

Ist eine Revision der Aminosäurendatierung möglich?

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

Vorgelegt von

Reimer C. Dobberstein

Kiel 2005

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden
vom Juni 2001 bis Mai 2004 am Institut für Rechtsmedizin,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. W. Wünnenberg

Korreferent/in.....

Tag der mündlichen Prüfung

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Matthies, Christiane und Annemarie

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	IV
	Tabellenverzeichnis	V
	Abkürzungen.....	VI
1	Zusammenfassung (deutsch).....	1
	Summary (english)	2
2	Einleitung	3
2.1	Chiralität.....	3
2.1.1	Chemie.....	4
2.1.2	Nomenklatur	5
2.1.3	Chiralität – Grundprinzip des Lebens	7
2.1.4	Vorkommen von d-AS in Lebewesen	8
2.1.4.1	Prokaryota	8
2.1.4.2	Eukaryota	8
2.1.4.3	<i>Homo sapiens sapiens</i>	9
2.2	Razemisierung von Aminosäuren in humanen Proteinen als „biologische Uhr“ zur Detektion einer intravitalen und postmortalen Proteinalterung.....	10
2.2.1	Erfassung einer intravitalen Proteinalterung und die Nutzbarkeit zur Lebensalterschätzung.....	12
2.2.2	Erfassung der postmortalen Razemisierung – Nutzbarkeit zur Datierung von Skelettfunden (Aminosäuredatierung)	13
2.3	Datierung von Skelettfunden	14
2.3.1	Fragestellung, Bedeutung	14
2.3.2	Methoden	14
2.3.2.1	Physikalische Datierung	14
2.3.2.2	Chemische Datierung	16
2.3.2.3	Sonstige Datierungen	17
2.3.3	Analytische Methoden	17
2.3.4	Degradation von Knochen während der Liegezeit	17
2.3.4.1	Kollagen, Zielprotein der chemischen Datierungsverfahren	17
2.4	Verfahren zur Datierung von Skelettfunden.....	20
2.4.1	Aminosäuredatierung: Grundlagen und Prinzip	20
2.4.2	Aminosäuredatierung: Die Kritik	21
2.4.3	Aminosäuredatierung: Lösungsansätze	21
2.5	Zielsetzung	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Art und Herkunft des Untersuchungsmaterials.....	25
3.1.1	Experimentell gealterte Knochen	25
3.1.2	Historische / archäologische Funde	26

3.2	Präparation	27
3.2.1	Präparation des Gewebes	27
3.2.2	Waschschritte	28
3.2.3	Präparation der Kollagen- und Nichtkollagenfraktion	29
3.2.4	CNBr-Spaltung.....	30
3.2.5	Elektrophoretische Präparation	32
3.2.5.1	Qualitative Gelelektrophorese	33
3.2.5.2	Präparative Gelelektrophorese.....	34
3.2.6	Elektroelution	34
3.2.7	Gruppentrennung durch einfache Gelfiltration	35
3.3	Gas- und hochdruckflüssigkeitschromatographische Analytik	37
3.3.1	Gaschromatographie	37
3.3.1.1	Hydrolyse und Derivatisierung	37
3.3.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	40
3.4	Aminosäurenprofile	44
3.5	Radiokarbon-Datierungen mittels AMS	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Ergebnisse systematischer Untersuchungen zu Möglichkeiten der Präparation definierter Knochenproteinfraktionen	47
4.1.1	Präparation von säureunlöslicher, nicht-kollagener (NCF) und säurelöslichen kollagener (CF) Knochenproteinfraktionen.....	47
4.1.2	Cyanbromid(CNBr)-Fragmente des Kollagens.....	49
4.1.2.1	Trennung und weitere Präparation der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente mittels Elektroelution	49
4.1.2.2	Gruppentrennung der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente über das Molekulargewicht (PD-10-Säulen)	52
4.2	Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus experimentell degradierten Knochenproben (Hitzeexperimente) präparierten Proteinfraktionen	53
4.2.1	AAR in Überstand (LE), kollagener Fraktion (CF), nicht-kollagener Fraktion (NCF) und Gesamtknochen (TB).....	53
4.2.2	AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroelutierten CNBr- Fragmenten	55
4.2.3	AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppentrennung nach Molekulargewicht)	57
4.3	Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus natürlich degradierten Knochen präparierten Proteinfraktionen, Zusammenhang zwischen dem Alter sicher datierter Knochenfunde und der AAR in den präparierten Proteinfraktionen	61
4.3.1	Gesamtknochenproben (TB) sowie „nicht-kollagene“, säurelösliche (NCF) und „kollagene“, säureunlösliche (CF) Knochenproteinfraktion	61
4.3.2	AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroelutierten CNBr- Fragmenten	66
4.3.3	AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppentrennung nach Molekulargewicht)	67
4.3.4	Korrektur der Beziehung zwischen AAR und Liegezeit über die Berechnung des „thermalen Alters“	69

5	Diskussion	73
5.1	Ergebnisse systematischer Untersuchungen zu Möglichkeiten der Präparation definierter Knochenproteinfraktionen	75
5.1.1	Präparation von säurelöslicher, „nicht-kollagener“ (NCF) und säureunlöslicher, kollagener (CF) Knochenproteinfraktion	75
5.1.2	Cyanbromid(CNBr)-Fragmente des Kollagens.....	76
5.1.2.1	Trennung und weitere Präparation der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente mittels Elektroelution	76
5.1.2.2.	Gruppentrennung der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente über das Molekulargewicht (PD-10-Säulen)	78
5.2.	Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus experimentell degradierten Knochenproben (Hitzeexperimente) präparierten Proteinfraktionen	78
5.2.1	AAR in Überstand (LE), kollagener Fraktion (CF), nicht-kollagener Fraktion (NCF) und Gesamtknochen (TB).....	79
5.2.2	AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroelutierten CNBr-Fragmenten	81
5.2.3	AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppentrennung nach Molekulargewicht)	82
5.3	Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus natürlich degradierten Knochen präparierten Proteinfraktionen, Zusammenhang zwischen dem Alter sicher datierter Knochenfunde und der AAR in den präparierten Proteinfraktionen	82
5.3.1	Gesamtknochenproben (TB) sowie „nicht-kollagene“, säurelösliche (NCF) und „kollagene“, säureunlösliche (CF) Knochenproteinfraktion	82
5.3.2	AAR in Cyanbromid-Fragmenten des Kollagens.....	84
5.3.2.1	AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroelutierten CNBr-Fragmenten	84
5.3.2.2	AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppentrennung nach Molekulargewicht)	84
5.4	Korrektur der Beziehung zwischen AAR und Liegezeit über die Berechnung des „thermischen Alters“	85
5.5	Zusammenfassende Würdigung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen	86
6	Literatur	89

Anhang

Danksagung

Erklärung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Konfigurationen der D- und L-Enantiomere der Asparaginsäure	4
Abbildung 2.2	Enantiomerisierung bei Aminosäuren mit zwei chiralen Zentren	5
Abbildung 2.3	L- und D-Glycerinaldehyd in der Fischerprojektion	6
Abbildung 2.4	Spontane Deamidierung des L-Asparaginylrests zum Aspartylrest über das Succinimid-Intermediat	11
Abbildung 2.5	Theoretisch mögliche Beziehungen zwischen dem Razemisierungsgrad von Asx und dem Proteinalter in Abhängigkeit vom Metabolismus des untersuchten Proteins.	12
Abbildung 2.6	Razemisierung von Asx aus humanem Dentin	12
Abbildung 2.7	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines fibrillären Kollagens	18
Abbildung 2.8	Schematische Darstellung des Synthesewegs von Typ III Kollagen	19
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung der Arbeitsschritte	27
Abbildung 3.2	Reaktionsmechanismus: Peptidspaltung am Methionin mit CNBr	30
Abbildung 3.3	Schematische Darstellung der Anordnung der CNBr-Peptide	31
Abbildung 3.3	Schematischer Aufbau der Elektroelution	35
Abbildung 3.4	Beispielchromatogramme zur gaschromatographischen Analytik von D/L-Asx	39
Abbildung 3.5	Schematische Darstellung der OPA/IBLC-Derivatisierung einer primären Aminosäure	41
Abbildung 3.6	Hochdruckflüssigkeitschromatographische Auftrennungen	42/43
Abbildung 3.7	Chromatogramme zur Quantifizierung der Aminosäurezusammensetzung	45
Abbildung 4.1	Aminosäurenkomposition der CF nach temperaturinduzierter Kollagendegradation	48
Abbildung 4.2	Aminosäurenkomposition der CF bei natürlich gealterten Knochen	49
Abbildung 4.3	Elektrophoretische Darstellung der Kollagenfragmente nach Cyanbromidspaltung bei zunehmender Proteindegradation bei 90°C im Hitzeexperiment	50
Abbildung 4.4	Elektrophoretische Darstellung des Gesamt-Kollagenfragmentmusters natürlich gealterter Knochenproben nach Cyanbromidspaltung	50
Abbildung 4.5	Präparation der mittels Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente durch Elektroelution aus elektrophoretisch dargestellten Banden	51
Abbildung 4.6	Exemplarische Darstellung der relativen Peptidkonzentration nach Gruppentrennung der CNBr-Kollagenfragmente mittels PD10-Säulen	52
Abbildung 4.7	Elektrophoretische Darstellung der nach Gruppentrennung der CNBr-Kollagenfragmente mittels PD10-Säulen in den Fraktionen 2-9	53
Abbildung 4.8	Experimentelle Kollagendegradation in Hitzeexperimenten (90°C): Razemisierungsgrade von Asx: LE (a), CF (b), NCF (c) und TB (d)	54
Abbildung 4.9	Kollagenausbeute gegen Dauer des Experiments (a) und der Razemisierungsgrad von Asx in Abhängigkeit zur Kollagenausbeute (b)	55
Abbildung 4.10	Razemisierung von Asx in Kollagen-CNBr-Peptiden nach experimenteller Kollagendegradation bei 90°C	56
Abbildung 4.11	Razemisierungsgrad von Asx, Glx und Ser in den niedermolekularen elektrophoretisch darstellbaren Banden 5-1 (a) und 6 (b) nach CNBr-Spaltung	57

Abbildung 4.12	Razemisierungsgrade von Asx (a), Glx (b) und Ser (c) vor und nach experimenteller Kollagendegradation bei 90°C. PD10-Fraktionen 1-15.....	58
Abbildung 4.13	Razemisierung von Asx in verschiedenen Fraktionen bei unterschiedlich alten Individuen (Hitzeexperiment).	59
Abbildung 4.14	Razemisierung von Asx, Glx, Ser in ausgewählten hoch- und niedermolekularen Fraktionen in Abhängigkeit vom Lebensalter	60
Abbildung 4.15a	AAR-Daten für natürlich gealterte Gesamtknochenproben in Abhängigkeit von der Liegezeit.....	61
Abbildung 4.15b	AAR-Daten für natürlich gealterte Knochenproben, nicht-kollagene Fraktionen in Abhängigkeit von der Liegezeit	62
Abbildung 4.15c	AAR-Daten für natürlich gealterten Knochenproben, kollagene Fraktion in Abhängigkeit von der Liegezeit.....	62
Abbildung 4.15d	Razemisierungsgrad der Asx in der kollagenen Fraktion (CF) historischer und rezenter Knochenfunde bis ca. 7.000 Jahre Liegezeit.....	63
Abbildung 4.16	Razemisierungsgrade der Asx in der kollagenen Fraktion historischer Fundkomplexe und einer rezenten Vergleichspopulation	64
Abbildung 4.17	Kollagenausbeute in Abhängigkeit zur Liegezeit	65
Abbildung 4.18	Razemisierungsgrad von Asx in TB, CF und NCF natürlich gealterter Knochen in Abhängigkeit vom Kollagengehalt.....	65
Abbildung 4.19	AAR (Asx, Ser, Glx) in den elektroeluierten Kollagenfragmenten Bande 5-1 und Bande 6	66
Abbildung 4.20	CNBr-Peptide aus natürlich gealtertem Knochenkollagen, Liegezeit 500 bis ca. 7000 a. Liegezeitabhängigkeit in hoch- und niedermolekularen Fraktionen	67
Abbildung 4.21	CNBr-gespaltene Kollagen: Razemisierungsgrad von Asx, Glx und Ser in Fraktionen verschiedener Peptidgrößen. Abhängigkeit vom Kollagengehalt	68
Abbildung 4.22	Über das „thermische Alter“ korrigierte Beziehung zwischen AAR (CF) und Liegezeit in grob präparierten Fraktionen historischer und archäologischer Knochenfunde	69
Abbildung 4.23	CNBr-gespaltene, natürlich gealterte Kollagen, hoch- und niedermolekulare Fraktionen. Korrektur der Liegezeit, „thermisches Alter“	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Zusammenstellung der gebräuchlichsten Datierungsmethoden.....	15
Tabelle 3.1	Zusammenstellung des Untersuchungsmaterials	26
Tabelle 3.2	Pipettierschema der SDS-Page Gelrezepturen	33
Tabelle 3.3	Programmierung der Injektorsequenz des automatischen Probengebers	44

Abkürzungen

a	Jahre
AAR	Aminosäurenrazemisierung
AS	Aminosäuren
Asx	während hydrolytischer Proteinspaltung freigesetzte Asn und Asp
CF	kollagene Fraktion der Proteine
CIP	Nomenklatur zur Bezeichnung chiraler Moleküle
CNBr	Cyanbromid (=Bromcyan)
Da / kDa	Molekulargewicht in Dalton / Kilodalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	Flammenionisationsdetektor (GC)
FLD	Fluoreszenzdetektor (HPLC)
GC	Gaschromatographie
Glx	während hydrolytischer Proteinspaltung freigesetzte Gln und Glu
HPLC	High-pressure liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IBLC	Iso-butyryl-L-cystein
MG	Molekulargewichtsstandard
NCF	nicht-kollagene Fraktion der Proteine
OH-Pro	Hydroxyprolin
OPA	o-Phthaldialdehyd
RP-HPLC	reverse Phase HPLC
TB	gesamte Proteinfraction des Knochengewebes

Die Aminosäuren sind mit den gängigen Abkürzungen angegeben. Sofern nicht anderweitige Angaben erfolgen, werden für chemische und physikalische Größen die Einheiten des SI Systems verwendet.

1 Zusammenfassung

Dobberstein, R C (2005) Ist eine Revision der Aminosäuredatierung möglich? Dissertation, Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 98 Seiten

Die Datierung von Skelettfunden über den Razemisierungsgrad von Aminosäuren (Aminosäuredatierung) wurde nach spektakulären Fehldatierungen heftig kritisiert. Ziel des Projektes war die Klärung der Frage: Ist eine Revision der Aminosäuredatierung möglich? Der dieser Methodenrevision zugrundeliegende Ansatz basierte auf der Hypothese, dass Aminosäuredatierungen nur dann zu verwertbaren Ergebnissen führen können, wenn *definierte* Proteinfractionen untersucht werden. An künstlich und natürlich gealterten Knochenproben wurden Verfahren zur Präparation solcher Knochenproteinfractionen entwickelt, und die präparierten Fraktionen im Hinblick auf ihre Brauchbarkeit für die Aminosäuredatierung untersucht.

Die erarbeiteten Daten identifizieren grundsätzliche Probleme des Verfahrens der Aminosäuredatierung. Eine wesentlich Problematik besteht darin, dass es bei der Proteindegradation zu einem nicht vorhersagbaren Verlust von Kollagenbruchstücken mit hochrazemisierten Aminosäurenresten an die Umwelt kommt. Solche Bruchstücke fanden sich nach Cyanbromidspaltung des Kollagens unter den kleinsten Fragmenten, die sich den eingesetzten Aufreinigungsverfahren entzogen. Sollten kleinste Kollagenbruchstücke mit hochrazemisierten Aminosäurenresten als „Liegezeituhr“ teilweise im Knochen erhalten bleiben, stellt der Einsatz von auf kleinstmolekulare Peptide optimierten Aufreinigungsverfahren die letzte methodische Chance für eine erfolgreiche Revision der Aminosäuredatierung dar.

Letztlich hat das Projekt die Aminosäuredatierung zunächst weiter problematisiert, anstatt sie zu revidieren. Die erhobenen Daten sind dennoch von hoher praktischer Relevanz. In der Literatur finden sich (noch immer) Mitteilungen über „erfolgreiche“ Aminosäuredatierungen. Da jede Fehldatierung zu weitreichenden geisteswissenschaftlichen Fehlinterpretationen führen kann, ist nach den vorliegenden Daten ein sehr kritischer Umgang mit der Aminosäuredatierung anzuraten.

Summary

Dobberstein, R C (2005) Is a revision of the amino acid racemization dating method possible? Doctoral Thesis, Math.-Nat. Fak. Univ. Kiel, 98 Pages

Dating of skeletal remains based on amino acid racemization dating was heavily criticised after spectacular errors. This study deals with the question, if a revision of this technique might be possible, in order to achieve a sufficiently accurate dating method for ancient proteins. The basic approach was the hypothesis, that amino acid racemization dating can only produce reliable results, when defined protein(fractions) are the targets of the analysis.

Artificially and naturally degraded bone samples were used to develop preparative protocols of protein purification and to test the applicability of the suchlike isolated protein(fractions) for their usefulness for amino acid racemization dating. The data obtained identify general difficulties of that technique. The main problem is the unpredictable degradation of collagen, and the loss of highly racemized collagen fragments into the environment. These highly racemized peptides were found within the smallest collagen fragments after the cleavage by cyanogen bromide. However, the applied methods were not optimized for their purification. If these smallest collagen fragments should indeed remain trapped within the bone mineral over time, an optimization of isolation and purification procedures for these smallest peptides might exhibit a last possibility for a successful revision of the amino acid dating technique. Finally, this study rather expounded the problems of amino acid racemization dating than revising it.

Nevertheless, the obtained data are highly relevant, as successfully applied amino acid racemization datings of skeletal remains are (still) reported. It is recommended to deal very critically with data derived from amino acid racemization dating, for erroneous results may lead to severe misinterpretations in humanities.

2 Einleitung

Die korrekte zeitliche Einordnung von Funden aus (prä-)historischer Zeit steht im Mittelpunkt des archäologischen Interesses. Nicht nur das Nachvollziehen und Verstehen der Naturgeschichte von vergangenen Lebensgemeinschaften, sondern gerade auch Fragen, die natur- und geisteswissenschaftliche Aspekte der Entwicklungsgeschichte des Menschen betreffen, sind stets eng an präzise Datierungsergebnisse gekoppelt. Die präzise Datierung solcher Funde kann Schwierigkeiten bereiten. Deshalb ist die Datierung auch wichtiger Funde nicht selten fraglich. Einige Beispiele: Das Schicksal der Neandertaler nach der Einwanderung des modernen Menschen nach Europa (Duarte *et al.* 1999, Tattersall & Schwartz 1999), die genaue Datierung des „Boxgrove Man“, dem mutmaßlich ältesten Hominidenfund Europas (Bowen & Sykes 1994, Gamble 1994, Roberts 1994, Roberts *et al.* 1994), sowie des Fundes „OH 1“ in der Olduvaischlucht in Ostafrika am Übergang des mittleren zum oberen Paläolithikum, mit dem vermuteten Alter von 17.000 oder 30.000-40.000 Jahren (Skinner *et al.* 2003), liegen bis zum heutigen Tag noch weitgehend im Dunkeln. Im fraglichen Zeitintervall von 200.000-40.000 Jahren B.P. (Before Present) stoßen die gebräuchlichen Methoden, inklusive der ¹⁴C-Datierung, an ihre Grenzen. Als vielversprechende Alternative wurde in den 70er Jahren die Aminosäurenrazemisierung (AAR) als biologische Uhr diskutiert, die Datierungen bis zu mehreren 100.000 Jahre ermöglichen sollte (Bada & Schroeder 1975, Schroeder & Bada 1976). Nach spektakulären Fehldatierungen wurde zumindest für Knochenfunde diese Methode als untauglich eingestuft (Bada *et al.* 1984, Collins *et al.* 1999). Seither wurde zur Kinetik der Aminosäurenrazemisierung weiteres Datenmaterial erarbeitet (Csapo *et al.* 1997, Collins & Galley 1998, Collins *et al.* 1995, 1998a, b, Ritz-Timme & Collins 2001). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit neuen Ansätzen zur Datierung von Skelettfunden mittels der Methode der Aminosäurenrazemisierung.

2.1 Chiralität

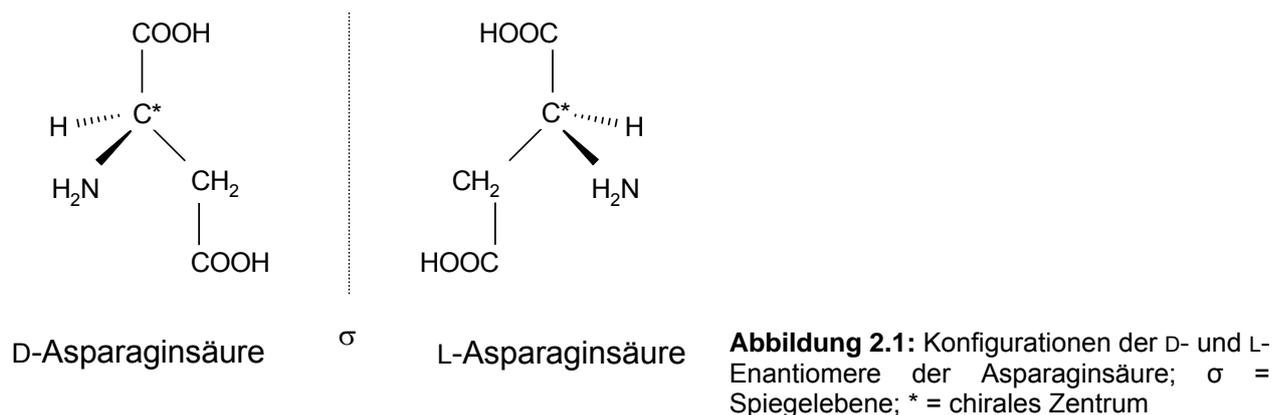
In allen biologischen Prozessen spielen Form, Zusammensetzung und Symmetrie der Moleküle eine entscheidende Rolle. Im Verlauf der Evolution entwickelten sich bei der Synthese Präferenzen für bestimmte Formen von Molekülen, die sich lediglich aufgrund ihrer sterischen Anordnung, nicht jedoch grundsätzlich in

ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden. Die Biosynthese von Aminosäuren erfolgt vorzugsweise in Form der L-Enantiomere, die von Zuckern hingegen als D-Enantiomere. Die dahingehende Weichenstellung muss in entwicklungsgeschichtlich sehr früher Zeit erfolgt sein, da sowohl bei basalen wie auch bei höher evolierten Lebensformen (Endosymbiontentheorie) die gleichen stereoselektiven Stoffwechselwege beschriftet werden.

2.1.1 Chemie

Der Begriff „chiral“ leitet sich vom griechischen Wort cheir für „Hand“ oder „Händigkeit“ ab. Chiralität beschreibt das Phänomen, dass sich Moleküle zueinander verhalten wie die linke Hand zur rechten, also wie Bild zu Spiegelbild, ohne deckungsgleich zu sein. In chiralen Molekülen lassen sich keine Symmetriezentren oder –ebenen finden (Vollhardt 1988).

Chemische Verbindungen, die sich derart verhalten, werden als Enantiomere bezeichnet. In der Regel sind die physikalischen Eigenschaften gleich. In wässriger Lösung zeigen reine Enantiomere allerdings gegensätzliche optische Eigenschaften (optische Aktivität). Die Schwingungsebene linear polarisierten Lichts wird von den beiden optischen Antipoden in entgegengesetzter Richtung gedreht, der Betrag der Drehung polarisierten Lichts ist bei beiden Enantiomeren der gleiche. Erfolgt die Rotation im Uhrzeigersinn, wird das Enantiomer als rechtsdrehend [per Definition (+)] bei Rotation im Gegenuhrzeigersinn demzufolge als linksdrehend [(-)-Enantiomer] bezeichnet (Mislow 1972). Ursache dieses Phänomens sind ein oder mehrere asymmetrisch substituierte C-Atome, d. h. das chirale C-Atom ist mit vier unterschiedlichen Liganden (Atomen oder Molekülgruppen) gesättigt assoziiert (Abbildung 2.1).



2 Einleitung

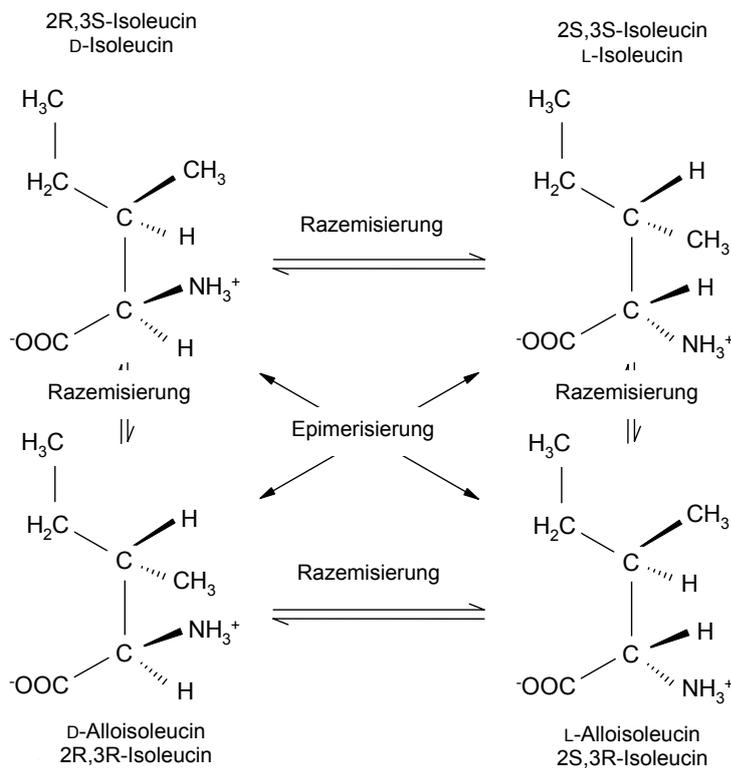


Abbildung 2.2: Enantiomerisierung bei Aminosäuren mit zwei chiralen Zentren, beide Bezeichnungen der Verbindungen (Trivialname und Name nach dem CIP-System) sind aufgeführt.

Im Gegensatz zu Enantiomeren verhalten sich Diastereomere nicht wie Bild und Spiegelbild zueinander, und sie weisen unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften auf. Epimerie ist eine spezielle Form der Diastereomerie, gekennzeichnet durch das Vorhandensein mehrerer Chiralitätszentren, die sich lediglich in der Konfiguration eines einzigen asymmetrisch substituierten C-Atoms unterscheiden (Abbildung 2.2 am Beispiel von Isoleucin, Alloisoleucin, nach Rutter & Blackwell 1995).

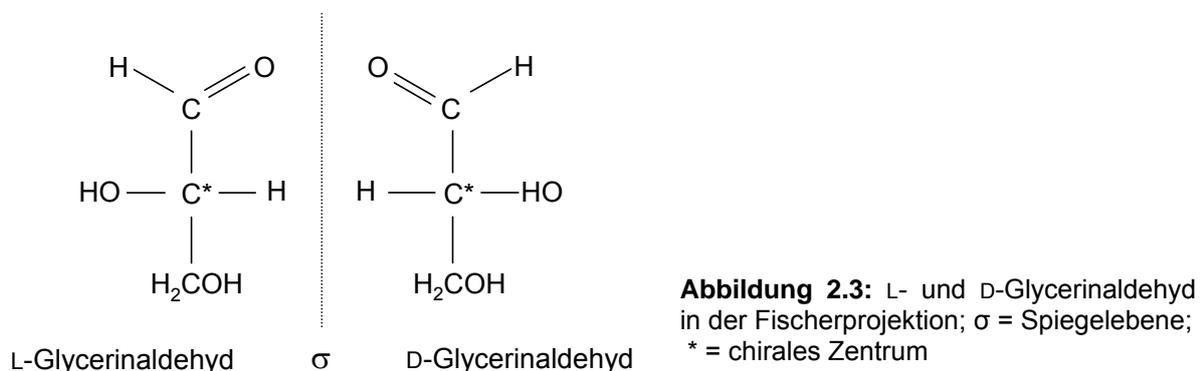
2.1.2 Nomenklatur

Die Umwandlung eines Enantiomers in seinen Antipoden unter dem Einfluss physikalisch-chemischer bzw. biochemischer Prozesse wird allgemein, nicht ganz korrekt, unter den Begriffen Razemisierung und (syn. Isomerisierung) zusammengefasst. Genaugenommen bedeutet Razemisierung, dass „ein Enantiomer über irgendeinen Prozess mit seinem Spiegelbild ins Gleichgewicht gebracht“ wird (Vollhard 1988). Aus Gründen der Einfachheit wird im Folgenden der klassische Razemisierungsbegriff als teilweise Umwandlung eines Enantiomers in seinen Antipoden erweitert um die Epimerisierung, sofern nicht das Enantiomer sondern ein Epimer¹ entsteht.

¹ Für die Aminosäuren Asparagin (Asp) und Glutamin (Glu) gilt, dass im Zuge der Proteinhydrolyse während der Probenbearbeitung aus den Asparaginyresten und den Glutaminyresten die freie Asparaginsäure (Asx) bzw. Glutaminsäure (Glx) entsteht, sodass in der Analytik nicht nach der Herkunft (hydrolysiert aus Asparagin oder Asparaginsäure resp. Glutamin oder Glutaminsäure) unterschieden werden kann. Im Folgenden werden, sofern nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, die Bezeichnungen Asx und Glx für diese freien AS verwendet.

Bis zur Entdeckung der Röntgenstrukturanalyse war die absolute Konfiguration chiraler Moleküle unbekannt. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur wurde bereits 1891 von Emil Fischer ein willkürliches System zur Benennung der Enantiomere geschaffen (Fischerprojektion) - basierend auf der Konfiguration des Glycerinaldehyds (Abbildung 2.3). Das Molekül wurde dazu als Kreuz mit dem chiralen C-Atom im Schnittpunkt der Achsen gezeichnet. Die längste Kohlenstoffkette steht vertikal, das am höchsten oxidierte C-Atom weist nach oben, die horizontalen Bindungen eines jeden C-Atoms der Hauptkette weisen hinter die Zeichenebene. Dasjenige Enantiomer des Glycerinaldehyds, dessen Hydroxylgruppe in dieser Projektion nach rechts weist, wurde als D-Glycerinaldehyd (gr. dextro = rechts) bezeichnet, der Antipode folglich als L-Glycerinaldehyd (gr. levo = links), D- und L- sind dabei kein Hinweis auf die optische Aktivität (Vollhardt 1988).

Der von Cahn *et al.* (1966) eingeführten R,S-Nomenklatur (CIP-Nomenklatur) folgend, werden die Substituenten des chiralen C-Atoms absteigend nach ihren Ordnungszahlen angeordnet, dabei betrachtet man das Molekül entlang der Achse Stereozentrum in die Richtung des Liganden niedrigster Priorität (gemäß der Ordnungszahl). Lassen sich die drei übrigen Liganden anhand der Ordnungszahlen entsprechend des Uhrzeigersinns sortieren, wird das Stereozentrum mit „R“ (lat. rectus = rechts) benannt, sinngemäß werden im Gegenuhrzeigersinn angeordnete Liganden mit „S“ (lat. sinister = links) bezeichnet. Bei gleicher Priorität der am chiralen Zentrum gebundenen Liganden wird die Einstufung entlang der Ligandenkette bis zum ersten Unterschied fortgesetzt, ungesättigte Verbindungen (Doppel- und Dreifachbindungen) werden wie gesättigte Bindungen behandelt.



Für Aminosäuren und Zucker hat sich die DL-Nomenklatur durchgesetzt, sie ist mit Ausnahme des Cysteins deckungsgleich mit der CIP-Nomenklatur (Vollhardt

1988). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird daher ebenfalls die DL-Nomenklatur verwendet.

2.1.3 Chiralität – Grundprinzip des Lebens

Der Ursprung der Enantiomerenpräferenz liefert Raum für eine Vielzahl sich zum Teil widersprechender Theorien und Hypothesen (Bonner 1998). Eine Theorie basiert auf der Kontamination der präbiotischen Erde mit interstellarer Materie, die einen sehr geringen Enantiomerenüberschuss aufwies (Bonner 1995, 1998). Dieser geringe Enantiomerenüberschuss habe in der Folge durch biotische, autokatalytische und stereochemische Anreicherungsprozesse zur Bildung von immer komplexeren, sich schließlich selbst reproduzierenden Molekülen führen können, aus denen in der Folge die Entstehung des Lebens mit seiner homochiralen Biochemie resultierte. Dagegen argumentiert Tranter (1986) in seinem Erklärungsansatz mit geringen energetischen Unterschieden der schwachen Wechselwirkungen enantiomerer Moleküle, die den bevorzugten Einbau von L-Aminosäuren (L-AS) in Peptidketten in der präbiotischen Zeit förderten. Das Enantiomer niedrigerer Energie wäre um einen kleinen Energiebetrag, die sogenannte „paritätsverletzende Energiedifferenz“, im Verhältnis zu seinem Spiegelbild stabiler. Berechnungen der Energieverhältnisse in Proteinfragmenten hätten in jedem Falle die L-AS als energetisch günstiger klassifiziert, was nicht auf den Zufall, sondern auf subatomare Phänomene als Ursprung der homochiralen Biochemie schließen ließe. Hazen *et al.* (2001) zeigten am Beispiel der Asparaginsäure und des Alanins, dass gesteinsbildende Mineralien wie Kalzit (CaCO_3) aus racemischen Gemischen selektiv das L-Enantiomer in höherer Konzentration adsorbieren. Ähnliche stereoselektive Voraussetzungen erfüllen andere gesteinsbildende Kristalle wie Gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Baryt (BaSO_4) oder Apatit ($\text{Ca}_5[(\text{F},\text{OH},\text{Cl})(\text{PO}_4)_3]$). Derart an selektive Oberflächen adsorbiert seien diese Enantiomere während der präbiotischen Ära in konzentrierterer Form für frühe Peptidpolymerisation verfügbar gewesen. Hierdurch wären im weiteren Verlauf der Evolution die Weichen für die selbstreplizierenden Peptide in Richtung der homochiralen Biochemie gestellt worden, so wie sie sich in allen Bereichen des Lebens zeigt.

Worin auch immer die Ursache der Homochiralität liegen mag, für nahezu alle Organismen gilt der Grundsatz, dass die Proteinbiosynthese in der Regel über die L-Enantiomere erfolgt, da die an der Proteinbiosynthese beteiligten Enzyme ebenfalls aus L-konfigurierten Aminosäuren bestehen. In der Umkehrung würde dieser

Grundsatz theoretisch ebenso für D-konfigurierte Enzyme, die stereoselektiv ausschließlich D-AS zu D-Proteinen synthetisieren, gelten.

2.1.4 Vorkommen von D-AS in Lebewesen

2.1.4.1 Prokaryota

Im Gegensatz zu Eukaryota zeichnen sich Prokaryota durch einen regen D-AS-Stoffwechsel aus - Ausgangsstoffe sind hier L- und D-Enantiomere. L-Enantiomere werden enzymatisch durch verschiedene Razemasen in ihre optischen Antipoden überführt (Adams 1972). Die Bakterienzellwand enthält mit D-Ala, D-Glu und D-Asp verschiedene D-AS als Bestandteile des Peptidoglycan-Gerüsts (Schleifer & Kandler 1972). Die Peptidbindungen zwischen D- und L-AS sind gegen Proteasen sehr stabil, daher wird dem Peptidoglycan-Gerüst eine Schutzfunktion gegen proteolytische Enzyme zugeschrieben (Rogers 1983). Auch erwiesen sich D-AS enthaltende antibiotisch wirkende Oligopeptide gegenüber proteolytischen Enzymen als äußerst beständig (Zasloff 2002).

Zahlreiche freie D-AS wurden vor allem aus kommerziell zur Nahrungsmittelproduktion genutzten Milchsäure-, Essigsäure-, oder Propionibakterien (Bhattacharyya & Banerjee 1974, Raunio *et al.* 1978, Brückner *et al.* 1993) und Hefen (Bhattacharyya & Banerjee 1974, Brückner *et al.* 1995) nachgewiesen (D-Ser, D-Pro, D-Leu, D-His, D-Tyr). Mikrobiell produzierte Lebensmittel weisen im Vergleich zu ihren Ausgangsprodukten z.T. in erheblich höherer Konzentration freie D-AS auf (Brückner & Lüpke 1991, Brückner *et al.* 1993). Als Verursacher wurden die zur Produktion eingesetzten Bakterienstämme (Gattungen *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*) mit ihren ausgeprägten D-AS-Stoffwechseln identifiziert.

2.1.4.2 Eukaryota

In Pflanzen kommen D-AS in freier und peptidgebundener Form, häufig auch als N-Malonyl- oder N-Acetylderivate, vor (Frahn & Illmann 1975, Fukuda *et al.* 1973, Zenk & Scherf 1964). In der Wurzel der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) wurden bis zu 40% des freien Ala als D-Enantiomer nachgewiesen. Konjugate in Form von L-Glu-D-Ala und N-Malonyl-D-Ala konnten Ogawa *et al.* (1978) in der Erbse (*Pisum sativum*) finden. Erhöhte Gehalte von D-AS in verschiedenen Obst- und Gemüsesorten im Vergleich zu den relativ geringen D-AS-Konzentrationen frischer

2 Einleitung

Produkte lassen auf mikrobielle Kontaminationen schließen (Brückner & Westhauser 1994).

In den 1930er Jahren wurde mit D-Ornithin als Gewebebestandteil von Dornhai (*Squalus acanthias*) erstmalig eine D-AS im Tierreich nachgewiesen, weitere Nachweise folgten mit D-Ala aus der Hämolymphe der amerikanischen Milchkrautwanze (*Oncopeltus fasciatus*), D-Ser beim Seidenspinner (*Bombyx mori*) und dem Regenwurm (*Lumbricus terrestris*, nach Corrigan 1969). Hashimoto *et al.* (1993a) und Kera *et al.* (1995) lieferten den Nachweis freier D-Asp und D-Glu bei Mammalia aus Nebennieren, Hoden, Milz und Hypophyse von Mäusen und Ratten. Speziell in endokrinen Geweben sowie in Nervengewebe wurden bei Mammalia in mehreren Arbeiten Vorkommen freier D-Asp und D-Ser belegt (Schell *et al.* 1997, Fedele *et al.* 1997, Nagata *et al.* 1994, Hashimoto *et al.* 1993b). Dunlop & Neidle (1997) berichteten über die Synthese und Metabolisierung von D-Ser mit L-Ser als direkter Vorstufe im Gehirn von Ratten und Mäusen, allerdings blieb die Funktion des D-Ser ungeklärt. Fedele *et al.* (1997) und Nagata *et al.* (1998) zeigten, dass D-Ser *in-vivo* die Funktion des N-Methyl-D-Aspartyl-Rezeptors im Zentralnervensystem von Ratten und Mäusen selektiv modulieren kann, und somit möglicherweise als Neurotransmitter fungiert. Di Fiore *et al.* (1998) schrieben D-Asp eine Kontrollfunktion in der Testosteronproduktion bei weiblichen Wasserfrosch (*Rana esculenta*) zu. Peptidgebundene D-AS wurden in Neuropeptiden bei verschiedenen Mollusken, u.a. der Afrikanischen Riesenschnecke (*Achatina fulica*, nach Kreil 1994), im Gift der Trichternetzspinne *Agelenopsis aperta* (Heck *et al.* 1996) und in Peptiden opioider Wirkung bei Anuren (Amice *et al.* 1998) nachgewiesen. Antimikrobiell wirksame, D-AS-enthaltende Peptide sind weiterhin Bestandteil vom Hautsekret verschiedener Unkenarten (*Bombina* sp., nach Mignogna *et al.* 1998).

2.1.4.3 *Homo sapiens sapiens*

Es ist mittlerweile bekannt, dass sich D-Aminosäuren in allen menschlichen Geweben finden. Dies ist Resultat einer Proteinalterung, die zur Akkumulation von D-Aminosäuren, insbesondere in langlebigen Proteinen, führt (siehe dazu 2.2). Diese Proteinveränderungen werden im Zusammenhang mit der Genese typischer Alterserkrankungen wie dem chronischen Lungenemphysem oder der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht (Shapiro *et al.* 1991). Auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Urin, Blut inkl. Erythrozyten und Blutplasma (Armstrong *et al.* 1993)

wurden D-Aminosäuren gefunden. Im Urin gesunder Probanden wurden D-Ala, D-Val, D-Thr, D-Ser und D-Phe als wiederkehrende Bestandteile nachgewiesen (Brückner *et al.* 1994). Nagata *et al.* (1992) identifizierten erhöhte Gehalte von D-Ser, D-Ala und D-Pro im Urin, bezogen auf den Serum-Kreatininingehalt, als Indikator für Nierendysfunktion. D-Asp wurde in Form seines Methylesters aus Proteinen von Erythrozyten isoliert, die Funktion blieb spekulativ, ein möglicher Zusammenhang mit einer Metabolisierung oder Reparatur veränderter Proteine wurde hergestellt (McFadden & Clarke 1982). In der Speichelflüssigkeit nachgewiesene relativ hohe Gehalte an D-Ala, D-Pro, D-Asp und D-Glu wurden auf den Stoffwechsel der oralen Bakterienflora zurückgeführt (Rothgans *et al.* 1983).

2.2 Razemisierung von Aminosäuren in humanen Proteinen als „biologische Uhr“ zur Detektion einer intravitalen und postmortalen Proteinalterung

Die Biosynthese von Proteinen in humanem Gewebe erfolgt nahezu ausnahmslos aus L-AS (Schroeder & Bada 1976), somit liegen sämtliche Aminosäuren in neusynthetisierten Proteinen als L-Enantiomere vor. Vom Zeitpunkt der Synthese an kann es zur spontanen, nicht-enzymatischen Umwandlung der L-Enantiomere in ihre D-Formen kommen. In vivo können die entstandenen D-AS-Reste in bestimmten Proteinen akkumulieren. Das Ausmaß und der Umfang dieser Akkumulation in vivo hängt im wesentlichen von der Struktur des Proteins, dem biochemischen Umfeld (Konzentration von Salzen, pH-Wert, Temperatur) und dem Metabolismus des Proteins ab (Ritz-Timme 1998, Ritz-Timme & Collins 2002). Die schnellste Razemisierungskinetik findet sich bei Asparagin, die über das instabile Succinimid-Intermediat deamidiert und razemisiert (Abbildung 2.4). Experimentelle Untersuchungen an denaturierten und synthetischen Proteinen zeigten, dass unter physiologischen Reaktionsbedingungen die Succinimidbildung wesentlich von der Primärstruktur an der Position N+1 beeinflusst wird. Aminosäuresequenzen wie die Kombinationen -Asn-Gly-, -Asn-Ala- und -Asn-Ser- fördern die Bildung des Succinimid-Intermediats, -Asp-Leu- und -Asp-Trp- behindern diese Reaktion (Clarke 1987, Fuji *et al.* 1999). Die Bildung des Succinimids ist innerhalb des Proteins von der lokalen Umgebung und der Stereochemie beeinflusst. In terminalen oder flexiblen Bereichen und an der Proteinoberfläche gelegenen Positionen kann die Umlagerung zum Succinimid besonders leicht erfolgen (van Duin & Collins 1998,

2 Einleitung

Robinson & Robinson 2001, Gineyts *et al.* 2000). Die spezifischen biochemischen und strukturellen Eigenschaften eines jeden Proteins bestimmen daher die Kinetik der Razemisierung seiner AS-Reste.

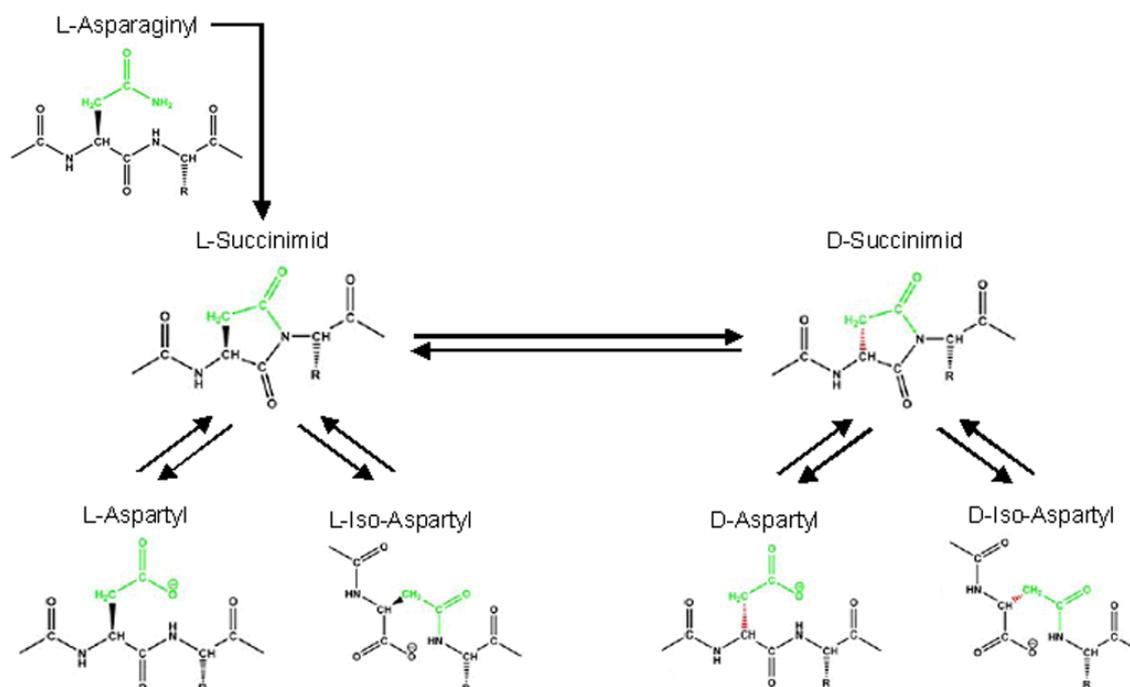


Abbildung 2.4: Spontane Deamidierung des L-Asparaginylrests zum Aspartylrest über das Succinimid-Intermediat (geschwindigkeitsbestimmender Schritt), über welches zudem die Razemisierung erfolgt (verändert nach Clarke 1987).

Deamidierung und Razemisierung verlaufen bei einer Körpertemperatur von 37°C spontan. Insoweit werden diese Prozesse als Teil der „physiologischen“ Proteinalterung und „molekularen Uhr“ beschrieben (Robinson & Robinson 2001).

Über verschiedene Proteinaufreinigungsschritte lassen sich nicht-kollagene und bakterielle Proteine gut von der kollagenen Fraktion abtrennen, sodass der Ursprung der D-Enantiomere in der Razemisierung der Kollagen-AS liegen muss. Faktoren, die diese Reaktion begünstigen, sind Temperatur, niedriger pH-Wert, Anwesenheit von Schwermetallionen (Bada & Shou 1980). Verschiedene Untersuchungen zeigten einen zeitlich linearen Verlauf über einen weiten Bereich der Reaktion auf. Somit sollte die Messung der Razemisierungsrate als Indikator der Kollagendegradation potentiell die Bestimmung von Alter/Liegezeit mittels Aminosäurenrazemisierung ermöglichen. Bedeutung für die Alters- und Liegezeitschätzung hat die Analyse der Razemisierungsgrade einzelner Aminosäuren erhalten.

2.2.1 Erfassung einer intravitalem Proteinalterung und die Nutzbarkeit zur Lebensalterschätzung

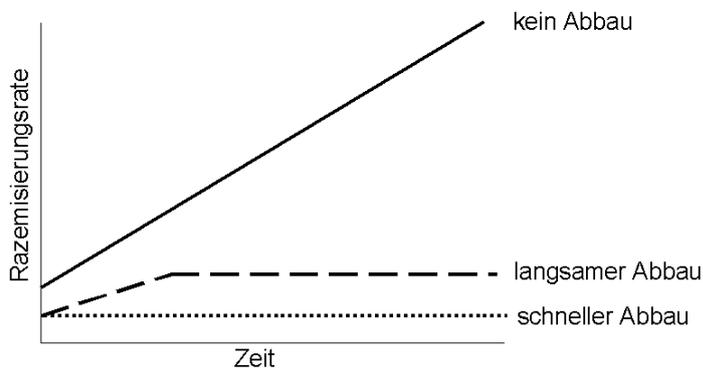


Abbildung 2.5: Theoretisch mögliche Beziehungen zwischen dem Razemisierungsgrad von Asx und dem Proteinalter in Abhängigkeit vom Metabolismus des untersuchten Proteins. (nach Ritz-Timme & Collins 2002)

säuren erfolgen kann (gepunktete Linie in Abbildung 2.5). In Proteinen mit längeren Halbwertszeiten ist eine allmähliche intravitale Razemisierung denkbar, durch den Austausch alter gegen junge Proteine ist die Akkumulation razemisierter Amino-

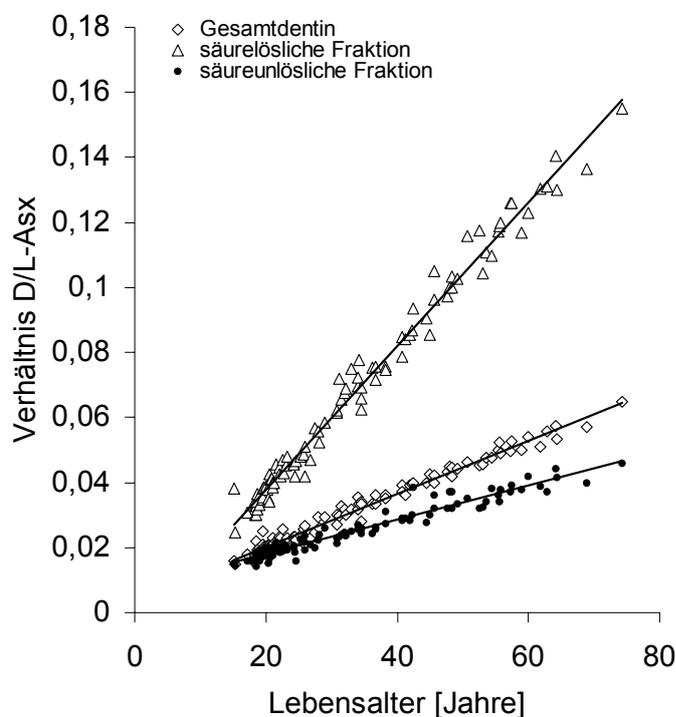


Abbildung 2.6: Razemisierung von Asx aus humanem Dentin (Dreiecke), säureunlöslichem (gefüllte Kreise) und säurelöslichem Dentinprotein (Rauten) in Abhängigkeit vom Lebensalter, (verändert nach Ritz-Timme, 1998).

Abhängig von Proteinstruktur und -umsatz akkumulieren sich D-AS in peptidgebundener Form in unterschiedlichem Ausmaß. Bei hohem Proteinumsatz ist der analytische Nachweis der Razemisierung kaum möglich, da das Protein schneller abgebaut wird, als eine Akkumulation von razemisierten Aminosäuren bis zu einem Niveau messbar, an dem sich ein Gleichgewicht zwischen dem Abbau und der Neusynthese, also der „alten“ D-AS und den „neuen“ L-AS einstellt (gestrichelte Linie in Abbildung 2.5). In permanenten Proteinen oder in früh angelegten Proteinen, die keinem Austausch unterliegen, kann ein direkter und vorhersagbarer Zusammenhang zwischen dem Razemisierungsgrad und dem Proteinalter vorliegen (durchgezogene Linie in Abbildung 2.5, nach Ritz-Timme & Collins 2002). Daher lassen sich vorhersagbar razemisierende permanente Proteine oder Protein-

fraktionen theoretisch zur Schätzung des Lebensalters nutzen.

Ein solcher enger Zusammenhang zwischen Aminosäurenrazemisierung (AAR) und Lebensalter wurde zunächst in Proteinen bradytropher Gewebe wie Dentin (Gillard *et al.* 1990, Ritz-Timme *et al.* 2002), Zahnschmelz (Gillard *et al.* 1990), Augenlinse (Masters *et al.* 1977, 1978, Garner & Spector 1978), *Ligamenta flava* (Ritz-Timme *et al.* 2003), Myelinscheiden des Zentralen Nervensystems (Fisher *et al.* 1986) oder Bandscheiben (Ritz & Schütz 1993) nachgewiesen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass auch in Geweben mit hohem Proteinumsatz langlebige Proteine mit Akkumulation von D-AS erhalten bleiben können. Als Beispiele lassen sich Elastin in der Lunge oder Osteocalcin im Knochen anführen (Ritz *et al.* 1994, Ritz *et al.* 1996, Shapiro *et al.* 1991). Trotz der mit etwa 120 Tagen geringen Lebensdauer von Erythrozyten stellten Brunauer & Clarke (1986) eine zunehmende Razemisierung der Asparaginreste in Membranproteinen fest.

Bereits die Erstbeschreiber der *in-vivo*-Razemisierung von Asparagin und Asparaginsäure von Zahnhartgeweben (Helfman *et al.* 1977) wiesen auf die Möglichkeiten einer zuverlässigen Lebensaltersschätzung aufgrund des Razemierungsgrades hin. Seither ist eine große Datenbasis, für verschiedene, unterschiedlich präparierte Proteinfractionen, erhoben worden (Othani 1995, 1997, Mörnstadt *et al.* 1994, Ritz 1993, Ritz-Timme 1998, Ritz-Timme *et al.* 2002, Waite *et al.* 1999). Die Altersschätzung aufgrund der AAR in Dentin ist derzeit die Methode mit der höchsten Präzision (Abbildung 2.6) (Ritz-Timme 2002). Die guten Ergebnisse der Altersschätzung an humanem Gewebe führten zu einigen weiterführenden Untersuchungen an Ratten (*Rattus sp.*) und Grönlandwalen (*Balaena mysticetus*) mit ebenfalls vielversprechenden Resultaten (Ohtani *et al.* 2000; George *et al.* 1999).

2.2.2 Erfassung der postmortalen Razemisierung – Nutzbarkeit zur Datierung von Skelettfunden (Aminosäuredatierung)

Nach dem Tod schreitet die AAR theoretisch weiter fort. Da die AAR temperaturabhängig ist, und diese mit dem Todeszeitpunkt von 37°C auf die Umgebungstemperatur sinkt, verläuft die postmortale AAR generell so langsam, dass sie bei der Lebensaltersschätzung im forensisch relevanten Zeitraum (~50 Jahre) nicht stört. Bei sehr langen Liegezeiten kommt es dann jedoch zu einer postmortalen Akkumulation von D-AS. Hintergrund ist insbesondere die zunehmende Proteindegradation, die durch Zunahme der molekularen Flexibilität die Kinetik der

AAR zu höheren Razemisierungsgeschwindigkeiten verändert. Dies ist die Grundlage der sog. „Aminosäuredatierung“ an Knochen(-kollagen).

2.3 Datierung von Skelettfunden

2.3.1 Fragestellung, Bedeutung

Die Frage nach dem Wer, Was und Wann in der Vergangenheit hat die Menschheit sicherlich bewegt seit der Mensch sich seiner selbst und seiner Umgebung bewusst geworden ist. Mit der Entwicklung der modernen Wissenschaften seit der Aufklärung liegt es im allgemeinen Interesse, historische Ereignisse oder Funde aus der Vergangenheit in ihren zeitlichen Rahmen einzuordnen. Besonders spektakuläre Ereignisse, die beispielsweise zum massenhaften Aussterben von Organismen führten, bringen der breiten Öffentlichkeit auch die Problematik der Datierung vergangener Ereignisse nahe. Dabei sind das Ende der Kreidezeit (Aussterben der sog. Dinosaurier, zusammen mit ca. 75% der damaligen Flora und Fauna vor ca. 65 Mio. Jahren) und der Riesenformen der Mammalia wie des Riesenhirsches (*Megaloceros giganteus*), des Höhlenbären (*Ursus spelaeus*) und der Säbelzahnkatze (*Homotherium latidens*) vor ca. 11.000 Jahren sicherlich die populärsten. Jedoch sind im Laufe der Erdgeschichte in gewisser Regelmäßigkeit zahlreiche derartiger, zum Teil sehr viel drastischerer, „Krisen“ eingetreten (Stanley, 1988, Visscher *et al.* 2004). Besonders aber auch die Frage nach dem Ursprung des modernen Menschen, seiner Ausbreitung und der Konkurrenz um Ressourcen mit „archaischen Verwandten“ sowie die Belege seiner Existenz stehen im Mittelpunkt allgemeinen Interesses.

2.3.2 Methoden

2.3.2.1 Physikalische Datierung

Zur Datierung werden im Idealfall rein zeitabhängige „molekulare Uhren“ verwendet, wie die Halbwertszeiten von natürlichen Radionukliden ^{14}C , $^{40}\text{K}/^{40}\text{Ar}$, $^{87}\text{Rb}/^{87}\text{Sr}$, $^{238}\text{U}/^{206}\text{Pb}$, $^{235}\text{U}/^{207}\text{Pb}$, $^{232}\text{Th}/^{208}\text{Pb}$, als Beispiele für die häufig angewandten Methoden. Vereinfachend lassen sich diese Methoden auf das gleiche Prinzip zurückführen: Mit bekannten Ausgangsgehalten und Halbwertszeiten und den Messergebnissen des Untersuchungsmaterials lassen sich rechnerisch die Alter bestimmen, stets unter der Voraussetzung, Bildungs- und Zerfallsrate der Isotopen waren über die Zeit hinweg konstant. Die Dauer der Halbwertszeit und die Präzision

2 Einleitung

der Analytik bestimmen den messbaren Zeitraum (siehe Tabelle 2.1). Zur direkten Datierung von hitzeexponierten, archäologischen Artefakten (Keramiken, Glas, gebrannte Ziegel), sowie von Flint- und Obsidianartefakten wird die Thermolumineszenzmethode häufig angewandt. Das Ausmaß der Störungen in Kristallstrukturen durch natürliche Radioaktivität wird durch die hohe Temperatur während des Brennens beseitigt, sodass die Kristallstörungen sich erst nach dem Brennvorgang wieder ansammeln können; dieser Vorgang ist mit konstanter radioaktiver Strahlung streng zeitabhängig (Geyh & Schleicher 1990). Mit der Methode der Kernspuren-Datierung („fission track“) nutzt man ein ähnliches Phänomen, indem man die Spuren auswertet, die sich über die Zeit bei der Spaltung von natürlichen Radionukliden (z.B. ^{238}U) in elektrisch neutralen Mineralien ansammeln. Die Spaltprodukte werden in entgegengesetzter Richtung auseinander geschleudert, und hinterlassen als mikroskopisch sichtbare Schäden eine „Brems“spur von Kationen in der Kristallstruktur, in der Größenordnung von ca. 10-20µm Länge und 1µm Breite. Bei Umgebungstemperaturen bis zu 80°C bleiben diese Spuren im Kristall für mehrere Millionen Jahre konserviert (Geyh & Schleicher 1990, Wagner & Glasmacher 2003).

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der gebräuchlichsten Datierungsmethoden mit Datierungszeitraum und -art des datierten Materials.

Datierungsmethode	Datierbares Zeitintervall (a B.P.)	Eingesetztes Material
$^{40}\text{K}/^{40}\text{Ar}$	$10^9\text{*-}10^5$	Gesteine/Mineralien
$^{238}\text{U}/^{206}\text{Pb}$, $^{235}\text{U}/^{207}\text{Pb}$, $^{232}\text{Th}/^{208}\text{Pb}$,	$10^9\text{*-}10^6$	Gesteine/Mineralien
$^{87}\text{Rb}/^{87}\text{Sr}$	$10^9\text{*-}10^7$	Gesteine/Mineralien
Thermolumineszenz	$10^5\text{-}10^3$	Keramik
Fission Track	$10^9\text{*-}10^5$ (10^2)	Mineralien
^{14}C	$10^4\text{-}10$	Photosynthetisch fixierter Kohlenstoff, Sedimente, Mollusken, pflanzliche und tierische Überreste
AAR	$10^6\text{-}10^2$	Mollusken, Korallen, tierische Überreste, limnische und marine Sedimente; Lebensalter

* Das Alter unseres Sonnensystems wird derzeit auf $4,58 \times 10^9$ Jahre beziffert, früheste Funde von Lebensformen werden auf ca. 500 Mio. Jahre später datiert.

2.3.2.2 Chemische Datierung

Zu den chemischen Methoden zählen Methoden, denen der Zerfall oder die Razemisierung von Aminosäuren zugrunde liegen, bzw. der molekulare Erhaltungsgrad der Proteine oder auch der DNA. Die Methoden werden also direkt am Fund eingesetzt, faktisch wird hier (Knochen-)Kollagen untersucht. Die Datierung stützt sich auf die Annahme einer konstanten Reaktionskinetik über die Zeit. Hierin liegt auch das Hauptproblem dieser Methoden, da die Reaktionskinetik an Umgebungsfaktoren wie pH-Wert, Temperatur oder Wassergehalt gekoppelt ist. Der Vorteil dieser Methoden besteht in der schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse und der relativ kostengünstigen Analytik; für anthropologische und paläontologische Funde sind diese Methoden insbesondere von Wert, da sich erdgeschichtlich relativ junge Funde (Tabelle 2.1) datieren lassen. Aufgrund der Tatsache, dass das zu datierende Objekt direkt untersucht wird, und nicht etwa über Begleitfunde oder Stratigraphie (s.u.) wird das Risiko von Fehldatierungen verringert. Denkbar wäre hier z.B. die Verschleppung von Skelettfragmenten durch Beutegreifer oder Aasfresser oder eine Verlagerung durch Erosion.

Für die an Kollagen anwendbaren Methoden der AAR und ^{14}C -AMS gilt gleichermaßen, dass geringe Kollagengehalte in der Probe sich nur durch den Einsatz von größeren Mengen an Untersuchungsmaterial kompensieren lassen. In der Regel degradiert das Kollagen mit der Dauer der Liegezeit, allerdings sind der Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung, der pH-Wert, und die Temperatur über die Dauer der Liegezeit hinweg für den Erhaltungsgrad des Kollagens von entscheidender Bedeutung. Funde aus extrem trockenen und heißen Gebieten können im Einzelfall sehr gut erhaltenes Kollagen aufweisen, gleiches gilt für Funde aus Permafrostböden. Funde aus kalkreichen Bodenschichten wie Löss oder Travertin sind ebenfalls im Verhältnis zur Liegezeit sehr gut erhalten. Dagegen fördern feucht-warme Klimate sowie alkalische Lagerungsbedingungen die Degradation des Kollagens (Collins *et al.* 2002). Detaillierte Angaben zur Methodik, Verwendung, und Grenzen der einzelnen Verfahren geben Geyh & Schleicher (1990).

Der entscheidende Nachteil der Datierung mittels AAR ist der unwiederbringliche Verlust des Funds, oder zumindest Teilen davon, im Verlauf der Kollagenpräparation. Allerdings werden im Kontext wichtiger Funde häufig große Mengen von Beifunden gemacht, die als Ersatz zur Datierung mittels AAR verwendet werden können.

2.3.2.3 Sonstige Datierungen

Als weitere Datierungsmethoden in der Archäologie/Paläontologie sind die Chronostratigraphie, die Datierung anhand von Begleitfunden (Werkzeuge, kulturbestimmende Grabbeigaben), oder biostratigraphisch, allein durch die zeitliche Einordnung von Funden anhand morphologischer Charakteristika in eine evolutionäre Reihe. Ebenso können palynologische (pollenkundliche) oder dendrochronologische Analysen Rückschlüsse auf das Alter von Funden ermöglichen. Gemeinsames Merkmal aller dieser Verfahren ist die relative Datierung, im Gegensatz zu den physikalischen Verfahren, die Information zum absoluten Alter ergeben (Schweingruber 1988, Boyd 1998).

2.3.3 Analytische Methoden

Die Analyse der Aminosäurenenantiomere wird vor allem mit rechnerunterstützten chromatographischen Verfahren durchgeführt. In den letzten Jahren wird die Ionenaustausch-Chromatographie in dem Maß, wie robuste Derivatisierungsverfahren und geeignete Trennmedien entwickelt wurden, von Gaschromatographie (CG) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) verdrängt (Scaloni *et al.* 2002). Die Darstellung der verwendeten Methoden findet sich detailliert unter Abschnitt 3.3.

2.3.4 Degradation von Knochen während der Liegezeit

20-25% des Gewichts rezenter Knochen entfallen auf die organischen Bestandteile. Mit einem Anteil von 90% des Trockengewichts der organischen Matrix stellt Kollagen die größte Proteinfraction. Der Verbund der organischen Matrix und dem kristallinen Hydroxylapatit in Knochen und Zähnen stabilisiert die Kollagen-tripelhelix weitgehend gegen diagenetische Prozesse, mit dem Erfolg, dass sie, im Vergleich zu anderen Proteinen, über extrem lange Zeiträume erhalten blieben (DeNiro & Weiner 1988).

2.3.4.1 Kollagen, Zielprotein der chemischen Datierungsverfahren

Kollagen ist eines der wichtigsten Strukturproteine der extrazellulären Matrix von Metazoen (beginnend bei Schwämmen über Anneliden bis zu den Wirbeltieren). Kollagene stellen einen Anteil von ca. 30% aller Proteine bei höheren Tieren (Persikov & Brodsky 2002). Nach seiner Synthese lagern sie sich extrazellulär in charakteristischen Fasern zu komplexen Molekülen zusammen und bewirken

aufgrund ihrer Eigenschaften die Funktionalität von komplexen Stützgeweben, wie Knochen, Knorpel, Cutis und Sehnen/Bänder. Kollagen ist weiterhin der Hauptbestandteil der Bindegewebematrix von Blutgefäßen und der meisten Organe. Die Fasern des fibrillären Kollagens bestehen aus 3 α -Ketten gleichen (homotrimeren) oder verschiedenen (heterotrimeren) genetischen Ursprungs. Die Elastizität und Widerstandsfähigkeit gegen mechanische Beanspruchungen wird über die Quervernetzungen der Kollagenfasern untereinander erreicht. Durch die tripelhelikale Struktur sind fibrilläre Kollagene für die meisten Proteasen unangreifbar (Nagase & Woessner 1999).

Allen Kollagentypen gemeinsam sind die beiden verschieden strukturierten Domänen - der tripelhelikalen (kollagenen) sowie der globulären Domäne. Typisch für Kollagen ist der hohe Anteil an Gly, ca. 1/3 des Aminosäuregesamtgehalts, gefolgt von Pro und Hyp. Kennzeichnend für die Primärstruktur ist das Triplett -Gly-Xxx-Yyy- der Aminosäuresequenz; Wiederholungen der Sequenz -Gly-Pro-Hyp- umfassen ca. 10% des gesamten Moleküls. Über die -Gly-Pro-Hyp- Sequenzen erfolgt die Verbindung der einzelnen α -Ketten untereinander zur Tripelhelix.

In humanen Geweben unterscheiden Exposito *et al.* (2002) 21 verschiedene Kollagene (Typ I-XXI), die grob unterteilt werden nach ihrer Primärstruktur und/oder ihrer supramolekularen Organisation:

- Fibrilläre Kollagene (Typ I-III, V und XI) umfassen jene gestreckten Kollagene, die im elektronenmikroskopischen Bild in Form gebänderter Fasern aggregiert vorliegen (Abbildung 2.7).

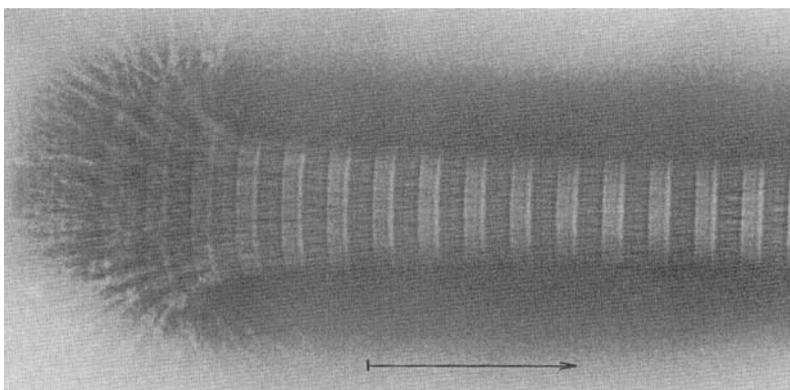


Abbildung 2.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines fibrillären Kollagens (*Rattus* sp.)

- Die übrigen Gruppen beinhalten die nicht-fibrillären Kollagene, mit unterbrochener kollagener Domäne.

2 Einleitung

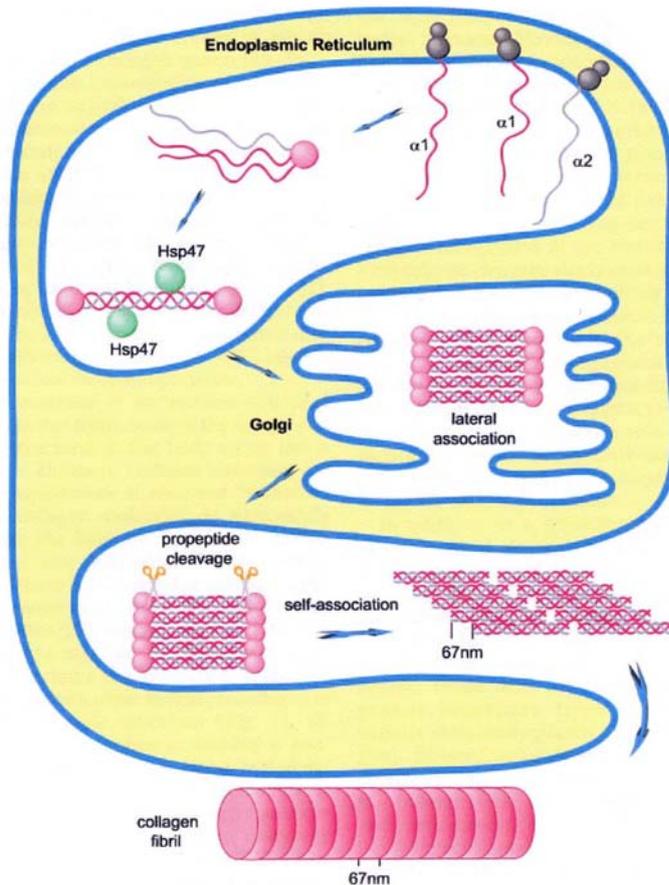


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Synthesewegs von Typ III Kollagen (aus Persikov & Brodsky 2002)

Die Synthese von Kollagen ist am besten anhand Beispiel der im elektronenmikroskopischen Bild gebänderten Kollagene der Typen I-III untersucht. Die am biosynthetischen Prozess beteiligten Zellen synthetisieren ein Prokollagen (Molekulargewichte der globulären pro- α -1- und pro- α -2-Kette 30-35 kDa), das anschließend dieses ins Interstitial sezerniert wird. Die Struktur des Kollagens ähnelt in diesem Stadium einer langgestreckten Hantel, mit einer zentralen Tripelhelix sowie N- und C-terminalen globulären Propeptiden. Die Funktion der globulären Propeptide wird im

Zusammenhang mit der Genese der einzelnen Kollagenmoleküle zur Tripelhelix diskutiert. Extrazellulär entfernen spezifische Peptidasen die N- und C-terminalen Propeptide, wonach die Kollagenmoleküle sich spontan zur charakteristischen Struktur zusammenlagern (Fibrillogenese) (Abbildung 2.8). In Geweben liegen verschiedene Kollagentypen nebeneinander vor, im Knochen wurden bisher vier Kollagene beschrieben. Die Matrix von Zähnen und Knochen wird hauptsächlich vom Typ I Kollagen gestellt, bestehend aus zwei α -1- sowie einer α -2-Kette (Burgeson & Nimni 1992, Exposito *et al.* 2002, Persikov & Brodsky 2002).

Posttranslationale Modifikationen des Kollagenmoleküls umfassen die enzymatische Abspaltungen der Propeptide und die Aggregation zur Kollagenfaser sowie ihre Quervernetzungen (vermittelt durch Lysyloxidase), die Hydroxylierung von Pro und Lys (Prolin-, Lysinhydroxylase), Glycosylierung (Addition von Zuckern an Hydroxylsilylreste durch Galactosyltransferase, Glucosyltransferase), die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten (Burgeson & Nimni 1992).

Zur Strukturaufklärung von Kollagen wurden die wasserunlöslichen Moleküle enzymatisch (Clostridien-Kollagenase) oder häufiger chemisch (mittels Cyanbromid, CNBr) in lösliche Fragmente bekannter Größe zerlegt. Im Anschluss erfolgt die Aminosäuresequenzermittlung mittels Edmann-Verdau. Grundlegende Arbeiten zu verschiedenen Kollagenen gingen aus der Arbeitsgruppe um Fietzek und Kühn hervor (Fietzek *et al.* 1972, Fietzek & Kühn 1975, Van der Rest & Fietzek 1982). Die Kollagenfragmente nach Cyanbromidspaltung sind chemisch exakt dadurch charakterisiert, dass die Spaltung an definierten Stellen im Kollagenmolekül (an Methioninresten) erfolgt. Die entstehenden Fragmente sind in der Literatur gut beschrieben (Novotna *et al.* 1996, Scott & Weiss 1976a, b) und lassen sich elektrophoretisch und chromatographisch darstellen. Dadurch sind sie klar definierbar.

2.4 Verfahren zur Datierung von Skelettfunden

Das derzeit zuverlässigste Verfahren zur Datierung von Skelettmaterial ist die Radiocarbon (^{14}C)– Methode. Diese führt im Zeitintervall von ca. 100 Jahren B.P. (Before Present) bis ca. 50000 Jahren B.P. meist zu guten Ergebnissen. Das Interesse an alternativen Verfahren zur ^{14}C -Datierung ist dennoch hoch und resultiert aus dem Bedarf an Möglichkeiten zur Verlängerung des erfassbaren Zeitraumes B.P. sowie zur Absicherung von ^{14}C -Datierungsergebnissen durch unabhängige Methoden, insbesondere bei schlecht erhaltenem Material.

In den 70er Jahren wurde die Aminosäuredatierung als vielversprechendes Alternativverfahren diskutiert – insbesondere auch deshalb, weil es Datierungen bis zu mehreren 100.000 Jahren ermöglichen sollte (Bada und Schroeder 1975, Schroeder und Bada 1976). Nachdem die Methode aber in spektakuläre Fehldatierungen involviert war, wurde sie heftig kritisiert (Bada *et al.* 1984, Collins *et al.* 1999). Mittlerweile steht ein umfangreiches grundlagenwissenschaftliches Datenmaterial zur Kinetik der Razemisierung von Aminosäuren zur Verfügung. Auf dieser Grundlage wird zunehmend über Möglichkeiten zur Überwindung der Probleme des Verfahrens nachgedacht.

2.4.1 Aminosäuredatierung: Grundlagen und Prinzip

Bei der Biosynthese menschlicher und tierischer Proteine werden ausschließlich L-Aminosäuren eingesetzt. Unter bestimmten Bedingungen kann eine spontane,

2 Einleitung

nicht-enzymatische Umwandlung der L-Aminosäurenreste in ihre D-Form (Razemisierung) auftreten. Die am schnellsten razemisierende Aminosäure Asparaginsäure kann bereits intravital (d.h. bei 37°C über maximal ca. 100 Jahre) eine messbare Razemisierung zeigen; andere Aminosäuren razemisieren intravital nur wenig oder gar nicht. Nach dem Tod, unter völlig neuen physikochemischen Voraussetzungen und über lange Zeiträume, kommt es zur Razemisierung zahlreicher Aminosäuren und damit zu einer allmählichen Akkumulation der D-Formen mit zunehmendem postmortalen Intervall. Die Aminosäuredatierung basiert auf dem resultierenden Zusammenhang zwischen dem Razemisierungsgrad dieser Aminosäuren und der Liegezeit.

2.4.2 Aminosäuredatierung: Die Kritik

Die bekannt gewordenen Fehldatierungen sind darauf zurückzuführen, dass die außerordentlich komplexe Natur der Razemisierung von Aminosäuren während der Knochenliegezeit unterschätzt wurde. Die zugrunde liegenden Prozesse werden wesentlich von der physikochemischen Umgebung der Aminosäurenreste beeinflusst. Die Razemisierungskinetik wird deshalb entscheidend von den Umgebungsbedingungen (hier insbesondere von der Temperatur) sowie von Art und Ausmaß der Proteindegradation bestimmt. Während die Temperatur und ihr Einfluss auf die Aminosäuredatierung durch einschlägige mathematische Modelle für definierte „Mutterproteine“ erfasst werden können, ist der Einfluss der Proteindegradation kaum vorhersagbar. Bei Untersuchung von Gesamtknochenprotein oder nicht definierten, groben Knochenextrakten (z.B. Säure- oder EDTA-Extrakten) archäologischer Proben ist die Proteinkomposition letztlich unbekannt, weil sie Resultat der Summe aller Degradationsprozesse ist. Wird das Verhältnis D-/L-Form einer Aminosäure in solchen Proben bestimmt, ist das Ergebnis von der Proteinzusammensetzung und damit vom Ausmaß der Degradationsprozesse abhängig, die in nur lockerer und indirekter Beziehung zur Liegezeit stehen. Eine genaue Datierung durch Untersuchung nicht definierter Proteinfractionen ist also nicht möglich; dies lässt sich durch die bekannt gewordenen Fehldatierungen eindrucksvoll belegen.

2.4.3 Aminosäuredatierung: Lösungsansätze

Der Einfluss von Degradationsprozessen kann nur ausgeschlossen werden, wenn definierte Proteine oder definierte Proteinfractionen untersucht werden: Der

Untersucher muss wissen, was genau er analysiert. Nur durch Bestimmung des Verhältnisses D-/L-Form geeigneter Aminosäuren in definierten Proben (optimalerweise in aufgereinigten Proteinen bzw. Peptiden) können Aminosäuredatierungen zu verwertbaren Ergebnissen führen. Diese Auffassung wird mit anderen Autoren geteilt (Cloos 1995, Elster *et al.* 1991, Julg *et al.* 1987, Kimber und Hare 1992, Matsu'ura und Ueta 1980).

In diesem Zusammenhang erscheint die Untersuchung von aufgereinigten Kollagenfraktionen, insbesondere von aufgereinigtem tripelhelikalen Kollagen, besonders interessant (Cloos 1995, Julg *et al.* 1987). Julg *et al.* (1987) leiten u.a. aus den Ergebnissen der Untersuchung eines kleinen Knochenkollektives von Fundstellen aus Südfrankreich ab, dass die Anwendung der Aminosäuredatierung auf aufgereinigtes tripelhelikales Kollagen die Möglichkeit eröffnet, Skelettfunde bis ca. 500.000 Jahre B.P. (!) zu datieren.

Bei sehr schlecht erhaltenen Funden kann die kollagene Knochenmatrix bereits weitgehend degradiert sein. Für solche Fälle wurde von DeNiro und Weiner (1988) vorgeschlagen, Proteine aus kristallinen Hydroxylapatit-Aggregaten für biogeochemische Untersuchungen einzusetzen; in diesem Zusammenhang wird u.a. auch konkret auf die Aminosäuredatierung hingewiesen. Die Proteine in den Aggregaten seien gut gegen Umwelteinflüsse und Kontaminationen geschützt; wegen der „Konservierung“ innerhalb der Aggregate seien die enthaltenen Proteine möglicherweise auch dann noch definierbar, wenn die übrige organische Knochenmatrix weitgehend degradiert sei. Ein weiterer interessanter Untersuchungsansatz für schlecht erhaltene Funde wäre die Analyse definierter nicht-kollagener Proteinfractionen. Insbesondere Osteocalcin, eines der wichtigsten nicht-kollagenen Knochenproteine, soll wegen seiner engen Bindung an die anorganische Knochenmatrix sehr lange stabil sein (Collins *et al.* 1998, Ulrich *et al.* 1987).

Die Aufreinigung definierter (kollagener oder nicht-kollagener) Proteinfractionen aus Knochenfunden dürfte die Entwicklung einer neuen, vielversprechenden Datierungsmethode durch Revision der Aminosäuredatierung ermöglichen. Die Überprüfung dieser Hypothese ist Ziel des geplanten Projektes.

2.5 Zielsetzung

Im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen zur Aminosäuren-razemisierung (AAR) am Kollagen sollte in der vorliegenden Arbeit der Ansatz verfolgt werden, eine oder mehrere definierbare Kollagenfraktionen mit einer zur Datierung ausreichend steilen Razemisierungskinetik über einen langen Zeitraum hinweg zu identifizieren und deren Robustheit hinsichtlich der Datierung zu prüfen. Demzufolge gliederte sich das Projekt in die drei Themenbereiche auf:

1. Systematische Untersuchungen zu Möglichkeiten der Präparation definierter Knochenproteinfraktionen an experimentell und „natürlich“ gealterten Knochen,
2. Erhebung von *in-vitro*-Daten zur Kinetik der Aminosäurenrazemisierung in präparierten Knochenproteinfraktionen,
3. Prüfung des Zusammenhangs zwischen dem Alter sicher datierter Knochenproben und der AAR in den präparierten Knochenproteinfraktionen.

3 Material und Methoden

Die Verfügbarkeit von historischen Knochenfunden für systematische Reihenuntersuchungen ist sehr begrenzt. Die Überarbeitung der Methode zur Datierung von Skelettfunden mittels der Aminosäurenrazemisierung erforderte jedoch zunächst eine ausreichende Verfügbarkeit von Untersuchungsmaterial, unter besonderer Berücksichtigung unterschiedlicher Liegezeiten. Als Standardmethode zur experimentellen Simulation der Kollagendegradation hat sich die *in-vitro*-Degradation bei hohen Temperaturen durchgesetzt (Von Endt & Ortner 1984). Im folgenden Schritt wurden Fragmente natürlich gealterter Skelette untersucht.

3.1 Art und Herkunft des Untersuchungsmaterials

Untersucht wurden sowohl künstlich gealterte humane (n=68) und bovine (n=1) Knochenfragmente aus standardisierten Hitzeexperimenten, als auch historische/archäologische humane (n=63) und nicht-humane (n=18) Knochenfunde bekannter Herkunft und sicherer Datierung (zeitl. Intervall 235-ca. 200.000 Jahre).

3.1.1 Experimentell gealterte Knochen

Zur Durchführung eines umfangreichen Temperaturexperiments wurde ein bovines Femur (150g, nach Präparation der Femurcompacta) eines 4 Jahre alt gewordenen Rinds erworben. Die Übertragbarkeit der bovinen Daten auf humanes Knochengewebe wurde untersucht mit ergänzenden Experimenten anhand von 5 verschieden alt gewordenen Individuen (16, 41, 57 resp. 59 und 72 Jahre) aus Routineasservaten von Obduktionen am Institut für Rechtsmedizin, UK-S.-H., Campus Kiel. In allen Fällen wurden einheitlich große Stücke der präparierten bovinen und humanen Kompakta verschiedenen Alters über die Dauer von maximal 39 Tagen bei 90°C inkubiert. (Präparation: vergl. Abschnitt 3.2). Zu definierten Zeiten (nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 23, 26, 29 und 32 Tagen) wurden zur Untersuchung der Razemisierung von Asx in verschiedenen grob aufgereinigten Knochenproteinfraktionen (wässriger Überstand (LE), Gesamtknochengewebe (TB), kollagene (CF) und nicht-kollagene Fraktion (NCF)) Aliquots entnommen.

Die Lebensaltersabhängigkeit der Razemisierung der Aminosäuren Asx, Glx und Ser wurde ebenfalls an den Routineasservaten (n=68; Institut für Rechtsmedizin, UK-S.-H., Campus Kiel) exemplarisch untersucht.

3.1.2 Historische / archäologische Funde

In den archäologischen Funden (Tabelle 3.1) findet sich ein heterogenes Spektrum mitteleuropäischer Skelettfragmente aus der jüngeren Vergangenheit (Fundkomplexe Hemmingstedt, Flensburg und Trier; zur Verfügung gestellt durch Frau PD I. Schröder, Inst. für Anthropologie Christian-Albrechts-Universität Kiel; Fundkomplex Grumentum, überstellt durch Prof. Fladt, Freiburg), bis hinein in die neolithischen Epochen Sachsen-Anhalts, die der Glockenbecherkultur (ca. 2.000 v.Chr.) und Linienbandkeramik-Kultur (ca. 5.000 v.Chr.) zugeordnet werden (überstellt durch Frau Dr. M. Hellmund, Landesamt für Archäologie, Sachsen-Anhalt). Die Untersuchung älterer Funde bovinen Ursprungs aus Europa, Asien, Nordamerika und der eines Mammuts (Großbritannien) (ca. 15.000 - 50.000 a resp. 200.000 a) wurden durch Material von Prof. M. Collins (Universität York, GB) ermöglicht.

Tabelle 3.1: Zusammenstellung des Untersuchungsmaterials

(Liegezeit in Jahren)	Herkunft	Art der Funde	Anzahl der Funde
505	Hemmingstedt, Schleswig-Holstein	Humane Skelettfragmente, Femora, „verscharrt“ in Kleiboden	4
ca. 400-700	Flensburg, Schleswig-Holstein	Humane Skelettfragmente, Femora, Erdbestattung	14
ca. 1.700	Trier, Rheinland-Pfalz	Humane Skelettfragmente, Femora, Erdbestattung	27
ca. 1.700	Grumentum (Italien)	Humane Skelettfragmente, Femora, Erdbestattung	4
ca. 2.480-6.380	<u>Sachsen-Anhalt:</u> Braunsdorf, Merseburg/ Querfurt; Derenburg, Wernigerode; Eilsleben, Bördekreis; Freyburg, Burgenlandkreis; Halle-Beesen; Queis, Quennstedt, Questzdölsdorf, Stedten, Saalkreis; Unseburg, Aschersleben; Westerhausen, Quedlinburg	Diverse humane ¹⁾ , bovine ²⁾ , equide ³⁾ , Skelettfragmente,	14 ¹⁾ , 2 ²⁾ , 3 ³⁾
ca. 30.000	Großbritannien	Ur (<i>Bos primigenius</i>), Hornzapfen	1
ca. 200.000	Großbritannien	Mammut (<i>Mammuthus primigenius</i>), Scapula	1
ca. 235-49.360	<u>Nordamerika:</u> Boyer River Reserve, Fort Vermilion; Cloverbar Pit, Edmonton; Gallelli pit, Calgary; Panther R., Banff NP, AB Kanada; Ikpikpuk R., North Slope; AK USA <u>Asien: Sibirien, (Permafrost):</u> Kolyma Lowland, Duvanny Yar; Kolyma Lowland, Stanchikovskiy Yar; Sibirien, Russland <u>Zentralasien</u> Tong He; Yanjiagang, Harbin; China	Bison (diverse Skelettfragmente)	18

3 Material und Methoden

Hauptaugenmerk lag auf der Untersuchung von Knochengewebe. Einen schematischen Überblick über die einzelnen Präparationsschritte vermittelt Abbildung 3.1.

3.2 Präparation

3.2.1 Präparation des Gewebes

Knochengewebe

Die noch anhaftenden Weichgewebereste der asservierten Femurdiaphysen wurden nach dem Auftauen zunächst mittels Skalpell weitestgehend entfernt, anschließend wurde das restliche Weichgewebe (Muskulatur, Sehnen, Knochenhaut) zusammen mit der äußeren *compacta* mit einer elektrischen Fräse unter Wasserkühlung abgetragen. Die Diaphysen wurden longitudinal in Hälften geteilt, die Markhöhle unter fließendem Wasser ausgespült und die Trabekel der *spongiosa* ebenfalls mit einer geeigneten Fräse entfernt. Die freigelegte *compacta* wurde unter Kühlung an einer chirurgischen Bandsäge oder mit einer oszillierenden Knochensäge in Stücke von 0,75 cm Kantenlänge zerteilt.

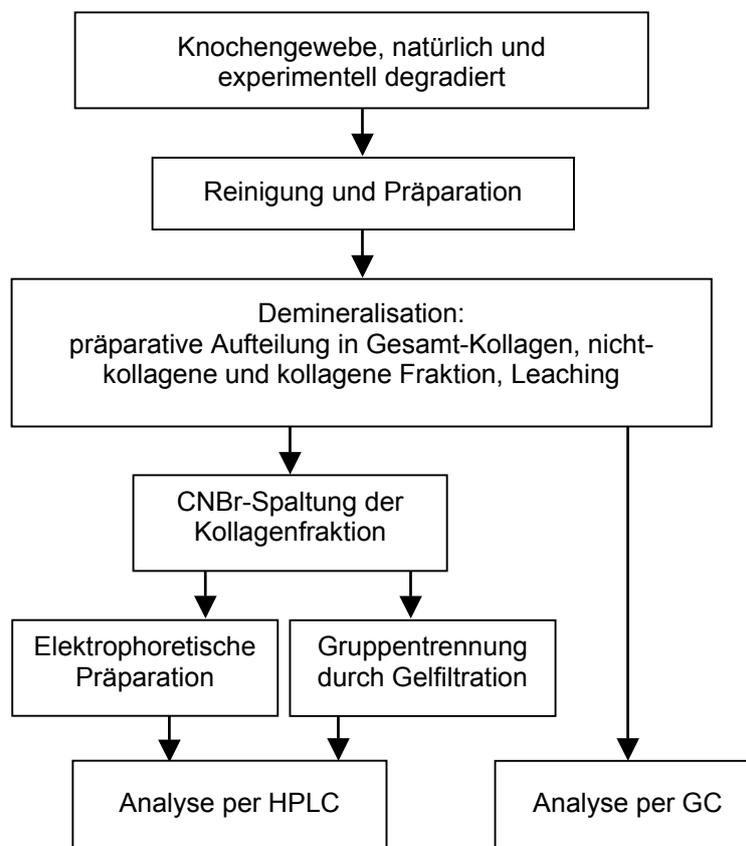


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte, ausgehend von unbehandeltem Gewebe bis zur Analytik

3.2.2 Waschschritte

Reagenzien

Waschlösung (mit Proteaseinhibitoren):

15%ige NaCl-Lösung (150g NaCl in 1l H₂O bidest.), darin 66g 6-Amino-N-hexansäure (H₂N(CH₂)₅COOH),

3,9g Benzamidin, (C₆H₅C(=NH)NH₂ x HCl),

625mg N-Ethylmaleimid, (C₆H₈NO₂),

522mg Phenylmethansulphonylfluorid (C₇H₇FO₂S)

lösen

Ethanol/Ether-Lösung

96%iges Ethanol (C₂H₅OH) mit Diethylether ((C₂H₅)₂O) im Volumenverhältnis 3:1 mischen

SDS-Lösung (2%, mit Proteaseinhibitoren):

2%ige Sodiumdodecylsulfat-Lösung (20g ad 1l H₂O bidest.), darin:

66g 6-Amino-N-hexansäure (H₂N(CH₂)₅COOH),

3,9g Benzamidin (C₆H₅C(=NH)NH₂ x HCl),

625mg N-Ethylmaleimid, (C₆H₈NO₂)

522mg Phenylmethansulphonylfluorid lösen

Die folgenden Waschschritte wurden in einer Kühlkammer bei 4°C auf einem Laborschüttler durchgeführt. Über Nacht wurden die Gewebepräparate zur Entfernung wasserlöslicher Substanzen in 15%iger NaCl-Waschlösung mit Proteaseinhibitoren (nach Takagi & Veiss 1984) gewaschen, anschließend 15min in Ethanol/Ether-Lösung und anschließend für 1h in 2%iger SDS-Lösung mit Proteaseinhibitoren entfettet. 4-5maliges Spülen mit H₂O bidest. beendete die Extraktion fett- und wasserlöslicher Komponenten. Nach Gefriertrocknung waren die Gewebepräparate bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C lagerbar.

3.2.3 Präparation der Kollagen- und Nichtkollagenfraktion

Reagenzien zur Präparation der Kollagen- und Nichtkollagenfraktion

Salzsäure (zur Demineralisation) 1N HCl (1mol HCl ad 1l H₂O bidest. lösen)

Die Probenvorbereitung zur gas-/flüssigkeitschromatographischen Analyse beinhaltete weitere Aufarbeitungsschritte. Die gefriergetrockneten Knochenstücke wurden mit einer hydraulischen Presse bei einem Maximaldruck von 20kN grob zerkleinert, im Anschluss wurden die zerpressten Stücke in einer Schwingmühle bei 30Hz für 30sec zu feinem Knochenmehl zermahlen. Zur Bestimmung der AAR in der Gesamtfraktion wurden 10mg Knochenpulver für die Hydrolyse abgewogen, 250mg wurden zur Präparation der Kollagen- und Nicht-Kollagenfraktion durch Demineralisation (bei 4°C, ca. 17h in Pyrexröhrchen) eingesetzt (bei stark degradiertem Kollagen entsprechend mehr), restliches Pulver wurde bei -20°C eingelagert. Nach der Demineralisierung wurden die Proben bei 4000 U/min zentrifugiert, jeweils 5ml in saubere Rollrandgläschen überführt und im Exsikkator mit angeschlossener Wasserstrahlpumpe getrocknet. Der Rückstand im Rollrandglas enthielt die nicht-kollagene Fraktion. Der abzentrifugierte Bodensatz (Kollagenfraktion) wurde mit H₂O bidest. bis zu einem neutralen pH-Wert gewaschen, gefriergetrocknet und zur Bestimmung des Kollagengehalts ausgewogen. Der Kollagengehalt berechnete sich nach der Formel:

$$\text{Kollagenausbeute [\%]} = (\text{Auswaage CF} \times 100) / \text{Einwaage Knochenpulver}$$

Der erhaltene Wert gab grob den Degradationsgrad des Kollagens und damit des Knochenfundes wieder, hohe Werte ließen auf wenig degradiertes Kollagen schließen.

3.2.4 CNBr-Spaltung

Ragenzien zur CNBr-Spaltung

Reduktionsschritt	2-Mercaptoethanol in 10mM NH_4HCO_3 -Lösung (1/9 v/v) lösen
Spaltungsschritt	70%ige Ameisensäure mit N_2 begasen CNBr im Verhältnis 50mg auf 1ml in 70%iger Ameisensäure lösen

Zur Isolation von möglicherweise hochrazemisierten Kollagenfragmenten wurde die Spaltung von Kollagen in kleinere Fragmente mittels Cyanbromid (CNBr) gewählt (modifiziert nach Rossi *et al.* 1996). Mit diesem Verfahren werden die Methioningruppen von Peptiden angegriffen und chemisch zu einem Homoserinlacton am C-terminalen sowie zu einem neuen freien N-terminalen Peptidende modifiziert (Mechanismus siehe Abbildung 3.2). In einem ersten Schritt lagert sich das CNBr unter Bildung eines Cyansulfoniumbromidintermediats an den Schwefel des Methionins an. Bei saurem pH erfolgt in einem Zwischenschritt unter Abspaltung von Methylthiocyanat die Umlagerung zu einem Iminolacton-Bromid. Die Spaltung des Proteins wird mit der Bildung des C-terminalen Homoserinlactons durch die im Sauren anschließende Hydrolyse der Peptidbindung abgeschlossen. Bei bekannter Proteinstruktur sind daher die Peptide definierter Größe ebenfalls bekannt.

Eine grob schematische Übersicht der Anordnung der CNBr-Peptide der $\alpha_1(I)$ - und $\alpha_2(I)$ -Ketten gibt Abbildung 3.3 wieder.

Dazu wurden 2-Mercaptoethanol mit 10mM NH_4HCO_3 -Lösung im Verhältnis 1:9

(v/v) gemischt. Im Reduktionsschritt wurden 40mg der Kollagenfraktionen im

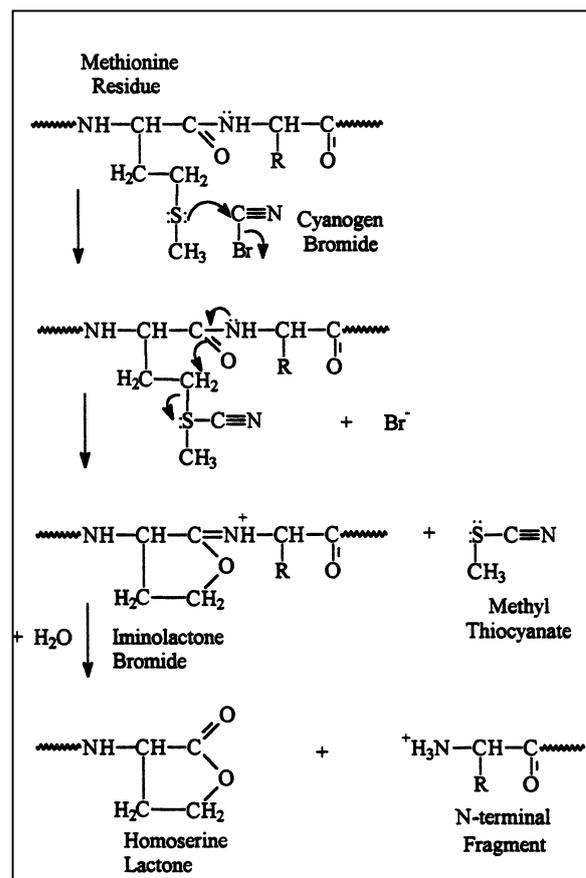


Abbildung 3.2: Reaktionsmechanismus: Peptidspaltung am Methionin mit CNBr (verändert nach Gross & Witkop 1962)

3 Material und Methoden

Verhältnis von 10-15mg auf 1mL in der Mercaptoethanollösung aufgenommen und für 4h bei 45°C inkubiert. Gefriertrocknung beendet die Reduktion.

CNBr im Verhältnis 50mg/1mL wurde in mit Stickstoff begaster 70% Ameisensäure gelöst. Darin wurde das gefriergetrocknete, reduzierte Kollagen im Verhältnis von 10mg Peptid zu 1ml 70% Ameisensäure aufgenommen. Die CNBr-Spaltung erfolgte bei 26°C in einem Hybridisierungsöfen, im Anschluss wurden die Proben für die elektrophoretische Präparation sowie die Gelfiltration aliquotiert. Die Kollagenspaltung wurde ebenfalls durch Gefriertrocknung beendet.

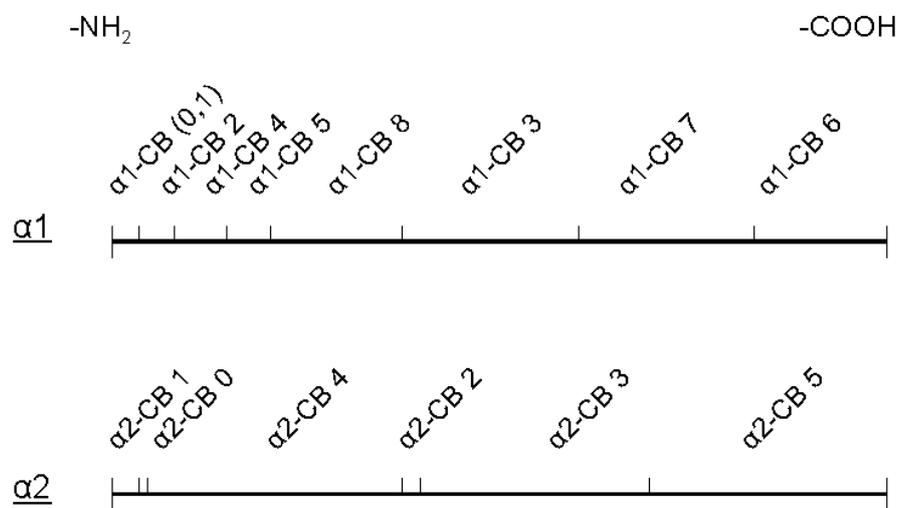


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Anordnung der CNBr-Peptide der α_1 (I)- und α_2 (I)-Ketten des Typ-I-Kollagen. (verändert nach Volpin & Veis 1973)

3.2.5 Elektrophoretische Präparation

Reagenzien für elektrophoretische Präparationen

SDS-Page Elektrophorese nach Laemmli (1970)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	29,1g Acrylamid (C_3H_5NO) und 0,9g N,N'-Methylenbisacrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) mit H_2O bidest. auf 100ml auffüllen
Trenngelpuffer (pH 8,9)	1,875 M Tris (= 227,1g Tris + 0,30M HCl ad 1l H_2O bidest.)
Sammelgelpuffer (pH 6,7)	0,25 M Tris (30,4g Tris + 0,25M HCl ad 1l H_2O bidest.)
Saccharoselösung (60%)	60 g Saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) in 100ml in H_2O bidest. lösen
Ammoniumpersulfatlösung (10%)	10 mg Ammoniumperoxodisulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$) in 100ml H_2O bidest. lösen
Elektrophoresepuffer (running-buffer, pH 8,3; 5-facher Ansatz)	15g Tris, 72g Glycin ($C_2H_5NO_2$) und 5g SDS ad 240ml in H_2O bidest. lösen
stacking-buffer	0,5M Tris-HCl (=0, 12g Tris-HCl) in 200ml H_2O bidest. lösen
Denaturierungsmix (sample-buffer, 2-facher Ansatz)	4,0ml 10%ige SDS-Lösung, 2,5ml stacking-buffer, 1,5ml Glycerin, 10mg Bromphenolblau, direkt vor Gebrauch 2ml Mercaptoethanol (C_2H_6OS), hinzupipettieren
Coomassie-Färbelösung (500ml)	1,25g Coomassie, 250ml Methanol und 75ml Eisessig ad 500ml in H_2O bidest. lösen

3 Material und Methoden

Coomassie-Entfärberlösung (2l) 280ml Methanol,
140ml Eisessig ad 2l in H₂O bidest. lösen

Tabelle 3.2: Pipettierschema der SDS-Page Gelrezepturen (Angaben für je 1 Gel)

	Protean II cell		Mini cell	
	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%	Trenngel 13,75%	Sammelgel 5%
Acrylamid/Bisacrylamid	10,8ml	1,7ml	2,7ml	0,425ml
Trenngelpuffer	6,0ml	-	1,5ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5ml	-	0,625ml
Saccharoselösung, 60%	2,4ml	-	0,6ml	-
SDS-Lösung, 10%	0,3ml	0,1ml	0,075ml	0,025ml
H ₂ O bidest.	7,4ml	5,5ml	1,85ml	1,375ml
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylenethylendiamin)	25µl	10µl	6,2µl	2,5µl
Ammoniumpersulfatlösung	150µl	100µl	37,5µl	25µl

3.2.5.1 Qualitative Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Präparationsschritte wurden von allen Kollagenextraktionen sowie CNBr-Verdauen SDS-Page Elektrophoresen (Laemmli, 1970) angefertigt. Auf diese Weise konnten fehlgeschlagene Versuchsansätze zeit- und kostensparend erkannt und gegebenenfalls wiederholt werden. Insbesondere fehlerhafte CNBr-Verdaue konnten anhand des fehlenden, typischen CNBr-Peptidmusters identifiziert werden (vergl. Abbildungen 3.4 und 3.5). Verwendet wurden in der Regel selbstangefertigte Polyacrylamidgele (13,75%iges Trenngel, 5%iges Sammelgel), in einigen Fällen fertige Gradientengele 10-20%ig von Biorad, in einer Mini-cell II (Biorad, Geldimension ca. 8x10cm x 0,5mm). Bei 200V und 37mA wurden die Kollagen-extrakte und CNBr-Verdaue über die Dauer von 30-40 min aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 30min in 1,25% Coomassie-Lösung gefärbt, und in der Entfärberlösung unter mehrfachem Wechsel der Lösung

3 Material und Methoden

angefertigten SDS-Page-Elektrophoresen zur Kontrolle der Elution kleinere Kollagenfragmente als ca. 6kDa nicht darstellbar waren. Um dieser Fragmente habhaft zu werden, wurde die Gelfiltration mit PD10-Säulen (Pharmacia) eingeführt (vergl. 3.2.7). Eluierte Peptide wurden im 4fachen Volumen kalten Acetons (-20°C) ausgefällt, bei -20°C für 30 min tiefgekühlt, bei 15.000g zentrifugiert und dekantiert. Das abzentrifugierte Peptid wurde in 1ml tiefgekühlter (-20°C) Aceton-Eisessig-Lösung aufgenommen, erneut bei 15.000g zentrifugiert, dekantiert und über Nacht gefriergetrocknet.

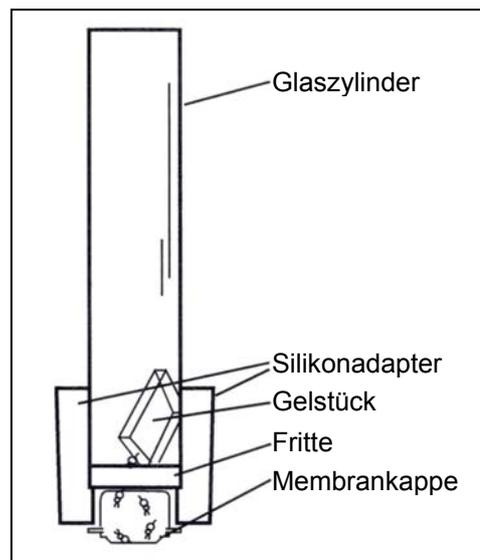


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau der Elektroelution

Nach der Peptidisolation mittels der Elektroelution erfolgte nach anschließender saurer Hydrolyse die Bestimmung der Razemisierungsraten von Asx, Glx und Ser.

3.2.7 Gruppentrennung durch einfache Gelfiltration

Reagenzien zur Gelfiltration

Essigsäure (0,1N) 6ml Eisessig (H_3COOH , 100%ig) ad 1l H_2O bidest.
lösen

Parallel zur Elektrophorese wurden Kollagenverdaue über PD-10 Gelfiltrationssäulen (Pharmacia; Filtermedium Sephadex G-25M) in 15 Fraktionen zu je 1ml aufgetrennt. Dazu wurden Aliquots der Kollagenverdaue in 0,1N Essigsäure gelöst und über Papierfilter grob vorgereinigt. Auf mit 25ml 0,1N Essigsäure equilibrierte PD-10 Gelfiltrationssäulen wurde anschließend das vorfiltrierte Peptidgemisch aufgeladen und mit 15ml 0,1N Essigsäure in Fraktionen (Volumen 1ml) eluiert. Die Bestimmung der relativen Peptidkonzentration erfolgte als Extinktion photometrisch bei 220nm und 280nm Wellenlänge. Nach der Gruppentrennung lagen faktisch eine hochmolekulare Gruppe (Fraktionen 1 bis 3) sowie eine niedermolekulare Gruppe (Fraktionen 6 bis 9) von Kollagenfragmenten vor (Abbildungen 3.8 und 3.9). Aliquots

von je 100-200µl pro Fraktion wurden zur Kontrolle mittels Elektrophorese abgenommen und gemeinsam mit den für die AAR verbleibenden Restproben im Exsikkator getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Hydrolyse der Peptide für die hochdruckflüssigkeits-chromatographische Bestimmung der Razemisierungsgrade von Asx, Glx und Ser.

Die über die gewählten Ansätze präparierten Knochenproteinfraktionen wurden systematisch an den künstlich gealterten Knochenproben (im Hitzeversuch) sowie an den natürlich gealterten Knochenproben (mit bekannter Datierung) untersucht. Anhand dieser Datenserien wurde die Durchführbarkeit sowie die Robustheit der Methode zur Auftrennung der CNBr-Fragmente bestätigt. Für die archäologischen Funde ließen sich definierte Fraktionen zur Untersuchung der Razemisierungsraten eingrenzen.

Verwendete Geräte und Hilfsmittel

- oszillierende Knochensäge, chirurgische Bandsäge
- Bohrmaschine (Fa. Bosch) mit verschiedenen Fräswerkzeugen
- Bohr- und Fräsgerät Micromot 40/E (Proxxon®); zur Aufnahme zahnärztlicher rotierender Werkzeuge (diamantiert, Tungstenkarbid Fa. Meisinger, Neuss)
- Gefriertrocknungsanlage (Fa. Pfeiffer Vakuum), Exsikkatoren und Wasserstrahlpumpen
- hydraulische Presse mit Presswerkzeug (Fa. P-O-Weber)
- Schwingmühle (Fa. Retsch), div. Laborschüttler, Magnetrührer und Vortex-Geräte
- Analysenwaagen (Fa. Sartorius) und Laborzentrifugen (Fa. Kendro, Fa. Eppendorf)
- Blockthermostat mit Abblaseeinrichtung (Fa. Liebisch)
- pH-Meter (Fa. WTW, Modell pH526, Messkette: pH-Elektrode SenTrix61)
- Hybridisierungsöfen (bis 50°C), Trockenschränke (90°C)
- Elektrophoresekammer mit Gießstand, Elektroelutionseinsatz (Fa. Biorad: Protean II Cell; Mini Cell, Electro-Eluter 422), Spannungsquelle
- Digitalkamera zur Dokumentation der Elektrophoreseergebnisse
- Wasseraufbereitungsanlage (Fa. Millipore)

3.3 Gas- und hochdruckflüssigkeitschromatographische Analytik

3.3.1 Gaschromatographie (GC)

3.3.1.1 Hydrolyse und Derivatisierung

Reagenzien zur Hydrolyse und Derivatisierung

Alle Reagenzien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe verwendet.

Salzsäure (zur Hydrolyse)	6N Salzsäure (6mol HCl ad 1l in H ₂ O bidest. lösen)
Derivatisierung	Isopropanol (2-Propanol, CH ₃ CH(OH)CH ₃) Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) konz. 4N Ammoniumhydroxid- Lösung (4mol NH ₄ OH in 1l H ₂ O bidest. lösen) Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂) TFAA (Trifluoressigsäureanhydrid) (C ₄ F ₆ O ₃)

Reagenzien zur Gaschromatographie

Lösungsmittel	Chloroform (CHCl ₃) zum Lösen und Injizieren der Proben
Trärgase	H ₂ , N ₂ , O ₂

Einwaagen:

Gesamtfraktion	10mg;
Nicht-Kollagenfraktion	gesamter gefriergetrockneter Rückstand
Kollagenfraktion	2mg
Leaching (bei Hitzeexperimenten):	gefriergetrockneter Rückstand von 5-7ml Flüssigkeit.

Zur Auftrennung chiraler Aminosäurengemische werden in der modernen Gaschromatographie häufig Säulen mit chiral beschichteter stationärer Phase verwendet. Eine der weit gebräuchlichen stationären Phasen mit guter Trennung und Thermostabilität besteht aus *N*-propionyl-L-Valin-tert-butylamid, welches an ein Copolymer aus Carboxyalkylmethylsiloxan/Dimethylsiloxan gekoppelt wird (Frank et

al. 1977). Vor der Trennung werden die Proteine in 1-2ml 6N HCl für exakt 6h bei 100°C hydrolysiert, dieses Verfahren wird zur Peptidaufarbeitung für beide chromatographischen Analysemethoden verwendet. Strenge Einhaltung des standardisierten Hydrolyseprotokolls verringert den Einfluss der Hydrolyse auf die Razemisierung und aufwändige Korrekturen können vermieden werden (Ritz-Timme *et al.* 2000). Der Anstieg der Razemisierungsrate ist positiv korreliert mit der Temperatur und der Dauer der Hydrolyse (Csapo *et al.* 1997). Die erkalteten und getrockneten Hydrolysate werden in anschließenden Derivatisierungs- und Reinigungsschritten in leichter-flüchtige N(O,S)-TFA-isopropylester überführt, die gaschromatographisch trennbar und mittels Flammenionisationsdetektor (FID) analysierbar sind.

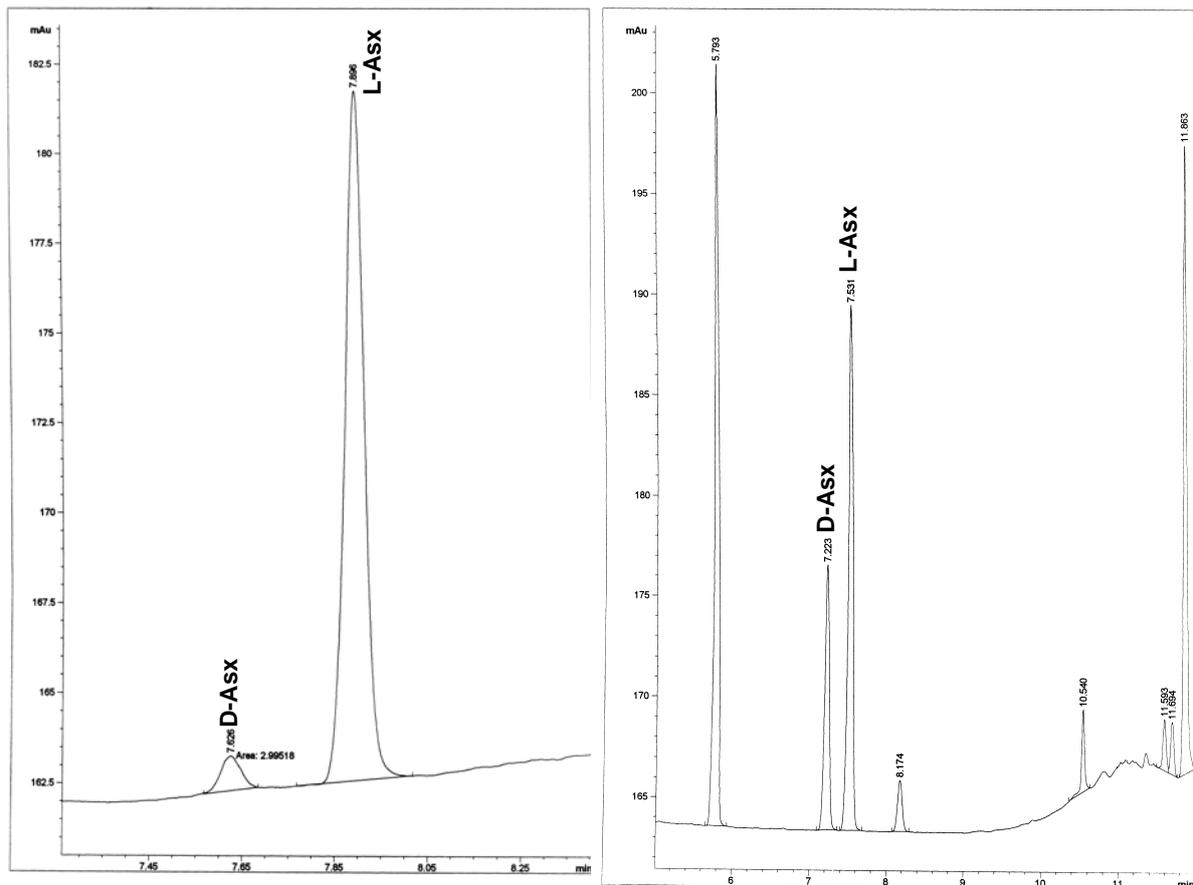
Die Probenvorbereitung für die gaschromatographischen Untersuchungen folgten den standardisierten Protokollen nach Ritz *et al.* (1993) resp. Ritz-Timme (2000), die einzelnen präparativen Schritte werden im Weiteren kurz skizziert:

Die Spaltung der Peptidbindungen zur Freisetzung von Asparagin/Asparaginsäure aus den Proteinen oder Peptiden erfolgte durch unvollständige, saure Hydrolyse bei 100°C in 6ml 6N HCl für 6h.

Die gefriergetrockneten Rückstände wurden in fest verschließbaren Pyrex®-röhrchen in je 1ml Isopropanol und 100µl H₂SO₄ konz. aufgenommen und für exakt 1h bei 110°C in einem Heizblock verestert, das organische Lösungsmittel wurde anschließend im Luftstrom abgeblasen. Zur Reinigung wurden die Reaktionsansätze durch Zugabe von 1ml 4N NH₄OH-Lösung auf einen alkalischen pH gebracht. Anschließend wurden je 1ml Dichlormethan hinzugegeben, gut geschüttelt, 5min bei 5000 U/min zentrifugiert und die jeweils untere Phase in neue Pyrexröhrchen gefüllt, danach wieder im Luftstrom getrocknet. Zur Derivatisierung in ihre jeweiligen TFA-Isopropylester wurde der trockene AS-Rückstand in 1ml Dichlormethan aufgenommen und je 50µl TFAA hinzupipettiert, in fest verschlossenen Pyrex®-röhrchen bei 60°C für exakt 15min acetyliert und im Anschluss wieder im Luftstrom getrocknet. Zur Qualitätskontrolle der Analytik und zur Identifikation der Signale anhand der Retentionszeiten (Abbildung 3.4) wurden zusammen mit den Proben jeweils Asparaginsäurestandards unterschiedlicher Konzentration und Enantiomerenzusammensetzung simultan als externe Standards derivatisiert (Ritz-Timme 2000).

3 Material und Methoden

Die Trennung und Analyse der Enantiomere erfolgte aus 1µl injizierten Probenvolumens auf Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektoren (FID) (Shimadzu GC9, Split 1:50) mittels einer chiralen Säule (Chirasil-L-Val, Chrompack, Frankfurt; Länge 25m, Innendurchmesser 0,25mm), als Trägergas wurde Wasserstoff mit einem Druck von 0,5bar eingesetzt. Einlass- und Detektortemperatur waren auf 200°C eingestellt, die Temperatur während eines Messlaufs wurde wie folgt programmiert: Start bei 130°C (isotherm), nach 9min Temperaturerhöhung mit einer Rate von 20°C/min bis auf 160°C, halten dieser Temperatur für die Dauer von 8min, danach Abkühlen auf 130°C bis zur Temperaturkonstanz. Identifiziert wurden die Signale anhand der Retentionszeiten der Reinsubstanzen, die Bestimmung des D/L-Asx-Verhältnisses erfolgte über die Flächen unter den Signalen, das L-Enantiomer wurde gleich 100% gesetzt (Ritz-Timme *et al.* 2003).



a) Standard, 0,15% D-Asx

b) Kollagen, Tage bei 90°C inkubiert

Abbildung 3.4: Beispielchromatogramme zur gaschromatographischen Analytik von D/L-Asx; Identifikation von D- und L-Asparaginsäure

3.3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Reagenzien zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Alle Reagenzien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe verwendet.

Probenpuffer	100ml 0,01M HCl (ad 100ml H ₂ O bidest.), darin 9,75mg NaN ₃ und 0,03mMol L-homo-Arginin lösen
Kaliumboratpuffer (1M, pH 10,4)	6,184g Borsäure (BH ₃ O ₃) in 80ml H ₂ O bidest. lösen, mit 5M KOH auf pH 10,4 einstellen, ad 100ml mit H ₂ O bidest. auffüllen
Derivatisierungsreagenz (2ml)	170mMol (45,594mg) <i>ortho</i> -Phthaldialdehyd und 260mMol (49,725mg) Iso-butyryl-L-cystein in 2ml Kaliumboratpuffer lösen, anschließend in Probengefäße mit 200µl-Einsatz füllen, bei -20°C bis 3 Monate haltbar
Eluent A (2l)	23mMol (3,773g) Natriumacetat (CH ₃ COO ⁺ Na ⁻), 1,5mMol (0,195g) Natriumazid (NaN ₃) und 1mMol (0,750g) EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ x 2H ₂ O) in 2l H ₂ O bidest. lösen, mit 10% Essigsäure (CH ₃ COOH) auf pH 6,00 einstellen
Eluent B (1,08l)	1l Methanol (H ₃ COH) mit 83,4ml Acetonitril (CH ₃ CN) mischen
Standard-Aminosäuren	D-Alanin, L-Alanin, D-Arginin, L-Arginin, D-Asparaginsäure, L-Asparaginsäure, D-Glutaminsäure, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Isoleucin, D-Leucin, L-Leucin, D/L-Methionin, L-Methionin, D/L-Phenylalanin, L-Phenylalanin, D-Serin, L-Serin, D-Threonin, L-Threonin, D/ L-Tyrosin, L-Tyrosin, D-Valin, L-Valin

Im Gegensatz zu den gaschromatographischen Verfahren haben sich in der HPLC nicht-chirale stationäre Phasen etabliert, die als stationäre Umkehrphasen (RP-HPLC) chirale Aminosäurenderivate in einem Lösungsmittelgradienten trennen.

3 Material und Methoden

Zur AS-Analyse wird auch hier das hydrolysierte Protein eingesetzt. Aufgrund geringer chemischer Stabilität der Derivate wurden Methoden zur Vorsäulenderivatisierung entwickelt, das heißt hier, das Aminosäurengemisch wird direkt vor der chromatographischen Auftrennung mit einem programmierbaren Probengeber in die nachweisbare Verbindung überführt. Die Analyse erfolgt hauptsächlich über UV-Detektoren, in denen mit kurzwelligem UV-Licht spezifische Bindungen zur Fluoreszenz angeregt werden, die Intensität und Qualität der Fluoreszenz wird analysiert. Gebräuchliche Verfahren verwenden *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) in Verbindung mit chiralen Thiolen, z.B. N-Isobutyryl-L-Cystein (IBLC) (Brückner *et al.* 1991) oder N-Acetylcystein (Nimura *et al.* 1984). Das zugrundeliegende Reaktionsschema ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

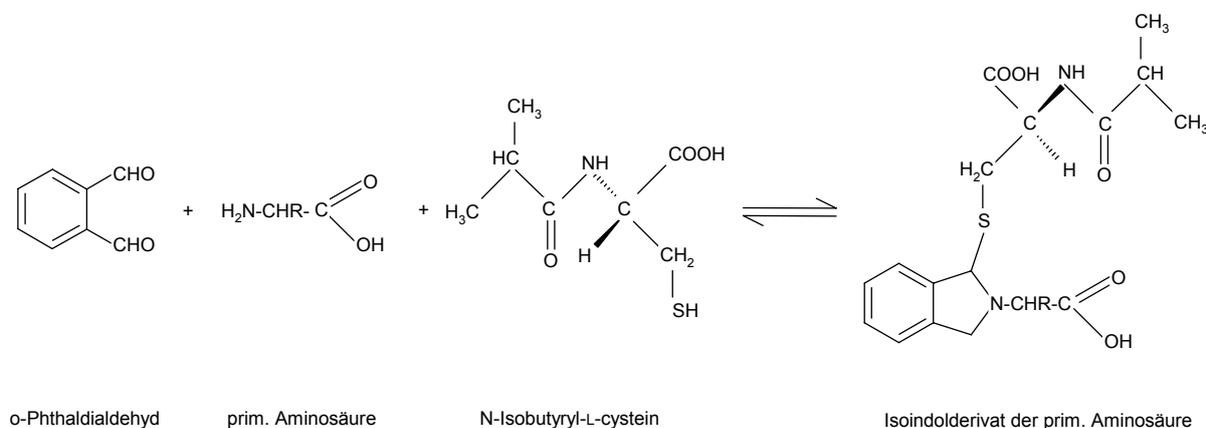


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der OPA/IBLC-Derivatisierung einer primären Aminosäure

Das nicht fluoreszierende OPA bildet im alkalischen Milieu in Gegenwart von Thiolen ein fluoreszierendes Isoindolringsystem. Der Aminostickstoff wird bei dieser Reaktion zu einem Pyrrolring umgesetzt, daher ist die Reaktion spezifisch für primäre Amine, mit sekundären Aminen wie z.B. Pro und Hyp erfolgt keine Umsetzung (Roth 1971). In der vorliegenden Arbeit wurde mit einigen Abwandlungen der Methode zur Vorsäulenderivatisierung mit OPA/IBLC nach Kaufmann & Manley (1998) gefolgt (Beschreibung der Methode s.u.). Je nach Alter und überstandener Analysenanzahl der HPLC-Säule lassen sich derart 10 Enantiomerenpaare nebeneinander in einer Analyse bestimmen.

Die HPLC-Ausrüstung bestand aus einem Agilent1100Series-System ausgerüstet mit quaternärer Pumpe, Vakuumentgaser, automatischen Probengeber, Säulenthermostat sowie einem programmierbarem Fluoreszenzdetektor (FLD). Die Analyse der AS-Enantiomenderivate erfolgte nach Kaufmann & Manley (1998) mit

3 Material und Methoden

den nachfolgenden Modifikationen: Als stationäre Phase wurden RP-HPLC-Säulen von Thermo-Electron Corporation mit den Spezifikationen BDS Hypersil C18, Größe 250x3mm, Partikelgröße 5µm, verwendet. Die Elution der Aminosäurederivate erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 0,56ml/min und bei 25±1°C über die Dauer von 90min unter Verwendung eines Gradienten aus 23mMol Natriumacetat (Eluent A, 95-48%) und Methanol/Acetonitril (Laufmittel B, 5-52%) als mobiler Phase. Im Anschluss wurde die Säule für 10min mit einem Gemisch aus 5% A und 95% B gereinigt und 10 min equilibriert (95% A, 5% B). Der Fluoreszenzdetektor wurde auf die Anregungswellenlänge von $\lambda=230\text{nm}$ und Detektionswellenlänge von $\lambda=445\text{nm}$ eingestellt. Identifiziert wurden die Signale anhand der Retentionszeiten der Standardreinsubstanzen in externen Standards. Die Derivatisierung der Proben erfolgte in der Probenkapillare des automatischen Probengebers direkt vor der Analyse. Insgesamt wurden jeweils 2µl der Analysesubstanz mit 2,2µl OPA/IBLC-Lösung zur Reaktion gebracht. Nicht umgesetztes OPA/IBLC stört die Analyse nicht, da lediglich das Isoindolderivat der primären AS fluoresziert (siehe 2.1.5.2). Typische Beispiele für HPLC-Chromatogramme der Aminosäurestandards und der Kollagenhydrolysate geben Abbildungen 3.6 a und b.

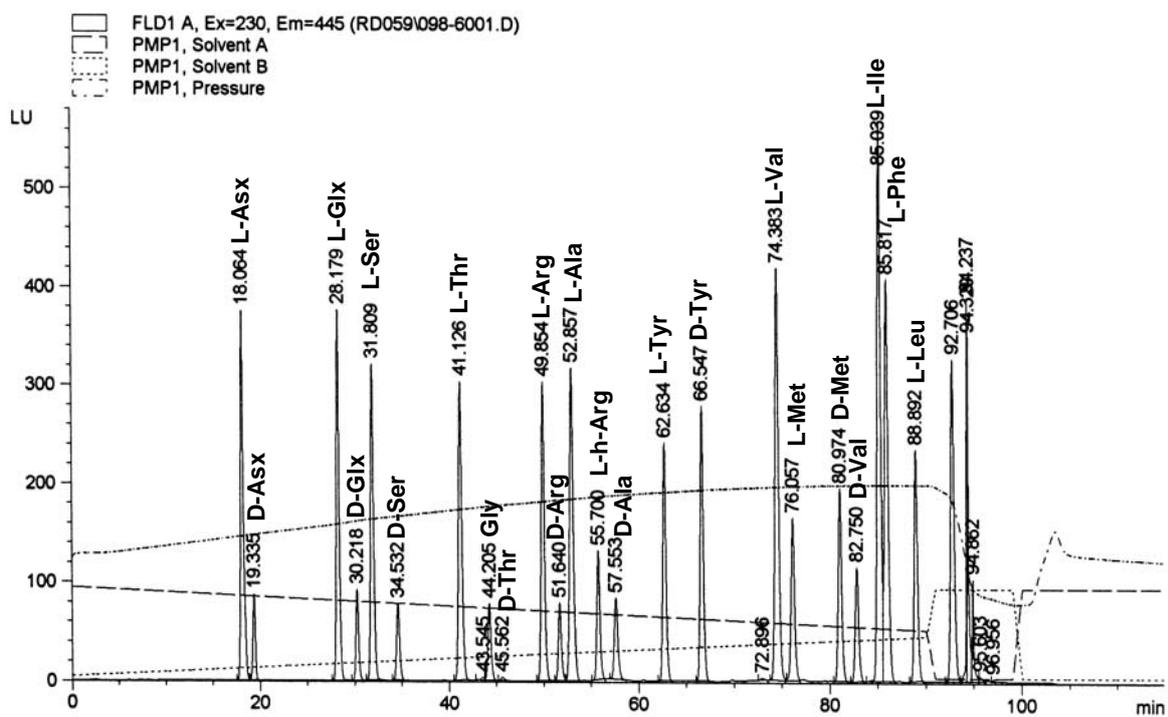


Abbildung 3.6a: Auftrennung eines d/l-Aminosäurenstandards, HPLC, Identifizierung anhand der Reinsubstanzen

3 Material und Methoden

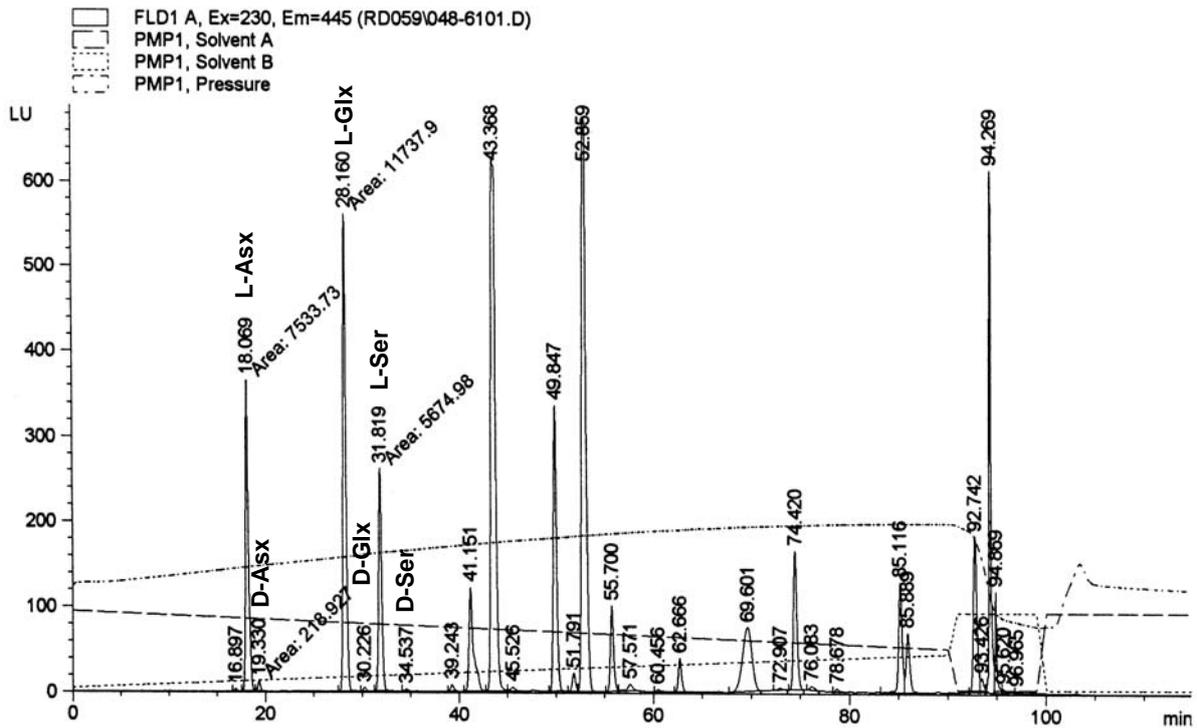


Abbildung 3.6b: Auftrennung eines Kollagenhydrolysats (CF), HPLC

Abbildung 3.6 a, b: Hochdruckflüssigkeitschromatographische Auftrennungen; a) eines D/L-Aminosäurenstandards und b) eines Kollagenhydrolysats, analysiert bei 230nm Anregungswellenlänge und 445nm Emissionswellenlänge. Die Identifikation erfolgte anhand der Retentionszeiten der Reinsubstanzen, bei der Auswertung werden den Signalen automatisch die Retentionszeiten und die Flächen unter den Signalen zugeordnet; zur Kontrolle der Qualität der Chromatographie wurde jeweils der Verlauf der Eluentengradienten und des Drucks aufgezeichnet.

In Tabelle 3.3 wird das Programm des automatischen Probengebers zusammengefasst. Die Quantifizierung der Enantiomeren erfolgte nach der Integration der Flächen unter den Signalen mit der HPLC-Steuerungs- und Analysesoftware „HPChemStation“. Die Bestimmung des D-/L-Aminosäurenverhältnisse erfolgte analog zur Auswertung der GC-Daten, das L-Enantiomer wurde gleich 100% gesetzt, das D-Enantiomer dazu ins Verhältnis (Ritz-Timme *et al.* 2003).

3 Material und Methoden

Tabelle 3.3: Programmierung der Injektorsequenz des automatischen Probengebers

Schritt Nr.	Befehl	ausgelöste Aktion
1	Draw 0.0 µl from vial 88	Injektionsnadel in Waschgefäß Nr. 88 spülen
2	Draw 1.1 µl from vial 87	1,1µl OPA/IBLC-Lösung aus Gefäß Nr. 87 aufziehen
3	Draw 0.0 µl from vial 88	Injektionsnadel in Waschgefäß Nr. 88 spülen
4	Draw 2.0 µl from sample	2,0 µl aus dem Probengefäß aufziehen
5	Draw 0.0 µl from vial 88	Injektionsnadel in Waschgefäß Nr. 88 spülen
6	Draw 0.0 µl from vial 89	Injektionsnadel in Waschgefäß Nr. 89 spülen
7	Draw 1.1 µl from vial 87	1,1µl OPA/IBLC-Lösung aus Gefäß Nr. 87 aufziehen
8	Draw 0.0 µl from vial 88	Injektionsnadel in Waschgefäß Nr. 88 spülen
9	Draw 0.0 µl from vial 89	Injektionsnadel in Waschgefäß Nr. 89 spülen
10	Mix 2.0 µl in seat, 200µl/min speed, 13 times	Aufgezogene Flüssigkeiten werden zur Durchmischung 13x in der Probenkapillare hin- und herbewegt
11	Wait 2 min	Derivatisierung,
12	Inject	Injektion der Probe in den Analysengang

3.4 Aminosäurenprofile

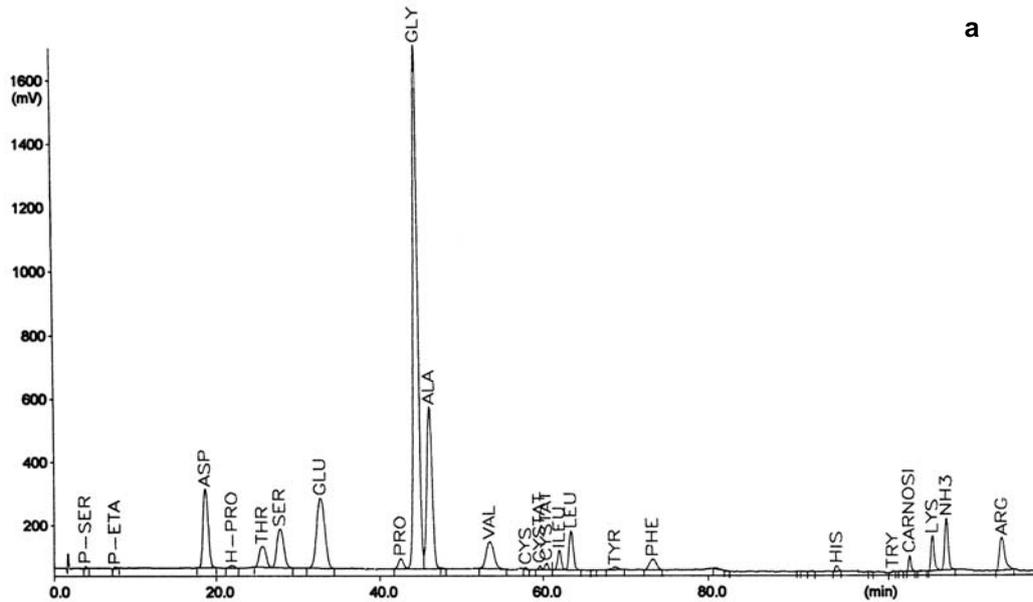
Zur genaueren Charakterisierung sowie zur Qualitätssicherung der Kollagenaufreinigung wurde das Aminosäurenlabor der Kinderklinik des UK-S.-H. Campus Kiel mit der Erstellung von Aminosäurenprofilen für ausgewählte Kollagenproben beauftragt. Als Referenz zur Charakterisierung der kollagenen Fraktion und der daraus erhobenen AS-Profile wurden die Primärstrukturen humanen α -1(I)- und α -1(II)-Kollagens (Miller 1984) herangezogen. Die vorbereitende Hydrolyse des Kollagens allerdings erfolgte im eigenen Labor. Im Gegensatz zur Analytik der D/L-Enantiomere vorbereitenden Hydrolyse wurden die Kollagenproben in fest verschlossenen Pyrex®röhrchen in 1ml 6N HCl für 24h bei 110°C inkubiert, um das Kollagen vollständig zu hydrolysieren. Im Anschluss erfolgte die Trocknung *in vacuo*. Die Aminosäuren wurden mittels Kationenaustausch-Chromatographie getrennt und photometrisch anhand der Reaktion mit Ninhydrin bei 570nm und 440nm (zur Quantifizierung von Pro und Hyp) auf einem Eppendorf/Biotronic Amino Acid

3 Material und Methoden

Analyser LC 3000 quantitativ analysiert (siehe Abbildung 3.7). Mit dieser Methode wurden die physiologischen Aminosäuren erfasst.

Data Handling file: 570NM

Calculation file : 570NM



Data Handling file: 440NM

Calculation file : 440NM

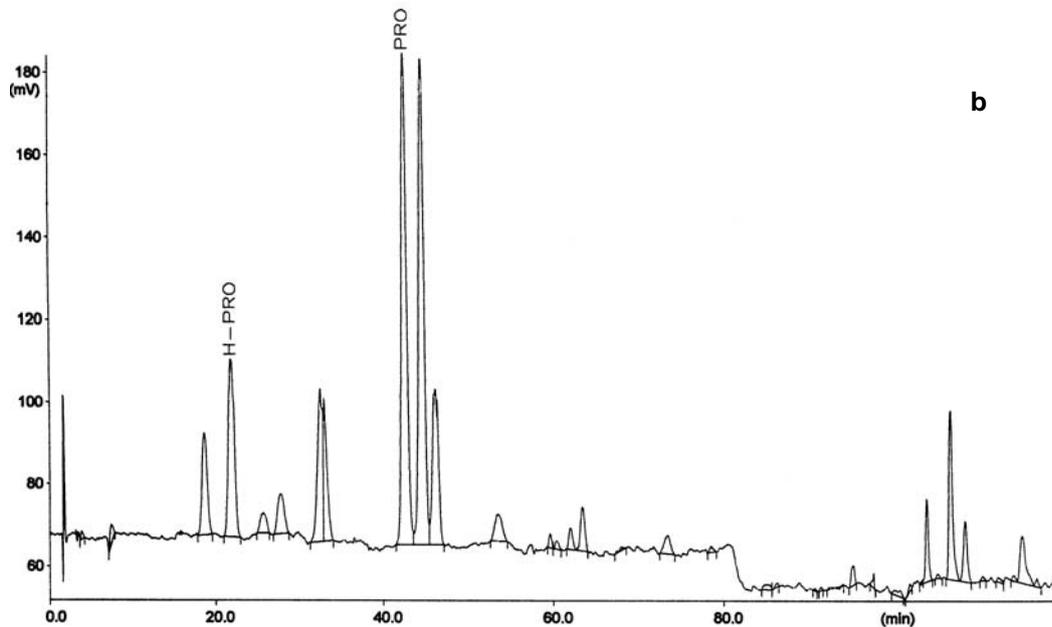


Abbildung 3.7: Chromatogramme zur Quantifizierung der Aminosäurezusammensetzung am Beispiel einer degradierten Kollagenfraktion.

- Auftrennung physiologischer Aminosäuren bei 570nm (ohne Prolin und Hydroxyprolin),
- Auftrennung und Analyse von Prolin und Hydroxyprolin bei 400nm.

3.5 Radiokarbon-Datierungen mittels AMS

Ein Großteil der historischen und archäologischen Knochenfunde (sämtliche übersandten Funde des Landesamtes für Archäologie, Sachsen-Anhalt, die Bison-Funde aus Nordamerika und Asien sowie vier Skelettfragmente von verschiedenen Grabungsstellen des Fundkomplexes Flensburg) wurde als Auftragsarbeit zur ^{14}C -AMS-Datierung an das Leibniz-Labor für Altersbestimmung und Isotopenforschung, Christian-Albrechts-Universität, Kiel überstellt. Die dort erhobenen Daten sowie die übrigen Datierungen der Knochenfunde sollten der AAR-Datierung zur Kalibrierung dienen. Die Datierung der historischen Knochenfunde erfolgte auf der Basis des Isotopenverhältnisses des Kohlenstoffs aus isoliertem Kollagen.

4 Ergebnisse

Die geplante Revision der Aminosäuredatierung sollte sich auf die Untersuchung möglichst definierter Knochenproteinfraktionen stützen. Entsprechend wurden im Rahmen des Projektes Verfahren zur Präparation möglichst definierter Knochenproteinfraktionen entwickelt und die präparierten Fraktionen im Hinblick auf ihre Brauchbarkeit für die Aminosäuredatierung untersucht: Das Projekt umfasste 3 Abschnitte:

- Systematische Untersuchungen zu Möglichkeiten der Präparation definierter Knochenproteinfraktionen
- Erhebung von Daten zur Kinetik der Aminosäurenrazemisierung in präparierten Proteinfraktionen aus experimentell degradierten Knochenproben (Hitzeexperimente)
- Prüfung des Zusammenhangs zwischen dem Alter sicher datierter Knochenproben und der AAR in den präparierten Knochenproteinfraktionen (Untersuchung natürlich degradierter Knochen)

4.1 Ergebnisse systematischer Untersuchungen zu Möglichkeiten der Präparation definierter Knochenproteinfraktionen

Es wurden zwei Ansätze verfolgt (vgl. Abbildung 2.1):

- Präparation von säurelöslichen (NCF) und säureunlöslichen Knochenproteinfraktionen (CF) durch einfache Säureextraktion
- Präparation definierter Kollagenfragmente nach Spaltung durch Cyanbromid (CNBr)

4.1.1 Präparation von säurelöslicher, nicht-kollagener (NCF) und säureunlöslicher, kollagener (CF) Knochenproteinfraktion

Die CF-Fraktion erwies sich im Hitzeexperiment sowie bei natürlich gealterten Knochenproben als relativ robust – jedenfalls, soweit dies mit Aminosäureanalysen erfassbar ist.

Im Hitzeexperiment stimmten die AS-Profile bis zum Tag 12, entsprechend einem Kollagenanteil von 3,4%, weitestgehend miteinander überein und repräsentierten die für Kollagen I typische AS-Komposition. Nach 12- bis 20-tägiger Inkubation bei 90°C schritt

die Degradation so weit fort, dass schließlich ab Tag 20 (Kollagenanteil 0,4%) das AS-Profil deutlich von dem intakten Kollagens abwich. Bezogen auf Gly waren, bis auf OH-Pro, Pro, Cys und Met, die übrigen AS unterschiedlich hoch angereichert (Abbildung 4.1).

Auch die Aminosäurenkomposition des Kollagens der natürlich gealterten Knochenproben erwies sich als relativ stabil. Abbildung 4.2. stellt Daten für Knochen mit Liegezeiten von bis zu 5000 Jahren dar; obwohl der Kollagengehalt bei diesen Proben bis auf bis zu 2% gesunken war, fand sich in allen Proben ein typisches kollagenes Muster der Aminosäuren. Von älteren Funden lag für die Erstellung des Aminosäurenprofils häufig nicht genügend Material zur Untersuchung vor. Als Referenzkollagen wurde die aus rezemtem Knochengewebe mit identischer Präparationsmethode extrahierte kollagene Fraktion gewählt. Die gute Übereinstimmung mit der Literatur war auch hier gegeben (vergl. 4.1.2).

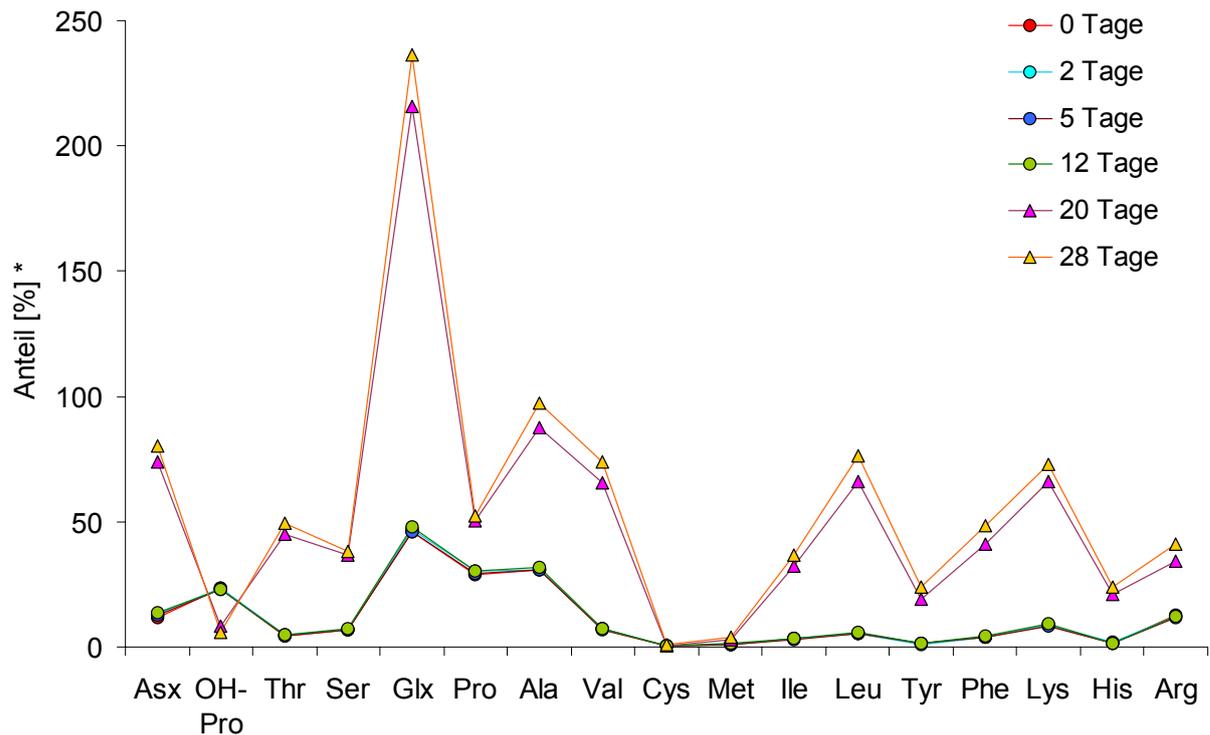


Abbildung 4.1: Aminosäurenkomposition der CF nach temperaturinduzierter Kollagendegradation (*Darstellung in Relation zum Glycingehalt (= 100%); „Tage“= Anzahl der Hitzeexpositionstage bei 90°C); die gezogenen Linien dienen der besseren Übersichtlichkeit in der Darstellung): Erst nach 20 Tagen Hitzeexposition (nach Abfall des Kollagengehalts auf unter 0,4%) zeigen sich deutliche Veränderungen der Aminosäurenkomposition (dreieckige Symbole) gegenüber den einheitlichen vorherigen Tagen 0-12 (runde Symbole). Die AS-Kompositionen von humanem α -1(I) und α -1(II) Kollagen wurden nach Sequenzierungsdaten von Miller (1984) kalkuliert, und stimmen mit der Zusammensetzung von nicht degradiertem Kollagen so gut überein, dass zur verbesserten Übersichtlichkeit auf ihre Darstellung verzichtet wird.

4 Ergebnisse

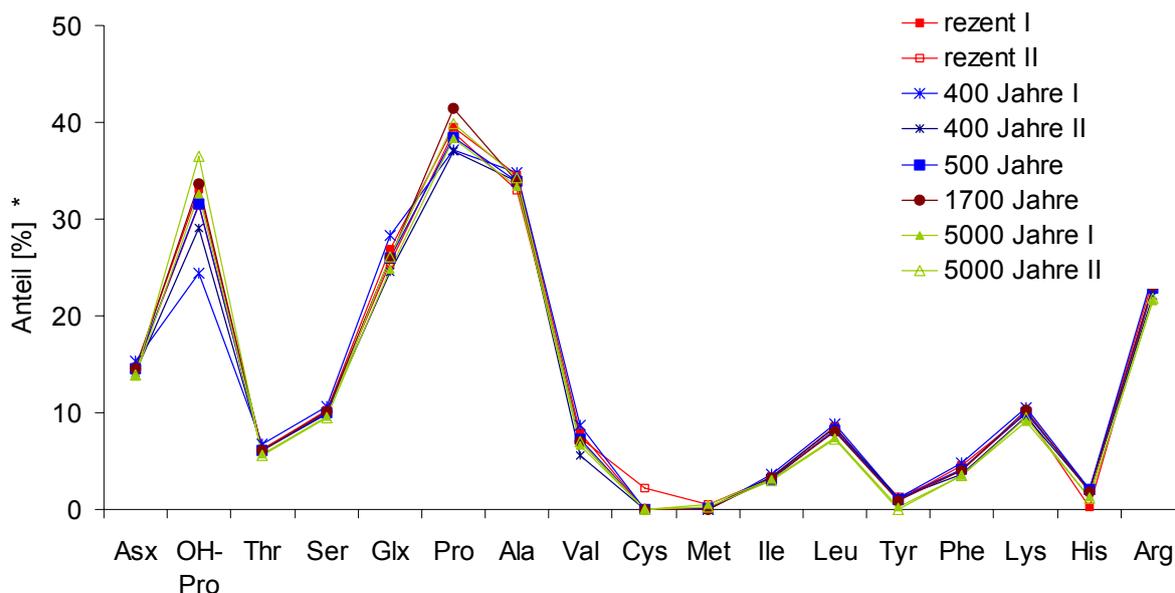


Abbildung 4.2: Aminosäurenkomposition der CF bei natürlich gealterten Knochen (*Darstellung in Relation zum Glycingehalt (= 100%), die gezogenen Linien dienen der besseren Übersichtlichkeit in der Darstellung): Bei den hier untersuchten Proben ist kein Anhaltspunkt für eine wesentliche Veränderung der Aminosäurenkomposition ersichtlich (Kollagengehalte zwischen 2 und 23%).

4.1.2 Cyanbromid(CNBr)-Fragmente des Kollagens

4.1.2.1 Trennung und weitere Präparation der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente mittels Elektroelution

Bei den hitzedegradierten Proben ließ sich in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-Page) ein typisches und hoch reproduzierbares Bandenmuster darstellen, sofern noch Reste intakten Kollagens aus Knochen präparativ als CF isolierbar waren (bis zu einem Kollagenanteil von 0,1%). Abbildung 4.3 stellt das charakteristische Elektrophoresemuster der CNBr-Peptide aus Kollagenmaterial nach Hitzeexposition bei 90°C dar.

Wie bei künstlicher Degradation im Hitzeexperiment konnte elektrophoretisch bei zahlreichen natürlich gealterten Kollagenproben nach Cyanbromidsplaltung ein typisches Kollagenfragmentmuster unabhängig von der Kollagenausbeute erzeugt werden (Abbildung 4.4). Einige archäologische Funde, darunter die ältesten (Mammut und dem Ur aus dem Pleistozän Großbritanniens), ließen sich, unabhängig von der Kollagenextraktion, auch in wiederholten Elektrophoreseansätzen elektrophoretisch nicht darstellen. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Kollagenausbeute und dem Erfolg der Darstellung der CNBr-Fragmente.

4 Ergebnisse

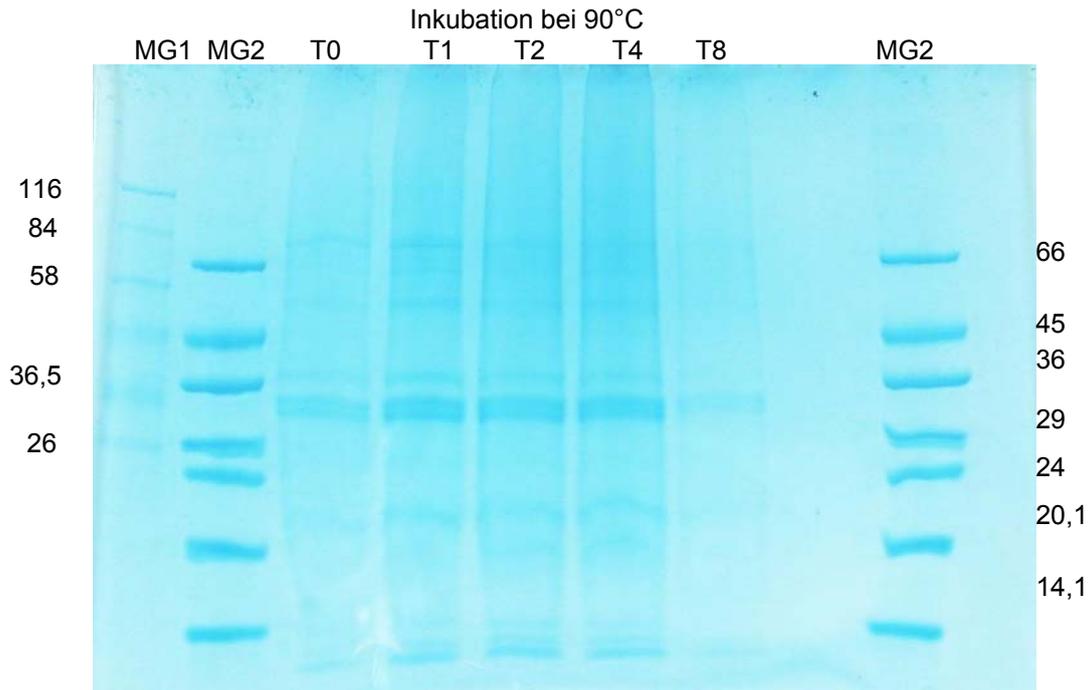


Abbildung 4.3: Elektrophoretische Darstellung der Kollagenfragmente nach Cyanbromidspaltung bei zunehmender Proteindegradation bei 90°C im Hitzeexperiment (10-20% Gradientengel mit 4% Sammelgel, Coomassie-Färbung). **MG1, 2:** Molekulargewichtsmarker (kDa); **T0, T1, T2, T8:** Kollagenfragmente nach Inkubation über 0, 1, 2 und 8 Tage im Hitzeexperiment. Zumindest bis zu einem Kollagengehalt von ca. 0,42% am Tag 8 (**T8**) (Ausgangswert am Tag 0: 23%) fand sich ein für frische Knochenproben charakteristisches Bandenmuster.

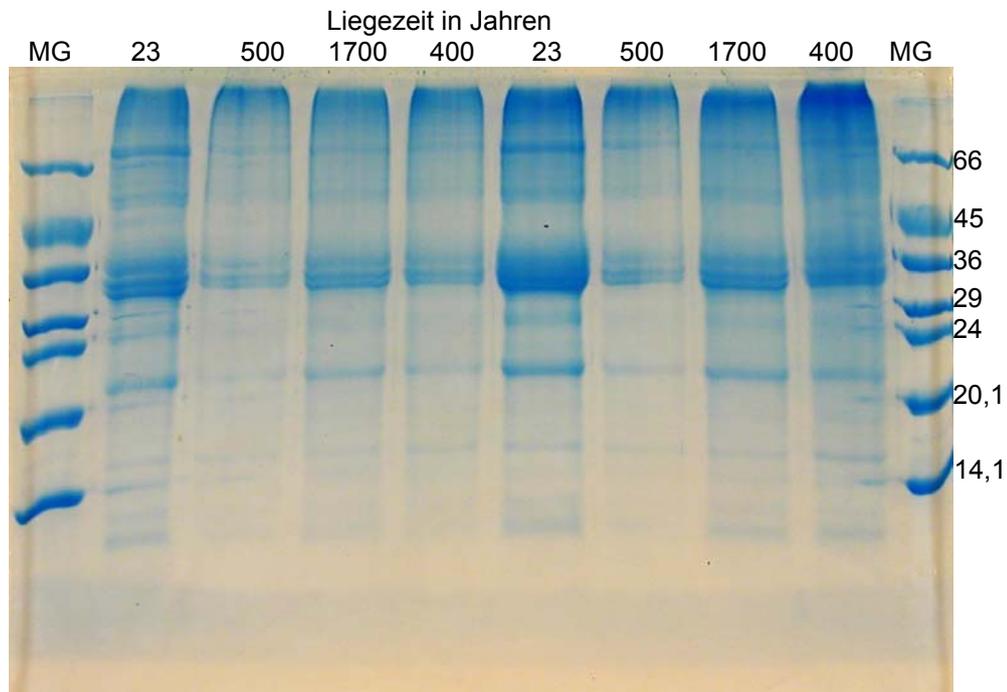


Abbildung 4.4: Elektrophoretische Darstellung des Gesamt-Kollagenfragmentmusters natürlich gealterter Knochenproben nach Cyanbromidspaltung (15% Gel, Coomassie-Färbung). **MG:** Molekulargewichtsmarker (kDa); 23, 500, 1700, 400: Liegezeit in Jahren. Das Bandenmuster entspricht jeweils dem eines rezenteren Knochens (vgl. Abbildung 4.3, T0).

4 Ergebnisse

Auf der Suche nach möglicherweise hochkonzentrierten Peptiden im Kollagen wurden Banden zur Elektroelution ausgewählt, die sich 1) sauber getrennt von benachbarten Banden darstellen ließen und 2) auch bei fortgeschrittener Degradation stets nachweisbar waren (Abbildung 4.4). Die Banden 2, 4, 5-1 und 6 (gekennzeichnet in Abbildung 4.5) erfüllten zunächst diese Voraussetzungen weitestgehend, allerdings waren Bande 2 und 4 zu dicht von benachbarten Banden umgeben, wodurch eine saubere Präparation in vielen Fällen nicht garantiert war. Daher wurde im weiteren Verlauf der Fokus auf die Isolation der in den Banden 5-1 und 6 enthaltenen Peptide mittels Elektroelution (vgl. Abbildung 3.1) gelegt.

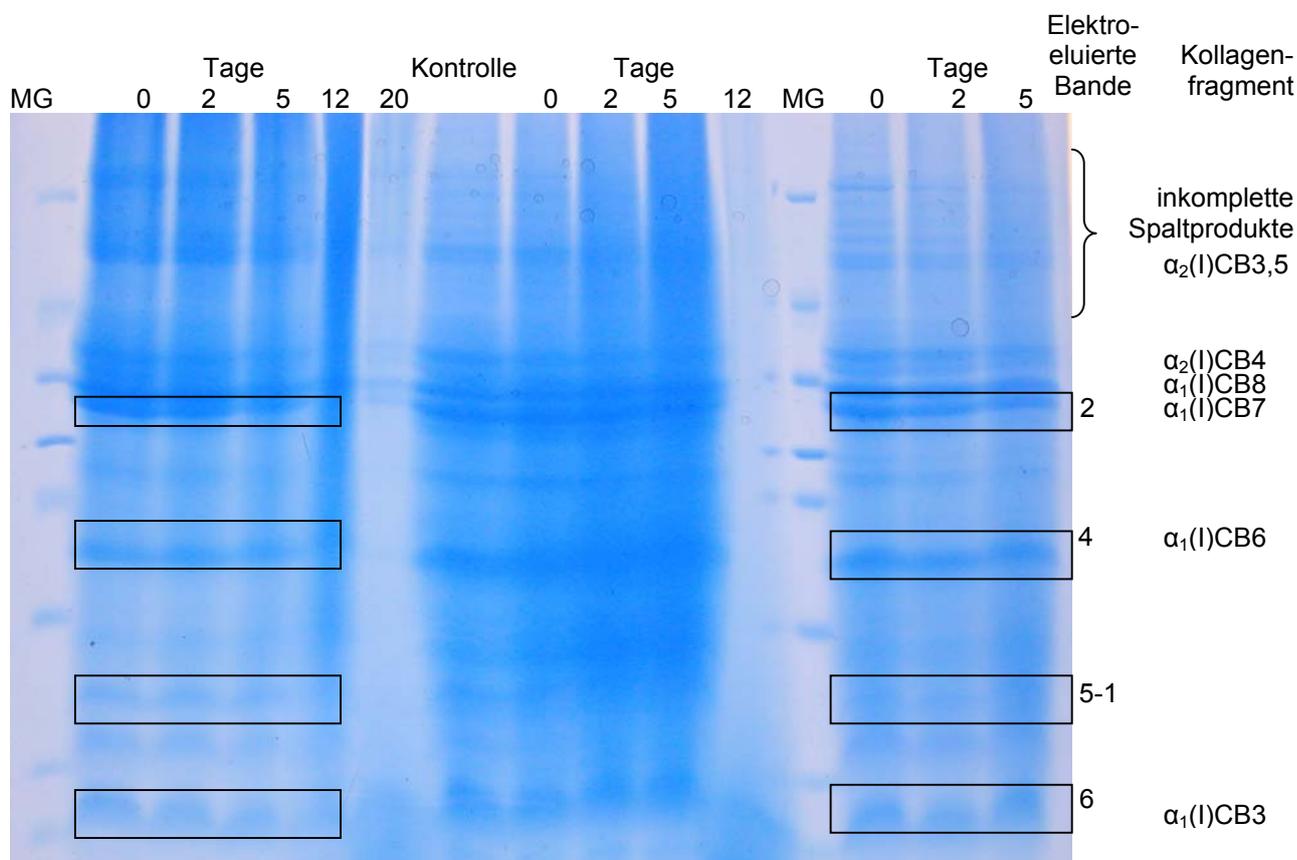


Abbildung 4.5: Präparation der mittels Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente durch Elektroelution aus elektrophoretisch dargestellten Banden (nach 2 bis max. 20 Tagen Hitzeexposition bei 90°C, Tag 0 dient als nicht-degradierte Referenz): Die markierten Banden 2, 4, 5-1 und 6 wurden wegen ihrer gut reproduzierbaren Darstellbarkeit für die Elektroelution (vgl. Abschnitt 2.2.6) ausgewählt, rechts außen: Nomenklatur der CNBr-Peptide (präparatives Gel: 12,5% Trenngel, 4% Sammelgel, Coomassie-Färbung; Kollagenfragmente nach Cyanbromidspaltung bei zunehmender Proteindegradation in drei Hitzeexperimenten, MG: Molekulargewichtsmarker (Zuordnung vgl. Abbildungen 4.3 und 4.4)).

4.1.2.2 Gruppentrennung der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente über das Molekulargewicht (PD-10-Säulen)

Durch die fraktionierte Gruppentrennung nach Molekulargewicht (vgl. 2.2.7) konnten mit geringem apparativen Aufwand bei gleichzeitig hohem Materialdurchsatz reproduzierbare Trennungen erzielt werden. Die Einteilung der Fraktionen erfolgte nach den Extinktionskurven und den eluierten Volumina, wobei die Peptide mit absteigender Größe getrennt eluieren; ab Fraktion Nr. 13 ist in der Masse aller CNBr-Präparationen kein Peptid mehr in der Lösung nachzuweisen (Abbildung 4.6). Die Kontrolle der Peptidgröße in den einzelnen Fraktionen anhand von SDS-Page-Elektrophoresen zeigte, dass die im niedermolekularen Bereich eluierenden Peptide sich in der Größenordnung zwischen 6 und 10 kDa bewegen (Abbildung 4.7). Damit sind sie jedenfalls nach ihrem Molekulargewicht weitestgehend identisch mit den unter den Banden 5-1 und 6 befindlichen Peptiden. Eine abschließende Bestätigung der Identität, z.B. über die Aminosäuresequenz dieser Peptide, konnte nicht erbracht werden, da kein ausreichendes Material für weiterführende Untersuchungen verfügbar war.

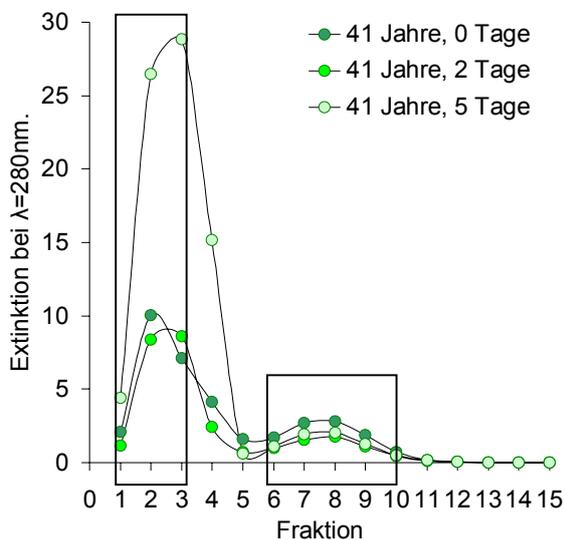


Abbildung 4.6: Exemplarische Darstellung der relativen Peptidkonzentration nach Gruppentrennung der CNBr-Kollagenfragmente mittels PD10-Säulen anhand der Extinktion von UV-Licht bei 280 nm. Fraktionen 1-5 enthalten vorwiegend die hochmolekularen, die folgenden bis Fraktion 11 die niedermolekularen Peptide, im wesentlichen mit MG von <3,5 kDa. Diese sind in Abbildung 4.12 detaillierter aufgeführt.

4 Ergebnisse

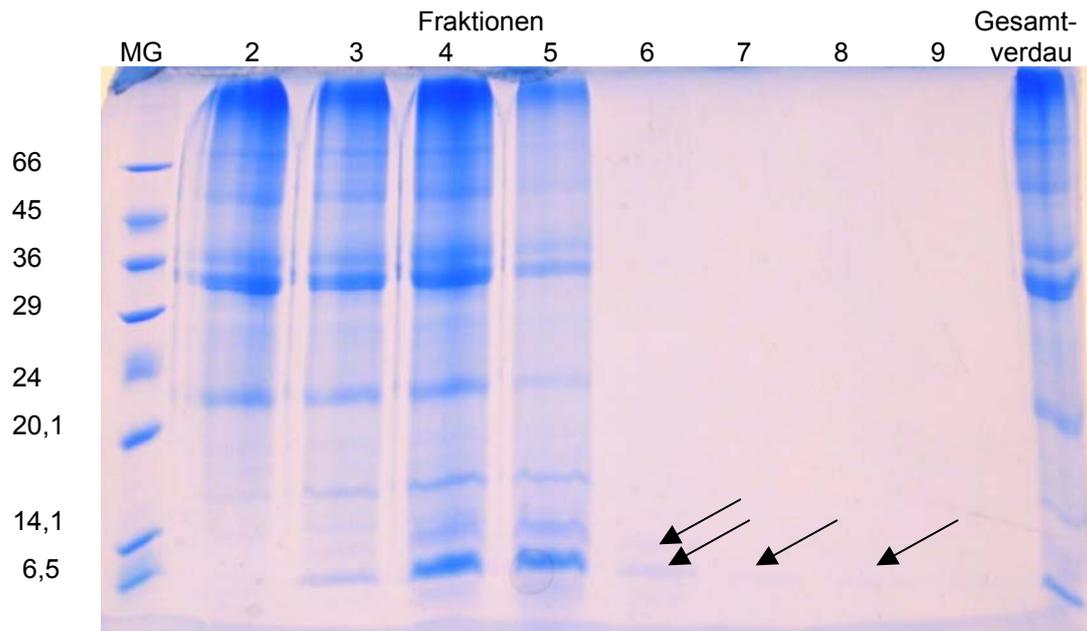


Abbildung 4.7: Elektrophoretische Darstellung der nach Gruppentrennung der CNBr-Kollagenfragmente mittels PD10-Säulen in den Fraktionen 2-9 (vgl. Abbildung 4.8) enthaltenen Peptide. Die Pfeile weisen auf die im Original besser erkennbaren niedermolekularen Banden hin.

Die über die gewählten Ansätze präparierten Knochenproteinfraktionen wurden systematisch an den künstlich (im Hitzeversuch) gealterten Knochenproben sowie an den natürlich gealterten Knochenproben (mit bekannter Datierung) im Hinblick auf ihre Brauchbarkeit für eine Revision der Aminosäuredatierung untersucht (vgl. 4.2.3).

4.2 Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus experimentell degradierten Knochenproben (Hitzeexperimente) präparierten Proteinfraktionen

4.2.1 AAR in Überstand (LE), kollagener Fraktion (CF), nicht-kollagener Fraktion (NCF) und Gesamtknochen (TB)

Der Razemisierungsgrad von Asx nahm mit der Dauer der Temperatureinwirkung in allen untersuchten Proteinfraktionen zu. Die insgesamt höchsten Werte mit mehr als 90% D-Asx wurden im LE gemessen; in dieser Fraktion wurden bereits nach 48-stündiger Inkubation Werte ab 20% D-Asx erreicht (Abbildung 4.8a). In den Fraktionen LE und NCF folgt die Razemisierungskinetik einer logarithmischen Funktion; dagegen verläuft die Razemisierung in der CF und der CF-dominierten TB über die Zeit in einer eher sigmoidalen Kurve (Abbildungen 4.8 b, c).

Die einzelnen Fraktionen weisen nach Lebensalter gestaffelte Razemisierungskinetiken auf (Abbildungen 4.8 a-d), wobei in jungem Kollagen die Razemisierung von

Asx schneller als in älterem Kollagen ansteigt. Dies wird besonders deutlich in den Fraktionen TB und CF, in denen sich ab 48h differente D-Asx-Werte für diese Altersgruppen ergeben.

Die AAR-Daten zeigten eine deutliche Beziehung zum Kollagengehalt der untersuchten Proben. Die Kollagenausbeuten der eingesetzten Knochenproben belegten, dass Kollagen mit zunehmendem Lebensalter offenbar eine erhöhte Stabilität gegen Degradation aufweist. Bereits nach acht Tagen ist vier Jahre altes bovines Kollagen bis auf 0,4% degradiert (Abbildung 4.9a). Werte dieser Größenordnung werden im humanen Kollagen erst nach ca. 20 (16 a), 24 (57 a) und 28 (72 a) Tagen erreicht.

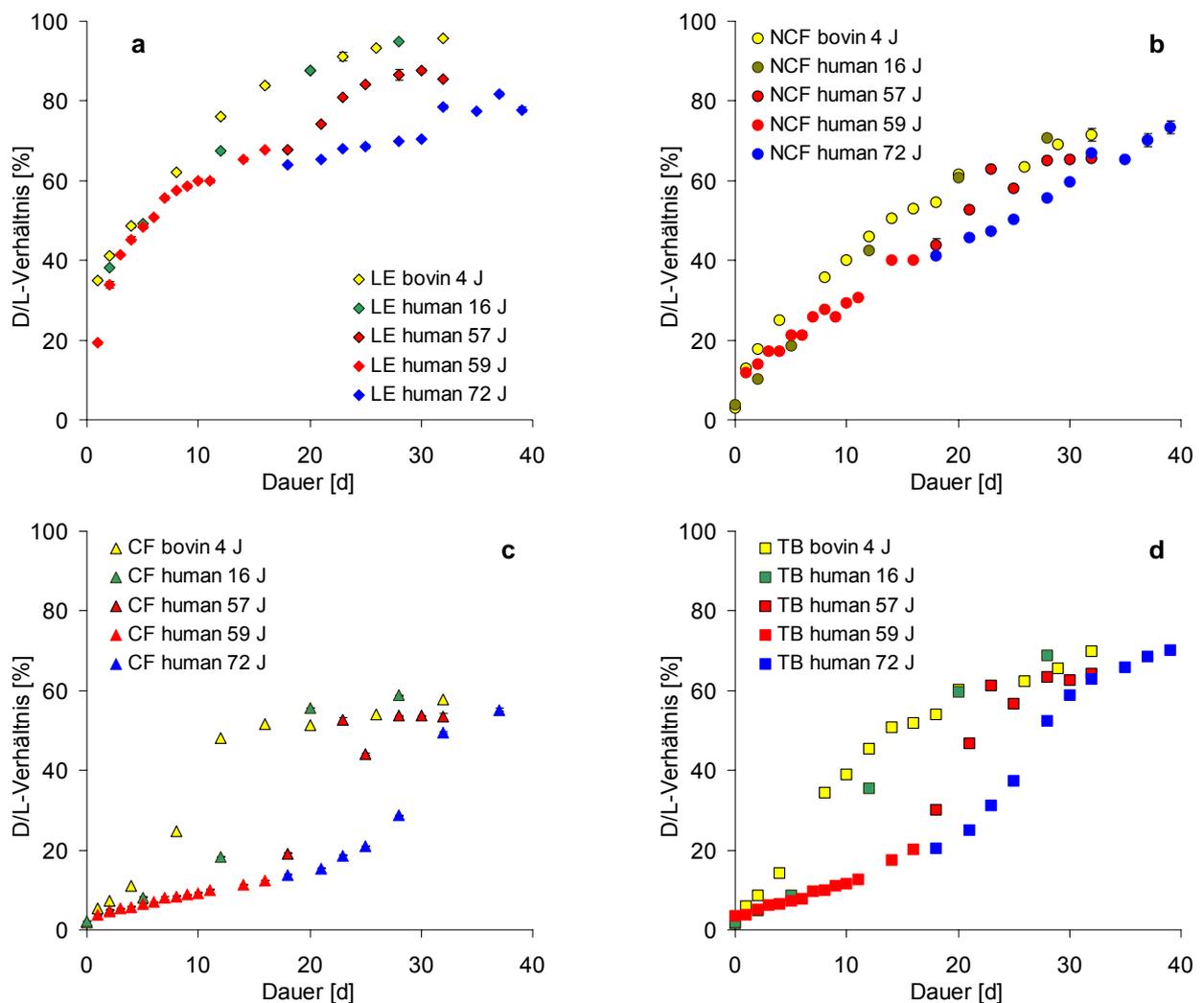


Abbildung 4.8 a-d: Experimentelle Kollagendegradation in Hitzeexperimenten (90°C): Razemisierungsgrade von Asx des **(a)** Überstands (LE), **(b)** kollagener Fraktion (CF), **(c)** nicht-kollagener Fraktion (NCF) und **(d)** Gesamtknochengewebes (TB). Die Daten in den Abbildungen a-d sind als Mittelwerte mit den Standardabweichungen (in der Mehrzahl der Daten aufgrund der hohen analytischen Präzision graphisch nicht darstellbar) angegeben.

4 Ergebnisse

Wie die Razemisierung von Asx zeigt auch die Kollagenausbeute eine deutliche Altersabhängigkeit, Kollagen junger Individuen zerfällt unter diesen Versuchsbedingungen schneller als das älterer Individuen. Die Analyse der Razemisierungsgrade von Asx in den verschiedenen Knochenproteinfraktionen in Abhängigkeit zur Kollagenausbeute (Abbildung 4.8 b) zeigt vergleichbare Daten in den Fraktionen LE und NCF sowie CF und TB. Bei einsetzender experimenteller Degradation (Kollagengehalt <21%) steigt der Razemisierungsgrad im LE und NCF zunächst steil an: Dann, zwischen Kollagengehalten von 21% und 5%, verflacht der Verlauf der Kurve, um bei Kollagenausbeuten <5% nochmals deutlich anzusteigen.

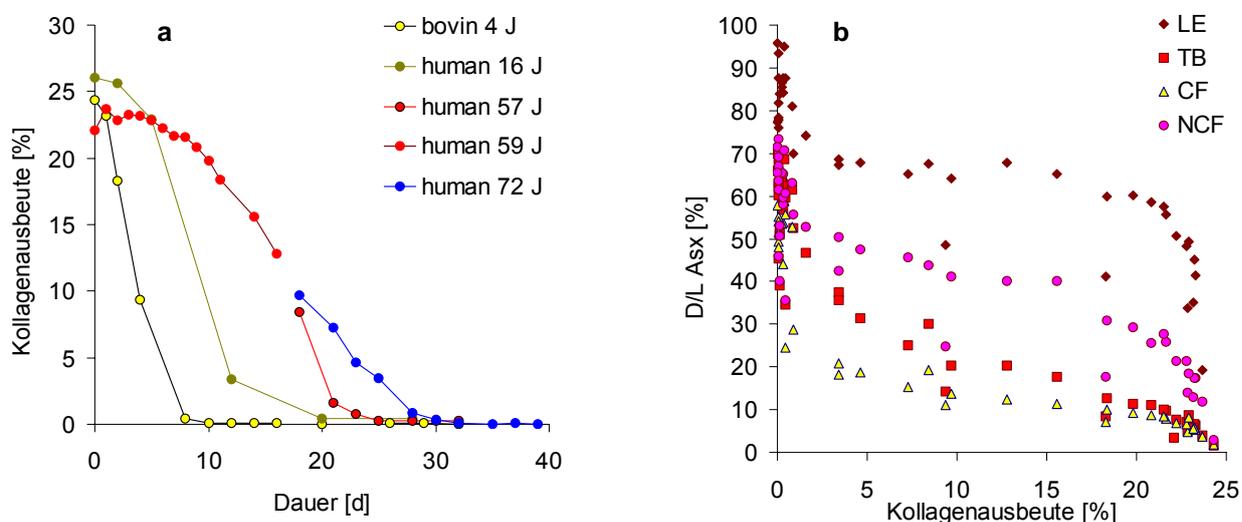


Abbildung 4.9 a-b: Kollagenausbeute gegen Dauer des Experiments (a) und Razemisierungsgrad von Asx in Abhängigkeit zur Kollagenausbeute (b).

4.2.2 AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroeluierten CNBr-Fragmenten

Aufgrund der fortschreitenden Kollagen Degradation stand für diese Analysen nur wenig Material zur Verfügung, dies gilt insbesondere für die längere Zeit beanspruchenden Experimente. Deren Ergebnisse haben daher lediglich schlaglichtartigen Charakter. Für die CNBr-Fragmente in den Banden 2, 4, 5-1 und 6 ergaben sich die in Abbildung 4.10 dargestellten Ergebnisse für 16, 47 und 67 Jahre alt gewordene Individuen. In der hochmolekularen Bande 2 fallen bis zum Tag 5 des Hitzeexperimentes die Razemisierungsraten für Asx im Vergleich zum Eingangswert leicht ab, danach findet sich bis zum Tag 12 ein deutlicher Anstieg der Razemisierungsrate bei dem

4 Ergebnisse

47jährigen Individuum. Bis zum Tag 20 des Experiments fällt der Wert von ca. 9,5% bis auf ca. 6,5% ab. Eine deutlichere Zunahme der Razemisierungsrate ist in Bande 4 zu verzeichnen, mit einem Anstieg auf ca. 4% respektive 5% nach 5 Tagen und auf 13,7% nach 12 Tagen bei dem 47jährigen Individuum. In der niedermolekularen Bande 5-1 finden sich ansteigende Razemisierungsraten für Asx. Allerdings zeigt sich bei dem jungen Individuum (16 Jahre) ein Wiederabfall der Werte ab Tag 5 des Hitzeexperiments. Bande 6 zeigt inhomogene Ergebnisse, nur das älteste Individuum weist eine Zunahme der Razemisierung von Asx bis Tag 5 auf, danach finden sich bei Bande 5 wieder abfallende Werte.

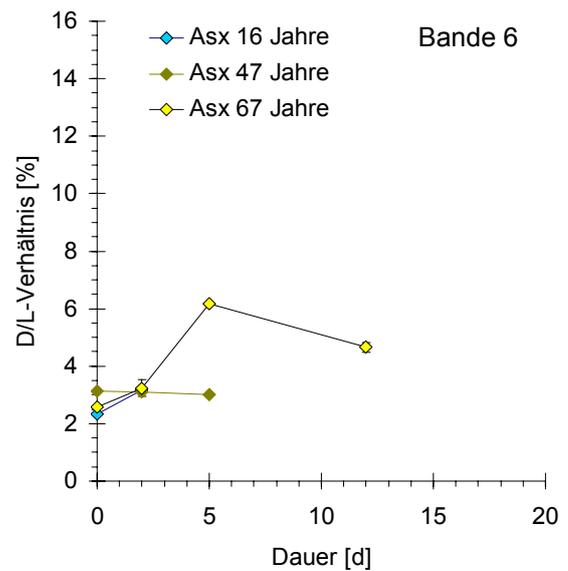
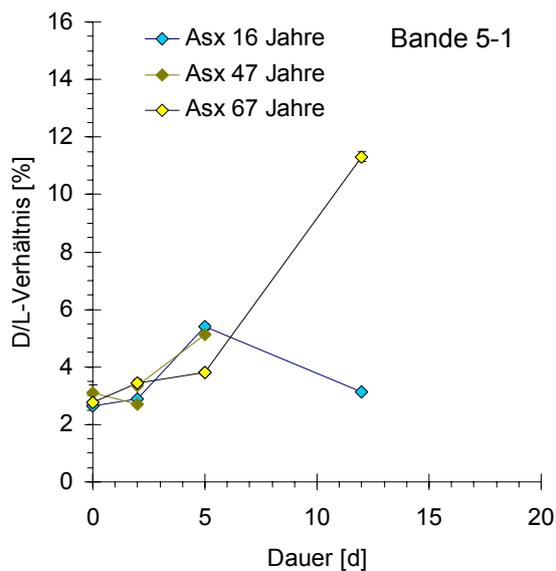
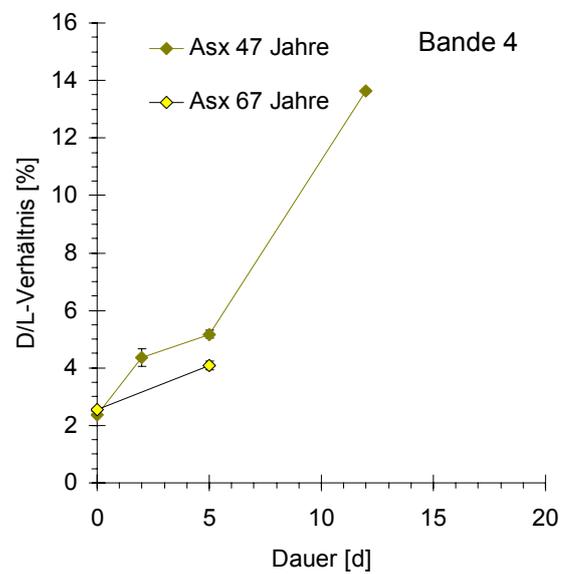
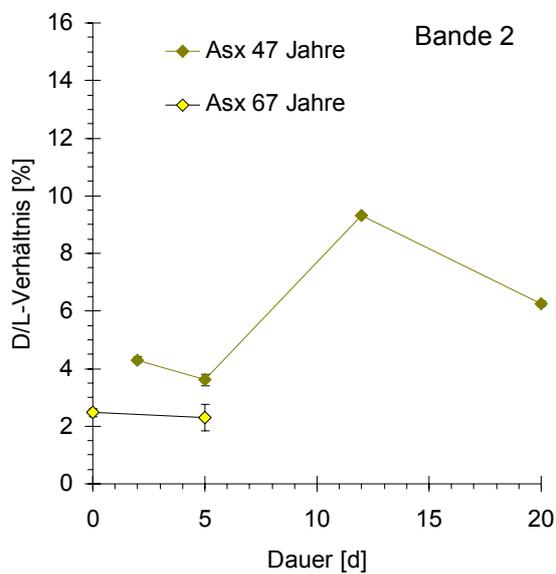


Abbildung 4.10: Razemisierung von Asx in Kollagen-CNBr-Peptiden nach experimenteller Kollagen-degradation bei 90°C. Banden 2 und 4 repräsentieren hochmolekulare Peptide um ca. 30 kDa, Banden 5 und 6 niedermolekulare Banden von ca. 6-12 kDa.

4 Ergebnisse

Bei Prüfung des Einflusses des Lebensalters auf die Razemisierung von Asx, Glx und Ser in den niedermolekularen Banden 5-1 und 6 (Abbildung 4.11) zeigt sich lediglich in Bande 5-1 ein gewisser Trend zu höheren Werten mit steigendem Lebensalter. In Bande 6 lässt sich kein derartiger Einfluss erkennen.

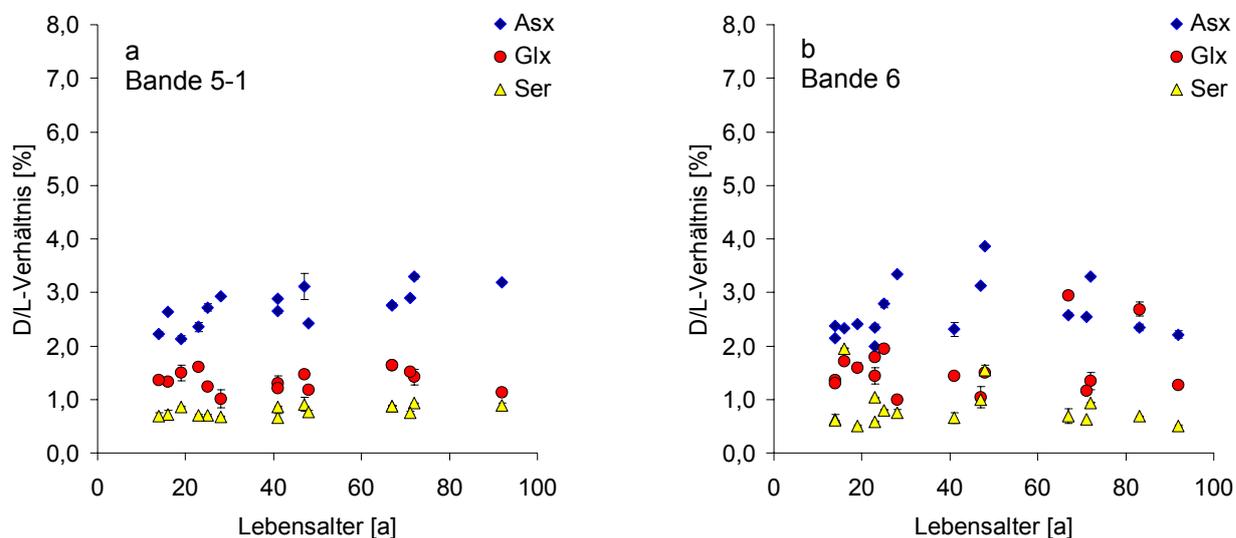


Abbildung 4.11: Razemisierungsgrad von Asx, Glx und Ser in den niedermolekularen elektrophoretisch darstellbaren Banden 5-1 (a) und 6 (b) nach CNBr-Spaltung: Korrelation mit dem Lebensalter

4.2.3 AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppen-trennung nach Molekulargewicht)

Mit der Dauer der Temperaturexposition konnte über das gesamte Spektrum der CNBr-Peptide eine regelhafte Erhöhung der Razemisierungsraten erzeugt werden, in der Größenordnung vergleichbar mit denen der elektrophoretisch präparierten Peptide. Die höchsten Werte waren generell für Asx nachweisbar, gefolgt von Ser und Glx (Abbildung 4.12). Regelmäßig zeigten sich in den höhermolekularen Peptidfraktionen 13 für Asx, Glx und Ser jeweils niedrigere Razemisierungsraten als in den niedermolekularen 6-10 (Abbildung 4.6). Dabei fielen besonders die hohen Werte in Fraktion 6 auf (Abbildung 4.12). Dieses grundsätzlich wiederkehrende Bild stellte sich über die Dauer der Experimente bis zum Tag 5 gleichbleibend dar (Abbildung 4.12). Proteinfragmente der Fraktionen ≥ 11 waren zwar hinsichtlich der AAR zu analysieren, mit den zur Verfügung stehenden elektrophoretischen Methoden jedoch nicht mehr visualisierbar. Zur Untersuchung der Aminosäurekomposition stand nicht ausreichend Material zur Verfügung, daher wurden diese Fraktionen nicht weiter berücksichtigt.

4 Ergebnisse

Präparativ war das Kollagenmolekül somit grob in schneller und langsamer razemisierende Bereiche auftrennbar.

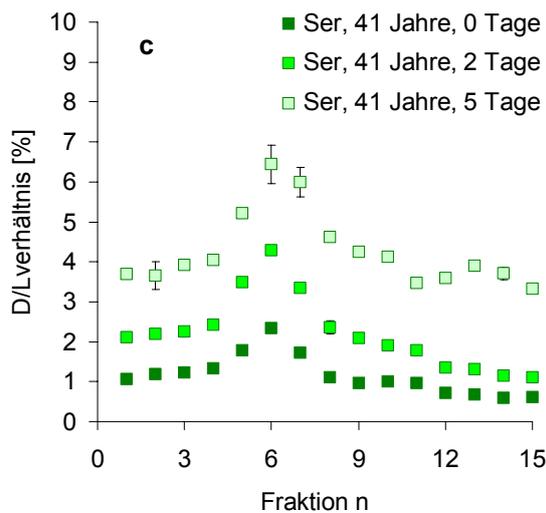
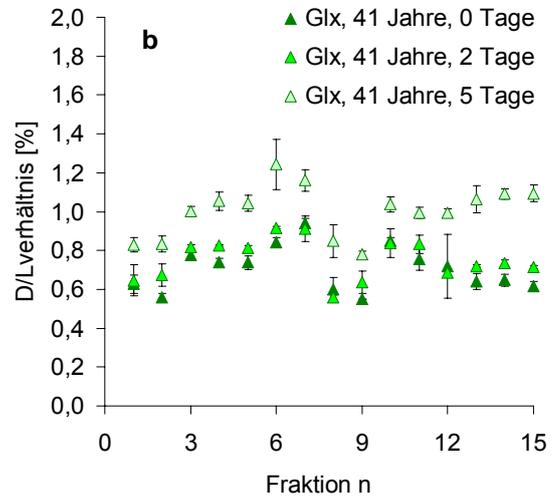
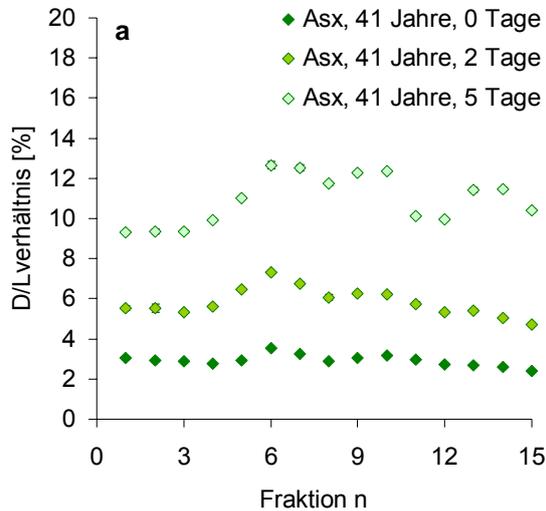


Abbildung 4.12a-c: Razemisierungsgrade (und Standardfehler) von Asx (a), Glx (b) und Ser (c) vor und nach experimenteller Kollagendegradation bei 90°C für 2 und 5 Tage nach Molekulargewichtstrennung in PD10-Fractionen 1-15. (Die Ordinateneinteilung wurde den Daten entsprechend gewählt).

Bei Prüfung des Einflusses des Lebensalters auf die Razemisierung in den Hitzeversuchen zeigt sich, dass die niedermolekularen Fraktionen 5, 6, 8 und 9 offenbar einem solcher Einfluss des Lebensalters unterliegen, auch wenn in den Fraktionen 8 und 9 vereinzelt zu wenig Substanz zur Analyse vorlag. Während sich hier bereits vor dem Beginn der Experimente eine Staffelung mit dem Alter ergibt, ist das in den hochmolekularen Fraktionen nicht der Fall (Abbildung 4.13). Bei weiterer systematischer Überprüfung der Abhängigkeit der Razemisierung in den verschiedenen Fraktionen vom Lebensalter zeigt sich das in Abbildung 4.13 dargestellte Bild. In allen Fraktionen,

4 Ergebnisse

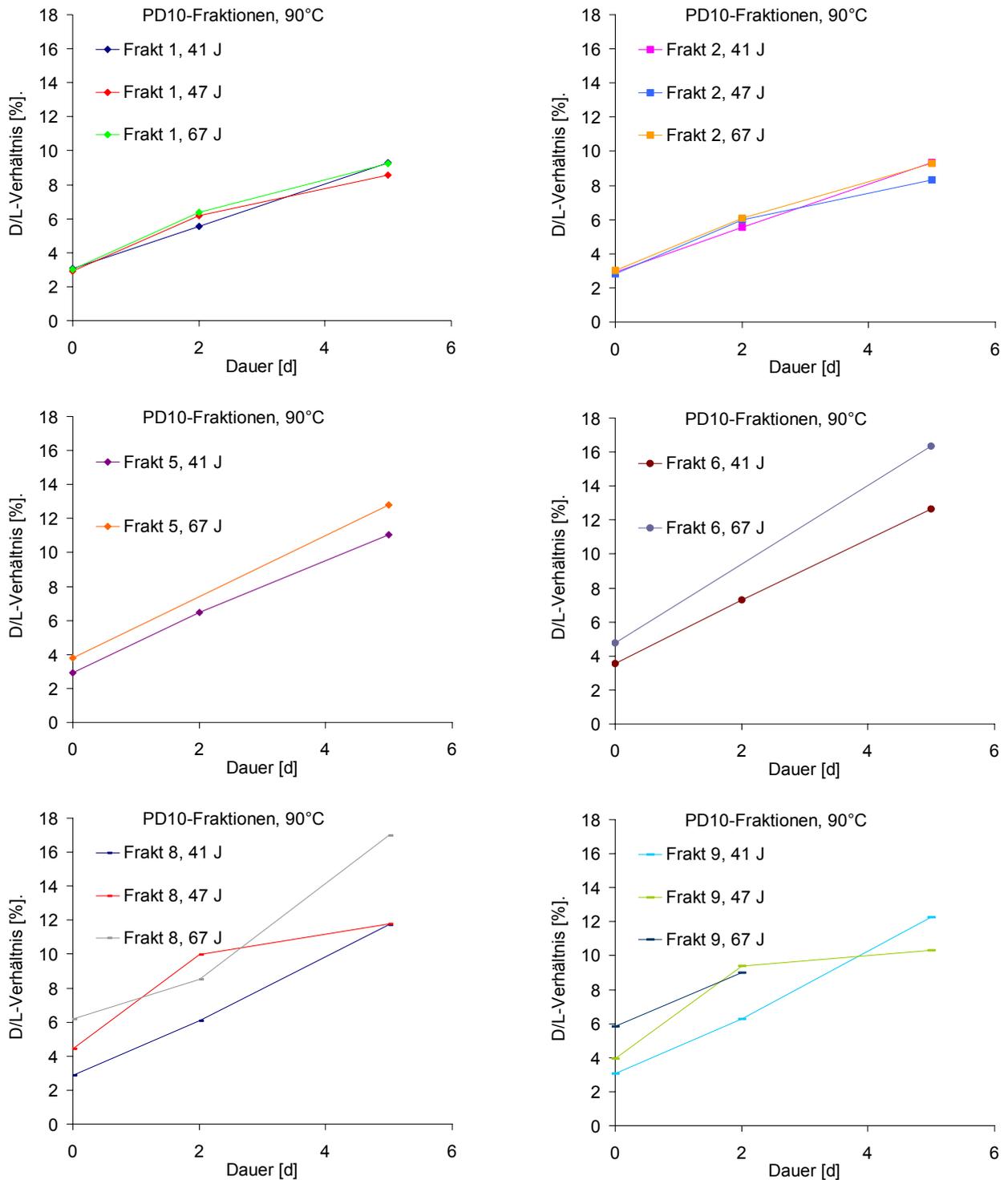


Abbildung 4.13: Razemisierung von Asx in verschiedenen Fraktionen bei unterschiedlich alten Individuen (Hitzeexperiment). In den niedermolekularen Fraktionen 5, 6, 8 und 9 ist die intravitale Razemisierung (Tag 0) besonders deutlich.

insbesondere aber in den niedermolekularen Fraktionen 6-9, lässt sich ein Trend in einer Zunahme der Razemisierungswerte mit dem Lebensalter, allerdings nur bis zu einem mittleren Lebensalter von ca. 40 Jahren, erkennen. Die z.T. hohen Standard-

4 Ergebnisse

abweichungen in den Analysen (Abbildung 4.14) lassen sich daher auch mit dem Erreichen der Nachweisgrenze erklären.

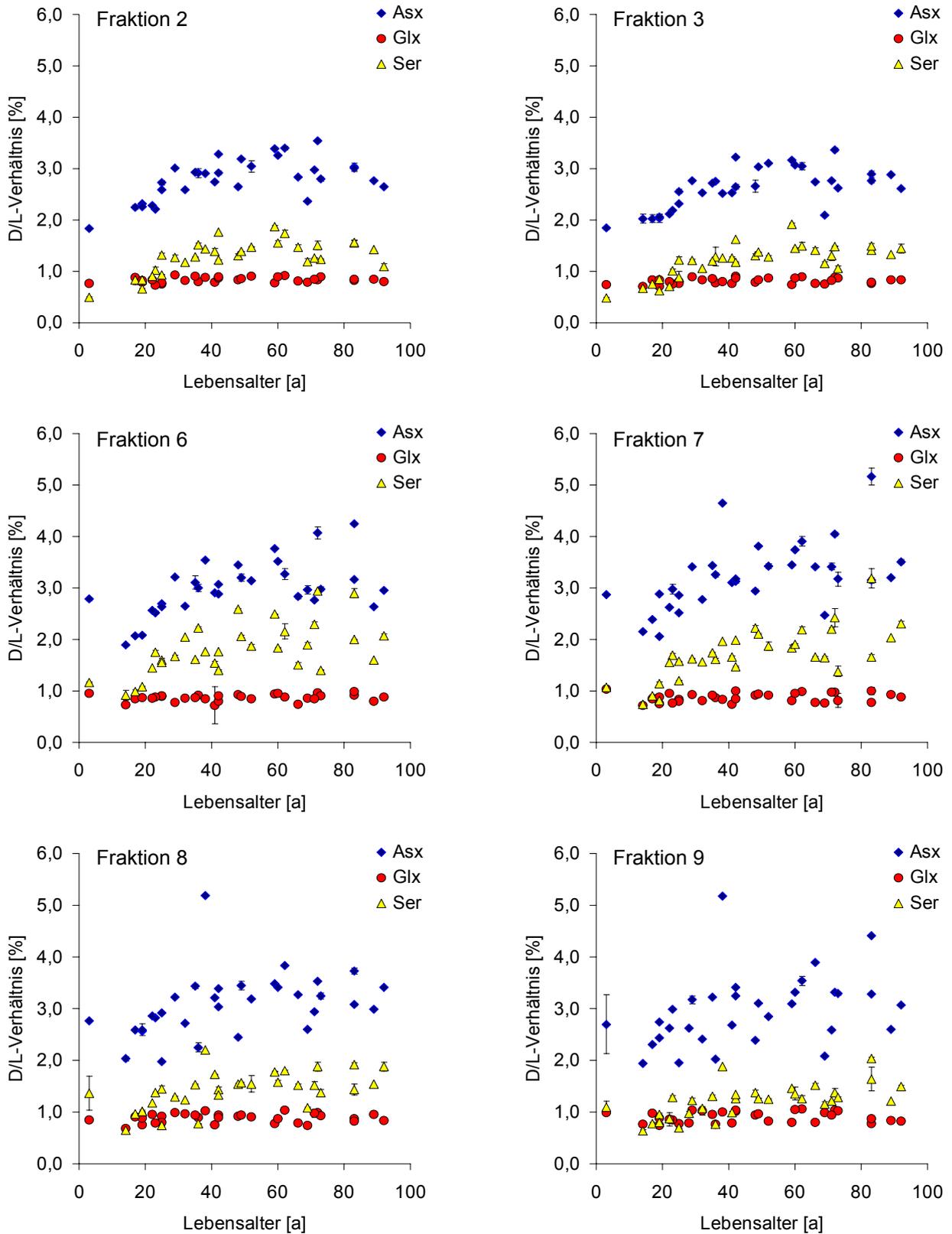


Abbildung 4.14: Razemisierung von Asx, Glx, Ser in ausgewählten hoch- und niedermolekularen Fraktionen (Fraktion 2 und 3, resp. 6-9) in Abhängigkeit vom Lebensalter.

4 Ergebnisse

4.3 Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus natürlich degradierten Knochen präparierten Proteinfraktionen, Zusammenhang zwischen dem Alter sicher datierter Knochenfunde und der AAR in den präparierten Proteinfraktionen

4.3.1 Gesamtknochenproben (TB) sowie „nicht-kollagene“, säurelösliche (NCF) und „kollagene“, säureunlösliche (CF) Knochenproteinfraktion

Die untersuchten Proben (TB, NCF, CF) verhalten sich (Abbildungen 4.15 a-c) sehr ähnlich. Bis zu einer Liegezeit von ca. 6.500 Jahren zeigte sich jeweils ein deutlicher Anstieg der Razemisierungsraten, wenn auch mit großer Streuung, selbst innerhalb der verschiedenen Fundorte mit jeweils zumindest annähernd gleichen Umgebungsbedingungen (z.B. Fundkomplexe Flensburg und Trier). Die Werte der Razemisierungsraten in den Fraktionen TB, CF und NCF staffeln sich übereinstimmend mit den vergleichbaren Fraktionen der experimentellen Ansätze (vgl. Abbildung 4.8). Bei längeren Liegezeiten über 10.000 Jahren wurden in allen Proben relativ weit streuende Razemisierungswerte gefunden.

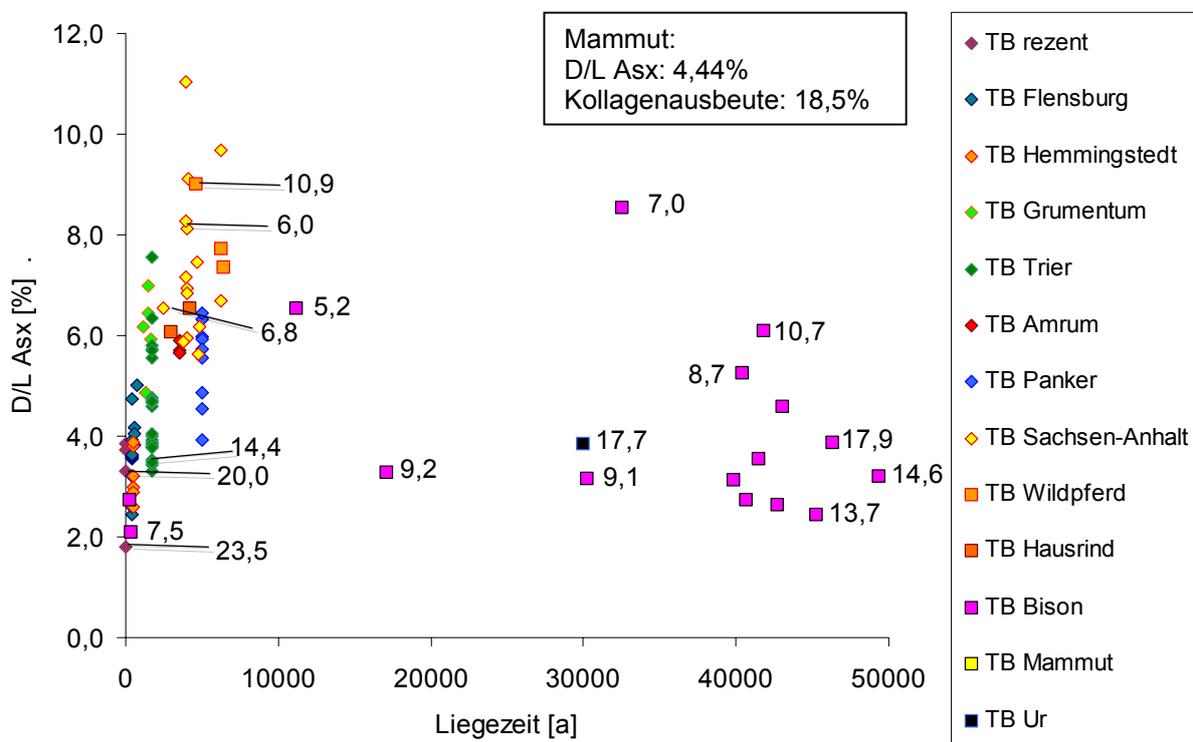


Abbildung 4.15a: AAR-Daten für natürlich gealterte Knochenproben (Gesamtknochenproben, TB) in Abhängigkeit von der Liegezeit. Gleiche Symbole kennzeichnen Funde identischer oder vergleichbarer Herkunft, soweit sie mit einem Ort benannt sind; ansonsten dienen sie der Kennzeichnung nicht-humanen Materials. Der AAR-Wert und die Kollagenausbeute für die ca. 200.000 Jahre alte Mammutknochenprobe wurde im Textfeld ergänzt, um die Skalierung der Grafik übersichtlich zu halten. Die in die Grafik eingefügten Zahlen geben die Kollagenausbeute in % für ausgewählte Proben an (Normbereich bei frischem Knochen um 23 %), um die Heterogenität des Degradationszustandes zu demonstrieren.

4 Ergebnisse

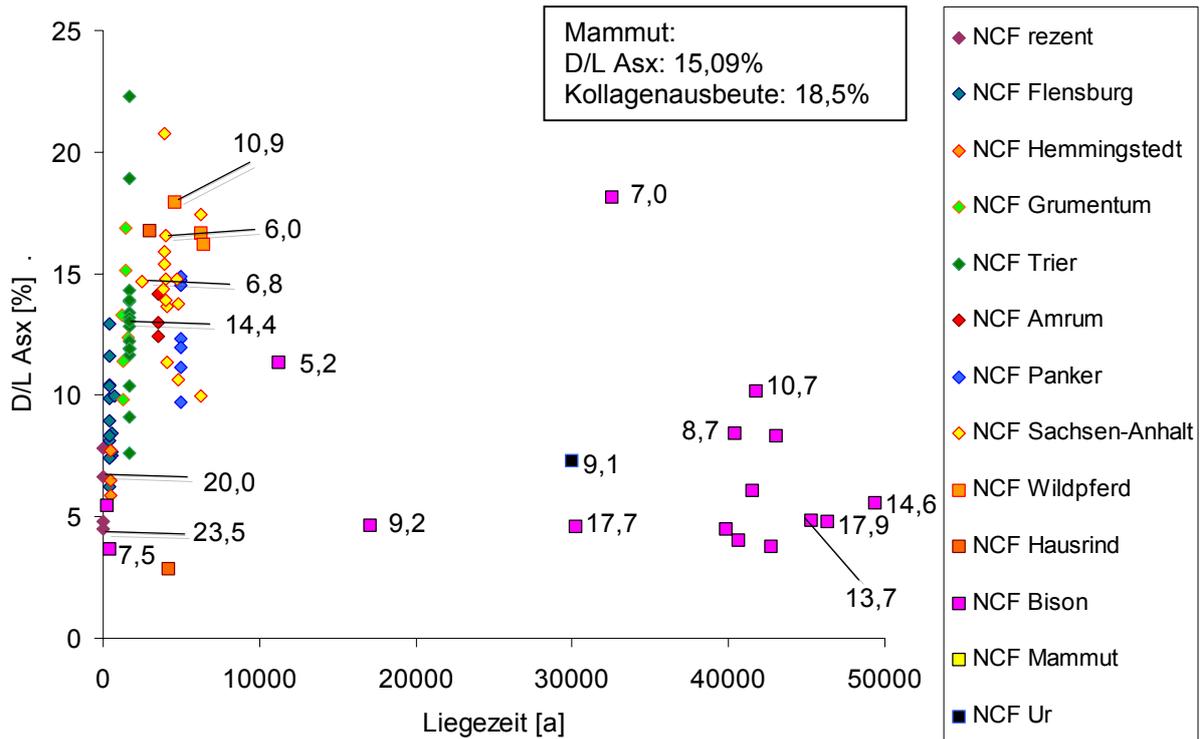


Abbildung 4.15b: AAR-Daten für die nicht-kollagene, säurelösliche Knochenproteinfraktion (NCF) aus natürlich gealterten Knochenproben in Abhängigkeit von der Liegezeit. Hinsichtlich der Symbole und Beschriftungen sei auf die Legende zu Abbildung 4.15.a) verwiesen.

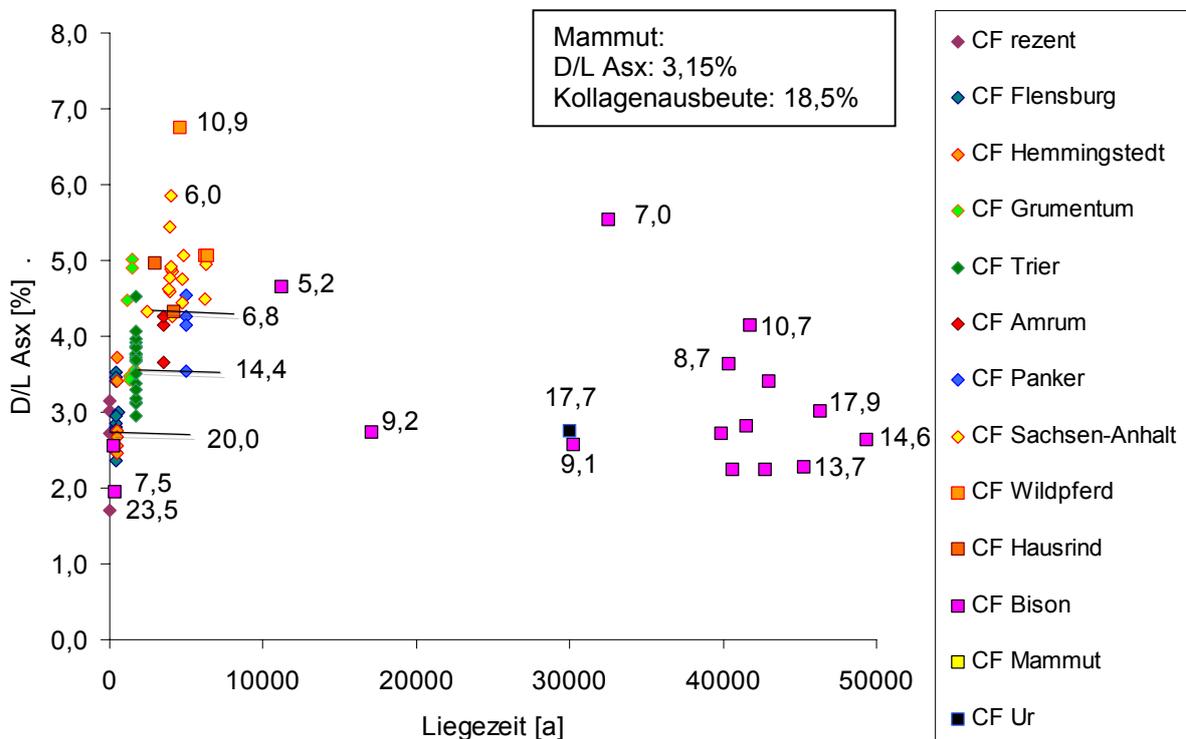


Abbildung 4.15c: AAR-Daten für die „kollagene“, säureunlösliche Knochenproteinfraktion (CF) aus natürlich gealterten Knochenproben in Abhängigkeit von der Liegezeit. Hinsichtlich der Symbole und Beschriftungen sei auf die Legende zu Abbildung 4.15a verwiesen. Daten mit einer Liegezeit bis 7.000 a sind in Abbildung 4.15d vergrößert dargestellt.

4 Ergebnisse

Die geringste Streuung und die niedrigsten Werte der AAR findet sich in der kollagenen Fraktion (CF). In der nicht-kollagenen Fraktion (NCF) und im Gesamtknochengewebe (TB) streuen die Razemisierungswerte deutlich weiter, generell liegen sie weiterhin auf einem höheren Niveau als die im CF.

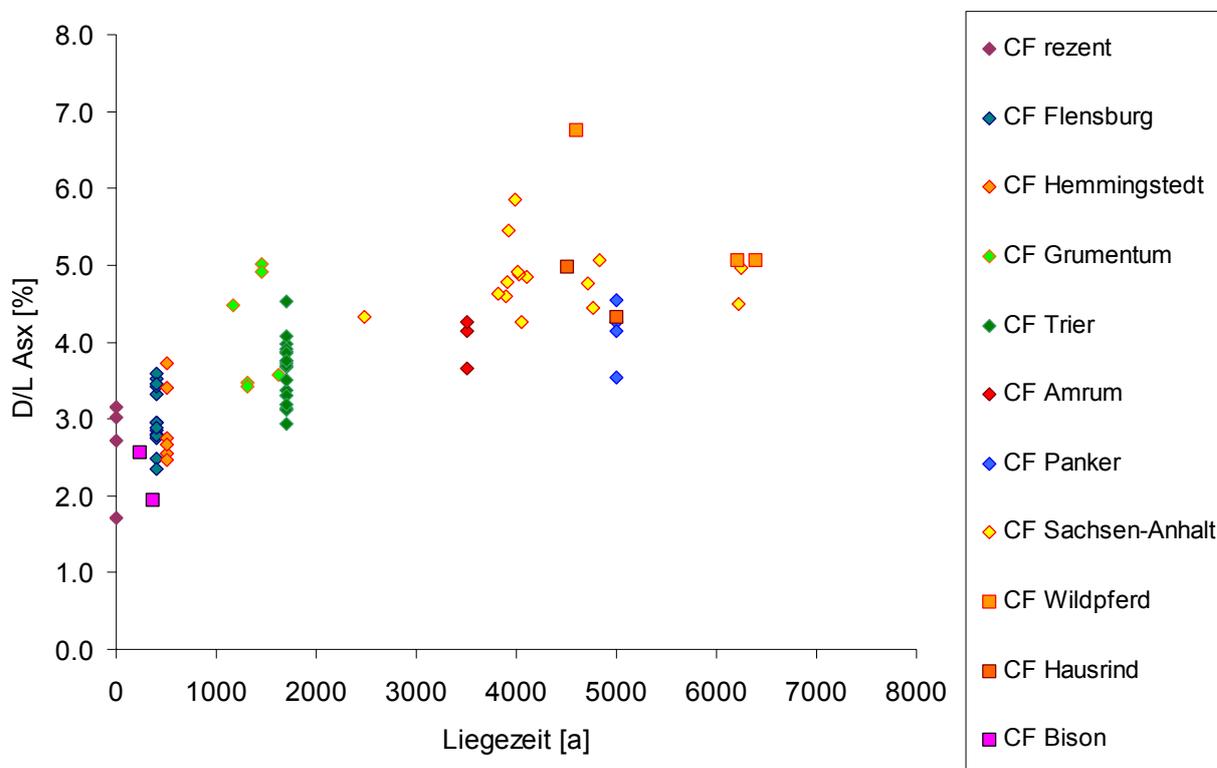


Abbildung 4.15d: Razemisierungsgrad der Asx in der kollagenen Fraktion (CF) historischer und rezenter Knochenfunde bis ca. 7.000 Jahre Liegezeit, Ausschnittsvergrößerung zu Abbildung 4.15c.

Bei der Analyse der doch relativ hohen Streuung bei Proben aus identischen Fundorten mit jeweils zumindest annähernd gleichen Umgebungsbedingungen (z.B. Trier, Flensburg) stellte sich die Frage, ob sich die bereits zu Lebzeiten ablaufende Razemisierung in den Daten abbildet (Ritz *et al.* 1994, 1996, Ritz-Timme 1998, Ritz-Timme *et al.* 2000) und so das erreichte Lebensalter die Daten beeinflusst hat. Zur Klärung dieser Frage wurden die Daten für die Fundkomplexe „Trier“ und „Flensburg“ nach dem Lebensalter der Individuen (Schröder *et al.* 1998, de Albuquerque Leinenbach *et al.* 2000) aufgetragen und mit an frischen Knochenproben erhobenen Daten verglichen (Abbildung 4.16). Dabei zeigten sich in den Fundkomplexen Flensburg und Trier, besonders bei den jüngeren Individuen, für das Lebensalter verhältnismäßig hohe Razemisierungsraten der Asx.

4 Ergebnisse

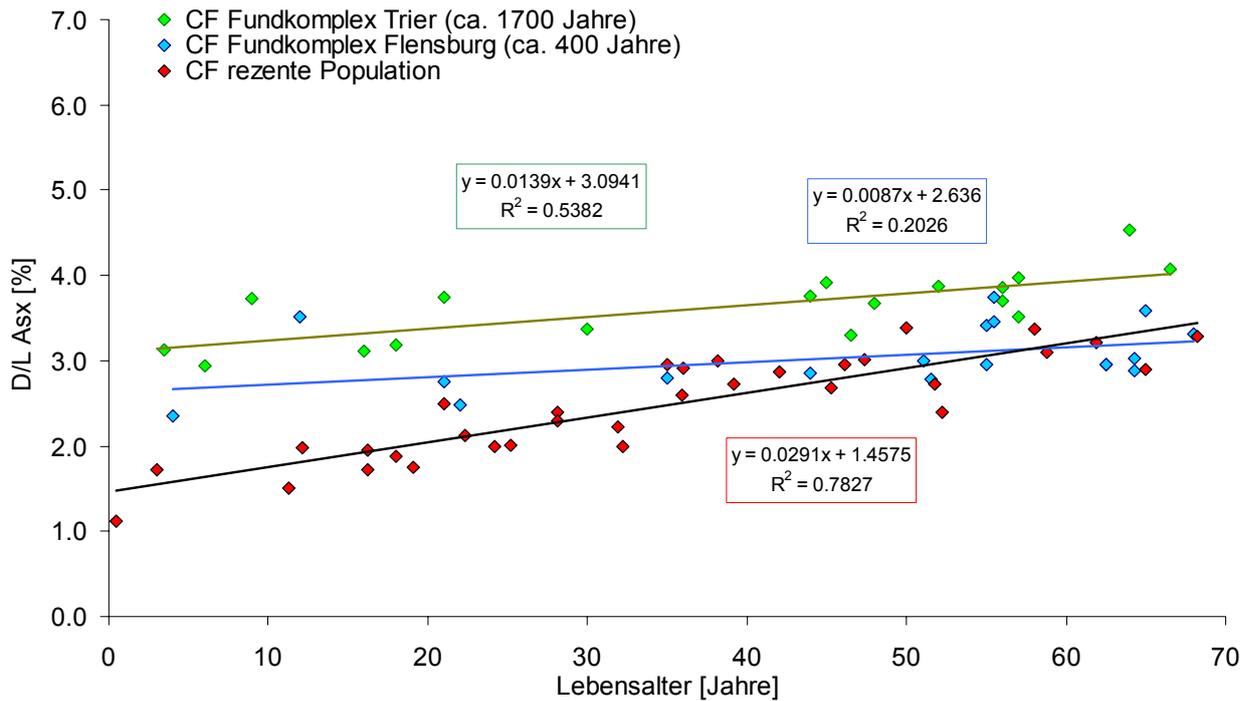


Abbildung 4.16: Razemisierungsgrade der Asx in der kollagenen Fraktion (CF) historischer Fundkomplexe (Femora) und einer rezente Vergleichspopulation (Kalotte, Daten aus Ritz-Timme, 1998) in Abhängigkeit vom Lebensalter. (Lebensaltersschätzung der historischen Funde erfolgte mittels gängiger morphometrischer und morphognostischer Methoden.)

Im Gegensatz zu den hitzedegradieren Proben zeigte sich in natürlich degradiertem Knochen keine einfache Beziehung zwischen AAR und Kollagengehalt. Theoretisch lassen kurze Liegezeiten hohe Kollagenausbeuten erwarten, mit zunehmender Dauer der Liegezeit sollte aufgrund fortschreitender Kollagendegradation mit einer Verringerung der Kollagenausbeute zu rechnen sein. Die erhobenen Daten geben dies bis ca. 7.000 a Liegezeit erwartungsgemäß wieder (Abbildung 4.17). Die relativ hohen Kollagenausbeuten bei Liegezeiten ≥ 10.000 a lassen zusammen mit den Fundorten auf Kältekonserverung in Permafrostböden schließen. Wenn auch eine Tendenz zu höheren AAR-Werten bei fortgeschrittener Kollagendegradation (niedrige Kollagenausbeuten) erkennbar wird, finden sich auch Proben mit bereits geringem Kollagengehalt und niedrigen AAR-Werten (Abbildung 4.18).

4 Ergebnisse

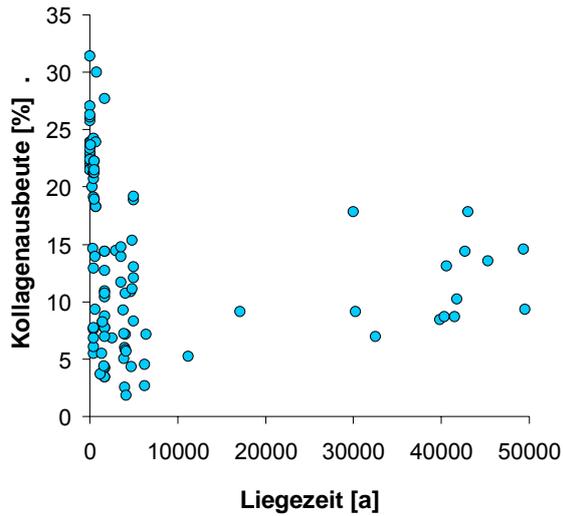


Abbildung 4.17: Kollagenausbeute in Abhängigkeit zur Liegezeit. Hohe Kollagenausbeuten jenseits 15.000 a Liegezeit lassen auf Lagerungsbedingungen in Permafrostböden schließen.

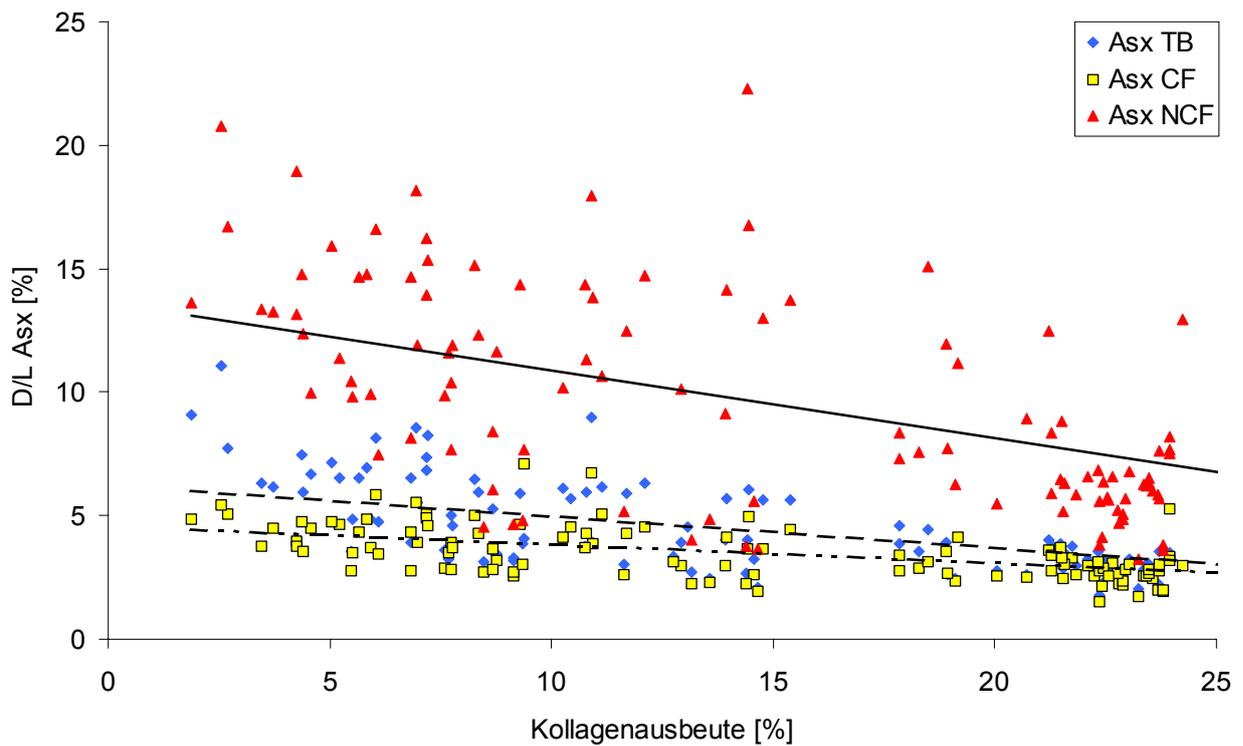


Abbildung 4.18: Razemisierungsgrad von Asx in Gesamtknochen (TB), kollagener (CF) und nicht-kollagener Fraktion (NCF) der natürlich gealterten Knochen, dargestellt in Abhängigkeit vom Kollagengehalt (als Indikator der Kollagenqualität)

4.3.2 AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroeluierten CNBr-Fragmenten

In Abbildung 4.19 ist die Razemisierung von Asx, Glx und Ser aus den elektroeluierten niedermolekularen Banden 5-1 und 6 in Abhängigkeit von der Liegezeit bis ca. 6500 a dargestellt. Eine Zunahme der Razemisierung mit der Liegezeit ist allenfalls bei Bande 6 erahnbar; im Vergleich zu Bande 6 streuen die Werte der Bande 5-1 deutlich stärker.

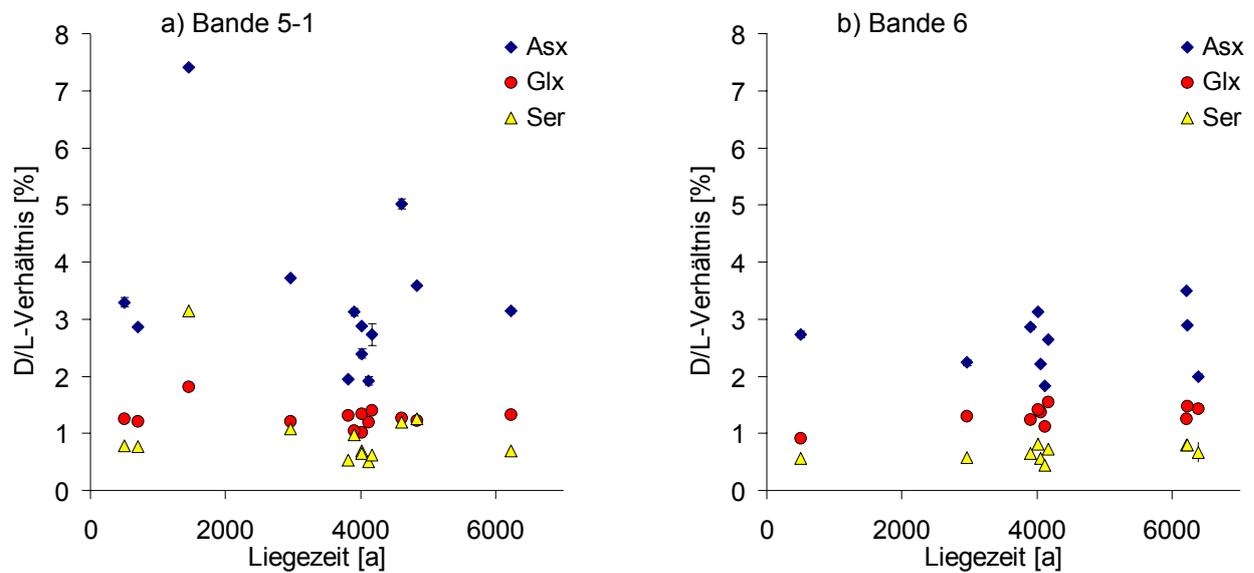


Abbildung 4.19: AAR (Asx, Ser, Glx) in den elektroeluierten Kollagenfragmenten Bande 5-1 und Bande 6 (nach Abbildung 4.4) nach Cyanbromidspaltung des Kollagens aus natürlich gealterten Knochenproben mit Liegezeiten von bis zu 6500 Jahren.

4 Ergebnisse

4.3.3 AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppentrennung nach Molekulargewicht)

In den höhermolekularen Fraktionen 2 und 3 (vgl. Abbildungen 4.20a, b) zeigten sich relativ gleich bleibende AAR-Werte bis zu Liegezeiten von 6500 Jahren. Dagegen

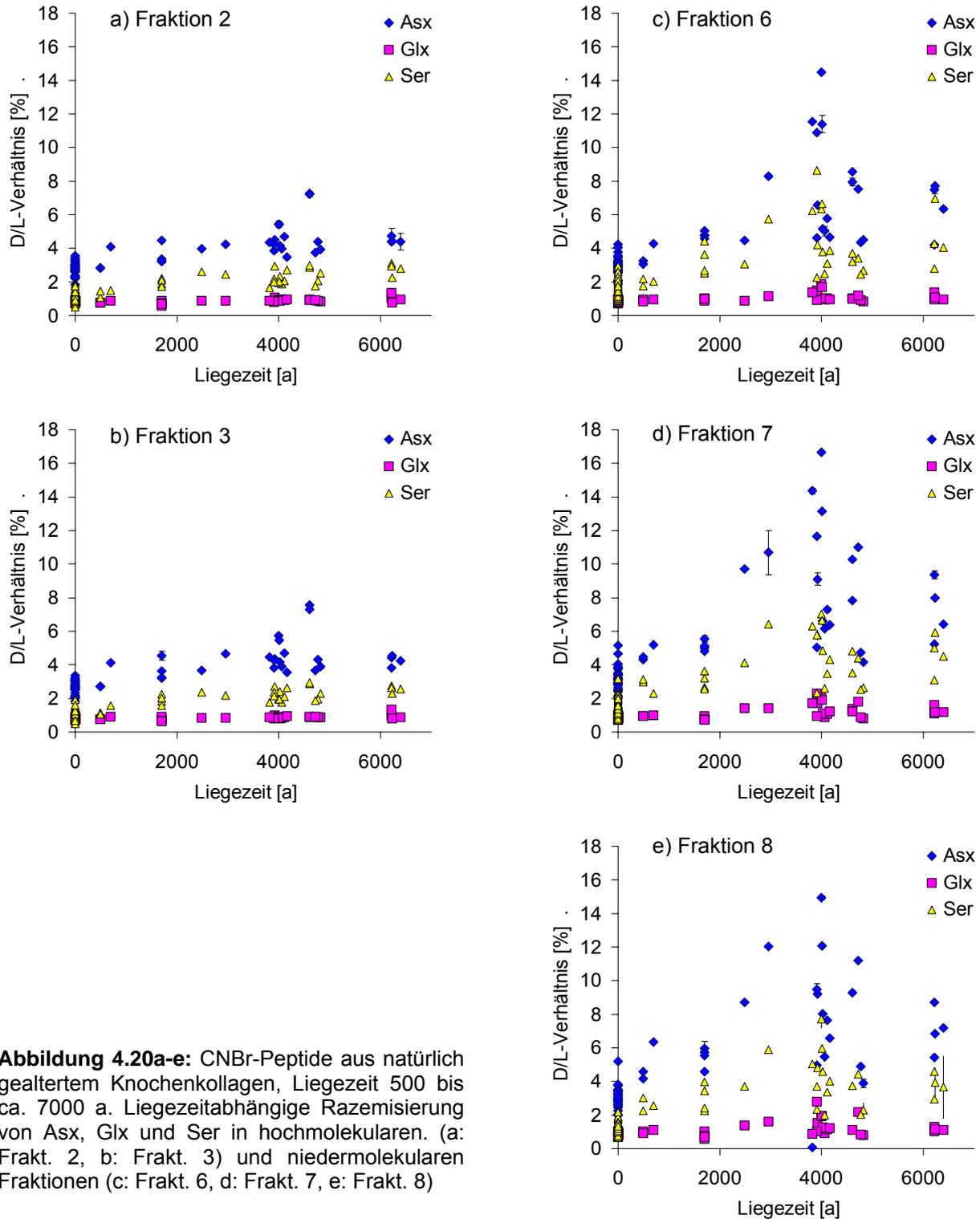


Abbildung 4.20a-e: CNBr-Peptide aus natürlich gealtertem Knochenkollagen, Liegezeit 500 bis ca. 7000 a. Liegezeitabhängige Racemisierung von Asx, Glx und Ser in hochmolekularen (a: Frakt. 2, b: Frakt. 3) und niedermolekularen Fraktionen (c: Frakt. 6, d: Frakt. 7, e: Frakt. 8)

4 Ergebnisse

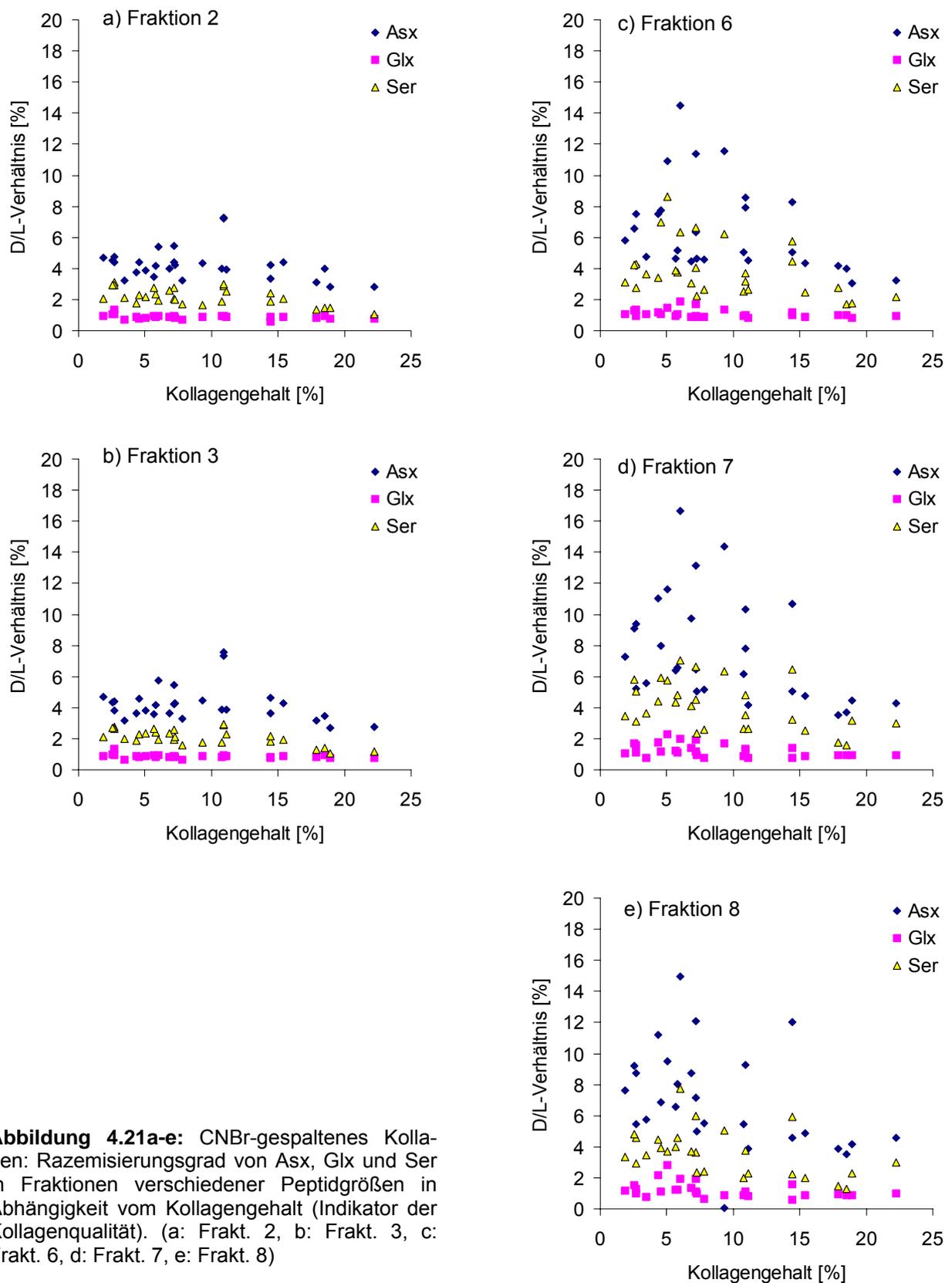


Abbildung 4.21a-e: CNBr-gespaltenes Kollagen: Razemisierungsgrad von Asx, Glx und Ser in Fraktionen verschiedener Peptidgrößen in Abhängigkeit vom Kollagengehalt (Indikator der Kollagenqualität). (a: Frakt. 2, b: Frakt. 3, c: Frakt. 6, d: Frakt. 7, e: Frakt. 8)

zeigte sich in den niedermolekularen Fraktionen 6-8 ein teilweise sehr deutlicher Anstieg der AAR-Werte mit der Liegezeit ab, allerdings einhergehend mit einer zuneh-

4 Ergebnisse

menden Streuung mit Zunahme der Liegezeit und mit plötzlichem „Abbruch“ ab einer Liegezeit von ca. 4000 Jahren.

Abbildung 4.21 gibt die Ergebnisse zur Ermittlung des Einflusses der Kollagen-degradation auf die Razemisierung wieder. Es wird ersichtlich, dass in hochmolekularen Kollagenfragmenten aus den tripelhelikalen Molekülbereichen die Razemisierung auch bei fortgeschrittener Kollagendegradation auf einem relativ niedrigen von 3,5-4% (Asx) Niveau bleibt (Fraktion 2 und 3). Dagegen nimmt in den niedermolekularen Fraktionen mit zunehmender Kollagendegradation (entsprechend abnehmender Kollagenausbeute) die Razemisierung zunächst stark zu (bis auf Werte um die 12% (Asx)). In stark degradiertem Kollagen (Kollagenausbeute $\leq 5\%$) fällt die Razemisierungsrate wieder auf Werte um 8% ab.

4.3.4 Korrektur der Beziehung zwischen AAR und Liegezeit über die Berechnung des „thermischen Alters“

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. M. Collins (BioArch, Departments of Biology and Archaeology, University of York, GB) wurde für die grob präparierten Proteinfractionen (TB, NCF, CF) der Versuch einer Korrektur der

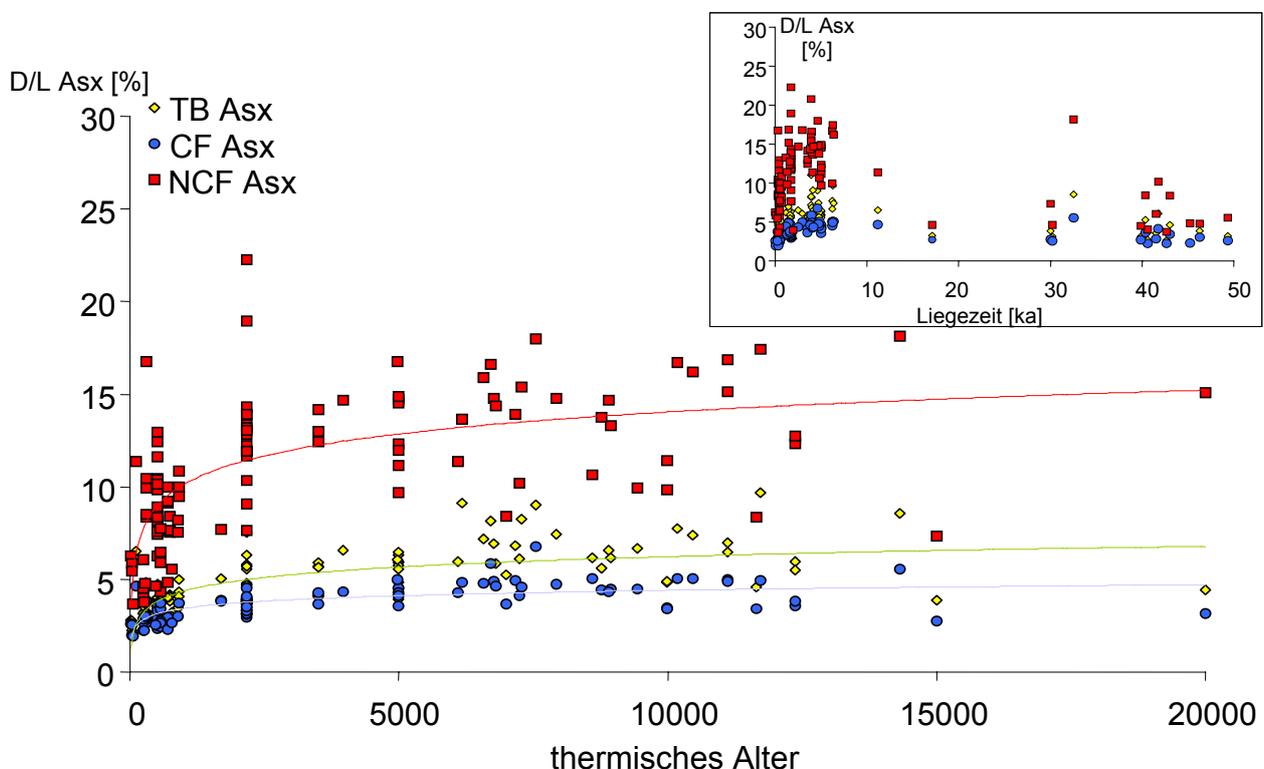
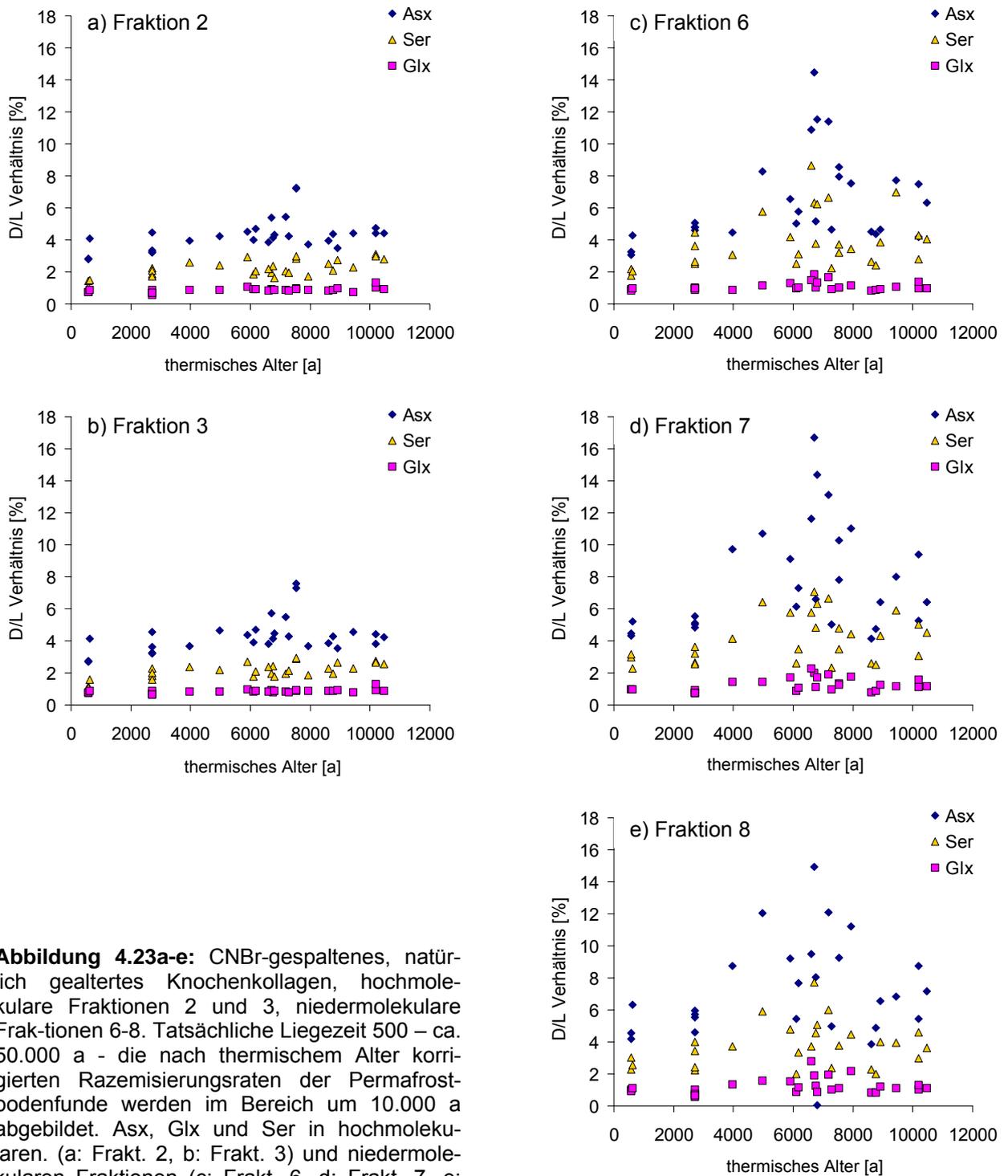


Abbildung 4.22: Über das „thermische Alter“ korrigierte Beziehung zwischen AAR (CF) und Liegezeit in grob präparierten Fraktionen historischer und archäologischer Knochenfunde. Tatsächliche Liegezeit 500 – ca. 50.000 a - die nach thermischem Alter korrigierten Razemisierungsraten der Permafrostbodenfunde werden im Bereich um 10.000 a abgebildet. Die Kurve zeigt den idealen Verlauf der AAR. Die verkleinerte Darstellung stellt zur besseren Veranschaulichung die unkorrigierten Werte den korrigierten gegenüber.

Aminosäurenrazemisierung unternommen (Abbildung 4.22).



Unter Berücksichtigung der Liegezeit, der Fundtiefe im Boden, Lage über NN und der hochgerechneten Jahresdurchschnittstemperaturen über die Dauer der Liegezeit wurde

4 Ergebnisse

ein „thermisches Alter“ für die natürlich degradierten Knochenfunde errechnet (Collins *et al.* 2002). Diesem Modell zufolge werden den unter Permafrostbedingungen gelagerten Funde (Abbildung 4.22, verkleinerte Darstellung) jüngere „thermische Alter“ zugewiesen. In Abbildung 4.22 werden die kalkulierten Daten des thermischen Alters zu den AAR-Werten für das CF, in Abbildung 4.23 zu den AAR-Werten für die mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmente des CF in Beziehung gesetzt.

5 Diskussion

Aminosäuredatierungen lassen, wie dargestellt wurde, zuverlässige Ergebnisse nur dann erwarten, wenn die Komposition der untersuchten Proben bekannt ist. Voraussetzung hierfür böte die Möglichkeit der Präparation definierter Proteinfractionen aus den zu untersuchenden Knochenproben. Die Entwicklung dafür tauglicher Methoden muss den molekularen Veränderungen während der Liegezeit Rechnung tragen. Immer bessere analytische Möglichkeiten eröffnen den Zugang zu „alten Biomolekülen“ mehr und mehr. Das Verständnis der Diagenese der mineralischen Matrix führte zur Etablierung wichtiger Untersuchungsmethoden, z.B. der Analyse stabiler Isotopen (Budd *et al.* 2000). Von einem ausreichenden Verständnis der Proteindiagenese sind wir aber noch weit entfernt (Hedges 2002).

Knochenkollagen ist eines der am besten untersuchten alten Proteine, dennoch ist das Verständnis seines Schicksals während der Liegezeit allenfalls bruchstückhaft. Zur Klärung und Beschreibung der Kollagendegradation wurden bislang im wesentlichen folgende Ansätze verfolgt:

- Bestimmung des C:N-Verhältnisses
- Analyse der Aminosäurekomposition
- (nicht systematisch) Untersuchung der Aminosäurerazemisierung
- (nicht systematisch) Darstellung von Kollagenfragmenten nach Spaltung mit Cyanbromid oder nach enzymatischer Spaltung

Bestimmung des C:N-Verhältnisses: Ein niedriges C:N-Verhältnis des Kollagens wird als Routineindikator für die Qualität des Proteins verwendet, allerdings streuen die akzeptablen C:N-Werte zur Beurteilung der Kollagenintegrität über einen weiten Bereich und verhalten sich häufig widersprüchlich zur Aminosäurezusammensetzung des Kollagens (van Klinken 1999). Dies verwundert nicht, da der Parameter letztlich unspezifisch ist.

Analyse der Aminosäurekomposition: Diese erwies sich bis zum Erreichen eines sehr niedrigen Kollagengehaltes als recht stabil (Hare 1980, Masters 1987, Gruppe & Turban-Just 1998). Dennoch liefert sie lediglich summarische Informationen über den

Zustand des Moleküls. Degradationsphänomene, die nicht zum Aminosäurenverlust führen, werden nicht erfasst.

Untersuchung der Aminosäurenrazemisierung: Die Aminosäurenrazemisierung (AAR) wurde als Mittel zur Voruntersuchung alter Funde vorgeschlagen, um daraus auf die Intaktheit der DNA zu schließen (Poinar *et al.* 1996). Doch die Kriterien, nach denen gearbeitet wird, sind nicht einheitlich (Serre *et al.* 2004). Das Verfahren wurde bereits kritisiert (Weiner *et al.* 1980, Taylor *et al.* 1989, Kimber & Hare, 1992), bislang gibt es auch noch keine wirklich umfangreichen und systematischen Untersuchungen zum Zusammenhang der AAR und der Degradation von DNA.

Darstellung von Kollagenfragmenten nach Spaltung mit Cyanbromid oder nach enzymatischer Spaltung: Tuross *et al.* (1980) bearbeiteten 5 verschiedene Knochenfunde unterschiedlicher geographischer Herkunft, indem extrahiertes altes Kollagen chemisch und enzymatisch mit CNBr und Pepsin in Fragmente zerlegt wurde, um diese elektrophoretisch und elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Jene Funde aus höheren geographischen Breiten (Delaware, USA und Neuseeland) zeigten einen besseren Erhaltungsgrad als die aus niederen Breiten (Kalifornien, USA und Ägypten). Einige hochmolekulare Fragmente traten bei der Elektrophorese nicht in das Gel ein, ähnliches beobachteten Schaedler *et al.* (1992) bei der elektrophoretischen Auftrennung von CNBr-Fragmenten einer ca. 11.200 Jahre alten Kollagenprobe. Umfangreichere und systematische Untersuchungen zu dieser Thematik liegen bislang nicht vor.

Die durch diese Ansätze erarbeiteten Daten vermögen den genauen Ablauf der Kollagendegradation nicht zu beschreiben. Deshalb mussten für die Entwicklung eines Verfahrens zur Präparation definierter Proteinfractionen zur Aminosäurendatierung systematische, umfangreiche Untersuchungen zunächst unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden. Dies wurde in weitem Umfang durch Hitzeversuche ermöglicht, in denen eine Kollagendegradation experimentell provoziert wurde.

5.1 Ergebnisse systematischer Untersuchungen zu Möglichkeiten der Präparation definierter Knochenproteinfraktionen

5.1.1 Präparation von säurelöslicher, nicht-kollagener (NCF) und säureunlöslicher, kollagener (CF) Knochenproteinfraktion

Nach dieser relativ groben Präparation lagen vor: 1.) Gesamtknochenprotein (TB), 2.) nicht-kollagene Fraktion (NCF, säurelöslich) sowie 3.) kollagene Fraktion (CF, säureunlöslich). In den Hitzeexperimenten kam der wässrige Überstand (LE) hinzu. Die Präparation dieser Fraktionen ist relativ einfach. Der große Nachteil dieses Ansatzes besteht darin, dass lediglich eine grobe Trennung von Proteinfraktionen nach ihrer Löslichkeit erreicht wird. So enthält die NCF-Fraktion keineswegs ausschließlich nicht-kollagene Proteine (Grupe 1995, Turban & Just 1997). Dies gilt insbesondere für degradiertes Knochenmaterial, bei dem diese Fraktion wenig definiert und abhängig vom Degradationszustand ist.

Die kollagene, säureunlösliche Knochenproteinfraktion erwies sich als sehr stabil. Die Aminosäurenprofile, sowohl von experimentell als auch natürlich degradiertem Knochengewebe, gaben ein erstaunlich einheitliches Bild wieder. Im Experiment wurde erst nach 20 Tagen mit einem Kollagenanteil von kleiner als 0,4% eine Abweichung vom kollagentypischen Aminosäurenprofil nachgewiesen (Abbildung 4.9a).

In natürlich degradiertem Kollagen blieb bis zu einer Liegezeit von ca. 5000 Jahren das kollagentypische Aminosäurenprofil erhalten (Abbildungen 4.1 und 4.2). Unabhängig hiervon lag die Kollagenausbeute zwischen 2% und 23%. Von älteren Funden lag für die Erstellung des Aminosäurenprofils nicht genügend Material zur Untersuchung vor.

Geringfügigere Degradationsvorgänge können aber theoretisch dazu führen, dass resultierende molekulare Bruchstücke noch *in situ* gehalten werden (z.B. über Crosslinks). In diesem Fall wäre die Proteindegradation durch die summarische Bestimmung der Aminosäurenkomposition nicht detektierbar; auch solche Degradationsformen können aber zumindest theoretisch Einfluss auf die Aminosäuredatierung nehmen. Hier hat die Definierbarkeit der „kollagenen“ Knochenproteinfraktion (CF) ihre Grenzen. Deshalb wurden in einem zweiten Ansatz definierte Kollagenfragmente nach Spaltung durch Cyanbromid (CNBr) präpariert.

5.1.2 Cyanbromid(CNBr)-Fragmente des Kollagens

Die Produktion von löslichen Kollagenfragmenten mittels CNBr wurde sowohl zur Strukturaufklärung der verschiedenen Kollagene verwendet (z. B. Fietzek *et al.* 1972, Volpin & Veiss, 1973) als auch – wenn auch nicht systematisch - zur Charakterisierung alten Kollagens (Tuross *et al.* 1980, Tuross 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Aminosäurenrazemisierung in CNBr-Fragmenten des Kollagens untersucht.

5.1.2.1 Trennung und weitere Präparation der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente mittels Elektroelution

Nach künstlicher Degradation zeigte sich ein für frische Knochenproben typisches CNBr-Peptidmuster über die Dauer des Hitzeexperiments bis zu einer Kollagenausbeute von <1% bezogen auf das Gesamtkollagen (Abbildungen 4.3 und 4.4). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass entgegen dem „polymer-degradation-model“ (Collins *et al.* 1995) die Hydrolyse der Aminosäuren aus dem Kollagen nicht zufällig geschieht, sondern vielmehr im jeweils noch vorhandenen Kollagen das Molekül hauptsächlich intakt vorliegt.

Auch nach natürlicher Alterung zeigte die große Mehrheit der alten Kollagenproben typische Kollagenfragmentmuster (Abbildung 4.4); dabei ließen sich in der Elektrophorese saubere Banden darstellen. Auch dieser Befund steht in Widerspruch zu dem „polymer-degradation-model“ (Collins *et al.* 1995), nach dem in der Elektrophorese ein „verschmierter“ Hintergrund aus Peptiden und Proteinfragmenten mit variierendem Molekulargewicht zu erwarten wäre. Ein solches Bild wurde beispielsweise von Tuross *et al.* (1980) in drei Kollagenproben (Höhlenfund, Moa, Teersee, Smilodon, Ägyptische Mumie) beobachtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang lediglich bei zwei alten Kollagenproben, beide Funde von Tieren aus dem britischen Pleistozän, die zudem nach dem thermischen Alter die längste Liegezeit aufwiesen (vergleichbar mit Smilodon und der Ägyptischen Mumie, Tuross *et al.* 1980) auch in wiederholten Ansätzen keine saubere Darstellung der CNBr-Fragmente. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass der Zerfall des Kollagens in Knochen mit längerer Liegezeit (hier: thermisches Alter >7000 Jahre, Abschnitt 4.3.4) komplexer wird. Die Ergebnisse widersprechen insoweit den Hitzeexperimenten, in denen das elektrophoretische Bild klar abzugrenzende Banden ohne Hintergrund zeigte, obwohl das Kollagen bereits nahezu vollständig zerstört

5 Diskussion

war. Eine mögliche Erklärung wäre eine extensive Oxidation der Methioninreste unter natürlichen Bedingungen, sodass dort das CNBr nicht mehr die Kollagenkette spalten kann, obwohl zur Reduktion des Methionins ein zusätzlicher Reduktionsschritt mit Mercaptoethanol vorgeschaltet wurde (Scott & Veiss 1976a, b, Novotna et al 1996, Rossi et al 1996). Andererseits könnte ein fehlender Reduktionsschritt vor dem CNBr-Schritt erklären, warum sich die CNBr-Fragmente bei Tuross et al. (1980) und Schaedler et al. (1992) nur verhältnismäßig unsauber darstellen ließen. Alternativ wäre einer höhere Vernetzung des Kollagen über Quervernetzung (Crosslinks) und somit eine Veränderung der Fragmentgröße eine Erklärung für unsaubere Elektrophoresen der CNBr-Fragmente. Ebenso könnte die zufällige Ansammlung von Brüchen der α -Ketten („polymer-degradation-model“, Collins et al. 1995) in den älteren Knochenproben eine bedeutendere Rolle erlangen als in jüngeren Knochen, allerdings fehlen dafür Belege aus den Hitzeexperimenten.

Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass die Präparation definierter Kollagenfragmente nach Spaltung mit CNBr grundsätzlich gut und zuverlässig machbar ist. Bei natürlich gelagerten Knochenproben mit sehr langen Liegezeiten (hier: von um 7.000a thermisches Alter) kann die Methode allerdings an ihre Grenzen stoßen.

Weiter wird – wie gesagt – durch die Daten belegt, dass das „polymer-degradation-model“ (Collins et al. 1995) mit der postulierten zufälligen Häufung von Defekten entlang der α -Kette offenbar nicht die wesentliche Ursache des Kollagenabbaus ist. Diese Erkenntnis ist von großer praktischer Bedeutung, insbesondere für Isotopenanalysen und ^{14}C -Datierungen. Die Aufreinigung von Kollagen für Isotopenanalysen und ^{14}C -Datierungen beinhaltet derzeit eine Filtrierung nach dem Molekulargewicht (30kDa; Richards et al. 2001, Ramsey et al. 2004), die allerdings, würde das „polymer model of degradation“ (Collins et al. 1995) zutreffen, lediglich die hochmolekularen Kollagene geringerer Liegezeiten zurückhalten, die niedermolekularen Kollagenfragmenten älterer Liegezeiten dagegen nicht. Der hier geführte Nachweis intakten Kollagens auch bei fortgeschrittener Degradation kann somit als Beleg für die Zweckmäßigkeit der genannten Kollagenaufreinigung gewertet werden; die Anwendung eines 30kDa Ultrafiltrationsschritts erscheint unter Berücksichtigung der erarbeiteten Daten nur allzu sinnvoll, da die intakten α -Ketten des Kollagens mit einem Molekulargewicht >100kDa darin zurückgehalten werden.

Die elektrophoretisch dargestellten CNBr-Fragmente wurden mittels Elektrolution aufgereinigt. Dieses Verfahren ist elegant, geschieht die Aufreinigung doch unter „visueller Kontrolle“. Nachteile sind ein infolge der Aufwändigkeit des Verfahrens vergleichsweise niedriger Probendurchsatz sowie die Nicht-Darstellung von Fragmenten mit Molekulargewichten unter 6kDa. Aus diesem Grund wurde als weiterer Ansatz die Gruppentrennung der CNBr-Fragmente über eine Gruppenseparation nach Molekulargewicht geprüft.

5.1.2.2. Gruppentrennung der durch Spaltung durch CNBr entstandenen Kollagenfragmente über das Molekulargewicht (PD-10-Säulen)

Dieses Verfahren zeichnete sich in der Tat durch die Möglichkeit eines hohen Materialdurchsatzes bei geringem apparativen Aufwand sowie die Erfassbarkeit auch kleinster Fragmente aus. Es zeigte außerdem eine hohe Reproduzierbarkeit (Abbildung 4.5). Nachteilig ist allerdings, dass es sich bei dem eingesetzten Verfahren lediglich um eine grobe Trennung in „großmolekular“ (>ca. 10kDa) und „kleinmolekular“ (<ca. 10 kDa) handelt.

5.2. Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus experimentell degradierten Knochenproben (Hitzeexperimente) präparierten Proteinfractionen

Das gebräuchlichste Verfahren zur Simulation der Kollagendegradation ist derzeit die Erhitzung von Kollagen oder von Knochenfragmenten über unterschiedliche Zeiträume (Hare 1980, Collins *et al.* 1999, Hedges 2002). Bei den jetzt durchgeführten Untersuchungen wurde eine einheitliche Temperatur von 90°C in wässriger Umgebung gewählt, und Knochenstücke definierter Größe wurden exponiert. Die Temperatur von 90°C liegt weit unterhalb des Schmelzpunkts von Kollagen im Knochengewebe, aber so hoch, dass in überschaubaren Zeiträumen für die nachfolgenden präparativen Ansätze degradiertes Kollagen erzeugt werden konnte. Knochenkollagen gelatinisiert (schmilzt) erst bei 173°C, demineralisiertes Kollagen bereits bei 94°C (Lees 1989). Collins *et al.* (1999) behaupten, dass unterhalb der Schmelztemperatur von Kollagen (68°C) innerhalb der Tripelhelix keine Razemisierung auftritt, innerhalb von intaktem Knochen nicht unterhalb von 150°C. Die Knochenfragmentgröße wurde standardisiert, da die Größe der Knochen-

fragmente die Razemisierung von Aminosäuren und die Diffusionsstrecke möglicherweise entstehender niedermolekularer Fragmente beeinflusst (von Endt & Ortner 1984). Knochenfragmente von 0,5cm Kantenlänge sollten im Gegensatz zur Arbeit von von Endt & Ortner (20-120µm) die natürlichen Verhältnisse im Knochen weitestgehend simulieren.

5.2.1 AAR in Überstand (LE), kollagener Fraktion (CF), nicht-kollagener Fraktion (NCF) und Gesamtknochen (TB)

Die unmittelbare Umgebung von Asn und Asp in der Primärstruktur sowie die höhere Struktur bestimmen die Kinetik der Razemisierung (Chazin & Kossiakoff 1995, Clarke 1987, Fujii *et al.* 1996, 1999, Kossiakoff 1988; Lowenson & Clarke 1988, Lura & Schirch 1988, Robinson & Robinson 2001a,b, van Duin & Collins 1998, Xie & Schowen 1999). Insoweit war zu erwarten, dass jede der untersuchten Fraktionen eine eigene Kinetik der AAR aufwies.

Im wässrigen Überstand wurden generell die höchsten Razemisierungswerte gemessen, es zeigte sich hier die schnellste Razemisierungskinetik. Die Freisetzung der Aminosäuren und (Oligo)peptide aus den eingesetzten Knochenstücken muss über Diffusion von wasserlöslichen kleinsten Peptiden (inklusive hochrazemisierten Kollagenbruchstücke) erfolgt sein. Einmal in Lösung gebracht, ist in diesen Peptiden eine weitere beschleunigte Razemisierung denkbar. Aufgrund der Altersstaffelung der AAR auch im LE darf man vermuten, dass bei fortschreitender Kollagen-degradation die Freisetzung von kleinsten Fragmenten durch die mit dem Alter zunehmende Quervernetzung des Kollagens (De las Heras *et al.* 1999) gebremst wird. Elektrophoretisch ließen sich aus der LE keine Peptide nachweisen, was einen weiteren Hinweis auf die geringe Größe der darin enthaltenen Peptide darstellt. Gerade aber bei kleinsten Peptiden entfallen sterische Hindernisse für eine Razemisierung; die im LE festgestellten hohen AAR-Werte erscheinen deshalb als außerordentlich plausibel.

Die Razemisierungsraten in Abhängigkeit zur Kollagen-degradation im CF und TB sind zu Beginn des Experiments zunächst weniger schnell (Abbildung 4.9b), verflachen bei mittleren Kollagenausbeuten und steigen bei Kollagenausbeuten $\leq 2\%$ exponentiell an. Dies lässt den Schluss zu, dass das intakte, tripelhelikale Kollagen im Knochengewebsverbund mit einer langsameren Kinetik zerfällt, als die peptid-gebundenen Aminosäuren im Kollagenverbund razemisieren. Der geschwindigkeits-

bestimmende Schritt wäre daher der Kollagenzerfall, nicht aber die Razemisierung. Diese scheint, sobald die sterische Behinderung aufgehoben wird, spontan zu erfolgen. Mit Erreichen eines kritischen Werts der Kollagendegradation steigt die Razemisierungsrate drastisch an. Dies ist möglicherweise erklärbar aufgrund des fortgeschrittenen Degradationszustandes mit nachlassender intramolekularer Stabilisierung sowie der relativen Zunahme der Anzahl von Telopeptiden (C- und N-terminale Proteinfragmente, sowie intramolekulare Fragmente) über die gesamte Länge des Moleküls durch intramolekulare Defekte. Derart instabile Abschnitte stellen möglicherweise erst die Voraussetzung für die Razemisierung von AS dar, die aufgrund sterischer Hinderungen im intakten tripelhelikalen Kollagen ausbleiben.

Es verwundert deshalb nicht, dass die Geschwindigkeit der AAR mit der Abnahme der Kollagenausbeute ansteigt (Abbildung 4.9b). Der offenbar stabilisierende Effekt eines höheren Lebensalters auf das Kollagenmolekül über Crosslinks Li *et al.* (2003) wird parallelisiert von altersabhängigen Kinetiken der AAR im Hitzeexperiment, mit langsamerer AAR im Knochen älterer Individuen.

Die erhobenen Daten stützen die Vermutung, dass hochrazemisierte Kollagenfragmente mit zunehmender Kollagendegradation aus dem Molekülverband herausgelöst werden und dann im LE erscheinen. Die vergleichsweise hohen AAR-Werte für die Gesamtknochen-Fraktion (TB) sowie für die nicht-kollagene Fraktion (NCF) lassen, unter Berücksichtigung der Aufreinigungsschritte vor der Hydrolyse, die Ansammlung von niedermolekularen, noch im molekularen Verband befindlichen, aber bereits geschädigten Peptiden in diesen beiden grob gereinigten Fraktionen vermuten (Abbildung 3.8b+d).

Die nicht-lineare Kinetik der Asx-Razemisierung wird nach Goodfriend (1991) weiterhin damit erklärt, dass das analysierte Asx sowohl aus Asp- als auch Asn-Resten stammt, wobei das letztgenannte während der Hydrolyse erst über die Deamidierung des Asn entsteht. Die unterschiedlichen Bildungsraten des Succinimid-Intermediats aus Asn- und Asp-Resten beeinflussen daher die Razemisierungskinetik.

5.2.2 AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroeluierten CNBr-Fragmenten

Die Untersuchung der elektroeluierten Peptide ließ sich aufgrund der fortschreitenden Kollagendegradation lediglich in eingeschränktem Umfang durchführen und ist daher von begrenzter Aussagekraft.

Die hochmolekularen Kollagenfragmente in Banden 2 und 4 zeigen unterschiedliche Razemisierungskinetiken im Verlauf der Hitzeexposition (vgl. Abbildung 4.10). Die Razemisierungsraten am Startpunkt (Tag 0) stimmen nahezu überein. Zusammen mit dem Abfall der Razemisierung in Bande 2 kann dies als Hinweis auf Fragmente, herrührend aus dem tripelhelikalen Bereich, gewertet werden, die im Verlauf der frühen Kollagendiagenese kleinste, hochrazemisierte Peptide zu unterschiedlichen Anteilen verlieren, so dass dadurch das elektrophoretische Auftrennverhalten geringfügig beeinflusst wird. Die über den Bereich der Bande 2 auftretenden unsauberen Hintergründe geben darauf weiteren Hinweis, für Bande 4 trifft ähnliches zu. Dieses Resultat, zusammen mit der engen Nachbarschaft zu weiteren Kollagenfraktionen führte zum Ausschluss dieser zwei höhermolekularen Kollagenfragmente bei den weiteren Untersuchungen.

Die Razemisierungsraten der niedermolekularen Fragmente in den Banden 5-1 und 6 (vergl. Abbildung 4.10) stellen sich zu Beginn des Experiments nicht mit dem Lebensalter korrelierend dar. In beiden Proteinfractionen steigt die Razemisierung zunächst an (bis Tag 5). Die folgenden Daten lassen vermuten, dass der Razemisierungsanstieg bei dem älteren Individuum und der Abfall bei dem jungen Individuum sich hier aufgrund der unterschiedlichen altersbedingten Kollagenstabilität über Crosslinks und der damit verbundenen unterschiedlich schnellen Kollagendiagenese detektieren lassen (Kollagenausbeute, vgl. Abbildung 4.9).

Die Razemisierung gegen das Lebensalter aufgetragen ergibt für Bande 5-1 einen ansteigenden Trend, allerdings bei einer Streuung um die Breite von 0,75%. In Bande 6 lässt sich ein solcher Trend nicht finden.

5.2.3 AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppen-trennung nach Molekulargewicht)

Bei Analyse der eluierten Fraktionen über den gesamten Molekulargewichtsbereich zeigte sich mit zunehmender Hitzeexposition ein Anstieg der Werte in allen Molekulargewichtsbereichen, allerdings in etwas unterschiedlichem Ausmaß (exemplarisch in Abbildung 4.13 dargestellt). Im niedermolekularen Bereich (ab Fraktion 6) fand sich ein insgesamt deutlicherer Anstieg der AAR als im höhermolekularen Bereich. Aufgrund der höheren Flexibilität kleinerer Moleküle war dies zu erwarten. Unklar sind dagegen die Werte für die Fraktionen um Fraktion 6, wo sich sowohl in den nicht erhitzten Proben als auch nach Erhitzung ein relativ höheres Niveau der AAR zeigte (Abbildung 4.12). Dies ist auf molekulare Besonderheiten der hier eluierenden Fragmente zurückzuführen. Eine weitere Aufklärung dieser Beobachtung würde eine bessere Trennung dieser Fragmente, beispielsweise durch eine „große“ Gelfiltration oder präparative HPLC erfordern.

Im Gegensatz zu den elektrophoretisch präparierten niedermolekularen Fragmenten bildet sich das Lebensalter in den über grobe Gelfiltration erhaltenen niedermolekularen Fragmenten klarer ab (vgl. Tag 0, Abbildung 4.13 und 4.14). Über den Lebensaltersbereich von ca. 20-50 Jahren ist ein Razemisierungsanstieg um ca. 2% im Asx nachweisbar (Fraktion 6 und 7). Allerdings reicht für eine verlässliche Lebensaltersschätzung hier die Präzision nicht an bereits etablierte Verfahren heran (Ritz-Timme 1999, Ritz-Timme *et al.* 2002, 2003, Ohtani 1997, *et al.* 2005).

5.3 Aminosäurenrazemisierung (AAR) in den aus natürlich degradierten Knochen präparierten Proteinfractionen, Zusammenhang zwischen dem Alter sicher datierter Knochenfunde und der AAR in den präparierten Proteinfractionen

5.3.1 Gesamtknochenproben (TB) sowie „nicht-kollagene“, säurelösliche (NCF) und „kollagene“, säureunlösliche (CF) Knochenproteinfraction

Die Aminosäurenrazemisierung in den Fraktionen TB, NCF und CF stellen sich in den Abbildungen qualitativ sehr ähnlich dar. Bis zu einer Liegezeit von ca. 6500 Jahren zeigte sich jeweils ein deutlicher Anstieg der AAR, wenn auch mit

5 Diskussion

großer Streuung selbst innerhalb der verschiedenen Fundorte mit jeweils zumindest annähernd gleichen Umgebungsbedingungen (z.B. Fundkomplexe Flensburg und Trier).

Nach längeren Liegezeiten >10.000 Jahren wurden in allen Proben überraschend niedrige Werte gefunden. Jedoch müssen bei der Interpretation dieser Ergebnisse die Umgebungsbedingungen berücksichtigt werden. Wenn auch niedrige AAR-Werte trotz langer Liegezeit im Einzelfall durch extrem kalte Umgebungsbedingungen (Permafrost) erklärt werden können, erklärt dies jedoch nicht das Gesamtbild der Daten. Die Berechnung des „thermischen Alters“ (vgl. 4.3.4) „harmonisiert“ die Daten zwar etwas, beseitigt aber nicht die große Streuung der Daten. Auch das Ausmaß der Kollagendegradation bietet keinen eindeutigen Erklärungsansatz für die in Abbildung 4.15 dargestellten Ergebnisse. Wenn auch eine Tendenz zu höheren AAR-Werten bei fortgeschrittener Kollagendegradation (niedrige Kollagenausbeuten) erkennbar wird, finden sich auch Proben mit bereits geringem Kollagengehalt und niedrigen AAR-Werten. Dies ist wiederum als Hinweis darauf zu werten, dass – in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen (Collins *et al.* 2002) – gerade die Kollagenanteile mit hochrazemisierten Aminosäureresten insbesondere während langer Liegezeiten an die Umgebung verloren gehen („leaching“), was ja durch die Ergebnisse der Hitzeexperimente ebenfalls belegt wird.

Die Analyse der doch relativ hohen Streuung bei Proben aus identischen Fundorten mit jeweils zumindest annähernd gleichen Umgebungsbedingungen (z.B. Trier, Flensburg) wirft sich die Frage auf, ob sich die bereits zu Lebzeiten stattgefundenene Razemisierung in den Daten abbildet (Ritz *et al.* 1994, 1996, Ritz-Timme 1998, Ritz-Timme *et al.* 2002) und so das erreichte Lebensalter die Daten beeinflusst hat. Bei Auftragen der Daten für die Fundkomplexe „Trier“ und „Flensburg“ nach dem Lebensalter der Individuen und Vergleich mit an frischen Knochenproben erhobenen Daten (Abbildung 4.15) zeigte sich jeweils eine „Anhebung“ der Regressionsgeraden im Bereich des jungen Lebensalters. Das bedeutet, dass die liegezeitbedingte Razemisierung bei jungen Individuen offenbar eine andere Kinetik (mit schnellerer Razemisierung) aufweist als bei älteren Individuen. Ursächlich könnten hier molekulare Unterschiede zwischen jungem und altem Kollagen (z.B. Crosslinks) oder eine intravital noch nicht abgeschlossene und

dann „nachgeholte“ rasche Razemisierung im Bereich der Telopeptide bei jungen Individuen sein. Diese Beobachtung entspricht der Hypothese von El Mansouri *et al.* 1996, wonach die im Boden gelagerten Knochen über weite Bereiche streuende Razemisierungsraten ergeben können, aufgrund des Verlusts von kleinen bis kleinsten Proteinfragmenten mit entsprechend schneller Razemisierungskinetik an die Umgebung.

Der Einfluss der Lagerungsbedingungen im natürlichen Umfeld auf die Kollagendegradation ist in hohem Maße unterschiedlich. Die mikrobielle Dekomposition während der frühen Liegezeit (Turban-Just 1997, Child 1995) sowie, nach der Dekomposition der Weichgewebe, die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Bodens über die gesamte Liegezeit hinweg (Collins *et al.* 2002) variieren von Fundort zu Fundort. Daher schwankt die Kollagenausbeute, auch innerhalb einzelner Fundkomplexe, über die Liegezeit bis zu ca. 6.500 Jahren. Die hohen Kollagenausbeuten der Permafrostfunde sind sicherlich ebenfalls mit den besonderen, konservierenden Lagerungsbedingungen zu erklären (vgl. Abbildung 4.17).

5.3.2 AAR in Cyanbromid-Fragmenten des Kollagens

5.3.2.1 AAR in elektrophoretisch aufgetrennten und elektroeluierten CNBr-Fragmenten

In den präparierten Fragmenten der Banden 5.1 und 6 (vgl. Abbildung 4.18) aus natürlich gealterten Proben mit Liegezeiten bis 6500 Jahren zeigten sich insgesamt nur niedrige AAR-Werte, ein Zusammenhang zwischen AAR und Liegezeit ließ sich bei Bande 6 allenfalls erahnen; die Daten für Bande streuen über einen weiten Bereich. Selbst bei den am schnellsten razemisierenden Asx-Resten ergab sich keine eindeutige Tendenz zu einer Zunahme mit der Liegezeit. Offenbar stammen die präparierten Fragmente aus den stabileren Tripelhelix-Anteilen des Kollagenmoleküls, in denen eine Razemisierung aus sterischen Gründen stark erschwert ist.

5.3.2.2 AAR in mittels Gelfiltration aufgetrennten CNBr-Fragmenten (Gruppen-trennung nach Molekulargewicht)

In den höhermolekularen Fraktionen 2 und 3 (vgl. Abbildung 4.20a und b) ließen sich bei Liegezeiten bis zu von 6500 Jahren AAR-Werte auf relativ

konstantem Niveau nachweisen. Dies entspricht den Ergebnissen der Analyse der elektroeluierten Kollagenfragmente der Banden 5-1 und 6 (vgl. Abbildungen 4.18a und b). Offenbar finden sich in diesen Fraktionen Fragmente aus den tripelhelikalen Anteilen des Kollagenmoleküls, von denen bekannt ist, dass durch die helikale Struktur die Bildung des Succinimid-Intermediats, und damit die Razemisierung von Asx unterbunden wird (van Duin & Collins 1998).

Dagegen zeigte sich in den niedermolekularen Fraktionen 6-8 (unter ca. 3,5kDa, vgl. Abbildung 4.20c-e) ein teilweise sehr deutlicher Anstieg der AAR-Werte mit der Liegezeit. Allerdings nimmt mit der Liegezeit die Streuung zu und ab einer Liegezeit von ca. 4000 Jahren verringert sich die Razemisierung abrupt. Die jetzt in den niedermolekularen Fraktionen festgestellte Zunahme der AAR-Werte bis zu einer bestimmten Liegezeit und die daran anschließende Razemisierung auf niedrigerem Niveau bei längeren Liegezeiten unterstützt die Annahme, dass – in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen – gerade die Kollagenanteile mit hochrazemisierten Aminosäurenresten aus geschädigten Molekülanteilen, insbesondere während langer Liegezeiten, an die Umgebung verloren gehen („leaching“). Somit werden sie in der Analyse – jedenfalls mit der hier eingesetzten Methodik – nicht erfasst.

5.4 Korrektur der Beziehung zwischen AAR und Liegezeit über die Berechnung des „thermischen Alters“

Diese Korrektur unter Einbeziehung von Fundtiefe im Boden sowie der hochgerechneten Jahresdurchschnittstemperatur am Fundort (Collins *et al.* 2002) ergab geringfügige Verbesserungen, indem der Fundkomplex „Sachsen-Anhalt“ in der zeitlichen Auflösung gespreizter dargestellt wird (Abbildung 4.22). In dieser Darstellung werden die Funde aus Permafrostböden mit tatsächlichen Liegezeiten von 10.000-50.000 Jahren im Bereich von 10.000 Jahren abgebildet. Letztlich hat die Korrektur der Beziehung zwischen AAR und Liegezeit über die Berechnung des „thermischen Alters“ die Datenlage jedoch kaum verändert. Dies bedeutet, dass der thermische Einfluss die nur lockere Beziehung zwischen AAR und Liegezeit nicht wesentlich bedingt.

5.5 Zusammenfassende Würdigung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Ziel des Projektes sollte die Revision der Aminosäurendatierung durch Untersuchung *definierter* Proteinfractionen sein.

Durch die durchgeführten systematischen **Untersuchungen an künstlich im Hitzeexperiment gealterten Knochenproben** wurden im Wesentlichen folgende Erkenntnisse erarbeitet:

- Die Kinetik der AAR in Knochenproteinen während künstlicher oder natürlicher Alterung wird wesentlich durch die Proteindegradation beeinflusst. Der Untersucher muss deshalb den Degradationszustand der zu analysierenden Proben kennen bzw. abschätzen können.
- Das Ausmaß der Kollagendegradation wird durch Feststellung des Kollagengehalts nur unzureichend erfasst. Ganz offensichtlich verbleiben im Hitzeexperiment auch bei fortgeschrittener Degradation (bis zu einem „Kollagengehalt“ von 0,1%) zunächst weitgehend intakte Kollagenanteile. Das jeweils „überlebende“ Kollagen scheint relativ lange seine molekulare Integrität zu bewahren. Der tatsächliche Zustand des nach Demineralisation verbliebenen unlöslichen „Kollagens“ kann nach Cyanbromidspaltung kontrolliert werden.
- Auch bei fortgeschrittener Proteindegradation können definierte Kollagenfraktionen nach Cyanbromidspaltung aufgereinigt werden, solange ein „kritisches Degradationsniveau“ nicht erreicht ist. Durch den „Kunstgriff“ der Kollagenspaltung wird eine klare Definition von sicher kollagenen Proteinfractionen ermöglicht; die Fragmente sind in der Literatur ausreichend gut beschrieben.

Aufgrund dieser Erkenntnisse aus den Hitzeversuchen wurde zunächst davon ausgegangen, dass Kollagenfragmente nach Cyanbromidspaltung als definierbare, auch bei fortgeschritten degradierten Knochen präparierbare Proteinfractionen als Untersuchungsmaterial zur Revision der Aminosäurendatierung eingesetzt werden können, jedenfalls solange, bis ein „kritisches Degradationsniveau“ erreicht wird.

Die Ergebnisse der **Untersuchungen an natürlich gealterten Knochenproben mit einer Liegezeit bis zu 200.000 Jahren** zeigen allerdings, dass

5 Diskussion

auch bei Aufreinigung definierter Proteinfractionen und Beachtung der „Thermal History“ (also der Umgebungstemperatur während der Liegezeit) die vielversprechenden Daten aus den Hitzeexperimenten nicht ohne weiteres auf natürlich gealterte Proben übertragbar sind:

- Eine grundlegende Problematik der Aminosäurendatierung besteht darin, dass es im Rahmen der Kollagendegradation zu einem offenbar individuell (auch unter Berücksichtigung des absoluten Degradationsausmaßes) nicht vorhersagbaren Verlust von (vermutlich hochrazemisierten) Kollagenbruchstücken an die Umwelt (Leaching) kommt. Dies betrifft offenbar gerade Knochen mit langer Liegezeit, bei denen infolge des Verlustes hochrazemisierter Kollagenfragmente teilweise auch nur niedrige AAR-Werte beobachtet wurden (vgl. Abbildungen 4.22 und 4.23). Unter diesen Bedingungen wäre eine Revision der Aminosäurendatierung durch Aufreinigung definierter Kollagenfragmente nur dann möglich, wenn die hochrazemisierten Aminosäurenreste aus geschädigten Molekülanteilen nicht komplett zu verloren gingen. Die Frage, ob und wo die liegezeitbedingte AAR dadurch „gespeichert“ wird, dass entsprechende Molekülanteile im Knochen verbleiben, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die hochrazemisierten Aminosäurenreste geschädigter Molekülanteile fanden sich nach Cyanbromidspaltung unter den kleinen bis kleinsten Fragmenten, die sich den im Rahmen des Projektes eingesetzten Aufreinigungsverfahren entzogen. Sollten solche kleinsten Kollagenbruchstücke als „Liegezeituhr“ tatsächlich durch Bindung an das Hydroxyapatit im Knochen erhalten bleiben, wie von DeNiro & Weiner (1988) vermutet, müsste im Rahmen weiterführender Untersuchungen mit auf kleinstmolekulare Peptide optimierten Aufreinigungsverfahren gearbeitet werden. Hierin wäre die „letzte Chance“ für eine erfolgreiche Revision des Verfahrens zu sehen.
- Als zusätzliche, methodisch nicht beeinflussbare und bislang nicht bekannte Fehlerquelle bei der Aminosäurendatierung wurde der Einfluss des Lebensalters auf die Kinetik der postmortalen AAR detektiert (vgl. Abbildungen 4.12, 4.13, 4.15)

Damit hat das im Rahmen des Projektes erhobene umfangreiche Datenmaterial die Aminosäurendatierung weiter problematisiert, anstatt sie zu

revidieren. Ohne Zweifel sind die erhobenen Daten dennoch von hoher praktischer Relevanz. In der Literatur finden sich (noch immer) Mitteilungen über „erfolgreiche“ Aminosäurendatierungen (Csapo *et al.* 1997, 2001). Da jede Fehldatierung zu massiven geisteswissenschaftlichen Fehlinterpretationen führen kann, ist nach den vorliegenden Daten ein sehr kritischer Umgang mit der Aminosäurendatierung anzuraten.

Außerhalb des Forschungsgebietes „Aminosäurendatierung“ dürften die Projektergebnisse auch von Relevanz für alle anderen Gebiete sein, für die die Degradation von Kollagen während langer Liegezeiten von Bedeutung ist, so für die C14-Datierung oder die Rekonstruktion von Paläodiät und Paläoklima aufgrund stabiler Isotopen.

6 Literatur

- Adams E (1972) Amino acid racemases and epimerases. In: Boyer PD (ed) *The Enzymes*, Vol. VI. Academic Press, New York, pp 479-507
- Amice M, Delfour A, Nicolas P (1998) Opioid peptides from frog skin. In: Jolles P (ed) *D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms*. Birkhäuser, Basel, pp 57-72
- Armstrong D W, Gasper M P, Lee S H, Zukowski J, Ercal N (1993) D-amino acid levels in human physiological fluids. *Chirality* 5:375-378
- Bada J L, Protsch R (1973) Racemization reaction of aspartic acid and its use in dating fossil bones. *Proc Natl Acad Sci* 70:1331-1334
- Bada J L, Schroeder R A, Carter G F (1974) New evidence for the antiquity of Man in North America deduced from aspartic acid racemization. *Science* 184:791-793
- Bada J L, Schroeder R A (1975) Amino acid racemization reactions and their geochemical implications. *Naturwissenschaften* 62:71-79
- Bada J L, Shou M Y (1980) Kinetics and mechanism of amino acid racemization in aqueous solution and in bones. In: Hare P E, Hoering C, King K (eds) *Advances in biogeochemistry of amino acids*. Carnegie Institution of Washington Conference, pp 235-255
- Bada J L, Gillespie R, Gowlett J A J, Hedges R E M (1984) Accelerator mass spectrometry radiocarbon ages of amino acid extracts from Californian palaeoindian skeletons. *Nature* 312:442-444
- Bhattacharyya S K, Banerjee A B (1974) D-amino acids in the cell pool of bacteria. *Fol Microbiol* 19:43-50
- Bonner W A (1995) Chirality and Life. *Orig Life Evol Biosphere* 25:175-190
- Bonner W A (1998) Homochirality and life. In: Jolles P (ed) *D-amino acids in sequences of secreted peptides of multicellular organisms*. Birkhäuser, Basel, pp 159-188
- Bowen D Q, Hughes S, Sykes G A, Miller G H (1989) Land-sea correlations in the Pleistocene based on isoleucine epimerization in non-marine molluscs. *Nature* 340:49-51
- Bowen D Q, Sykes G A (1994) How old is "Boxgrove man"? *Nature* 371:751
- Boyd W E (1998) *New frontiers and applications in palynology*. Elsevier, Amsterdam
- Brunauer L S, Clarke S (1986) Age-dependent accumulation of protein residues which can be hydrolyzed to D-aspartic in human erythrocytes. *J Biol Chem* 261:12538-12543
- Brückner H, Lüpke M (1991) Determination of amino acid enantiomers in orange juices by chiral phase capillary gas chromatography. *Chromatographia* 31:123-128
- Brückner H, Wittner R, Godel H (1991) Fully automated high-performance liquid chromatographic separation of DL-amino acids with o-phthaldialdehyde together with N-Isobutyryl-Cysteine. Application to food samples. *Chromatographia* 32:383-388

- Brückner H, Becker D, Lüpke M (1993) Chirality of amino acids of microorganisms used in food biotechnology. *Chirality* 5:385-392
- Brückner H, Westhauser T (1994) Chromatographic determination of D-amino acids as native constituents of vegetables and fruits. *Chromatographia* 39:419-426
- Brückner H, Haasmann S, Friedrich A (1994) Quantification of D-amino acids in human urine using GC-MS and HPLC. *Amino Acids* 6:205-211
- Brückner H, Langer M, Lüpke M, Westhauser T, Godel H (1995) Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by derivatization with o-phthaldialdehyde and chiral thiols. Application with reference for food science. *J Chromatogr A* 697:229-245
- Budd P, Montgomery J, Barreiro B, Thomas RG (2000) Differential diagenesis of strontium in archaeological human dental tissues. *Appl Geochem* 15:687-694
- Burgeson R E, Nimni M E (1992) Section III, Basic Science and Pathology, Collagen Types - Molecular Structure and Tissue Distribution. *Clin Orthop* 282:250-272
- Cahn R S, Ingold C K, Prelog V (1966) Specification of molecular chirality. *Angew. Chem* 78:413-447
- Chazin W J, Kossiakoff A A (1995) The role of secondary and tertiary structures in intramolecular deamidation of proteins. In: Asward D W (ed) *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 193-206
- Child A M (1995) Towards an understanding of the microbial decomposition of archaeological bone in the burial environment. *J Archaeol Sci* 22:165-174
- Clarke S (1987) Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginyl residues in cellular proteins. *Int J Peptide Protein Res* 30:808-821
- Cloos P A C (1995) Age related changes in proteins in human dentine. *Det Kongelige Danske Kunstakademi (Konservatorskolen)*, Kopenhagen
- Collins M J, Riley M S, Child A M, Turner-Walker G (1995) A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *J Archaeol Sci* 22:175-183
- Collins M J, Child A M, van Duin A C T, Vermeer C (1998) Is osteocalcin stabilised in ancient bones by adsorption to bioapatite. *Ancient Biomolecules* 2:223-233
- Collins M J, Galley P (1998) Towards an optimal method of archaeological collagen extraction: The influence of pH and grinding. *Ancient Biomolecules* 2:209-222
- Collins M J, Waite E R, van Duin A C T (1999) Predicting protein decomposition: the case of aspartic acid racemization kinetics. *Phil. Trans. Royal Soc. Ser. B* 354:51-64
- Collins M J, Nielsen-Marsh C, Hiller J, Smith C I, Roberts J P, Prigodich R V, Wess T J, Csapo J, Millard A R, Turner-Walker G (2002) The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44:383-394
- Corrigan J J (1969) D-amino acids in animals. *Science* 164:142-149
- Csapo J, Czapó-Kiss Z, Wagner L, Talos T, Martin T G, Folestad S, Tivesten A, Nemethy S (1997) Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids. *Anal Chim Acta* 339:99-107

6 Literatur

- Csapo J, Bernert Z, Csapo Z, Pohn G, Csapo-Kiss Z, Költö L, Szikossy I, Némethy S (2001) Introduction of amino acid racemization based age estimation into palaeoanthropological research. *Annls hist-nat Mus natn hung* 93:239-257
- de Albuquerque Leinenbach G, Malyusz V, Schröder I (2000) Anthropologische Befunde zur Schlacht von Hemmingstedt. *Archäol Nachr Schleswig-Holstein* 11:58-83
- De las Heras S M, Valenzuela A, Villanueva E (1999) Deoxypyridinoline crosslinks in human dentin and estimation of age. In *J Legal Med* 112:222-226
- DeNiro M J, Weiner S (1988) Chemical, enzymatic and spectroscopic characterization of "collagen" and other organic fractions from prehistoric bones. *Geochim Cosmochim Acta* 52:2197-2206
- Di Fiore M M, Assisi L, Botte V, D'Aniello (1998) D-aspartic acid is implicated in the control of testosterone production by the vertebrate gonad. Studies on the female green frog *Rana esculenta*. *J Endocrinology* 157:199-207
- Duarte C, Mauricio J, Pettitt P B, Souto P, Trinkaus E, van der Plicht H, Zilhao J (1999) The early Upper Palaeolithic human skeleton from the Abrigo do Lagar Velho (Portugal) and modern human emergence in Iberia. *Proc Natl Acad Sci* 96:7604-7609
- Dunlop D S, Neidle A (1997) The origin and turnover of D-serine in brain. *Biochem Biophys Res Comm* 235:26-30
- Elster H, Gil-Av E, Weiner S (1991) Amino acid racemization of fossil bone. *J Archaeol Sci* 18:605-617
- El Mansouri M, El Fouikar A, Saint-Martin B (1996) Correlation between ¹⁴C ages and aspartic acid racemization at the upper palaeolithic site of the Abri Pataud (Dordogne, France). *J Archaeol Sci* 23:803-809
- Exposito J-Y, Cluzel C, Garonne R, Lethias C (2002) Evolution of collagens. *Anat Rec* 268:302-316
- Fedele E, Bisiglia M, Raiteri M (1997) D-serine modulates the NMDA receptor/nitric oxide/cGMP pathway in the rat cerebellum in vivo microdialysis. *Arch Pharmacol* 355:43-47
- Fietzek P P, Wendt P, Kell I, Kühn K (1972) The covalent structure of collagen: Amino acid sequence of α 1-CB3 from calf skin collagen. *FEBS Lett* 26:74-76
- Fietzek P P, Kühn K (1975) The covalent structure of collagen; Amino-acid sequence of the cyanogen-bromide peptides α 1-CB2, α 1-CB4 and α 1-CB5 from calf skin collagen. *Eur J Biochem* 52:77-82
- Fisher G H, Garcia N M, Payan I L, Cadilla-Perezrios R, Sheremata W A, Man E H (1986) D-aspartic acid in purified myelin and myelin basic proteins. *Biochem Biophys Res Comm* 135:683-687
- Frahn J L, Illman R J (1975) The occurrence of D-alanine and D-alanyl-D-alanine in *Phalaris tuberosa*. *Phytochem* 14:1464-1465
- Frank H, Nicholson G J, Bayer E (1977) Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with a novel chiral stationary phase. *J Chromatogr Sci* 15:174-176
- Fujii N, Momose Y, Harada K (1996) Kinetic study of racemization of aspartyl

- residues in model peptides of α A-crystallin. *Int J Peptide Protein Res* 48:118-122
- Fujii N, Momose Y, Ishii N, Takita M, Akaboshi M, Kodama M (1999) The mechanisms of simultaneous stereoinversion, racemization, and isomerization at specific aspartyl residues of aged lens proteins. *Mech Ageing Dev* 107:347-358
- Fukuda M, Zokomura A, Ogawa T, Sasaoka K (1973) D-alanine in germinating *Pisum sativum* seedlings. *Phytochem* 12:2593-2595
- Gamble C (1994) Time for Boxgrove man. *Nature* 369:275-276
- Garner W H, Spector A (1978) Racemization in human lens: Evidence of rapid insolubilization of specific polypeptides in cataract formation. *Proc Natl Acad Sci* 75:3618-3620
- George J C, Bada J, Zeh J, Scott L, Brown S E, O'Hara T, Suydam R (1999) Age and growth of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) via aspartic acid racemization. *Can J Zool* 77:571-580
- Geyh M A, Schleicher H (1990) Absolute age determination: physical and chemical dating methods and their application. Springer Verlag, Heidelberg
- Gillard R D, Pollard A M, Sutton P A, Whittaker D K (1990) An improved method for age at death determination from the measurement of D-aspartic acid in dental collagen. *Archaeometry* 32:61-70
- Gineyts E, Cloos P A, Borel O, Grimaud L, Delmas P D, Garnero P (2000) Racemization and isomerization of type I collagen C-telopeptides in human bone and soft tissues: assessment of tissue turnover. *Biochem J* 345:481-485
- Gross E, Witkop B (1962) Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: The methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. *J Biol Chem* 237
- Grupe G (1995) Preservation of collagen in bone from dry, sandy soil. *J Archaeol Sci* 22:193-199
- Grupe G, Turban-Just S (1998) Amino acid composition of degraded matrix collagen from archaeological human bone. *Anthrop Anz* 56:213-226
- Hare P E (1980) 12. Organic geochemistry of bone and its relation to the survival of bone in the natural environment. In: Behrensmeyer A K, Hill A P (eds) *Fossils in the Making: Vertebrate Taphonomy and Palaeoecology*. Chicago University Press, Chicago, pp 208-219
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K (1993) Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor related distribution and aging. *J Neurochem* 60:783-786
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Hayashi T, Takahashi K (1993) Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. *FEBS Lett* 331:4-8
- Hazen R M, Filley T R, Goodfriend G A (2001) Selective adsorption of L- and D-amino acids on calcite: Implications for biochemical homochirality. *Proc Natl Acad Sci* 98:5487-5490
- Heck S D, Faraci W S, Keblough P R, Saccomano N A, Thadeio P F, Volkmann R A (1996) Posttranslational amino acid epimerization: Enzyme-catalyzed isomerization of amino acid residues in peptide chains. *Proc Natl Acad Sci*

6 Literatur

93:4036-4039

- Hedges R E M (2002) Bone diagenesis: An overview of processes. *Archaeometry* 44:319-328
- Helfman P M, Bada J L, Shou M-Y (1977) Considerations on the role of aspartic acid racemization in the aging process. *Gerontology* 23:419-425
- Julg A, Lafont R, Perinet G (1987) Mechanisms of collagen racemization in fossil bones: Application to absolute dating. *Quat Sci Rev* 6:25-28
- Kaufman D S, Miller G H (1995) Isoleucine epimerization and amino acid composition in molecular-weight separations of Pleistocene *Genyornis* eggshell. *Geochim Cosmochim Acta* 59:2757-2765
- Kaufman D S, Manley W F (1998) A new procedure for determining DL amino acid ratios in fossils using reverse phase liquid chromatography. *Quaternary Geochronology* 17:987-1000
- Kera Y, Aoyama H, Matsumura H, Hasegawa A, Nagasaki H, Yamada R (1995) Presence of free D-glutamate and D-aspartate in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1243:282-286
- Kimber R W L, Hare P E (1992) Wide-range of racemization of amino-acids in peptides from human fossil bone and its implications for amino-acid racemization dating. *Geochim Cosmochim Acta* 56:739-743
- Kossiakov A A (1988) Tertiary structure is a principal determinant to protein deamidation. *Science* 240:191-194
- Kreil G (1994) Peptides containing a D-amino acid from frogs and molluscs. *J Biol Chem* 269:10967-10970
- Kvendvolden K A, Peterson E, Wehmiller J, Hare P E (1973) Racemization of amino acids in marine sediments determined by gas chromatography. *Geochim Cosmochim Acta* 37:2215-2225
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lees S (1989) Sonic velocity and the ultrastructure of mineralised tissues. In: Hukins D W L (ed) *Calcified Tissues*. Macmillan Press, London, pp 121-152
- Li X, Agrawal C M, Wang X (2003) Age dependence of *in situ* thermostability of collagen in human bone. *Calcif Tissue Int* 72:513-518
- Lowenson J, Clarke S (1988) Does the chemical instability of aspartyl and asparaginyl residues in proteins contribute to erythrocyte aging? *Blood Cells* 14:103-117
- Lura R, Schirch V (1988) Role of peptide conformation in the rate and mechanism of deamidation of asparaginyl residues. *Biochem* 27:7671-7677
- Man E H, Fisher G H, Payan I L, Cadilla-Perezrios R, Garcia N M, Chemburkar R, Arends G, Frey II WH (1987) D-aspartate in human brain. *J Neurochem* 48:510-515
- Masters P M, Bada J L, Zigler J S jr (1977) Aspartic acid racemization in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature* 268:71-73
- Masters P M, Bada J, Zigler J S jr (1978) Aspartic acid racemization in heavy

- molecular weight crystallins and water-insoluble protein from normal human lenses and cataracts. *Proc Natl Acad Sci* 75:1204-1208
- Masters P M (1987) Preferential preservation of non-collagenous protein during bone diagenesis: Implications for chronometric and stable isotopic measurements. *Geochim Cosmochim Acta* 51:3209-3214
- Matsu'ura S, Ueta N (1980) Fraction dependent variation of aspartic acid racemization age of fossil bone. *Nature* 286:883-884
- McFadden P N, Clarke S (1982) Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: possible step in the repair of aged membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci* 79:2460-2464
- Mignogna G, Simmaco M, Barra D (1998) Occurrence and function of D-amino acids-containing peptides and proteins. Birkhäuser, Basel
- Miller E J (1984) Chemistry of the collagens and their distribution. In: Piez K A, Reddi A H (eds) *Extracellular Matrix Collagen*. Elsevier, New York - Amsterdam - Oxford, pp 473
- Miller G H, Magee J W, Jull A J T (1997) Low-latitude glacial cooling in the southern hemisphere from amino acid racemization in emu eggshells. *Nature* 385:241-244
- Mislow K (1972) Einführung in die Stereochemie, 1. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim
- Mörnstad H, Pfeiffer H, Teivens A (1994) Estimation of dental age using HPLC-technique to determine the degree of aspartic acid racemization. *J Forensic Sci* 39:1425-1431
- Nagase H, Woessner J F (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494
- Nagata Y, Masui R, Akino T (1992) The presence of free D-Serine, D-alanine and D-proline in human plasma. *Experientia* 48:986-988
- Nagata Y, Uehara T, Kitamura Y, Nomura Y, Horiike K (1998) D-serine content and D-[3H]serine binding in the brain region of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev* 104:115-124
- Nimura N, Toyama A, Kinoshita T (1984) Optical resolution of amino acid enantiomers by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 316:547-552
- Novotna J, Deyl Z, Miksik I (1996) Capillary zone electrophoresis of collagen type I CNBr peptides in acid buffers. *J. Chromatogr B* 681:77-82
- Ogawa T, Kawasaki Y, Sasaoka K (1978) *De novo* synthesis of D-alanine in germinating *Pisum sativum* seedlings. *Phytochem* 17:1275-1276
- Ohtani S (1995) Estimation of age from dentin by using the racemization of aspartic acid. *Am J Forensic Med Pathol* 16:158-161
- Ohtani S (1997) Different racemization ratios in dentin from different locations within a tooth. *Development & Aging* 61:93-99
- Ohtani S, Yamamoto T, Sugimoto H, Sashima M, Satoh M (2000) Age-related changes in the D-aspartic acid content of the teeth of the senescence-accelerated mouse. *Arch Oral Biol* 45:13-18

6 Literatur

- Ohtani S, Ito R, Arany S, Yamamoto T (2005) Racemization in enamel among different types of teeth from the same individual. *Int J Legal Med* 119:66-69
- Persikov A V, Brodsky B (2002) Unstable molecules form stable tissues. *Proc Natl Acad Sci* 99:1101-1103
- Poinar H N, Höss M, Bada J L, Pääbö S (1996) Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272:864-866
- Ramsey C B, Higham T, Bowles A, Hedges R (2004) Improvements of the pretreatment of bone at Oxford. *Radiocarbon* 46:155-163
- Raunio R P, Munter M J, Jaakkola O J, Karppinen J T (1978) D-amino acids of the amino acid pool and occurrence of racemase and D-amino acid oxidase activities in *Escherichia coli* B. *Fol Microbiol* 23:341-348
- Richards M P, Pettitt P B, Stiner M C, Trinkaus E (2001) Stable isotope evidence for increasing dietary breadth in the European mid-Upper Palaeolithic. *Proc Natl Acad Sci* 98:6528-6532
- Ritz S, Schütz H W (1993) Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to postmortem estimation of age at death. *J Forensic Sci* 38:633-640
- Ritz S, Schütz H W, Peper C (1993) Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: its applicability for root dentin. *Int J Legal Med* 105:189-293
- Ritz S, Turzynski A, Schütz H W (1994) Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in noncollagenous bone proteins. *Forensic Sci Int* 69:149-59.
- Ritz S, Turzynski A, Schütz H W, Hollmann A, Rochholz G (1996) Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: Basis for an accurate age at death determination. *Forensic Sci Int* 770:13-26
- Ritz-Timme S (1998) In-vivo Razemisierung von Asparaginsäure: Ein Phänomen des Alterns und seine Nutzbarkeit zur Lebensaltersbestimmung. In: Olbrich ES, K. & Schramm, A. (ed) *Kompendium der Gerontologie*, vol 5.
- Ritz-Timme S (1999) Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure. Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche. Berg S, Brinkmann B (eds) *Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik*. Vol 23. Schmidt Römhild, Lübeck, pp.84
- Ritz-Timme S, Rochholz G, Schütz H W, Collins M J, Waite E R, Cattaneo C, Kaatsch H-J (2000) Quality assurance in age estimation based on aspartic acid racemization. *Int J Legal Med* 114:83-86
- Ritz-Timme S, Rochholz G, Stammert R, Ritz H-J (2002) Biochemische Altersschätzung. Zur Frage genetischer und soziokultureller (ethnischer) Einflüsse auf die Razemisierung von Asparaginsäure in Dentin. *Rechtsmedizin* 12:203-206
- Ritz-Timme S, Collins M (2002) Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Res Rev* 1:43-59
- Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins M J (2003) Age estimation on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *Int. J Legal Med* 117:96-101
- Roberts M B, Stringer C B, Parfitt S A (1994) A hominid tibia from the Middle

- Pleistocene sediments at Boxgrove, UK. *Nature* 369:311-313
- Roberts M B (1994) Roberts replies. *Nature* 371:751
- Robinson NE, Robinson AB (2001) Molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci* 98:944-949
- Robinson NE, Robinson AB (2001) Deamidation of human proteins. *Proc Natl Acad Sci* 98:12409-12413
- Rogers (1983) Bacterial cell structure. In: Cole J A, Knowles C J, Schlessinger D (eds) *Aspects of microbiology*, Vol. 6. Van Nostrand Reinhold Co Ltd, Wokingham, Berkshire UK, pp 6-27
- Rossi A, Vitellato Zuccarello L, Zanaboni G, Monzani E, Dyne K M, Cetta G, Tenni R (1996) Type I collagen CNBr peptides: species and behaviour in solution. *Biochemistry* 35:6048-6057
- Roth M (1971) Fluorescence reactions for amino acids. *Anal Chem* 43:880-882
- Rothgans J, Wodarz R, Schoenknecht W, Drysch K (1983) The determination of amino acid enantiomers in human saliva with Chirasil Val. *Arch Oral Biology* 28:1121-1124
- Rutter N W C, Blackwell B (1995) Amino acid racemization dating. In: Rutter N W C, Catto N R (ed) *Dating Methods of Quaternary Deposits: Geotext 2*, vol 2. Geological Association of Canada, pp 125-166
- Scaloni A, Simmaco M, Bossa F (2002) D-amino acid analysis. In: Smith B J (ed) *Protein Sequencing Protocols*. Celltech Chiroscience plc, Slough, UK
- Schaedler J M, Krook L, Wootton J A M, Hover B, Brodsky B, Naresh M D, Gillette D D, Madsen D B, Horne R H, Minor R R (1992) Studies of collagen in bone and dentin matrix of a Columbian mammoth (Late Pleistocene) of central Utah. *Matrix* 12:297-307
- Schell M J, Cooper O B, Snyder S H (1997) D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc Natl Acad Sci* 94:2013-2018
- Schieber A, Bruckner H, Rupp-Classen M, Specht W, Nowitzki-Grimm S, Classen HG (1997) Evaluation of D-amino acid levels in rat by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry: no evidence for subacute toxicity of orally fed D-proline and D-aspartic acid. *J Chromatogr B* 691:1-12
- Schleifer KH, Kandler O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic position. *Bacteriol Rev* 36:407-477
- Schroeder R A, Bada J L (1976) A review of the geochemical applications of the amino acid racemization reaction. *Earth Sci Rev* 12:347-391
- Schröder I, Dietrich M, Koch J, Weidner M (1998) Anthropologische Untersuchung von 27 spätrömischen Skeletten aus einem Gräberfeld an der Medarstraße in Trier. *Trierer Zeitschrift* 61:343-364
- Schweingruber F H (1988) *Tree rings - basics and applications of dendrochronology*. Reidel, Dordrecht
- Scott P G, Veis A (1976) The cyanogen bromide peptides of bovine soluble and insoluble collagens. I. Characterization of peptides from soluble type I collagen by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Conn Tissue Res* 4:107-116

6 Literatur

- Scott P G, Veis A (1976) The cyanogen bromide peptides of bovine soluble and insoluble collagens II. Tissue specific cross-linked peptides of insoluble skin and dentin collagen. *Conn Tissue Res* 4:117-129
- Serre D, Langaney A, Chech M, Teschler-Nicola M, Paunovic M, Mennecier P, Hofreiter M, Possnert G, Pääbo S (2004) No evidence of Neanderthal mtDNA contribution to early modern Humans. *PLOS Biology* 2:313-317
- Shapiro S D, Endicott S K, Province M A, Pierce J A, Campbell E J (1991) Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibres deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 87:1828-1834
- Skinner A R, Hay R L, Masao F, Blackwell B A B (2003) Dating the Naisiusiu Beds, Olduvai Gorge, by electron spin resonance. *Quat Sci Rev* 22:1361-1366
- Stanley S M (1988) *Krisen der Evolution: Artensterben in der Erdgeschichte. Spektrum der Wissenschaft*, Heidelberg
- Takagi Y, Veis A (1984) Isolation of phosphophoryn from human dentin organic matrix. *Calcif Tissue Int* 36:259-265
- Tattersall I, Schwartz J H (1999) Hominids and hybrids: The place of Neanderthals in human evolution. *Proc Natl Acad Sci* 96:7117-7119
- Taylor R E, Ennis P J, Slota P J (1989) Non-age related variations in aspartic acid racemization in bone from radiocarbon-dated late Holocene archaeological site. *Radiocarbon* 31:1048-1056
- Trantner G E (1986) Paritätsverletzung: Ursachen der natürlichen Chiralität. *Nachrichten Chemie Tech Lab* 34:866-876
- Turban-Just S (1997) Zum biogenen Abbau menschlicher Knochenproteine. *Anthrop Anz* 55:131-141
- Tuross N, Eyre D R, Holtrop M E, Glimcher M J, Hare P E (1980) Collagen in fossil bones. In: Hare P E, Hoering T C, King jr K (eds) *Biogeochemistry of amino acids*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 53-63
- Tuross N (2002) Alterations in fossil collagen. *Archaeometry* 44:427-434
- Ulrich M M W, Perizonius W R K, Spoor C F, Sandberg P, Vermeer C (1987) Extraction of osteocalcin from fossil bones and teeth. *Biochem Biophys Res Comm* 149:712-719
- Van der Rest M, Fietzek P P (1982) A comprehensive approach to the study of collagen primary structure based on high-performance liquid chromatography. *Eur. J. Biochem.* 125:491-496
- van Duin A C, Collins M J (1998) The effects of conformational constraints on aspartic acid racemization. *Org. Geochem.* 29:1227-1232
- van Klinken G J (1999) Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *J Archaeol Sci* 26:687-695
- Visscher H, Looy C V, Collinson M E, Brinkhuis H, van Konijnenburg-van Cittert J H A, Kürschner W M, Sephton M A (2004) Environmental mutagenesis during the end-permian ecological crisis. *Proc Natl Acad Sci* 101:12952-12956
- Vollhardt K P C (1988) *Organische Chemie*, 1. Aufl. VCH Verlag GmbH

- Volpin D, Veis A (1973) Cyanogen bromide peptides from insoluble skin and dentin bovine collagens. *Biochemistry* 12:1452-1464
- von Endt D W, Ortner D J (1984) Experimental effects of bone size and temperature on bone diagenesis. *J Archaeol Sci* 11:247-253
- Wagner G A, Glasmacher U A (2003) Physikalische Uhren zur Frühzeit des Menschen. *B i u Z* 33:302-308
- Waite E R, Collins M J, van Duin A T C (1999) Hydroxyproline interference during the gas chromatographic analysis of D/L Aspartic acid in human dentine. *Int J Legal Med* 112:124-131
- Weiner S, Kustanovich Z, Gil-Av, Traub W (1980) Dead Sea scrolls parchments: unfolding of the collagen molecules and racemization of aspartic acid. *Nature* 287:820-823
- Xie M, Schowen R L (1999) Secondary structure and protein deamidation. *J Pharm Sci* 88:8-13
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395
- Zenk H, Scherf H (1964) Verbreitung der D-Tryptophan-Konjugationsmechanismen im Pflanzenreich. *Planta* 62:350-364

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Stefanie Ritz-Timme für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und die hilfreichen Diskussionen.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. W. Wünnenberg für die Übernahme der Betreuung vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät.

Prof. M. Oehmichen möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit am Institut für Rechtsmedizin, Kiel durchzuführen.

Danken möchte ich weiterhin Lisanne Stahl, Erika Borzikowski und Thorsten Stahl für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre im Labor.

Bei Claudia Hintze und insbesondere Sabine Mönrichs möchte ich mich für das besondere Engagement und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Für die Einarbeitung in die apparative Analytik und die technische Unterstützung sowie für die unermüdliche Hilfsbereitschaft möchte ich Frau Dr. Gertrud Rochholz und Herrn Dr. Hans-Werner Schütz danken.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Matthew Collins und seiner Arbeitsgruppe für die Kollegialität und Gastfreundschaft während der Zeit in Newcastle und York und der unermüdlichen Diskussionsbereitschaft.

Allen übrigen Mitarbeitern an den Instituten für Rechtsmedizin in Kiel und Düsseldorf möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Nicht zuletzt meiner Schwiegermutter, meinen Eltern und ganz besonders meiner Familie bin ich zu Dank verpflichtet, die mich mit viel Verständnis und Geduld in der vergangenen Zeit unterstützt haben.

Ist eine Revision der Aminosäuredatierung möglich?

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Kiel, den

Ist eine Revision der Aminosäuredatierung möglich?

Lebenslauf

Persönliche Daten Reimer Christian Dobberstein
geb. 29.03.1966 in Wyk/Föhr
verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1972-1976 Grundschule Süderende/Föhr
1976-1986 Gymnasium Wyk/Föhr
1986 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1986-1988 Ausbildung zum Chem.-techn. Assistenten, Theodor-Litt-Schule,
Neumünster

Wehrdienst

1989-1990 Wehrdienst in Hamburg und Husum

Hochschulausbildung

WS 1990/90 Studiengang Biologie an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
August 1997 Abschluss als Diplombiologe

Berufstätigkeit

1999-2000 wiss. Angestellter am ehemaligen Institut für Meereskunde, Kiel
2001-2004 wiss. Angestellter am Inst. für Rechtsmedizin,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
seit 2004 wiss. Angestellter am Institut für Rechtsmedizin,
Universitätsklinikum Düsseldorf

Auslandsaufenthalt

2003 dreimonatiges EU-Stipendium an der University of Newcastle
upon Tyne, GB

Ist eine Revision der Aminosäuredatierung möglich?
