. Später fängt jetzt an.

X Erklärung

Diese Dissertation wurde von Professor Dr. Gisela Grupe betreut.

Ich erkläre hiermit, dass die Dissertation weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich weder anderweitig eine Dissertation erfolglos eingereicht, noch mich einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Lisa Seifert

München, 9. Oktober 2013

XI Lebenslauf

Name: Lisa Seifert
 Geburtsdatum: 22.08.1982
 Geburtsort: München
 Familienstand: ledig
 Kontakt: lisaseifert@gmx.de

Akademische Ausbildung:

2005-2010: Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
 2010 Diplom in Biologie (Gesamtnote: 1,3)

- Anthropologie und Humangenetik (Hauptfach)
- Infektionsbiologie (Nebenfach)
- Zellbiologie (Nebenfach)
- Diplomarbeit: „Molekulargenetische Applikationen in der Paläoepidemiologie am Beispiel Tuberkulose“ (Note: 1,0)

 2011-2013 Promotion zum Dr. rer. nat., Ludwig-Maximilians-Universität, München, in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

Berufliche Ausbildung und Arbeitserfahrung:

06/2005 – 10/2005: **Redakteurin** in der Lokalredaktion Landau der Passauer Neue Presse
 05/2003 – 04/2005: **Volontariat** bei der Passauer Neue Presse

Stipendium:

seit 05/2012 Promotionsstipendium nach dem Bayerischen Eliteförderungsgesetz (BayEFG)

Auszeichnung:

2012 Rudolf-Virchow-Förderpreis für herausragende Master- und Diplomarbeiten der Berliner Gesellschaft für Anthropologie, Ethnologie und Urgeschichte

Mitgliedschaften:

seit 2010 Mitglied der Gesellschaft für Anthropologie (GfA)
 seit 2011 Doktorand im strukturierten Doktorandenprogramm des ArchaeoBioCenters

Publikationen:

Beiträge

Seifert L, Harbeck M, Thomas A, Hoke N, Zöller L et al. (2013) Strategy for sensitive and specific detection of *Yersinia pestis* in skeletons of the Black Death pandemic. PLoS ONE 8 (9): e75742.
 Harbeck M, **Seifert L**, Hänsch S, Wagner DM, Birdsell D et al. (2013) *Yersinia pestis* DNA from Skeletal Remains from the 6th Century AD Reveals Insights into Justinianic Plague. PLoS Pathog 9 (5): e1003349.
Seifert L (2012) Molekulargenetische Applikationen in der Paläoepidemiologie am Beispiel Tuberkulose. In: Mitteilungen der Berliner Gesellschaft für Anthropologie, Ethnologie und Urgeschichte. Band 33. Berlin: Verlag Marie Leidorf. S. 115-124.
Seifert L (2012) Molekulargenetische Untersuchungen an einem Pott'schen Gibbus aus der barocken Gruft in der Josephskapelle, Hall in Tirol. In: Zanesco A, Hrsg. Neues zur Geschichte der Stadt. Hall in Tirol: Ablinger & Garber. S. 108–110.

Vorträge

- Seifert L**, Riehm J, Hänsch S, Wiechmann I, Grupe G et al. (2013) The murder is out: *Yersinia pestis* caused the Plague of Justinian. Vortrag. 10th international meeting of the German Society for Anthropology (GfA), Bozen, september 2nd-6th 2013
- Seifert L** (2013) Die Pest aus dem Zahn: Nachweis von *Yersinia pestis* in historischem Skelettmaterial seit dem 6. Jahrhundert. Vortrag. Institutsseminar des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, 13.6.2013.
- Seifert L**, Riehm J, Hänsch S, Wiechmann I, Grupe G. *et al.* (2013) Das Rätsel der Justinianischen Pest: Nachweisversuch von *Yersinia pestis* in Individuen aus Aschheim. Vortrag. DGUF-Jahrestagung, Archäologie und Paläogenetik, Erlangen, 9.-12. Mai.
- Seifert L** (2012) Besonderheiten der Arbeit mit aDNA am Beispiel meiner Dissertation. Vortrag. Vorstellung des Promotions-Projekts beim Institutsseminar des Kooperationspartners, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München.
- Seifert L** (2012) Molekulargenetische Applikationen in der Paläoepidemiologie am Beispiel Tuberkulose. Vortrag. Verleihung des Rudolf-Virchow-Förderpreises.
- Seifert L**, Wiechmann I, Hotz G, Grupe G, Harbeck M (2011) Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in skeletal remains. Vortrag. Workshop der Arbeitsgruppe Palaeoanthropologie und Prähistorische Anthropologie (APPA) und des Rachel Carsson Center (RCC), Munich, March 4.-5th.

Poster

- Seifert L**, Wiechmann I, Grupe G, Hotz G, Harbeck M (2010) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in skeletal remains. 18th European Meeting of the Paleopathology Association, Wien, August 23rd – 26th.

Sonstiges:

- 2009 und 2011: Mitarbeit an einer archäologischen Ausgrabung in Kufstein und Hall in Tirol
- 2009 und 2011: Praktikumsbetreuung, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 2011: Mitwirkung an der Neugestaltung der Homepage der Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie München

München, 9. Oktober 2013