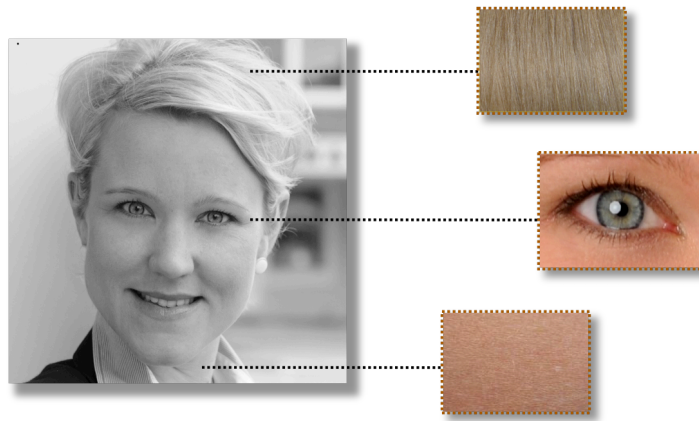


Rekonstruktion humaner Pigmentierungsmerkmale mittels SNP-Analyse

Entwicklung eines molekulargenetischen Analyseverfahrens
sowie dessen Anwendung an degradierter DNA



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

vorgelegt von

Melanie Harder
geb. Röpke

KIEL
2012

Referent/in: PD Dr. Nicole von Wurmb-Schwark

Koreferent/in: Prof. Dr. Manuela Dittmar

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2012

Zum Druck genehmigt: _____

gez. _____, Dekan

Gliederung

1. EINLEITUNG	1
1.1 Pigmentierung	1
1.1.1 Melanine	1
1.1.1.1 Melaninsynthese	1
1.1.1.2 Pigmentierungsgene.....	3
1.1.2 Pigmentierung unterschiedlicher Gewebe.....	7
1.1.2.1 Haarfollikel	7
1.1.2.2 Auge	8
1.1.2.3 Epidermis.....	10
1.1.3 Pigmentierungsdiversität	11
1.1.3.1 in Europa	11
1.1.3.2 Populationsgenetische Ursachen	12
1.1.3.3 Das Neolithikum als möglicher Ursprung der heutigen Diversität	13
1.2 Rekonstruktion der Pigmentierung mittels DNA Analysen	14
1.2.1 Einzelnukleotidpolymorphismen als genetische Marker	14
1.2.2 Anwendungsgebiete	17
1.3 alte DNA	18
1.3.1 Besonderheiten der aDNA	19
1.3.2 Analysemöglichkeiten	21
2. FRAGESTELLUNG	23
3. MATERIAL & METHODEN (REZENTES MATERIAL)	25
3.1 Material	25
3.1.1 Unverwandte Probanden.....	25
3.1.2 Familien.....	28
3.1.3 besondere Pigmentierungsanomalien	29
3.2 DNA-Extraktion	29
3.2.1 aus Mundschleimhautabstrichen.....	30
3.2.2 aus Blut	30
3.3 DNA Quantifizierung der nukleären DNA mittels Realtime-PCR	31
3.4 Analyse der Pigmentierungs-SNPs	31
3.4.1 Primerdesign	35
3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion	36
3.4.2.1 Analyse der 18 ausgewählten Pigmentierungs-SNPs	36
3.4.2.2 Augenfarbenrekonstruktion nach (Walsh et al., 2011)	37
3.4.2.3 Haarfarbenrekonstruktion nach (Branicki et al., 2011)	37

Gliederung

3.4.3 Überprüfung des Amplifikationserfolges	39
3.4.3.1 mittels Agarose-Gelelektrophorese	39
3.4.3.2 mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.4.4 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels ExoSAP-IT	42
3.4.5 Einzelbasenverlängerung mittels SNaPshot Multiplex System	43
3.4.6 Detektion mittels Kapillarelektrophorese am ABI Prism 3130	44
3.5 statistische Auswertung.....	47
4. MATERIAL & METHODEN (ALTE DNA)	49
4.1 Material	49
4.1.1 Neolithische Proben	49
4.1.2 Mittelalterliche Proben	49
4.2 Kontaminationsprävention	50
4.2.1 bei der Beprobung	50
4.2.2 im Labor	50
4.3 Authentizitätskriterien	51
4.4 Extraktion aus Knochen und Zähnen	51
4.5 STR-Analysen	52
4.5.1 Screening-PCRs.....	53
4.5.1.1 Hexaplex-PCR	53
4.5.1.2 Modifiziertes Powerplex S5 Kit.....	54
4.5.2 Genetischer Fingerabdruck	56
4.5.2.1 PowerPlex 16HS Kit	56
4.5.2.2 AmpFiSTR NGM™ Kit	57
4.6 Sequenzierung des mtDNA D-Loops	58
4.6.1 PCR	60
4.6.2 Überprüfung des Amplifikationserfolges mittels Agarose-Gelelektrophorese	61
4.6.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mit dem MinElute Purification Kit	61
4.6.4 Sequenzierreaktion mit dem BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit	62
4.6.5 Aufreinigung mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit.....	62
4.6.6 Detektion mittels Kapillarelektrophorese am ABI Prism 3130	62
4.7 Analyse der Pigmentierungs-SNPs	63
4.7.1 Primerdesign	63
4.7.2 PCRs.....	63
4.7.2.1 Augenfarbe	64
4.7.2.2 Rotstich.....	64
4.7.2.3 Haarfarbe	65
4.7.2.4 Hauttyp.....	65

Gliederung

4.7.3 Überprüfung des Amplifikationserfolges mittels Polyarylamid-Gelelektrophorese	65
4.7.4 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels ExoSAP-IT	66
4.7.5 Einzelbasenverlängerung mittels SNaPshot Multiplex System	66
4.7.6 Detektion mittels Kapillarelektrophorese am ABI Prism 3130 Genetic Analyzer.....	66
5. ERGEBNISSE (REZENTES MATERIAL).....	67
5.1 Realtime-PCR.....	67
5.2 Pigmentierungs-SNPs.....	67
5.2.1 Pigmentierungs-SNPs (eigenes Projekt)	68
5.2.2 Vergleich mit der Irisplex von (Walsh et al., 2011)	76
5.2.3 Vergleich mit der Methode von (Branicki et al., 2011)	77
5.3 Exkurs Pigmentierungs-SNPs.....	79
5.3.1 Familien	79
5.3.2 Iris-Heterochromie	82
6. ERGEBNISSE (ALTES PROBENMATERIAL)	83
6.1 Screening-PCR	83
6.1.1 Neolithische Proben	83
6.1.2 Mittelalterliche Proben	86
6.2 mtDNA	88
6.2.1 Neolithische Proben	88
6.2.2 Mittelalterliche Proben	89
6.3 Genetischer Fingerabdruck	91
6.3.1 Neolithische Proben	91
6.3.2 Mittelalterliche Proben	92
6.4 Pigmentierungsrekonstruktion mittels SNP-Analyse	94
6.4.1 Neolithische Proben	94
6.4.2 Mittelalterliche Proben	98
7. DISKUSSION	104
7.1 Aussagekraft der entwickelten Methode.....	104
7.2 Vergleich mit bereits publizierten Methoden.....	106
7.3 Einsatz der entwickelten Methode in der forensischen Genetik	108
7.4 Anwendbarkeit an stark degradierter DNA und minimalen DNA-Mengen	109

Gliederung

7.5 Unterschiede bei den aDNA Proben bezüglich der DNA-Erhaltung	110
7.6 Rekonstruktionserfolge und Unterschiede zwischen den aDNA Proben	111
7.7 Mitochondriale Haplogruppen und ermittelte Pigmentierungsmerkmale	113
7.8 Ursprung der Pigmentierungsdiversität und der blauen Augenfarbe	114
7.9 Familienquartetts und Probandin mit Iris-Heterochromie	115
8. ZUSAMMENFASSUNG.....	117
9. ANHANG	122
9.1 Abkürzungen	165
9.2 Geräte, Chemikalien und Einwegmaterialien	168
10. LITERATURVERZEICHNIS	171
11. ABBILDUNGSVERZEICHNIS UND TABELLENVERZEICHNIS	182
12. DANKSAGUNG.....	190
13. LEBENSLAUF	191

1. Einleitung

1.1 Pigmentierung

Die menschliche Pigmentierung ist sehr vielfältig und tritt in den unterschiedlichsten Nuancen auf. Verantwortlich hierfür ist das Pigment Melanin deren Bezeichnung sich aus dem Griechischen *mélanos* = schwarz ableitet.

1.1.1 Melanine

Melanine sind für die Pigmentierung verschiedenster Gewebe verantwortlich und schützen die Zellen vor UV-Strahlen (Prota, 1994). Des Weiteren fangen sie freie Radikale ab und verhindern somit DNA-Schäden (Pathak, 1995). Es gibt zwei Melaninvarianten:

- Eumelanin (braun-schwarz)
- Phäomelanin (rot-gelb)

Im menschlichen Organismus werden immer beide Varianten synthetisiert, wobei das Mengenverhältnis sehr unterschiedlich ausfallen kann (Prota, 1992; Seiji et al., 1963). Dieses Verhältnis ist ausschlaggebend für die individuelle Pigmentierung (Sturm et al., 1998). Im Fall der Haarfarbe beispielsweise kommt es bei einem geringen Eumelanin- und hohen Phäomelaningehalt zur Ausprägung einer hellen Haarfarbe wie blond oder hellbraun. Bei einem geringen Phäomelanin- und einem hohen Eumelaningehalt, fallen die Haarfarben entsprechend dunkler aus. Liegt eine Störung in der Melaninsynthese oder der Melanosomen- und Melanozytenbiogenese vor, führt dies zu Albinismus. Dieser stellt sich bei kompletter Ausprägung in Form weißer Haare, blau-roter Augen und sehr heller Haut dar (Oetting & King, 1999).

1.1.1.2 Melaninsynthese

Die Melaninsynthese erfolgt in lysosomen-ähnlichen Organellen, den Melanosomen. Diese werden in Melanozyten synthetisiert, die in den unterschiedlichsten Geweben lokalisiert sein können. Die Melanosomenbildung erfolgt über insgesamt vier verschiedene Reifestadien (I-IV). Hierbei ändert sich sowohl die Morphologie als auch der Melaningehalt (Raposo & Marks, 2007).

Zunächst sammelt sich das inaktive Enzym Tyrosinase im Golgi-Apparat und wird dort in Form von Vesikeln abgeschnürt. Sobald das *α -melanocyte stimulating hormon* (= *α -MSH*) an den *melanocyte-1-receptor* (= *MC1R*) bindet, kommt es zur vermehrten Synthese von *cyclic adenosine*

Einleitung

monophosphaten (= *cAMP*) und somit zur Aktivierung vom *microphthalmia transcription factor* (= *MITF*) (Busca & Ballotti, 2000; Goding C.R., 2000). Dieser aktiviert wiederum mehrere Enzyme in den Melanosomen, von denen die Tyrosinase das Wichtigste darstellt (Marks & Seabra, 2001). Die aktivierte Tyrosinase beginnt anschließend mit der Oxidation von Tyrosin zu 3,4 Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und Dopachinon. Das Dopachinon wird daraufhin entweder über Glutathiondopa und Cysteinyl-dopa zu Phäomelanin oder über DOPachrom und seinen Derivaten zu Eumelanin umgewandelt. Die Synthese des Phäomelanins ist immer an die Anwesenheit von Cystein gekoppelt. Des Weiteren kommt es zur vermehrten Synthese von Phäomelaninen, sofern *MC1R* durch das Binden des *agouti signaling proteins* (= *ASIP*) blockiert wird und es somit zur Abnahme des *cAMP*-Spiegels kommt (Lu et al., 1994) (Abbildung 1).

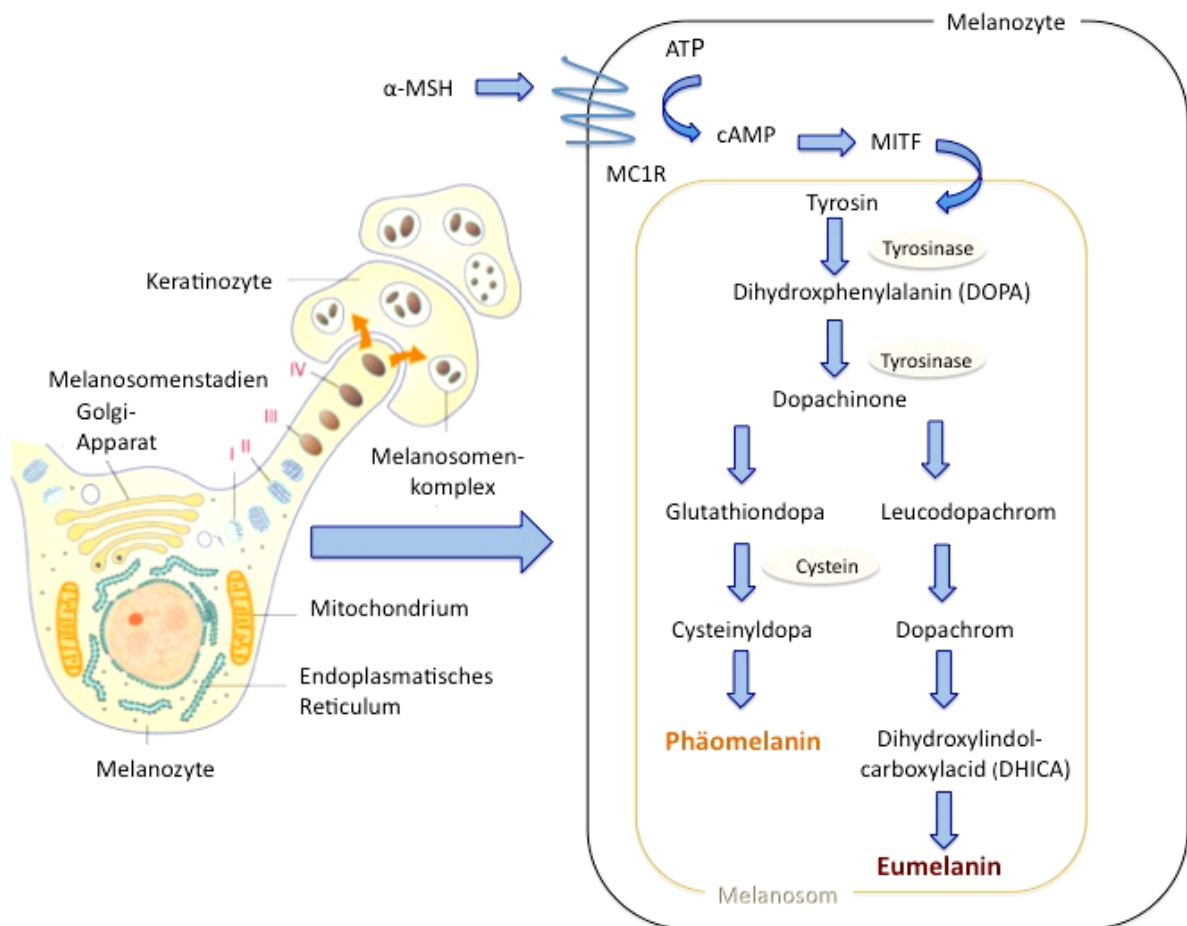


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Melaninsynthese, verändert nach (Fritsch P., 2009; Tully, 2007). In den Melanozyten werden Melanosome ausgebildet, die Eu- und Phäomelanine synthetisieren. Diese Synthese erfolgt über zwei unterschiedliche Wege, deren Schlüsselenzym die Tyrosinase darstellt. Reife Melanosome werden letztendlich an die umgebenden Keratinozyten abgegeben.

Einleitung

Die stetige Melaninsynthese sorgt für das Heranreifen der Melanosome vom Anfangsstadium I bis hin zum Endstadium IV. Während dieses Reifeprozesses wandern die Melanosome peripherwärts in die Dendriten der Melanozyten, wo sie in Form von Melanosomkomplexen an die umgebenden Keratinozyten abgegeben werden (Fritsch P., 2009; Colombo et al., 2011) (Abbildung 1). Diese Art und Weise des Melanintransfers erfolgt sowohl in der Epidermis als auch in den Haarfollikeln. Beim Auge hingegen werden die Melanine im Cytoplasma gespeichert (Nordlund et al., 1998).

Reife Eumelanosome sind in der Regel ellipsoid und $0,9 \times 0,3 \mu\text{m}$ groß. Reife Phäomelanosome sind eher sphärisch mit einem Durchmesser von $0,7 \mu\text{m}$ (Sturm et al., 2001). Die kleineren Phäomelanosome lagern sich daher an der Membran zu größeren Einheiten zusammen (Sturm et al., 1998). Grundsätzlich wird die Melaninsynthese über die genetische Ausprägung bestimmt, dennoch gibt es zusätzliche Faktoren wie das Alter, der Konsum von Drogen, der Hormonhaushalt, und die regionale UV-Strahlung, die an der Regulierung beteiligt sind (Miyamura et al., 2007; Garcia-Borron & Sanchez, 2011). Zudem kann bei Frauen tendenziell ein höherer Melaninanteil als bei Männern ausgemacht werden (Robins, 1991).

1.1.1.3 Pigmentierungsgene

Zur Identifikation von Genen, die mit der Pigmentierung assoziiert sind, wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien an den Modellorganismen *Mus musculus* und *Danio rerio* durchgeführt. Bei *Mus musculus* konnten insgesamt 127 Gene identifiziert werden, die einen Effekt bezüglich der Pigmentierung aufweisen (Logan et al., 2006; Bennett & Lamoreux, 2003). Circa ein Dutzend orthologe Gene konnten beim Menschen nachgewiesen werden (*TYR*, *TYRP*, *OCA2*, *HERC2*, *SLC45A2*, *SLC24A5*, *SLC24A4*, *MC1R*, *ASIP*, *KITLG*, *IRF4*, *TPCN2*), die zum einen mit diversen Pigmentierungsanomalien und zum anderen mit normalen Pigmentierungsmerkmalen in Verbindung gebracht werden (Parra E.J., 2007; Sturm R.A., 2009). Zudem tragen zahlreiche Assoziationsstudien und das *Human Genome Project* dazu bei, neue Erkenntnisse bezüglich der Pigmentierung, zu erzielen (Kayser et al., 2008; Han et al., 2008; Hinds et al., 2005; International HapMap Consortium, 2007).

In folgenden Abschnitt wird auf die wichtigsten Pigmentierungsgene eingegangen (Abbildung 2).

Einleitung

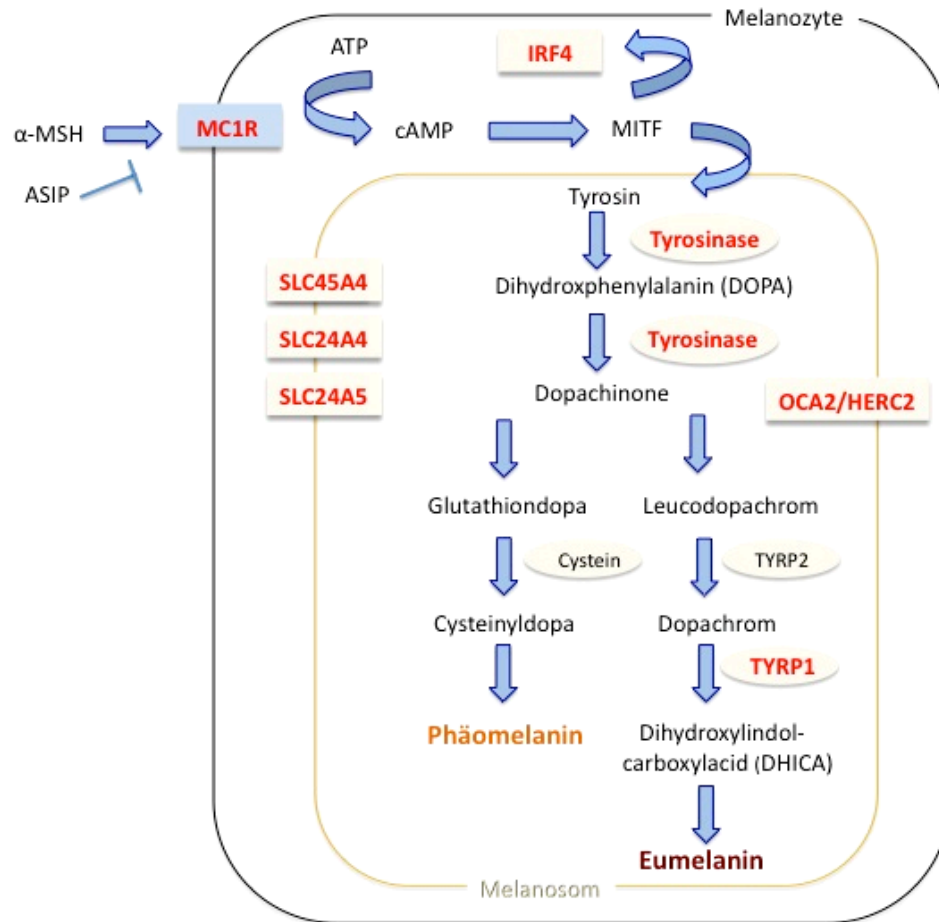


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Melaninsynthese mit den wichtigsten Pigmentierungsgenen (rot markiert), verändert nach (Fritsch P., 2009; Tully, 2007). Die Synthese von Eu- und Phäomelanin erfolgt in den Melanosomen, die in den Melanozyten heranreifen. Die Aktivierung von MC1R über α -MSH führt zum Anstieg des cAMP Levels und zur Aktivierung von MITF. Dieses wiederum aktiviert die Tyrosinase, so dass die Melaninsynthese starten kann. Die wichtigsten Pigmentierungsgene, die diese Synthese regulieren können, sind in der Abbildung rot markiert dargestellt.

- *Melanocortin-1-receptor (= MC1R)*

Den bekanntesten Pigmentierungslocus stellt *MC1R* (MIM#155555) dar. Dieser G-proteingekoppelte Transmembranrezeptor setzt sich aus insgesamt 317 Aminosäuren zusammen und wird überwiegend in Melanozyten exprimiert (Roberts et al., 2008a; Roberts et al., 2008b; Gantz et al., 1994). Das *MC1R*-Gen ist auf Chromosom 16q24.3 lokalisiert und spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Melanogenese. *MC1R* wird durch α -MSH aktiviert, was zu einer vermehrten Synthese von cAMP und der Aktivierung vom *MITF* führt (Busca & Ballotti, 2000; Goding C.R., 2000). Dieses aktiviert wiederum die Tyrosinase und startet den Prozess der Melaninsynthese (Marks & Seabra, 2001). *ASIP* stellt den Antagonisten zu α -MSH dar und kann *MC1R* blockieren, sodass vermehrt Phäomelanine synthetisiert werden (Lu et al., 1994). Die drei

Einleitung

Gene *SLC45A2*, *SLC24A5* und *SLC24A4* gehören alle zur *solute carrier family* (= *SLC*) und sind membranständige Kalium-abhängige Natrium-Calcium-Austauscher ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Es wird angenommen, dass jeweils ein intrazelluläres Calcium- und Kalium-Ion gegen vier extrazelluläre Natrium-Ionen ausgetauscht wird (Li et al., 2002).

- *Solute carrier family 45 member 2* (= *SLC45A2*)

Das *SLC45A2*-Gen (MIM#606202), auch bekannt als *antigen in melanoma* (= *AIM1*), ist auf Chromosom 5p13.2 lokalisiert und wird sowohl in Melanomzelllinien, als auch in Melanozyten exprimiert. Es besteht aus insgesamt sieben Exons, umfasst einen Bereich von 40 kb und kodiert für ein *membrane-associated transporter protein* (= *MATP*), das sich aus insgesamt 530 Aminosäuren zusammensetzt. *MATP* spielt eine entscheidende Rolle bei der Melaninsynthese, da es die benötigten Proteine in die Melanosome transportiert (Kushimoto et al., 2003; Newton et al., 2001; Fukamachi et al., 2001). Eine ganze Reihe von Mutationen im *SLC45A2*-Gen wird mit dem *oculocutaneous albinism type IV* (= *OCA4*) in Verbindung gebracht (Inagaki et al., 2004; Newton et al., 2001). Beim Modelorganismus *Mus musculus* führt das orthologe Gen *underwhite* zu Hypopigmentierungen (Sweet et al., 1998).

- *Solute carrier family 24 member 5* (= *SLC24A5*)

Das *SLC24A5*-Gen (MIM#609802) ist auf Chromosom 15q21.1 lokalisiert. Im Jahre 2005 wurde das *zebrafish golden* Gen am Modelorganismus *Danio rerio* entdeckt, bei dem ein Aminosäureaustausch zu einer helleren Ausprägung der Streifen führte. Beim menschlichen orthologen Gen *SLC24A5* wird ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an der Position 111 für die Ausprägung hellerer Haut verantwortlich gemacht (Lamason et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass das membranständige Protein *SLC24A5* an dem Reifeprozess der Eumelanosome beteiligt ist, indem es das *silver gene* aktiviert (Frudakis et al., 2003). Zudem reguliert es den pH-Wert in den Melanosomen (Lamason et al., 2005).

- *Solute carrier family 24 member 4* (= *SLC24A4*)

Das *SLC24A4*-Gen (MIM#609840) umfasst insgesamt acht Exons und erstreckt sich auf 174 kb. Es ist auf Chromosom 14q32.12 lokalisiert und kodiert für ein membranständiges Protein aus insgesamt 605 Aminosäuren (Li et al., 2002). Es gehört genau wie *SLC45A2* und *SLC24A5* zur

Einleitung

Familie der Natrium-Calcium-Austauscher ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) und reguliert in einer noch unbekannten Art und Weise die Melaninsynthese.

- *Tyrosinase* (= *TYR*)

Das Tyrosinase-Gen (MIM#606933) ist auf Chromosom 11q14-q21 lokalisiert, besteht aus fünf Exons und kodiert das Enzym Tyrosinase, welches eine Schlüsselfunktion bei der gesamten Melaninsynthese einnimmt (Giebel et al., 1991). Es katalysiert die beiden ersten Schritte, sowie einen weiteren Schritt bei der Umwandlung von Tyrosin zu Melanin (Spritz R.A., 1994).

- *Tyrosinase related protein 1* (= *TYRP1*)

Das *TYRP1*-Gen (MIM#115501) kodiert das *tyrosinase related protein 1* und ist auf Chromosom 9p23 lokalisiert. Es setzt sich aus sieben Exons zusammen und erstreckt sich über einen Bereich von 24 kb. *TYRP2* katalysiert die Tautomerisierung von DOPACHrom zu DHICA. *TYRP1* katalysiert die Oxidation von DHICA zu Eumelanin und ist zudem wichtig für den korrekten Transport der Tyrosinase in die Melanosome. Des Weiteren stabilisiert es die Tyrosinase bezüglich ihrer Aktivität (Hearing V.J., 2000; Toyofuku et al., 2001).

- *Oculocutaneous albinism type II* (= *OCA2*)

Das *OCA2*-Gen (MIM#611409) umfasst 24 Exons und erstreckt sich über einen Bereich von 345 kb (Lee et al., 1995). Es ist auf Chromosom 15q11.2-q12 lokalisiert und kodiert das transmelanosomale Membranprotein "P", welches den pH-Wert in Melanosomen reguliert und zudem am Transport verschiedener Proteine beteiligt ist (Sturm, 2006). Es besteht aus insgesamt 838 Aminosäuren mit zwölf membranständigen Domänen und führt bei bestimmten Mutationen zum *oculocutaneous albinism II* (= *OCA2*) (Yuasa et al., 2007). Das *mouse pink-eyed dilution gene* (*p*) stellt das orthologe Gen bei *Mus musculus* dar (Rinchik et al., 1993).

- *Hect domain and RLD2* (= *HERC2*)

Das *HERC2*-Gen (MIM#605837) ist auf Chromosom 15q13 circa 20 kb aufwärts von *OCA2* lokalisiert und umfasst 93 Exons über einen Bereich von 250 kb. Es kodiert ein Protein, welches aus 4834 Aminosäuren besteht (Ji et al., 2000). Die genaue Funktion des Proteins ist bis heute nicht geklärt. Es wird allerdings angenommen, dass *HERC2* die Expression des *OCA2*-Gens reguliert und somit indirekt die Melaninsynthese beeinflusst (Sturm et al., 2008).

- *Interferon regulatory factor 4* (= *IRF4*)

Das *IRF4*-Gen (MIN#601900) ist auf Chromosom 6p25-p23 lokalisiert, umfasst acht Exons und kodiert für ein Protein, welches zur Gruppe der *interferon regulatory factor family* gehört. *IRF4* fungiert als Transkriptionsfaktor und reguliert die Transkription von Interferonen und anderen Cytokinen. Das Protein besteht aus 451 Aminosäuren und wird sowohl in Melanomzelllinien als auch in Melanozyten expremiert (Grossman et al., 1996). Es wird angenommen, dass das *IRF4*-Gen von *MITF* reguliert wird (Hoek et al., 2008).

1.1.2 Pigmentierung unterschiedlicher Gewebe

Im menschlichen Organismus gibt es eine Reihe von Gewebearten, die Melanozyten aufweisen. Melanozyten sind dendritische Zellen, die während der Embryogenese überwiegend aus der Neuralleiste hervorgehen. In der Epidermis und den Haarfollikeln sind die sogenannten "klassischen" Melanozyten lokalisiert, welche für die Haut- und Haarfarbe verantwortlich sind. Zusätzlich sind "nicht-klassische" Melanozyten im inneren Ohr, in der Hirnhaut, im Lungen-, Fett- und Herzgewebe sowie in mehreren Bereichen des Auges vorzufinden (Brenner & Hearing, 2009; Colombo et al., 2011). In den folgenden Abschnitten wird auf die Gewebe eingegangen, die für die Augen-, Haar- und Hautfarbe von Bedeutung sind.

1.1.2.1 Haarfollikel

Das Haar ist ein Anhängsel der Epidermis, mit Ursprung in der Dermis. Die Farbnuancen können von hellblond bis schwarz variieren. Das Wachstum erfolgt in den Haarfollikeln und gliedert sich in eine anagene (Wachstum), katagene (Übergang), telogene (Stillstand) und exogene (Ausfall) Phase (Stenn & Paus, 2001). Die Melaninsynthese erfolgt ausschließlich während der anagenen Phase in den Melanozyten der Haarzwiebel, die aus der Epidermis einwandern. Im Vergleich zu den epidermalen Melanozyten, sind die der Haarzwiebel voluminöser und dendritischer. Zudem produzieren sie größere Melanosome, welche an die umgebenden Keratinozyten abgegeben werden, um daraus die Cortex des Haarschaftes zu bilden (Bell, 1967; Slominski et al., 2005) (Abbildung 3). Eine Melanozyte versorgt in diesem Fall fünf Keratinozyten mit Melanosomen. Im Alter nimmt die Anzahl der Melanozyten in den Follikeln ab, was zum Ergrauen der Haare führt (Tobin & Paus, 2001).

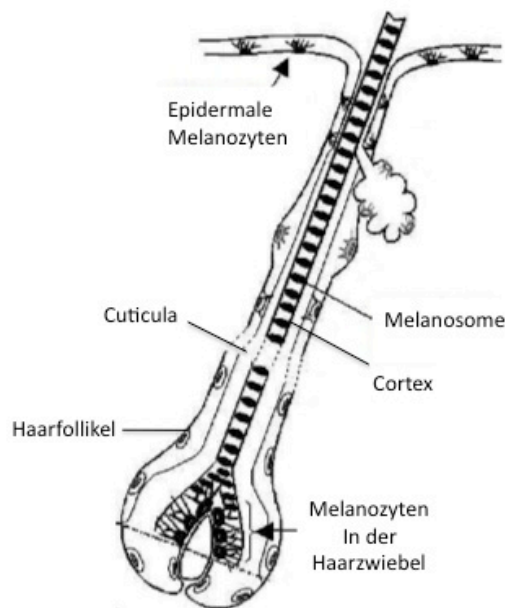


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Haarschaftes, verändert nach (Slominski et al., 2005). Epidermale Melanozyten wandern in die Haarzwiebel, wo die reifen Melanosome an die umliegenden Keratinozyten abgegeben werden, um die Cortex auszubilden.

1.1.2.2 Auge

Melanine im Auge sind für die Ausprägung der Augenfarbe verantwortlich, die von hellblau bis zu schwarz variieren kann. Das menschliche Auge besitzt zwei unterschiedliche Arten an Melanozyten. Zum einen uveale Melanozyten mit Ursprung in der Neuralleiste und zum anderen Melanozyten des retinalen Pigmentepithels (= RPE), die aus dem Neuroepithel hervorgegangen sind. Im RPE werden die Melanozyten ausschließlich für die Funktionalität der *Retina* angelegt und bilden im Laufe der Jahre keine weiteren Melanosome aus. Die Melanozyten der *Uvea* sorgen für die individuelle Augenfarbe (Colombo et al., 2011). Diese synthetisieren kontinuierlich Eu- und Phäomelanine und speichern diese im Cytoplasma (Nordlund et al., 1998). Die *Uvea* lässt sich von anterior nach posterior in die Bereiche *Iris*, *Corpus ciliare* und *Choroidea* unterteilen. Die Aufgabe der Melanine in der *Choroidea* und dem *Corpus ciliare* ist bislang ungeklärt. Es wird allerdings angenommen, dass sie diese vor oxidativen Schäden schützen (Rozanowska, 2011). Die *Iris* stellt den Bereich dar, der für die Ausprägung der Augenfarbe relevant ist. Die Anzahl der Melanozyten ist bei allen Augenfarben von hellblau bis hin zu schwarz identisch, allerdings variiert die

Einleitung

Melanosomengröße und -dichte (Eagle C.R., 1988; Wilkerson et al., 1996). Braune Augen beispielsweise besitzen sehr viele große Eumelanosome in den vorderen Schichten und dem Stroma der *Iris*. Helle Augen hingegen weisen wenig Melanosome mit einem hohen Phäomelanosomenanteil auf. Bei einer geringen Melanindichte werden die einfallenden Lichtstrahlen kaum adsorbiert, so dass die langwelligen Lichtanteile vom Auge resorbiert und die kurzwelligeren hingegen reflektiert werden. Das Auge erscheint somit blau. Allerdings kann es hier trotzdem zur Ausbildung eines dunklen Ringes um die Pupille kommen (Abbildung 4). Bei Albinos sind sowohl die Iris als auch das RPE unpigmentiert, so dass die Augen auf Grund der durchbluteten Gefäße rötlich erscheinen (Sturm & Larsson, 2009; Sturm & Frudakis, 2004).

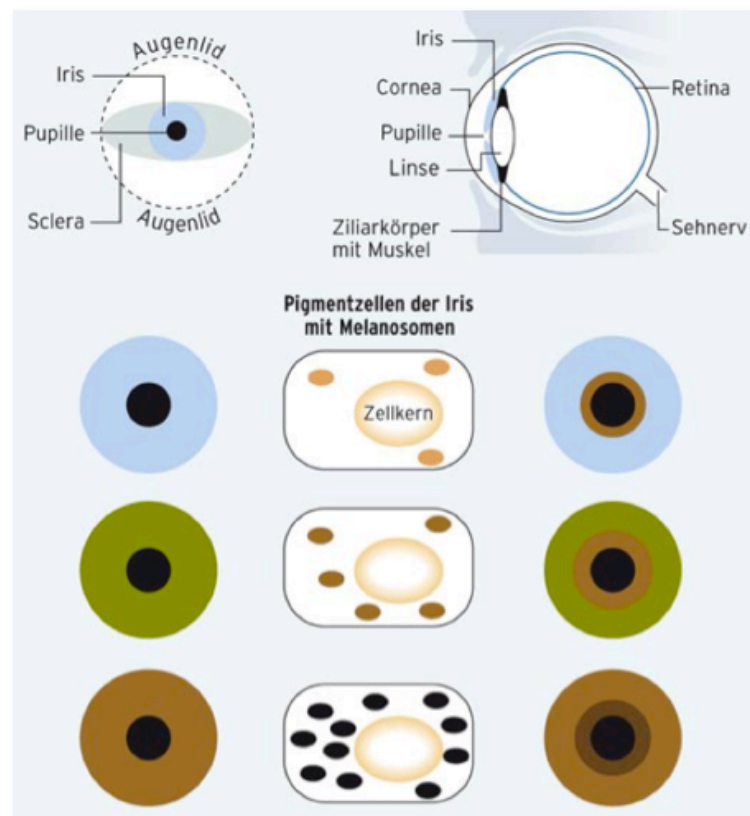


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Auges und der Augenfarbenausprägung, verändert nach (Sturm & Frudakis, 2004). Im oberen linken Bild ist eine Frontalansicht des Auges dargestellt. Hier sind von innen nach außen die Pupille, die Iris sowie die Sclera abgebildet. Auf dem oberen rechten Bild ist ein Querschnitt des Auges dargestellt. Der vordere Bereich des Auges wird durch die Cornea abgegrenzt, hinter der sich die Iris, die Pupille und die Linse mit Ziliarkörper befinden. An der hinteren Innenseite des Auges ist der Verlauf der Retina zu erkennen. Das untere Bild zeigt die Melanozyten der Iris bei unterschiedlichen Augenfarben. Hier wird deutlich, dass blauäugige im Vergleich zu braunäugigen eine deutlich geringere Melanosomendichte mit helleren Melanosomen aufweisen.

1.1.2.3 Epidermis

Die Hautfarbe ist ein individuelles Merkmal, das vor allem durch den Melaningehalt und den Melanintypus in der Epidermis determiniert wird. Der Melaninanteil in der Haut ist genetisch bedingt, kann aber auch durch UV-Strahlen beeinflusst werden. Zudem wird die Hautfarbe durch Bluthämoglobine und Carotinoide verändert (Quevedo & Holstein, 2006). Unter geschlechtsspezifischer Betrachtung zeigt sich bei Frauen ein tendenziell hellerer Hauttypus als bei Männern (Robins A.H., 1991).

Melanine, die für die Ausprägung der Hautfarbe verantwortlich sind, werden in den Melanozyten der Epidermis synthetisiert, in Melanosome verpackt und über die Dendriten in die umliegenden Zellen transportiert (Abbildung 5).

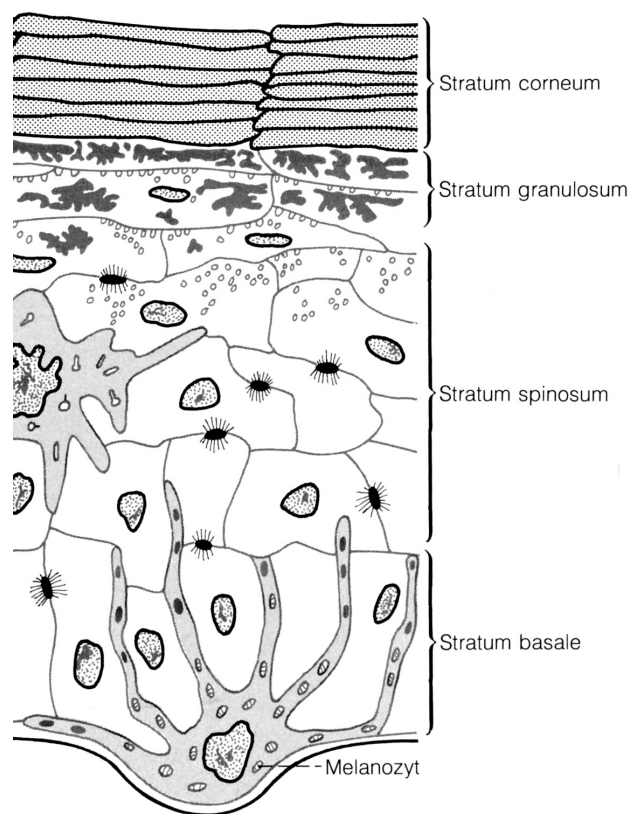


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Epidermis, verändert nach (Benninghoff, 1993). Die Epidermis setzt sich aus folgenden Schichten zusammen: *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale*. Im *Stratum basale* befinden sich Melanozyten, die Melanosome bilden und diese an die umliegenden Zellen abgeben.

Einleitung

Eine Melanozyte versorgt circa 30 bis 40 Keratinozyten mit Melanosomen (Eisinger & Marko, 1982). Dermatologen differenzieren sechs verschiedene Hauttypen, die nach der Sonnenempfindlichkeit als Phototyp I bis VI klassifiziert werden. Der Phototyp I stellt nach dieser Einteilung den hellsten und sonnenempfindlichsten, Phototyp VI hingegen den sonnenunempfindlichsten Typ dar (Fitzpatrick, 1988). Sowohl beim Phototyp I als auch beim Phototyp VI ist die Anzahl der Melanozyten im Gewebe identisch. Der Melaniningehalt beim Phototyp VI ist allerdings um das vierfache erhöht (Tadokoro et al., 2005). Die dunkleren Phototypen weisen größere Melanosome auf, die sich überwiegend im Cytosol der Keratinozyten anordnen. Bei den helleren Phototypen hingegen lagern sich vier bis acht Melanosome zu einer Einheit zusammen. Um den Nukleus vor UV-Strahlen zu schützen, sammelt sich ein Großteil der Melanosome, unabhängig vom Phototyp, um den Nukleus herum an (Szabo et al., 1969; Konrad & Wolff, 1973; S., 2003).

1.1.3 Pigmentierungsdiversität

Bei Betrachtung äußerlicher Ausprägungen ist bei den Pigmentierungsmerkmalen wie Augen-, Haar- und Hautfarbe eine sehr hohe Diversität zu beobachten. Diese Vielfalt zeigt sich sowohl zwischen verschiedenen als auch innerhalb einzelner Populationen. Europa stellt den Kontinent mit der größten Pigmentierungsdiversität dar.

1.1.3.1 in Europa

In Europa reicht die Vielfalt der Haarfarbe von hellblond bis schwarz, mit zusätzlichen Farbtönen wie rot, rotblond oder rotbraun. Neben der großen Bandbreite an Haarfarben zeigt auch die Augenfarbe ein sehr umfangreiches Farbspektrum von hellblau über grün bis hin zu dunkelbraun. Sowohl bei der Augen- als auch bei der Haarfarbe ist in Europa ein **Südost-Gradient** bezüglich der Helligkeit zu erkennen. In den nördlichen Regionen überwiegt der Anteil an hellen Augen und hellen Haaren mit über 80 %. Dieser sinkt sowohl in Süd- als auch in Südost-Europa auf 1 bis 29 % (Abbildung 6). In anderen Ländern außerhalb Europas sind nur noch vereinzelt helle Augen und Haare ausgeprägt. Dort dominieren bei den ursprünglichen Populationen braune Augen und schwarze Haare (Frost, 2006; Rees J.L., 2003; Sturm R.A., 2004). Auch In Bezug auf die Hautfarbe ist Europa einzigartig. In den nördlichen Breiten überwiegen die hellen und sonnenempfindlichen Phototypen I und II, wohingegen die sonnenunempfindlicheren Phototypen III und IV in den

Einleitung

südlichen und südöstlichen Regionen vorherrschend sind. Somit sind auf einem Kontinent vier verschiedene Hauttypen anzutreffen (Fitzpatrick, 1988).

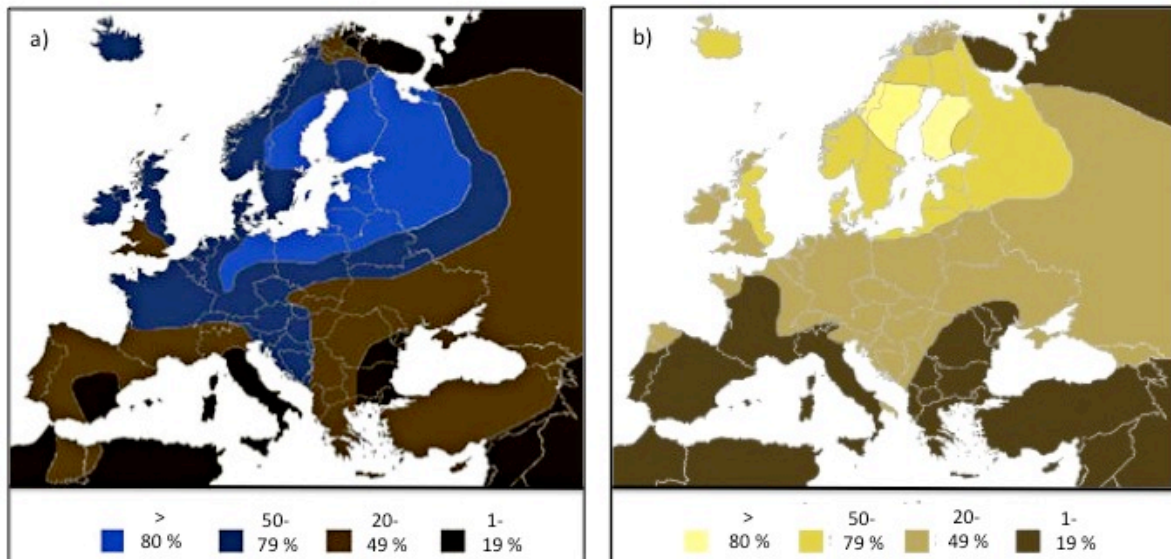


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Verteilung von hellen Augen und Haaren in Europa. a) prozentuale Verteilung der hellen Augen, b) prozentuale Verteilung der hellen Haare.

1.1.3.2 Populationsgenetische Ursachen

Die einzigartige Pigmentierungsdiversität, die heutzutage in Europa vorliegt, beruht wahrscheinlich auf verschiedenen Faktoren.

Die **sexuelle Selektion** wird als mögliche Ursache in Betracht gezogen (Frost, 1986; Frost, 2006). D.h., dass bei der Partnerwahl bestimmte Phänotypen, meist die seltenen und auffälligen, bevorzugt ausgewählt werden, so dass sich diese stärker im Genpool manifestieren.

Die **natürliche Selektion** könnte in dieser Hinsicht ebenfalls von Bedeutung gewesen sein. Bei dieser werden vorteilhafte Genvarianten, beispielsweise als Anpassung an bestimmte Umwelt- oder Lebensbedingungen, über einen relativ kurzen Zeitraum im Genpool fixiert. Die Anpassung an das europäische Klima in Form einer Depigmentierung könnte hierbei eine große Rolle gespielt haben.

1.1.3.3 Das Neolithikum als möglicher Ursprung der heutigen Diversität

In den letzten 50 000 Jahren haben sich **drei große Bewegungen in Europa** ereignet, die archäologisch belegt sind (Abbildung 7). Die **erste Bewegung** begann vor etwa 40 000 Jahren im Jungpaläolithikum, als der Neandertaler durch den anatomisch modernen Menschen abgelöst wurde und vom Levant in viele Bereiche Europas vordrang (Straus L.G., 1989; Mellars P.A., 1992). Die **zweite größere Bewegung** ereignete sich vor circa 18 000 Jahren, als in Nord- und Zentraleuropa eine Eiszeit vorherrschte und sich die Menschen in wärmere Regionen Europas zurückzogen. Mit dem Rückgang der Gletscher wanderten diese wieder Richtung Norden, was heute als postglaziale Phase oder mesolithische Reexpansion bezeichnet wird (Otte M., 1990). Die **letzte der drei Bewegungen** erfolgte vor circa 10 000 Jahren und ist unter dem Begriff Neolithische Revolution bekannt. Funde aus dieser Zeit deuten auf einen Beginn der Agrarkultur im Levant hin, die im Laufe der Zeit auch in Nord- und Westeuropa Anwendung fand (Ammermann & Cavalli.Sforza, 1984; Renfrew C., 1987). Die Phase des Neolithikums wurde geprägt durch Ackerbau, Viehzucht und Veränderungen im kulturellen und gesellschaftlichen Leben, zu denen das Verzieren von Gefäßen oder die Herstellung von Steingeräten zählt. Die Nutzung dieser Steinwerkzeuge gab dem Kulturabschnitt seinen Namen und leitet sich aus dem Griechischen *neo* = neu und *lithos* = Stein ab.

Es gibt insgesamt **drei Theorien zur Ausbreitung der Agrarkultur** in Europa. Das ***demic diffusion* (= DD) Modell** geht von einem Import der Techniken durch Populationsbewegungen aus dem Mittleren Osten aus, ohne jeglichen Kontakt mit lokalen paleolithischen Populationen (Ammermann & Cavalli.Sforza, 1984). Das ***cultural diffusion* (= CD) Modell** stützt sich lediglich auf den reinen Technikaustausch ohne Populationsbewegungen (Zvelebil & Zvelebil, 1988). Das dritte Modell geht von einem **kombiniertem Szenario des DD und CD Modells** aus (Zvelebil M., 1989; Thorpe I., 1996). Da die neolithische Revolution eine Phase des Kultur- und Wissensaustausches darstellt und Vermischungen dieser damaligen Populationen vermutet werden, ist eine Prägung unseres heutigen Genpools durch das Neolithikum anzunehmen (Ammermann & Cavalli.Sforza, 1984). Die beschriebenen Vermischungen der Populationen könnten dazu beigetragen haben, dass nicht nur der Genpool im allgemeinen eine Prägung erfahren hat, sondern zusätzlich die heutige Pigmentierungsdiversität in dieser Zeit entstanden ist.

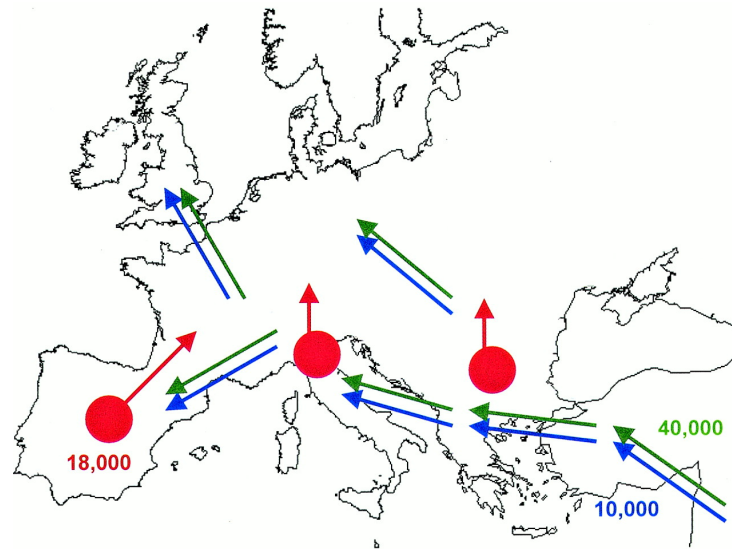


Abbildung 7: Schematische Darstellung der demographischen Prozesse in Europa im archäologischen Kontext nach (Barbujani & Bertorelle, 2002). Die Jahreszahlen sind grob geschätzte *before present* (= BP) Zeitangaben. Die grünen Pfeile stellen die **paläolithische Kolonisation**, die roten die **mesolithische Reexpansion** und die blauen die **neolithische Bewegung** dar. Die roten Kreise markieren die Rückzuggebiete während der Eiszeit.

1.2 Rekonstruktion der Pigmentierung mittels DNA Analysen

Zur Rekonstruktion der Augen-, Haar- und Hautfarbe eines Individuums ist es möglich eine DNA-Analyse bekannter Pigmentierungsgene durchzuführen. Da kleine Sequenzänderungen innerhalb dieser Gene für die individuelle Pigmentausrprägung entscheidet sind, ist es in diesem Fall ausreichend einzelne Nukleotidveränderungen zu analysieren.

1.2.1 Einzelnukleotidpolymorphismen als genetische Marker

Beim Vergleich des Genoms unterschiedlicher Individuen liegt eine 99,9 %-ige Sequenzübereinstimmung vor. Lediglich 0,1 % des Genoms sind variabel. Diese Variabilität beruht auf Mutationen, die aus verschiedenen Gründen entstanden sein können. Treten in einer Population verschiedene Genvarianten auf, von denen die seltenere in einer Häufigkeit von mehr als 1 % vorliegt, wird in diesem Fall von einem Polymorphismus gesprochen (Brookes, 1999). Die häufigste Form stellt der **single nucleotide polymorphism (= SNP)** dar.

Hierbei handelt es sich um den Austausch eines einzelnen Nukleotids in der DNA-Sequenz (Abbildung 8), bei dem sowohl Transitionen (Austausch von Purin gegen Purin oder Pyrimidin gegen Pyrimidin) als auch Transversionen (Austausch Purin gegen Pyrimidin oder umgekehrt) auftreten (Zhao et al., 2006).

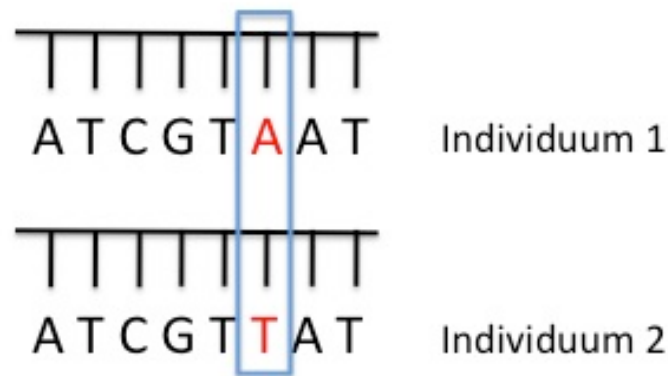


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines *single nucleotide polymorphism* (= *SNP*). Dargestellt sind zwei Allele verschiedener Individuen mit einem Sequenzunterschied an der sechsten Position (rot markiert). Eine Einzelnukleotidveränderung, die mindestens zu einem Prozent in einer Population ausgeprägt ist, wird als *SNP* definiert.

Beim Vergleich zweier Chromosomen können im Mittelwert alle 1000 bp einzelne Nukleotidveränderungen detektiert werden, die sowohl in kodierenden als auch in nicht kodierenden Bereichen lokalisiert sein können. Je nachdem, wo ein *SNP* auftritt, kann er unterschiedliche Folgen für den Organismus mit sich bringen. So genannte ***random SNPs* (= *rSNPs*)** treten in stillen Bereichen auf und haben in der Regel keine Auswirkung auf den Phänotyp. *SNPs*, die den Phänotyp beeinflussen, sind unter dem Begriff ***phenotype relevant SNPs* (= *pSNPs*)** bekannt. Zu diesen zählen ***gene-associated SNPs* (= *gSNPs*)** und ***coding SNPs* (= *cSNPs*)**. Diese liegen entweder in der Nähe (*gSNPs*) oder direkt im Exon eines Gens (*cSNPs*) und können somit für diverse Krankheitsanfälligkeiten oder Medikamentenunverträglichkeiten verantwortlich sein. Des Weiteren können *pSNPs* das äußere Erscheinungsbild beeinflussen, indem sie Synthesewege wie beispielsweise den des Melanins regulieren (Cargill et al., 1999).

Alle *SNPs* sind in der Regel biallelische Marker, die in Einzelfällen auch in drei oder vier verschiedenen Allelen auftreten (Collins et al., 1998; Philipps et al., 2004). Bis heute konnten 12,6 Millionen *SNPs* im menschlichen Genom identifiziert werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, Stand 27.10.2011). Die Mutationsrate der *SNPs* ist im Vergleich zu anderen Markern relativ gering (10^{-9} bis 10^{-8}), so dass sich diese besonders gut für populationsgenetische sowie -geographische Untersuchungen eignen (Nielsen, 2000).

Einleitung

- Pigmentierungsassoziierte SNPs

SNPs, die innerhalb der Pigmentierungsgene lokalisiert sind, gehören in der Regel zur Gruppe der pSNPs. Dabei werden eine Reihe von SNPs mit Pigmentierungsvariationen bezüglich der Augen-, Haar- und Hautfarbe beim Menschen in Verbindung gebracht (Sturm, 2006).

Das *OCA2*-Gen auf Chromosom 15 wurde lange Zeit für das wichtigste Element bei der Ausprägung der **Augenfarbe** angesehen (Rebbeck et al., 2002). Bestimmte Mutationen in diesem Gen führen zu Pigmentierungsanomalien wie dem okulokutanen Albinismus Typ II (Brilliant, 2001). Es zeigte sich jedoch, dass der SNP rs12913832 des *HERC2*-Gens im Vergleich zum *OCA2*-Gen eine signifikantere Assoziation hinsichtlich der Augenfarbe aufweist (Sulem et al., 2007; Kayser et al., 2008; Sturm et al., 2008). In Bezug auf die Ausprägung der **Haarfarbe** spielt das *MC1R*-Gen eine entscheidende Rolle. Bestimmte SNP-Varianten innerhalb dieses Gens können zur Ausprägung roter Haare führen (Beaumont et al., 2008; Schiöth et al., 1999). Der **Hauttyp** wird über diverse Mutationen im *TYR*, *MC1R*, *SLC24A5* und *SLC45A2*-Gen reguliert (Norton et al., 2007; Sulem et al., 2007; Lucotte et al., 2010; Graf et al., 2007; Branicki et al., 2007; Valverde et al., 1995; Han et al., 2008).

Insgesamt konnten bei den Genen *SLC24A5*, *MC1R*, *OCA2*, *HERC2*, *TYRP*, *TYR*, *IRF4* und *SLC45A2* die signifikantesten Assoziationen bezüglich der Augen-, Haar- und Hautfarbenausprägung nachgewiesen werden.

- Vererbung

Bezüglich der Augenfarbenausprägung wurde viele Jahre das Modell von Davenport gelehrt, bei dem es davon abhängt, welches Allel dominant und welches rezessiv vorliegt. Braune Augen würden bei diesem Modell dominant, blaue Augen rezessiv vererbt werden. Entsprechend könnten aus braunäugigen Eltern nie blauäugige Kinder hervorgehen (Davenport & Davenport, 1907). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei den genannten Pigmentausprägungen bezüglich der Augenfarbe blauäugige Kinder keine Seltenheit sind. Das im Jahre 1907 von Davenport aufgestellte Modell gilt daher als weitestgehend überholt. Heute ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die an der Ausprägung der Augenfarbe beteiligt sind. Somit wird dieses Pigmentierungsmerkmal nicht monogenetisch sondern **polygenetisch** vererbt und lässt sich nicht so einfach erklären, wie anfangs angenommen. Analog verhält es sich mit den anderen Pigmentierungsmerkmalen. Alle weisen einen polygenetischen Charakter auf und sind hoch komplex in ihrer Vererbung (Edwards et al., 2010).

1.2.2 Anwendungsgebiete

Die Analyse von *SNPs*, die mit der Pigmentierung assoziiert sind, ist für die unterschiedlichsten Wissenschaftsgebiete von großem Interesse. In der Medizin sind SNP-Analysen sinnvoll, um Pigmentierungsanomalien, wie Hautkrebs oder Albinismus, besser verstehen und Patienten individueller therapieren zu können. Zusätzlich kann die Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes bei historischen, archäologischen, evolutionsbiologischen und forensischen Fragestellungen Anwendung finden. In den folgenden Abschnitten wird auf die verschiedenen Anwendungsgebiete genauer eingegangen.

- **Archäologische und historische Fragestellungen**

In Museen oder Dokumentationen wird oft über Rekonstruktionen des äußeren Erscheinungsbildes von historischen Personen berichtet. Liegen schriftliche Zeugnisse, Gemälde oder Fotografien über das Aussehen der betreffenden Person vor, so ist es einfach eine Rekonstruktion zu gestalten. Existieren allerdings keinerlei oder divergierende Zeugnisse hierzu, kann eine Rekonstruktion immer nur eine Annäherung an das Originalbild darstellen. Mithilfe von Gen-Analysen könnte eine **naturgetreue Nachbildung** der Haar-, Augen- und Hautfarbe gewährleistet werden.

- **Forensische Fragestellungen**

Die Rekonstruktion von Pigmentierungsmerkmalen ist auch für die forensische Genetik von großem Interesse. Phänotypspezifische Information können im Bereich der **Tätersuche** Anwendung finden, um Personen als Tatverdächtige ein- oder auszuschließen. Dies führt dazu, dass der Kreis der Tatverdächtigen stark eingegrenzt werden kann. Zudem kann die Rekonstruktion der Augen-, Haar- oder Hautfarbe über die Bedeutsamkeit eines Beweisstückes entscheiden. In England beispielsweise beschrieb eine Augenzeugin den Täter einer Schießerei als rothaarig. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte an diesem Tatort eine Zigarettenkippe sichergestellt werden. Eine DNA-Analyse hinsichtlich der Pigmentierung wäre im Fall der Zigarettenkippe sinnvoll gewesen wäre, um die Relevanz des Beweisstückes zu überprüfen. Hätte die Analyse ergeben, dass die Zigarette von einer rothaarigen Person geraucht wurde, wäre das Anordnen einer Massenuntersuchung auf Grund dieses Hinweises angebracht gewesen (Tully, 2007). Doch auch bei **vermissten Personen** und **unbekannten Leichen** kann die Rekonstruktion

der Pigmentierung von großem Nutzen sein, um in schwierigen Fällen zusätzliche Informationen zu erlangen (Kayser & Schneider, 2009). Um allerdings äußerlich sichtbare Merkmale, auch unter dem Begriff *externally visible characteristics* (= EVCs) bekannt, rekonstruieren zu können, müssen **kodierende DNA-Abschnitte** untersucht werden, deren Analyse in Deutschland im forensischen Kontext bisher nicht gestattet ist. Der Geschlechtsmarker Amelogenin ist bis heute der einzige validierte kodierende Marker, der bei forensischen Analysen Anwendung findet (Pouchkarev et al., 1998). In den Niederlanden erfolgte diesbezüglich bereits eine Gesetzesänderung im Jahre 2003, die eine Rekonstruktion der EVCs im Bereich der forensischen Genetik legalisiert (Kayser & de Knijff, 2011). In den kommenden Jahren wird vermutlich auch in anderen Ländern eine Anpassung der Gesetze erfolgen, so dass in Zukunft auch kodierende DNA-Bereiche im forensischen Kontext analysiert werden dürfen.

- **Evolutionsbiologische Fragestellungen**

Zusätzlich zu den archäologischen, historischen und forensischen Fragestellungen können auch evolutionsbiologische Aspekte mit Hilfe der Pigmentierungsrekonstruktion untersucht werden. So kann in Bezug auf die Pigmentierung bis heute nicht genau erklärt werden, wann die Depigmentierung beim Menschen eingesetzt hat, welche Faktoren dabei eine Rolle gespielt haben und warum Europa mit seiner extremen Diversität ein einzigartiges Phänomen darstellt. DNA-Analysen ermöglichen in dieser Hinsicht Einblicke in die Vergangenheit und könnten Lösungsansätze liefern.

1.3 alte DNA

Als alte oder auch *ancient* DNA (= *aDNA*) wird DNA bezeichnet, die aus alten, toten Organismen oder Materialien extrahiert wird und meistens stark degradiert vorliegt. Da in der forensischen Genetik als auch in dem Bereich der aDNA Forschung mit altem und stark degradiertem Material gearbeitet wird, ist es teilweise sehr schwierig den zeitlichen Rahmen von aDNA genau zu definieren. Bei Analysen von humaner DNA kann allerdings allgemein gesagt werden, dass die aDNA dort beginnt, wo die Gerichtsbarkeit aufhört. Als forensisch relevant wird eine Zeitspanne von bis zu 50 Jahren angesehen (Bonte et al., 1976).

1.3.1 Besonderheiten der aDNA

Bei aDNA-Studien werden bevorzugt die noch erhaltenden Hart- oder Weichgewebe analysiert. Es können jedoch ebenso andere Funde wie Pergament, Nahrungsreste, Ausscheidungsprodukte, Krankheitserreger oder Sedimente verwendet werden (Burger et al., 2000; Poinar et al., 2003; Willerslev et al., 2003; Bouwman & Brown, 2004).

Mehrere Studien der vergangenen Jahren haben gezeigt, dass **Zähne** im Vergleich zu diversen Langknochen grundsätzlich **bessere DNA-Erhaltungen** aufweisen (Sosa et al., 2011; Kleindorp, 2006). Diese sollten daher bevorzugt untersucht werden. Trotz bekannter Faktoren wie Temperatur oder Materialauswahl kann in der Regel ein Erfolg oder Misserfolg der DNA-Analysen nicht vorhergesagt werden, da der Grad der Degradierung von bei jeder Probe sehr unterschiedlich ausfällt. Bei kälteren Temperaturen wie z.B. bei Proben aus Permafrostregionen konnten allerdings gute DNA-Qualitäten und -Quantitäten festgestellt (Schwarz et al., 2009).

Die Degradierung der DNA beginnt unmittelbar mit dem Tod eines Organismus, da autolytisch freigesetzte Enzyme die DNA fragmentieren und Reparaturmechanismen der Zelle nicht mehr vorliegen. Dies führt schnell zu einer qualitativen und quantitativen Verschlechterung der Biomoleküle. Im Verlauf der zunehmenden Verwesung kommt es durch eine Vielzahl biochemischer Prozesse und Mikroorganismen zu einer noch stärkeren Degradierung der DNA.

Die **Hydrolyse** und **Oxidation** stellen hierbei die häufigsten chemischen Reaktionen dar. Bei der Hydrolyse entstehen durch direkte Spaltung des Phosphodiesterückrats oder durch Depurinierungen (Verlust einer Purinbase) DNA-Strangbrüche (Abbildung 9a). Zusätzlich können hydrolytische oder oxidative Prozesse zu **Deaminierungen** der DNA führen. Hierbei handelt es sich um einzelne Basenveränderungen von Cytosin zu Uracil oder Guanin zu Xanthin, die regulär in keiner DNA-Sequenz auftreten. Da sich diese veränderten Basen häufig mit anderen komplementären Basen binden (z.B. Uracil mit Adenin), kann dies bei der Sequenzierung zu Fehlinterpretationen führen (Abbildung 9c). Um dies zu verhindern, kann die Uracil-N-glycosylase (= UNG) verwendet werden, um alle Uracile aus der Sequenz zu entfernen. Dies hat allerdings zur Folge, dass die DNA noch stärker fragmentiert und eine Analyse meist nicht mehr möglich ist. Weitere Veränderungen der DNA stellen die **Alkylierung** sowie die **Maillard-Reaktion** dar. Hierbei bilden sich Verknüpfungen, sogenannte *cross links*, zwischen verschiedenen Biomolekülen aus, die eine Amplifikation der DNA erschweren oder gar nicht ermöglichen (Abbildung 9b). Bei Maillard-Produkten können diese Verknüpfungen durch die Verwendung von N-Phenacylthiazolium-Bromid (= PTB) aufgebrochen werden, so dass eine Amplifikation ermöglicht wird (Poinar et al., 2003).

Einleitung

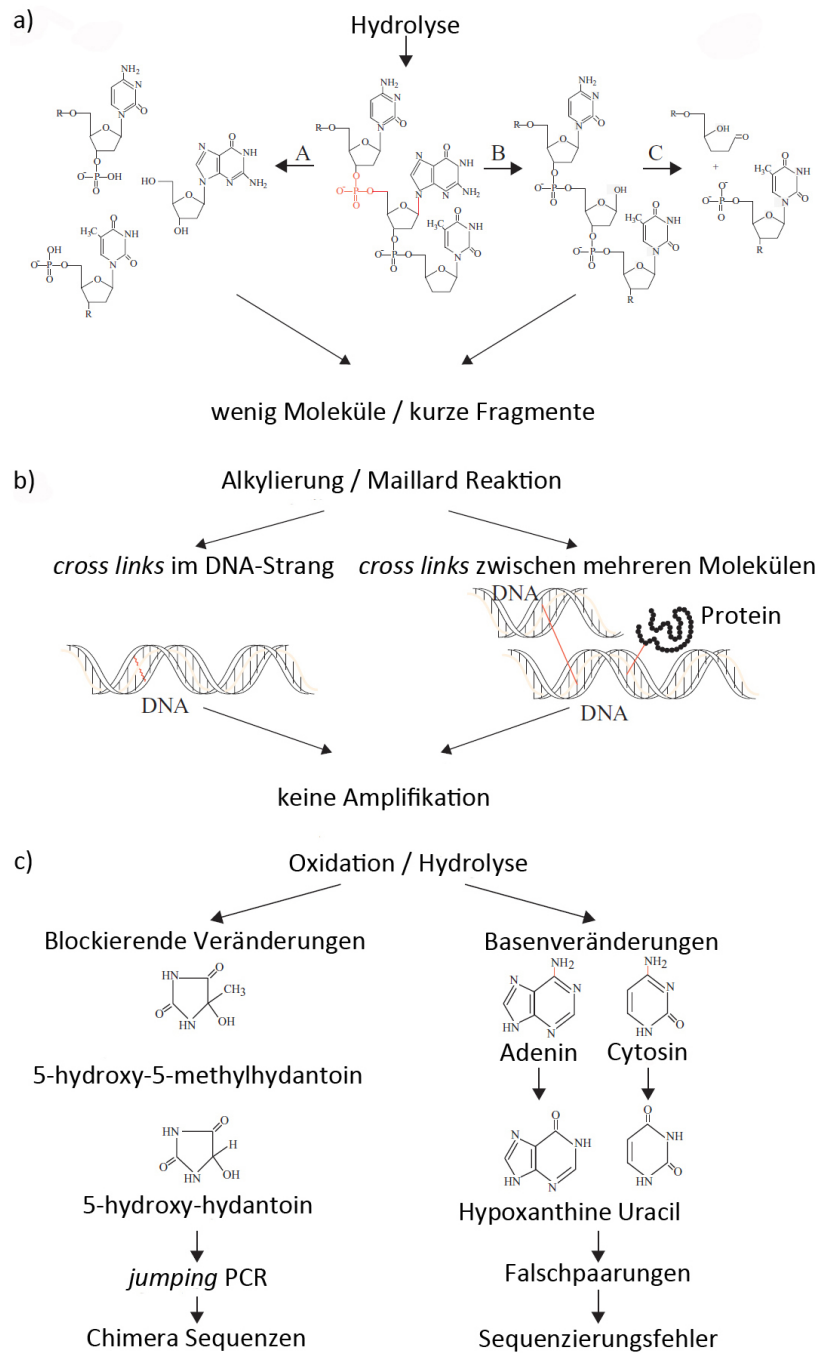


Abbildung 9: Schematische Darstellung der postmortalen DNA-Modifikationen nach (Willerslev & Cooper, 2005).

a) Strangbrüche auf Grund von hydrolytischen Prozessen, b) bei der Alkylierung und der Maillard Reaktion kommt es zu Verknüpfungen der DNA, die eine Amplifikation verhindern, c) Hydrolyse und Oxidation führen zu Veränderungen der DNA, aus denen Chimera Sequenzen und Sequenzierungsfehler hervorgehen.

1.3.2 Analysemöglichkeiten

Trotz schlechter DNA-Qualitäten und -Quantitäten bei archäologischem oder forensischem Material, sind die heutigen Analyseverfahren sehr erfolgversprechend. Häufig werden beide Komponenten des menschlichen Genoms, die chromosomale und mitochondriale DNA, auf unterschiedliche Arten analysiert.

- **chromosomale DNA**

Die chromosomale DNA, auch unter dem Begriff nukleäre DNA (= nDNA) bekannt, liegt in Form von 22 Chromosomenpaaren und 2 Gonosomen (diploide Zelle) im Zellkern vor und umfasst den größten Teil des menschlichen Erbguts (3×10^9). Ungefähr 5 % des nukleären Genoms weist kodierende und 95 % nicht kodierende Bereiche auf (Klug et al., 2007).

Da die nicht kodierenden Bereiche mutationsanfälliger sind, eignen sich diese besonders für die Unterscheidung verschiedener Individuen. Heutzutage werden hierfür sogenannte **short tandem repeats (= STRs)** untersucht. Dies sind repetitive DNA-Einheiten, die aus einem bestimmten Muster von sich wiederholenden Basensequenzen bestehen. Da diese Regionen **hoch polymorph** in der Anzahl ihrer Wiederholungen sind, haben sich im Laufe der Evolution unterschiedlichste Varianten ausgebildet (Butler, 2009). Durch die **biparentale** Vererbung ergeben sich etliche Kombinationsmöglichkeiten, so dass bei der Analyse zahlreicher STR-Systeme, die Wahrscheinlichkeit eines identisch genetischen Profils zweier unverwandter Individuen sehr gering ausfällt. Das genetische Profil ist somit so individualspezifisch, dass zum einen Personen unterschieden und zum anderen Verwandtschaften ermittelt werden können. Heutzutage sind kommerzielle STR-Kits speziell für die Analyse von stark degradiertem Material erhältlich und stellen somit sowohl im Bereich der aDNA als auch bei forensischen Fragestellungen eine optimale Analysemöglichkeit dar.

- **mitochondriale DNA**

Die mitochondriale DNA (= mtDNA) umfasst den weitaus kleineren Teil des menschlichen Erbguts und liegt mit einer Länge von 16 569 Basenpaaren (= bp) als zirkulär-doppelsträngiges Molekül in der Mitochondrienmatrix vor (Pakendorf & Stoneking, 2005). Im Vergleich zur nDNA, die nur einmal im Zellkern vorliegt, tritt die mtDNA abhängig vom Gewebetyp in **unterschiedlicher**

Kopienanzahl auf (Taanman, 1999). Zusätzlich schützt die spezielle Struktur des Mitochondriums die mtDNA vor Umwelteinflüssen und macht diese degradationsunempfindlicher.

Die mtDNA besteht zu 95 % aus kodierender DNA, weist allerdings aufgrund fehlender Reparaturmechanismen eine zehn- bis 20-fach höhere Mutationsrate im Vergleich zur nDNA auf (Murken et al., 2006). Die einzigen nicht kodierenden Bereiche sind im *displacement loop* (= *D-Loop*) lokalisiert und werden als *hypervariable regions* I, II und III (= *HVRI, II, III*) bezeichnet. Da nicht kodierende Bereiche grundsätzlich höhere Mutationsraten aufweisen, zeigen die Regionen des *D-Loops* die höchsten Sequenzvariabilitäten des mitochondrialen Genoms. Diese Mutationen in HVRI, II und III werden aufgrund der reinen **maternalen Vererbung** von der Mutter an die Kinder weitergegeben. Die weiblichen Nachkommen vererben diese wiederum an Ihre Kinder. Somit können die mitochondrialen Mutationen dazu dienen, maternale Linien mehrere tausend Jahre zurückzuverfolgen.

Da HVRI und II eine höhere Sequenzvariabilität aufweisen als HVRIII, werden in der Regel die zuerst genannten Regionen sequenziert und mit einer Ursprungssequenz abgeglichen (Brinkmann & Wiegand, 1997). Sequenziert wurde die mtDNA erstmals von (Anderson et al., 1981), die 17 Jahre später von der Arbeitsgruppe (Andrews et al., 1999) überarbeitet wurde. Diese überarbeitete Version wird heute als *revised Cambridge reference Sequence* (= *rCRS*) bezeichnet und dient als Vergleichssequenz für die Nomenklatur der mtDNA. Anhand der Unterschiede zwischen der *rCRS* und der untersuchten Sequenz ergeben sich bestimmte Haplotypen, die einer Haplogruppe zugeordnet werden können und eine Grundlage für populationsgenetische Studien darstellen. Aus diesen Informationen lassen sich frühe Wanderbewegungen und Abstammungslinien rekonstruieren, die für aDNA-Analysen von großer Bedeutung sind.

- **SNPs**

Zusätzlich zur STR-Analyse und der Sequenzierung bestimmter Mutationen in HVRI und II können ebenfalls Einzelnukleotidpolymorphismen untersucht werden. Diese können sowohl auf der nukleären als auch auf der mitochondrialen DNA lokalisiert sein. Da hierfür sehr kleine Amplikonlängen benötigt werden, stellt diese Analyse ebenfalls eine sehr erfolgversprechende Methode für die Analyse von stark degradiertem Material dar. Eine detaillierte Beschreibung über SNPs ist dem Kapitel 1.2.1 zu entnehmen.

2. Fragestellung

Das äußerliche Erscheinungsbild des Menschen wird stark durch seine Augen-, Haar- und Hautfarbe geprägt. Weltweit sind unterschiedlichste Farbnuancen in zahlreichen Kombinationen vorzufinden. Welche Pigmentierung jeder Einzelne ausbildet, liegt als verschlüsselte Information auf den Genen, die an der Synthese des Pigmentes Melanin beteiligt sind. Dieses Pigment existiert in zwei unterschiedlichen Varianten, dem helleren rötlich/orangen Phäomelanin und dem dunkleren braun/schwarzen Eumelanin. Das Mengenverhältnis dieser beiden Komponenten ist letzten Endes ausschlaggebend für die individuelle Pigmentierung. Zahlreiche Studien der letzten Jahre konnten belegen, dass bereits kleinste Variationen der DNA Sequenz, auch unter dem Begriff **single nucleotid polymorphism (= SNPs)** bekannt, dieses Mengenverhältnis beeinflussen. Diese Erkenntnisse führten zu der Überlegung eine molekulargenetische SNP-Analyse zur Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes zu etablieren.

Daher wurde die Entwicklung eines aussagekräftigen molekulargenetischen Analyseverfahrens zur Rekonstruktion der humanen Augen-, Haar- und Haarfarbe zum Ziel dieser Arbeit. Eine derartige Methode würde sowohl im Bereich der **forensischen Genetik** als auch im Bereich **historischer und archäologischer Wissenschaften** eine ideale Ergänzung zu den bisherigen Methoden darstellen. Anhand minimaler DNA-Spuren könnten somit Täter aufgrund ihres Aussehens überführt, Tatverdächtige belastet und entlastet oder unbekannte Personen besser identifiziert werden. Doch auch die naturgetreue Nachbildung bekannter Persönlichkeit der vergangenen Jahrhunderte oder gar Jahrtausende könnte somit durch diese Analysen ermöglicht werden.

Bei der Entwicklung des Verfahrens soll zum einen eine hohe Aussagekraft und zum anderen dessen Anwendbarkeit an Minimalspuren im Vordergrund stehen. Um dieses Ziel zu erreichen, sind die **statistische Auswertung** sowie die **Methodenetablierung** von sehr großer Bedeutung. Des Weiteren soll zur Überprüfung der Aussagekraft, das entwickelte Analyseverfahren **mit bisher publizierten Methoden verglichen** und an ausgewählten modernen Proben mit auffälliger Pigmentierung getestet werden.

Zusätzlich zum technischen und statistischen Teil soll das neu entwickelte Analyseverfahren auch **praktisch Anwendung** finden. Für diesen Teil der Arbeit sollen archäologische Skelette, die teilweise ein Alter von mehreren tausend Jahren aufweisen, hinsichtlich ihrer Pigmentierung zu Lebzeiten rekonstruiert werden. Es soll hierbei der Frage nachgegangen werden, wie unsere Vorfahren überhaupt aussahen. Des Weiteren soll mit Hilfe der archäologischen Funde nicht nur die Augen-, Haar- und Hautfarbe der damaligen Menschen rekonstruiert, sondern ebenfalls der

Fragestellung

Frage nachgegangen werden, in welcher Zeit der **Ursprung der heutigen europäischen Pigmentierungsdiversität** anzunehmen ist. Da sich das **Neolithikum** (Jungsteinzeit) durch einen extremen Wandel vom Jäger und Sammler hin zum sesshaften Bauern auszeichnet, was mit Gründungen von Dorfgemeinschaften einherging, wird diese Phase als möglicher Ursprung der heutigen Diversität angenommen. Es sollen Skelette aus dieser Zeit hinsichtlich ihrer äußerlichen Erscheinungsmerkmale analysiert und deren molekulargenetische Daten im Kontext zur Fragestellung betrachtet werden.

Abschließend wird der Fokus speziell auf die **Ausprägung der blauen Augenfarbe** gerichtet. Da deren Entstehung ebenfalls bis zum heutigen Zeitpunkt ungeklärt ist und lediglich Schätzungen existieren, die den Ursprung auf 6 000 - 10 000 Jahre zurückdatieren, soll mittels SNP-Analyse zum einen die existierende Hypothese überprüft und zum anderen eine mögliche neue aufgestellt werden. Für diese Analyse sollen ebenfalls die neolithischen Individuen mit einem Alter von 5 000 Jahren verwendet werden.

Zum Vergleich der Daten, aus der Analyse der neolithischen Proben, sollen zusätzlich **mittelalterliche Individuen** aus der Zeit des 13./14. Jahrhunderts hinsichtlich ihres Aussehens rekonstruiert werden. Als **Authentizitätskriterium** sowie für **zusätzliche Interpretationsmöglichkeiten** wird zudem eine Bestimmung der mitochondrialen Haplogruppen und der individualspezifischen STR-Merkmale aller archäologischen Skelette angestrebt.

Die Arbeit gliedert sich somit in die Teilbereiche der höchst komplexen Methodenetablierung und -validierung sowie dessen Anwendung an Jahrtausende altem Skelettmaterial, um bisher ungeklärten Fragen bezüglich der Entstehung der heutigen Pigmentierung nachzugehen.

3. Material & Methoden (rezentes Material)

3.1 Material

Für die Untersuchung der Pigmentierungs-SNPs wurden sowohl norddeutsche Einzelpersonen als auch Familien beprobt. Alle Teilnehmer dieses Projektes haben nach einer ausführlichen Aufklärung der Untersuchung ihres genetischen Materials zugestimmt. In der Regel fertigten die Probanden den Mundschleimautabstrich selbst an. Bei den Institutsmitarbeitern standen vorliegende Blutproben zur Verfügung. Genehmigt wurde diese Studie von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (AZ.: D 400/11).

3.1.1 Unverwandte Probanden

Es wurden insgesamt 400 unverwandte norddeutsche Individuen (203 ♀, 197 ♂) zwischen 18 und 82 Jahren (\bar{x} 31 Jahre) beprobt. Dabei wurde ebenfalls darauf geachtet, dass deren Eltern und Großeltern deutschen Ursprungs sind. Für die Etablierung und Validierung der Analysemethode zur Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes wurden lediglich norddeutsche Probanden untersucht, da aus statistischen Gründen eine relativ hohe Probandenanzahl einer einzelnen Population nötig ist, um ein aussagekräftiges Ergebnis erzielen zu können.

Bei allen Probanden wurde die Augen-, Haar- und Hautfarbe, wie im nachfolgenden Text beschrieben, bestimmt (siehe Anhang Tabelle 1).

Bei der **Augenfarbe** wurde zwischen verschiedenen Blau- (1-3), Grün- (4-6) und Braunabstufungen (7-9) differenziert (Abbildung 10).



Abbildung 10: Darstellung der unterschiedlichen Augenfarben. Fotografische Abbildungen.

Blautöne

- 1= blau
- 2= blau-braun
- 3= blau-grün

Grüntöne

- 4= blau-grün-braun
- 5= grün
- 6= grün-braun

Brauntöne

- 7= braun-gelb-grün
- 8= braun-grün
- 9= braun

Material und Methoden

Zur Bestimmung der **Haarfarbe** wurden Echthaarsträhnen als Vergleichsmaterial verwendet (Abbildung 11). Diese wurden in neun Kategorien (I-IX) von hellblond bis schwarz eingeteilt. Zusätzlich wurde der Rotstich im Haar dokumentiert. Die Haarfarbe rotblond wurde beispielsweise als blond mit Rotstich eingestuft. Bei einigen rothaarigen Probanden konnte der Grundton nicht bestimmt werden, so dass deren Haarfarbe als "rot" definiert wurde und keine Einteilung nach den Kategorien I-IX erfolgte.



Abbildung 11: Darstellung der unterschiedlichen Haarfarben und Kategorien. Fotografische Abbildungen. I= hellblond, II= blond, III= dunkelblond, IV= aschblond, V= hellbraun, VI= braun, VII= dunkelbraun, VIII= schwarz-braun, IX= schwarz

Der **Hauttyp** wurde nach (Fitzpatrick, 1988) definiert (Tabelle 2). Es gibt insgesamt sechs verschiedene Hauttypen (I-VI), von denen in der deutschen Population die Hauttypen I-IV auftreten. Analog hierzu erfolgte eine Zuordnung der Norddeutschen in die Kategorien I-IV.

Tabelle 2: Tabellarische Einteilung der Hauttypen nach (Fitzpatrick, 1988).

Hauttyp	Definition
I	Nie Bräunung, immer Sonnenbrand
II	Leichte Bräunung, immer Sonnenbrand
III	Mittlere Bräunung, gelegentlich Sonnenbrand
IV	Gute Bräunung, gelegentlich Sonnenbrand
V	Üppige Bräunung, selten Sonnenbrand
VI	Starke Bräunung, nie Sonnebrand

Zu Dokumentationszwecken wurden mit einer Canon EOS 400D Nahaufnahmen von den Augen, Haaren sowie der Haut erstellt. Das biologische Material wurde in Form von Mundschleimhautabstrichen entnommen. Zusätzlich wurde bei jedem Probanden das Alter, das Geschlecht, die Ausprägung von Sommersprossen sowie die Pigmentausprägung der Eltern in schriftlicher Form dokumentiert.

Material und Methoden

Eine grobe Darstellung der prozentualen Verteilungen aller Augen-, Haar- und Hautfarben ist in Abbildung 12 dargestellt.

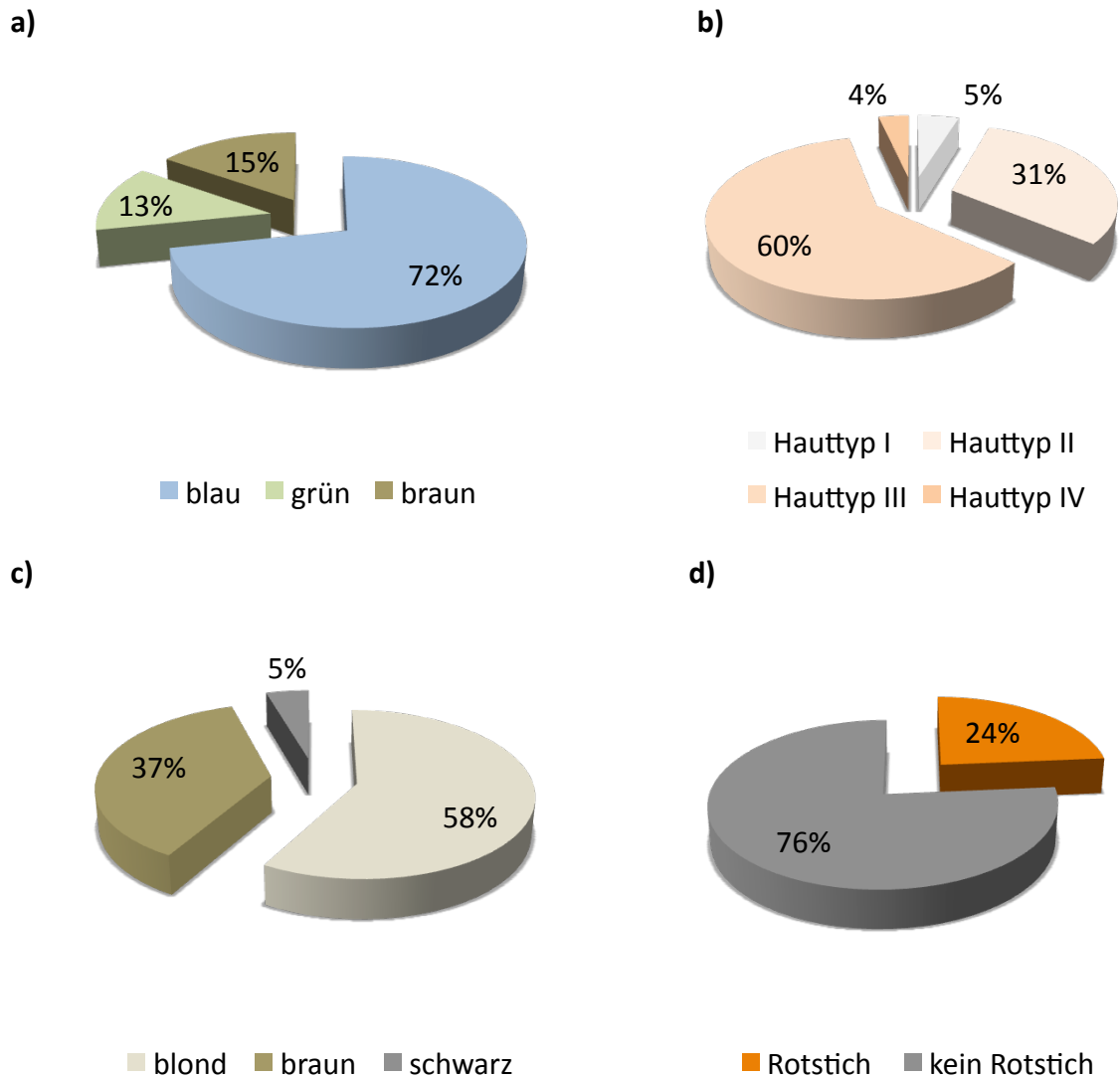


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Augen-, Haar- und Hauttypen in Form eines Tortendiagramms (rezente Proben). Dargestellt sind die Verteilungen der 400 beprobten norddeutschen Individuen in Prozent. a) Augenfarben eingeteilt nach blau, grün und braun; b) Hauttypen eingeteilt nach I,II,III und IV; c) Haarfarben eingeteilt nach blond, braun und schwarz; d) Rotstich eingeteilt nach Vorhandensein oder Fehlen.

3.1.2 Familien

Für ein besseres Verständnis der genauen Vererbungsmuster hinsichtlich der Pigmentierung sind Analysen ganzer Familien sinnvoll. Im Rahmen dieser Studie wurden zwei Familienquartetts untersucht. Die Pigmentierungsmerkmale sind in den Abbildung 13 und 14 schematisch dargestellt.

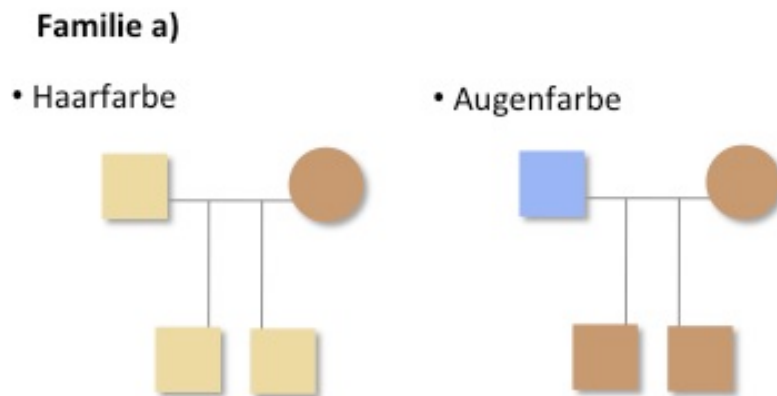


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Pigmentausprägungen des Familienquartetts a). Vater: dunkelblonde Haare (III), blaue Augen (1); Mutter: dunkelbraune Haare (VII), braune Augen (9); Sohn 1 (links): dunkelblonde Haare (III), braune Augen (9); Sohn 2 (rechts): braune Haare (VI), braune Augen (9).

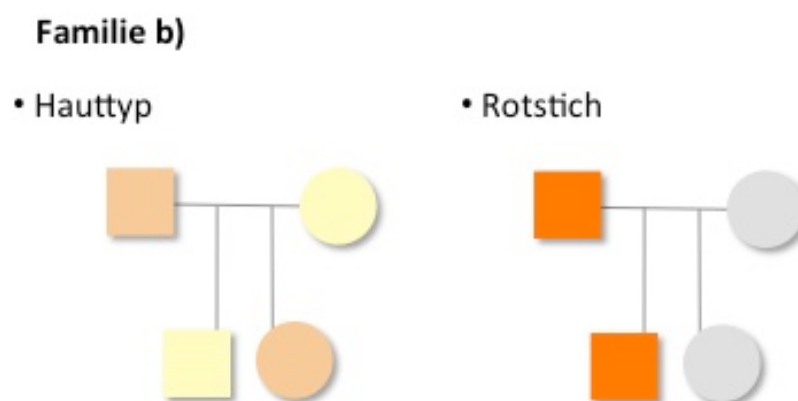


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Pigmentausprägungen des Familienquartetts b). Vater: dunkelblonde Haare (III) mit Rotstich, Hauttyp III; Mutter: dunkelblonde Haare (III), Hauttyp II; Sohn: hellblonde Haare (I) mit Rotstich, Hauttyp II; Tochter: dunkelblonde Haare (III), Hauttyp III.

3.1.3 besondere Pigmentierungsanomalien

Die Iris-Heterochromie stellt eine beim Menschen sehr seltene Pigmentierungsanomalie dar, bei der es aufgrund einer Störung der Pigmentsynthese zur Ausprägung unterschiedlicher Augenfarben kommt. Der Begriff "heterochrom" leitet sich aus dem Griechischen ab und setzt sich aus den Worten "hetero" = anders und "chrom" bzw. "chroma" = Farbe zusammen.

In einigen Fällen können nur Teile des Auges betroffen sein, doch meistens sind komplett unterschiedliche Augenfarben ausgeprägt. Ist diese Form der Anomalie angeboren, treten meist keine Beschwerden auf. Kommt es allerdings im Laufes des Lebens zu einer derartigen Veränderung der Augenfarbe, liegt dies meist an einer Entzündung der Iris (Axenfeld, 1915).

In dieser Arbeit wurde eine Probandin mit zentraler Iris-Heterochromie untersucht, die linksseitig von Geburt an eine blau-braune Augenfarbe und rechtsseitig eine braun-grüne Augenfarbe aufweist (Abbildung 15).

a)



b)



Abbildung 15: Darstellung der unterschiedlichen Augenfarben bei Iris-Heterochromie. Fotografische Abbildung. Dargestellt sind das rechte Auge a) mit braun-gelb-grün Augenfarbe und das linke Auge b) mit blau-brauner Augenfarbe.

3.2 DNA-Extraktion

Für diese Arbeit wurde die DNA aus verschiedenen biologischen Materialien extrahiert. Für die Analysen der rezenten Proben wurde aus Blut- und Mundschleimhautzellen extrahiert.

3.2.1 aus Mundschleimhautabstrichen

Die DNA aus den Mundschleimhautabstrichen wurde mittels Chelex-Verfahren extrahiert (Walsh et al., 1991). Hierfür wurde zunächst ein halber Abstrich in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt. Dieser wurde mit 200 µl 5 %-iger Chelex® 100 Lösung (Sigma-Aldrich) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Abstrich ausgedrückt und die Flüssigkeit in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt. Um die Zellen zu lysieren wurden 2 µl Proteinase K (20 mg/ml, Bioline) hinzugefügt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 30 Minuten bei 56 °C (Eppendorf, Typ 5436). Zum Aufbrechen der Kernmembran wurden die Proben anschließend für 3 Minuten bei 96 °C im Thermoschüttler (Eppendorf, Typ 5436) erhitzt und für 3 Minuten bei 12 000 U/min (Eppendorf, Typ 5415C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

3.2.2 aus Blut

Für die Extraktion aus Blut wurde das NucleoSpin® Dx Blood Kit von Macherey & Nagel verwendet. Hierfür wurden 200 µl Blut in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und mit 25 µl Proteinase K (20 mg/ml, Bioline) und 200 µl BQ1-Puffer versetzt. Dieses Gemisch wurde für 10 Minuten bei 70 °C im Thermoschüttler (Eppendorf, Typ 5436) inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl 95 %iger Ethanol hinzugefügt. Nach kräftigem Vortexen wurde das Gemisch auf Säulchen pipettiert, die vorher in 2,0 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt) platziert wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13 000 U/min für 1 Minute (Eppendorf, Typ 5415C). Die Säulchen wurden anschließend in einem neuen 2,0 ml Reaktionsgefäß positioniert und mit 350 µl BQ2-Puffer versetzt. Bei 13 000 U/min wurde ein zweites Mal für 3 Minuten zentrifugiert (Eppendorf, Typ 5415C). Für den anschließenden Elutionsschritt wurden die Säulchen erneut in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) platziert. Diese wurden mit 50 µl des vorgewärmten (70 °C) Elutionspuffers (BE-Puffer) versetzt und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde für 1 Minute bei 13 000 U/min (Eppendorf, Typ 5415C) zentrifugiert. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das Eluat bei -20 °C gelagert.

3.3 DNA Quantifizierung der nukleären DNA mittels Realtime-PCR

Die selbst entwickelte Singleplex-Realtime PCR dient der Quantifizierung von nukleärer DNA und amplifiziert ein 98 bp Fragment aus dem Telomerase-Gen (Röpke, 2008). Dieses Fragment wird mit Hilfe einer NED-markierten Sonde detektiert. Die Standardreihe, die mit amplifiziert wird, um eine Extrapolation der nukleären DNA innerhalb der Proben zu ermöglichen, wurde aus der Zelllinie Human Genomic Female G152A (Promega) angesetzt. Es wurden hierbei DNA-Mengen von 0,1-100 ng/2 µl verwendet. Die Probenansätze, die sich aus 23 µl Mastermix und 2 µl Probe zusammensetzten, wurden in spezielle Thermo-Fast 96 Detection Plates (Abgene) pipettiert, mit einem *Optical Adhesive Cover* (Applied Biosystem) versiegelt und für 2-3 min bei 2 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben im Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) analysiert. Sowohl die Proben als auch die Standards wurden in Doppelbestimmung pipettiert, so dass die Software aus beiden gemessenen Werten einen Mittelwert bilden konnte. Zusätzlich wurde pro Realtime-PCR eine Negativkontrolle in Doppelbestimmung quantifiziert, um eine Kontamination ausschließen zu können. Der genaue PCR-Ansatz, das PCR-Profil sowie die verwendeten Primer sind den Tabellen 3a, b und c (im Anhang) zu entnehmen.

3.4 Analyse der Pigmentierungs-SNPs

Die Analyse der Pigmentierungs-SNPs an rezenten Proben gliedert sich in zwei Abschnitte:

Der erste Teil befasst sich mit der **Analyse von insgesamt 18 SNPs**, die im Rahmen dieses Projektes aus der Literatur ausgewählt wurden. 15 dieser SNPs wurden aufgrund ihrer hohen Assoziationen bezüglich der Pigmentierung ausgewählt (Tabelle 4, 1-15). Der SNP Nr. 16 wurde als *ancestral informative marker* (= AIM) eingesetzt, um den deutschen Ursprung der Probanden zu überprüfen. Die SNPs Nr. 17 und 18 wurden als interne Kontroll-SNPs benutzt, da diese im Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium* = LD) zu Nr.9 und 4 sind. An insgesamt 400 Norddeutschen unverwandten Probanden wurden die in Tabelle 4 aufgeführten SNPs analysiert. Genauere Informationen zur Analyse sind in Kapitel 3.5.2.1 zu finden.

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der 18 ausgewählten SNPs.

Es sind die Gene, die SNP-IDs, die SNP-Allele sowie die Literaturquellen dargestellt.

	Gen	SNP-ID	SNP Allele	Literatur
1	<i>OCA2</i>	rs7495174	G/A	(Duffy et al., 2007)
2	<i>MC1R</i>	rs1805008	C/T	(Sulem et al., 2007)
3	<i>MC1R</i>	rs1805007	C/G/T	(Sulem et al., 2007)
4	<i>HERC2</i>	rs916977	G/A	(Kayser et al., 2008)
5	<i>OCA2</i>	rs4778138	G/A	(Duffy et al., 2007)
6	<i>IRF4</i>	rs12203592	G/A	(Han et al., 2008)
7	<i>OCA2</i>	rs1800407	G/A	(Sturm et al., 2008)
8	<i>SLC24A4</i>	rs12896399	G/T	(Sulem et al., 2007)
9	<i>HERC2</i>	rs12913832	G/A	(Sturm et al., 2008)
10	<i>OCA2</i>	rs4778241	C/A	(Duffy et al., 2007)
11	<i>MC1R</i>	rs1805009	G/C	(Valverde et al., 1995)
12	<i>TYR</i>	rs1393350	G/A	(Sulem et al., 2007)
13	<i>SLC45A2</i>	rs13289	C/G	(Graf et al., 2007)
14	<i>TYRP1</i>	rs1408799	C/T	(Han et al., 2008)
15	<i>HERC2</i>	rs6867641	C/T	(Graf et al., 2007)
16	<i>SLC24A5</i>	rs1426654	C/T	(Stokowski et al., 2007)
17	<i>HERC2</i>	rs1129038	G/A	(Eiberg et al., 2008)
18	<i>HERC2</i>	rs1667394	G/A	(Han et al., 2008)

Der zweite Teil befasst sich mit der Überprüfung kürzlich publizierter Methoden zur Rekonstruktion der Augen- und Haarfarbe (Branicki et al., 2011; Walsh et al., 2011). Dieser Teil wurde ergänzt, um die Analysemethode, die in diesem Projekt entwickelt wurde, mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichen zu können.

In der **Publikation von (Walsh et al., 2011)** werden für die **Rekonstruktion der Augenfarbe** insgesamt sechs SNPs, auch unter dem Begriff Irisplex bekannt, analysiert (Tabelle 5a).

Tabelle 5a: Tabellarische Übersicht der Irisplex-SNPs nach (Walsh et al., 2011).
Es sind die Gene, die SNP-IDs sowie die SNP-Allele dargestellt.

	Gen	SNP-ID	SNP Allele
1	<i>IRF4</i>	rs12203592	G/A
2	<i>OCA2</i>	rs1800407	G/A
3	<i>SLC24A4</i>	rs12896399	G/T
4	<i>HERC2</i>	rs12913832	G/A
5	<i>TYR</i>	rs1393350	G/A
6	<i>SLC45A2</i>	rs16891982	C/G

Fünf dieser SNPs (Tabelle 5a, Nr. 1-5) sind identisch mit den SNPs Nr. 6, 7, 8, 9 und 12 aus Tabelle 4. Somit wurde lediglich der SNP rs16891982 (Tabelle 5a, Nr.6) an 100 der insgesamt 400 Probanden ergänzend analysiert. Die Verteilung der Augenfarben bei den 100 Probanden setzte sich wie folgt zusammen (detaillierte Angaben siehe Tabelle 5b im Anhang):

- 60 x Blautöne (1-3)
- 23 x Grüntöne (4-6)
- 17 x Brauntöne (7-9)

In der **Publikation von (Branicki et al., 2011)** werden für die **Rekonstruktion der Haarfarbe** insgesamt elf SNPs und die *MC1R* Varianten *MC1R_R*, *MC1R_r* analysiert (Tabelle 6a). Da hier ebenfalls Übereinstimmungen mit Tabelle 4 und 5a vorliegen, wurden zusätzlich nur die SNPs Nr. 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11 sowie die beiden *MC1R* Varianten aus Tabelle 6a untersucht. Insgesamt wurden hierfür 108 der insgesamt 400 Probanden ausgewählt, bei denen die Verteilung der Haarfarben wie folgt ausfiel (detaillierte Angaben siehe Tabelle 6b im Anhang):

- 38 x blond (I-IV)
- 36 x braun (V-VIII)
- 16 x schwarz (IX)
- 18 x rot oder Rotstich

Material und Methoden

Tabelle 6a: Tabellarische Übersicht der SNPs und *MC1R* Varianten zur Rekonstruktion der Haarfarbe nach (Branicki et al., 2011). Es sind die Gene, die SNP-IDs sowie die SNP-Allele dargestellt.

	Gen	SNP-ID	SNP Allele
1	<i>HERC2</i>	rs12913832	G/A
2	<i>IRF4</i>	rs12203592	G/A
3	<i>TYR</i>	rs1042602	C/A
4	<i>EXOC2</i>	rs4959270	A/C
5	<i>SLC45A2</i>	rs28777	A/C
6	<i>TYRP1</i>	rs683	A/C
7	<i>OCA2</i>	rs1800407	G/A
8	<i>SLC24A4</i>	rs2402130	A/G
9	<i>KITLG</i>	rs12821256	C/T
10	<i>SLC45A2</i>	rs16891982	C/G
11	<i>ASIP</i>	rs2378249	A/G
12	<i>MC1R_R</i>	N29ins	C/C
		rs1805006	C/A
		rs11547464	G/A
		rs1805007	C/T
		Y152OCH	A/C
		rs1805008	C/T
		rs1805009	G/C
13	<i>MC1R_r</i>	rs1805005	G/T
		rs2228479	G/A
		rs1110400	T/C
		rs885479	G/A

Alle Pigmentierungs-SNPs der Tabellen 4, 5a und 6a wurden mittels kapillarelektrophoretischer Elektrophorese analysiert. Hierfür wurde das SNaPshot® Multiplex Systems von Applied Biosystems verwendet. Das Analyseverfahren gliedert sich wie folgt:

Amplifikation der Fragmente mit dem zu analysierenden SNP

mittels PCR

(Kapitel 3.5.2)



Überprüfung des Amplifikationserfolges

mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Kapitel 3.5.3)



Aufreinigung der Amplifikate

mittels ExoSAP-IT® (Affymetrix)

(Kapitel 3.5.4)



Einzelbasenverlängerung

mittels SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)

(Kapitel 3.5.5)



Kapillarelektrophoretische Auftrennung der farbmarkierten Primer am

ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)

(Kapitel 3.5.6)

Für die Analyse der MC1R Varianten MC1R_R und MC1R_r aus Tabelle 6a wurde das komplette MC1R-Exon sequenziert und ausgewertet. Die Methode wird in Kapitel 3.4.2.3 detailliert beschrieben.

3.4.1 Primerdesign

Zum Designen der Primer wurde die Software PrimerSelect (DNASar, Lasergene software) verwendet. Bei Entwerfen der Fragmente wurde darauf geachtet, dass eine große Varianz hinsichtlich der Größe vorliegen, um diese bei der Auftrennung mittels Gelelektrophorese unterscheiden zu können. Da möglichst viele Fragmente in einer Multiplex-PCR analysiert werden sollten, wurden die Schmelztemperaturen der Primer angeglichen. In diesem Projekt wurde bei allen Primern die Schmelztemperatur von 60 °C als Optimum festgesetzt. Zusätzlich wurde beim Designen der Primer auf hairpin- und primer-dimer-Formationen geachtet. Mit der Software *Blast*

(= *Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden abschließend alle Primer auf Humanspezifität überprüft.

3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*= PCR) ist ein von Karry Mullis im Jahre 1983 entwickeltes Verfahren mit dem DNA vervielfältigt werden kann. Durch Anwendung sequenzspezifischer Primer werden dabei nur die Bereiche der DNA amplifiziert, die untersucht werden sollen. In den folgenden Abschnitten werden die PCRs zur Analyse der verschiedenen Pigmentierungs-SNPs beschrieben.

3.4.2.1 Analyse der 18 ausgewählten Pigmentierungs-SNPs

Für die Analyse der 18 Pigmentierungs-SNPs wurden zwei Multiplex-PCRs (I, II) entwickelt. Die **Multiplex I** amplifiziert acht und die **Multiplex II** insgesamt neun Fragmente (Tabelle 7a).

Tabelle 7a: Tabellarische Darstellung der PCR-Fragmente aus Multiplex I und II.
Es sind die Gene, der jeweilige SNP sowie die PCR-Fragmente in Basenpaaren (= bp) angegeben.

Multiplex-PCR I				Multiplex-PCR II			
	Gen	bp	SNP-ID		Gen	bp	SNP-ID
1	SLC45A2	137	rs13289	1	TYRP1	96	rs1408799
2	OCA2	64	rs7495174	2	SLC24A4	114	rs12896399
3	OCA2	181	rs1667394	3	HERC2	176	rs1129038
4	MC1R	174	rs1805007, -008	4	HERC2	163	rs12913832
5	HERC2	75	rs916977	5	SLC45A2	130	rs6867641
6	OCA2	167	rs4778138	6	SLC24A5	137	rs1426654
7	IRF4	121	rs12203592	7	OCA2	66	rs4778241
8	OCA2	254	rs1800407	8	MC1R	143	rs1805009
				9	TYR	73	rs1393350

Detaillierte Angaben bezüglich der Primersequenzen, Temperaturprofile und PCR-Ansätze sind im Anhang in Tabelle 7b, c und d zu finden. Die Validierung der Multiplex-PCRs zeigte, dass DNA-Mengen zwischen 0,2 - 0,5 ng/µl optimale Ergebnisse liefern. Bei mehr oder weniger DNA-Einsatz zeigten sich vermehrt drop-outs, die zu falschen Ergebnissen führten. Alle 400 Extrakte wurden daher im Vorwege mittels Realtime-PCR quantifiziert (Kapitel 4.4.1) und entsprechend auf 0,2 - 0,5

ng/µl eingestellt. Zusätzlich wurden die Extrakte vor jeder PCR für 1 Minute bei 6 000 U/min (Eppendorf, Typ 5424) zentrifugiert, um eine Überführung möglicher Chelexreste zu vermeiden.

3.4.2.2 Augenfarbenrekonstruktion nach (Walsh et al., 2011)

Um das Methode von (Walsh et al., 2011) zu überprüfen, wurde der SNP rs16891982 (SLC45A2-Gen) in einer Singleplex-PCR analysiert (Tabelle 8a). Der zu untersuchende SNP wurde dafür in Form eines 107 bp großen PCR-Fragments amplifiziert. Für die PCR wurde jeweils 2 µl DNA-Extrakt eingesetzt. Detaillierte Angaben zu den Primersequenzen, dem Temperaturprofil und PCR-Ansatz sind den Tabellen 8b, c und d im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 8a: Tabellarische Darstellung des PCR-Fragmentes zur Analyse des SNPs rs16891982.
Es ist das Gen, der zugehörige SNP sowie das PCR-Fragment in Basenpaaren (= bp) angegeben.

Singleplex-PCR			
	Gen	bp	SNP-ID
1	SLC45A2	107	rs16891982

3.4.2.3 Haarfarbenrekonstruktion nach (Branicki et al., 2011)

Der Abschnitt zur Haarfarbenrekonstruktion nach (Branicki et al., 2011) gliedert sich in zwei Unterkapitel. Zum einen wurden sieben SNPs mit Hilfe des SNaPshot® Multiplex Systems von Applied Biosystem analysiert und zum anderen wurde das komplette *MC1R*-Exon sequenziert, um die Varianten *MC1R_R* und *MC1R_r* zu untersuchen.

- **SNP-Analyse**

Die Analyse der zusätzlichen sieben SNPs aus der Publikation von (Branicki et al., 2011) wurden in vier verschiedenen PCRs amplifiziert. Die SNPs Nr. 1-3 aus Tabelle 9a wurden als Multiplex-, die SNPs Nr. 4 und 5 als Duplex- und die SNPs Nr. 6 und Nr. 7 als Singleplex-PCR (I, II) analysiert. Für die PCRs, deren Amplifikate Größen von 102-152 bp aufweisen, wurden jeweils 2 µl DNA-Extrakt eingesetzt. Detaillierte Angaben zu den Primersequenzen, Temperaturprofilen und PCR-Ansätzen sind den Tabellen 9b, c und d im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 9a: Tabellarische Darstellung der verschiedenen PCR-Ansätze für die Analyse der sieben SNPs aus der Publikation von (Branicki et al., 2011). Es sind die Gene, der jeweilige SNP sowie die PCR-Fragmente in Basenpaaren (= bp) angegeben

Multiplex			
	Gen	bp	SNP-ID
1	TYR	120	rs1042602
2	EXOC2	113	rs4959270
3	SLC45A2	109	rs28777
Duplex-PCR			
	Gen	bp	SNP-ID
4	SLC24A4	152	rs2402130
5	KITLG	106	rs12821256
Singleplex-PCR I			
	Gen	bp	SNP-ID
6	ASIP	135	rs2378249
Singleplex-PCR II			
	Gen	bp	SNP-ID
7	TYRP1	102	rs683

- **Sequenzierung des *MC1R*-Exons**

Für die Analyse der *MC1R* Varianten *MC1R_R* und *MC1R_r* wurde das komplette Exon analysiert und ausgewertet. Hierfür wurde ein 1080 bp PCR-Fragment amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Amplifikation des Fragmentes sowie die Überprüfung des Amplifikationserfolges mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5.3.1) erfolgte im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Die anschließende Sequenzierung wurde vom Institut für klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (= IKMB) durchgeführt. Detaillierte Angaben zu den Primersequenzen, dem PCR-Temperaturprofil und PCR-Ansatz sind den Tabellen 9 e, f und g im Anhang zu entnehmen.

Die Auswertung beider Varianten erfolgte nach (Branicki et al., 2011) mit Hilfe der Software SeqMan ([DNASar](#), [Lasergene software](#)). Heterozygote Varianten zeigten in Form von Doppelpeaks im Elektropherogramm (siehe Abbildung 16). Für die *MC1R_R* Variante wurden insgesamt sieben und für *MC1R_r* vier SNP-Regionen untersucht (siehe Tabelle 6a). Diese wurden wie folgt eingeteilt:

- keine Mutation = wt/wt
- eine heterozygote Variante = wt/R oder wt/r
- mindestens zwei heterozygote Varianten oder eine neue homozygote Variante = R/R oder r/r

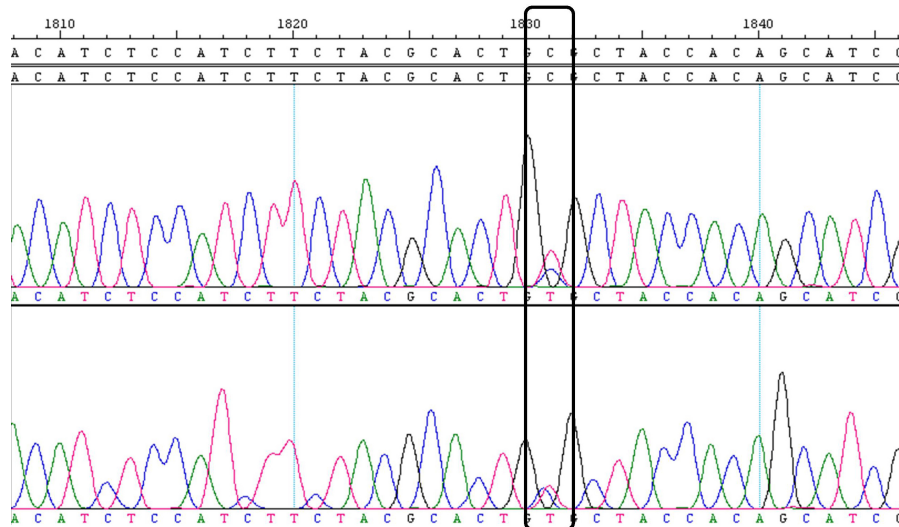


Abbildung 16: Ausschnitt einer humanen *MC1R*-Sequenz. Dargestellt eine DNA-Sequenz, die mittels Sanger-Sequenzierung am ABI Prism™ 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem) erstellt wurde. Das Nukleotid Guanin (G) stellt sich im Elektropherogramm als schwarzer, Cytosin (C) als blauer, Thymin (T) als roter und Adenin (A) als grüner Peak dar. Die eingerahmte Stelle stellt eine Heterozygotie in Form eines Doppelpeaks dar.

3.4.3 Überprüfung des Amplifikationserfolges

Um den Amplifikationserfolg einer PCR zu überprüfen werden überwiegend Gelelektrophoresen verwendet. In dieser Arbeit wurden sowohl Agarose- als auch Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt.

3.4.3.1 mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zum Sichtbarmachen einzelner sowie mehrerer PCR-Fragmente dient die Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wandert die negativ geladene DNA horizontal in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die kleineren Fragmente wandern in der Gelmatrix langsamer als die Größeren, so dass eine Auftrennung anhand der Fragmentgröße erfolgt. Je nach Agarosekonzentration kann die Auftrennungsstärke reguliert werden. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches eine fluoreszierende Eigenschaft aufweist und in doppelsträngige DNA interkaliert, können die Fragmente in Form von Banden mit Hilfe von UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

Für PCR-Produkte, die Größen zwischen 100-500 bp aufweisen, wurden 2 %-ige Agarosegele verwendet. Dafür wurden 200 ml 1x TBE-Puffer (Rezept siehe Anhang) mit 4 g LE-Agarose (Biozym) in einer Mikrowelle (Severin) erhitzt. Das Gemisch wurde anschließend nach kurzem Abkühlen mit 10 μl Ethidiumbromid (Invitrogen, 10 mg/ml) versehen. Diese Menge wurde für ein

Material und Methoden

Gel der Größe 15 x 20 cm mit insgesamt 32 Taschen benötigt. Um bei der späteren Auswertung eine Orientierung bezüglich der Fragmentgröße zu erhalten, wurden die äußeren Taschen des Gels mit 3 µl Größenstandard (= DNA-Fragment bekannter Größe) (Hyperladder IV oder V, Bioline oder 1 kb, Fermentas) gefüllt. Die übrigen Taschen wurden mit einem Gemisch aus 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Ladepuffer (Rezept siehe Anhang) beladen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 45 Minuten (Electrophoresis Power Supply ST 304, Gibco). Die Dokumentation und Auswertung wurde mit Hilfe des GelDoc™ EQ (Biorad) und der Software Quantity One Version 4.5.0. (Biorad) durchgeführt. Als Beispiel für die Darstellung ist eine Verdünnungsreihe des MC1R-Exons in Abbildung 17 dargestellt.

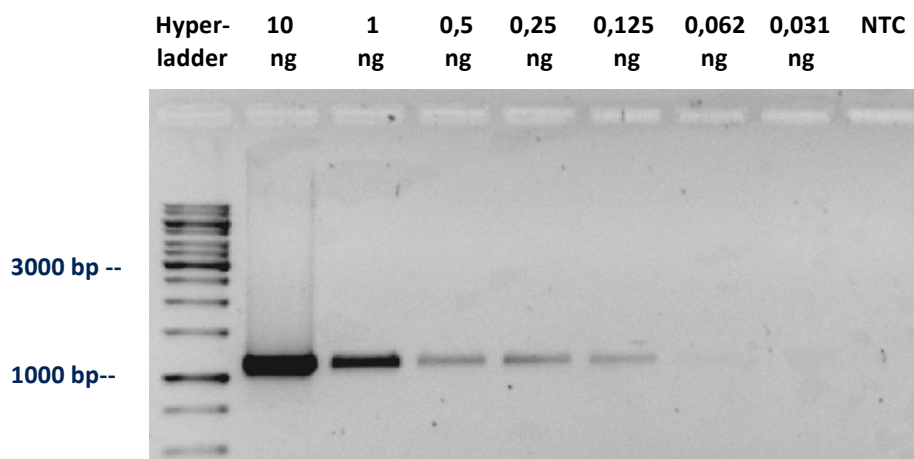


Abbildung 17: Bild eines 2 %-igen Agarosegels nach der Gelelektrophorese. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 45 Minuten. Aufgetragen wurde eine Verdünnungsreihe des amplifizierten MC1R-Exons sowie ein 1 kilobasen (= kb) Hyperladder (Fermentas) als Größenvergleich. NTC= engl. *negative template control*, bp= Basenpaare

3.4.3.2 mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Da ein Polyacrylamidgel in sehr hohen Konzentrationen (3,5 – 20 %) angefertigt werden kann, eignet es sich besonders gut um kleine Fragmente, sowie mehrere Fragmente unterschiedlicher Länge oder aber Proteine aufzutrennen (Mülhardt, 2009; Schrimpf, 2002). Aufgrund dieser Eigenschaft erfolgte die Amplifikationskontrolle der Multiplex-PCRs mit Hilfe eines Polyacrylamidgels. Dafür wurden die PCR-Produkte auf einem Polyacrylamidgel der Länge nach aufgetrennt. Für das Sichtbarmachen der Banden wurde die Silberfärbung gewählt, da diese im Vergleich zu anderen Färbungen sehr sensitiv ausfällt.

Material und Methoden

Zum Anfertigen des Gels wurden zunächst die Glasplatten mit Ethanol gesäubert und anschließend getrocknet. Diese wurden dann in die Gießvorrichtung eingespannt. Zur Fertigung von zwei Gelen der Größe 20 x 20 cm mit jeweils 24 Taschen wurde eine Lösung aus 15,17 ml 1 x TBE-Puffer (Rezept siehe Anhang), 33 ml Tris-Formiat (Rezept siehe Anhang) und 17,1 ml Rotiphorese® Gel 40 (40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19 : 1, Roth) angesetzt. Um eine Polymerisierung des Gels zu ermöglichen, wurden zusätzlich 660 µl Ammoniumpersulfat (= APS, 10 %) und 66 µl Tetramethylethyldiamine (= TEMED) hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen, mit einem Gelkamm versehen und für 30 Minuten auspolymersiert. Die Polymerisation des Gels erfolgt, indem sich die kurzen monomeren Acrylamidmoleküle mit den doppelendigen Bisacrylamidquervernetzern unter Bildung von freien Radikalen, die vom Ammoniumpersulfat zur Verfügung gestellt und von TEMED katalysiert werden, zu einem Netz zusammenlagern (Martin R., 1996). Anschließend wurden die Glasplatten mit den Gelen in die Gelkammer eingehängt und die Kämme vorsichtig entfernt. Die Gelkammer wurde anschließend mit 1 x TBE-Puffer befüllt, so dass die Taschen des Gels möglichst luftblasenfrei geflutet wurde. Im Anschluss wurden je 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer (Rezept siehe Anhang) zusammenpipettiert und in die jeweiligen Taschen überführt. Zur Überprüfung der Fragmentgröße wurden zusätzlich 3 µl Größenstandard (Hyperladder V, Bionline) aufgetrennt. Um nicht unnötig alle Pipetten mit Acrylamidresten zu verschmutzen, wurden nur die Pipetten verwendet, die für den Elektrophoreseschritt vorgesehen sind.

Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V und 80 mA für zwei Stunden (Electrophoresis Power Supply ST 304, Gibco). Im Anschluss wurden die Banden mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Hierfür wurden die Fragmente auf dem Gel zunächst in einer 1 %-igen Salpetersäure (HNO_3 , Roth) für sieben Minuten inkubiert. Nach der Fixierung erfolgte ein Waschschriff mit Aqua dest. zur Entfernung der restlichen Salpetersäure. Durch Zugabe von 3 %-iger, frisch angesetzter, Silbernitratlösung (AgNO_3 , Roth) wurde das Gel 20 Minuten gefärbt. Das überschüssige Silbernitrat wurde durch einen dreiminütigen Wachschriff mit Aqua dest. entfernt. Zum Sichtbarmachen der Banden wurde eine Entwicklerlösung (Rezept siehe Anhang) hinzugefügt. Diese wurde nach Einsetzen des gewünschten Färbegrades entfernt. Anschließend wurde das Gel gründlich mit Aqua dest. gewaschen und für fünf Minuten in 10 %-iger Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, Roth) inkubiert, um die Färbung zu stoppen. Abschließend folgte ein Fixierschriff in 10 %-igem Glycerin ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$, Roth) über Nacht. Das Gel wurde am nächsten Tag mit Hilfe des GelDocs™ EQ (Biorad) und der Software Quantity One Version 4.5.0. (Biorad) dokumentiert. Als Beispiel sind ist eine Verdünnungsreihe der

Material und Methoden

Multiplex I und II in Abbildung 18 dargestellt. Anhand der Bandenintensität wurde das einzusetzende Volumen für die Einzelbasenverlängerung abgeschätzt.

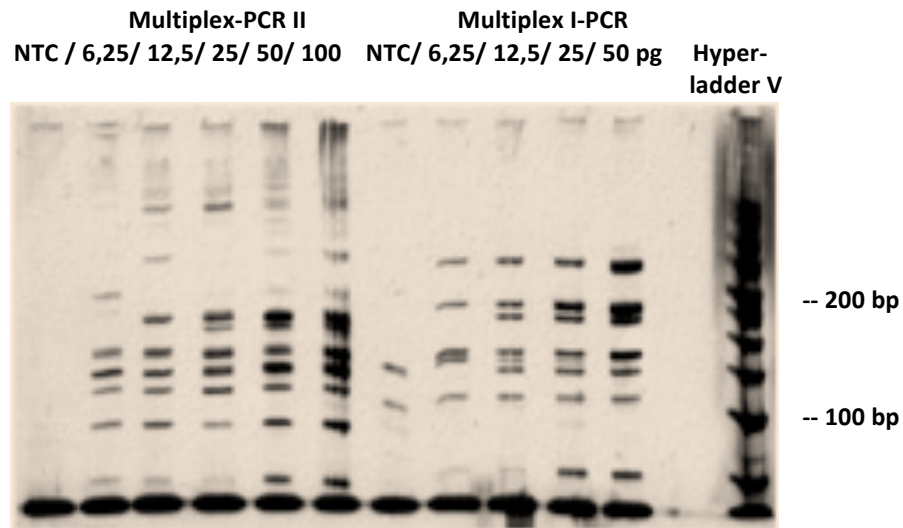


Abbildung 18: Bild eines 10 %-igen Polyacrylamidgels nach der Gelelektrophorese. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 90 Minuten. Aufgetragen wurden die PCR-Produkte einer Verdünnungsreihe (DNA G152A von Promega), die in der Multiplex-PCR I und II amplifiziert wurden. Zusätzlich ist der Hyperladder V (Bioline) als Größenvergleich mit aufgetragen worden. Anhand der Bandenintensitäten wurde die einzusetzende Menge an PCR-Produkt für die anschließende Einzelbasenverlängerung abgeschätzt. Bei sehr guten Bandenintensitäten wie bei 12,5-100 pg in der Multiplex II und 12,5-50 pg in der Multiplex I wurden 0,5 µl PCR-Produkt eingesetzt. Bei schwächeren Intensitäten wie bei 6,25-12,5 pg wurde die Menge auf 1,0 µl erhöht. NTC= engl. *negative template control*, bp= Basenpaare

3.4.4 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels ExoSAP-IT

Mit dem Reagenz ExoSAP-IT® (Fermentas), bestehend aus Exonuklease I und Shrimp alkalischer Phosphatase, werden nicht-gebundene Desoxyribonukleosidtriphosphate (= dNTPs) und Primer aus dem PCR-Ansatz entfernt. Diese Aufreinigung erfolgte mit den angefertigten PCR-Produkten als Vorbereitung zur Einzelbasenverlängerung (Kapitel 3.4.5).

Hierfür wurden 2 µl ExoSAP-IT® (Fermentas) und 5 µl PCR-Produkt in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (Biozym) überführt, im PCR-Gerät (DNA-Thermal-Cycler Typ Mastercycler® Gradient, Eppendorf) für 15 Minuten bei 37 °C aktiviert und bei 80 °C für 15 Minuten inaktiviert.

3.4.5 Einzelbasenverlängerung mittels SNaPshot Multiplex System

Für die Einzelbasenverlängerung (engl. *single base extension*= SBE) Reaktion wurde das SNaPshot® Multiplex System von Applied Biosystem verwendet. In diesem sind zusätzlich zum PCR-Puffer und der Taq-Polymerase, vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (= ddNTPs; Adenin (A) = dR6G, Cytosin (C) = dTAMRA, Guanin (G) = dR110, Thymin (T) = dROX), enthalten. Bei den farbmarkierten ddNTPs handelt es sich um Nukleotidanaloga, die zwar von der DNA-Polymerase akzeptiert und in den DNA-Strang eingebaut werden, aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-Ende jedoch zu einem Strangabbruch führen. Flankiert der SBE-Primer den zu untersuchenden Sequenzabschnitt, bindet basenspezifisch ein farbmarkiertes ddNTP an dieser Stelle. Der SBE-Primer wird somit um ein Nukleotid verlängert und kann aufgrund der Farbmarkierung kapillarelektrophoretisch analysiert werden (Abbildung 19).

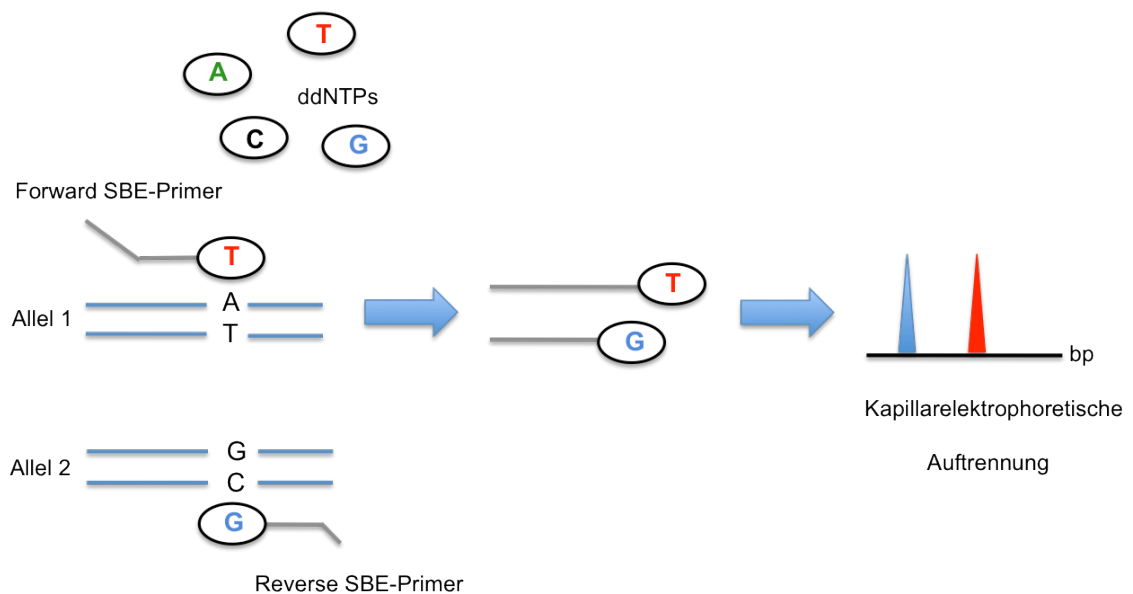


Abbildung 19: Schematische Darstellung der single base extension (SBE) Reaktion unter Verwendung des SNaPshot® Multiplex Systems von Applied Biosystem. In dem Kit sind farbmarkierte ddNTPs enthalten, die sich an das 5'-Ende des Primers anlagern und aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe (OH) am 3'-Ende die Strangverlängerung stoppen. Die farbmarkierten Primer, die unterschiedliche Längen aufweisen, können somit im Anschluss kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert werden.

Um mehrere SNPs gleichzeitig analysieren zu können, wurden SBE-Primer in unterschiedlicher Länge eingesetzt. Diese wurden durch das Anhängen von GACT- oder Poly-A-Schwänzen entsprechend verlängert. Für ein optimales Abdecken aller Farbbereiche wurden zudem einige SBE-Primer in der reverse Variante verwendet. In dem Fall wird jeweils die komplementäre Base (G=C, A=T) des SNPs detektiert, was das Verwenden gleichlanger SBE-Primer bei identischer SNP-Ausprägung ermöglicht.

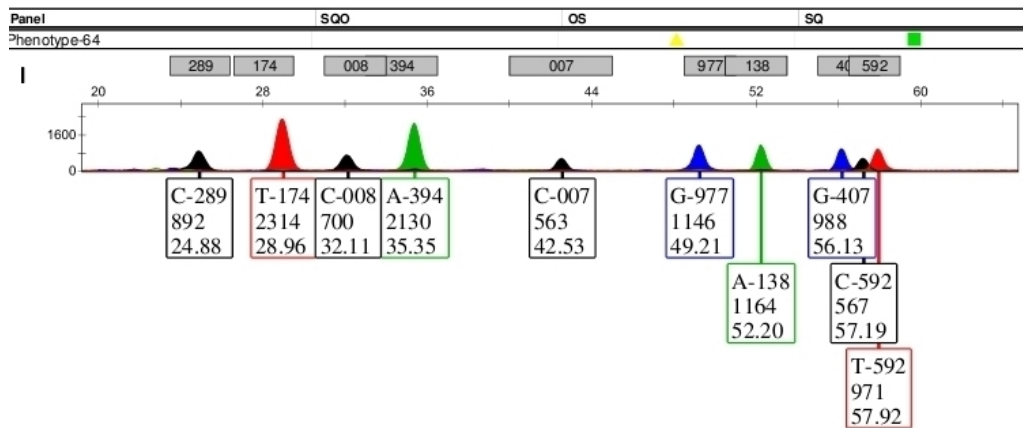
In dem SNaPshot® Multiplex System Kit von Applied Biosystems sind alle wichtigen Komponenten für eine SBE-Reaktion enthalten, so dass lediglich die SBE-Primer und das aufgereinigte PCR-Produkt ergänzt werden müssen. Detaillierte Angaben zu den SBE-Ansätzen der verschiedenen PCRs (siehe Kapitel 3.5.2), den Sequenzen der SBE-Primer sowie den verwendeten Temperaturprofilen sind den Tabellen 7 e, f, g (Multiplex I, II), 8 e, f, g (SNPs von (Walsh et al., 2011)) und 9 h, i, j (SNPs von (Branicki et al., 2011)) zu entnehmen. Grundsätzlich wurden bei guter Bandenintensität (siehe Kapitel 3.5.3.2) 0,5 µl des aufgereinigten PCR-Produktes in die SBE-Reaktion in einem Gesamtvolumen von 7 µl eingesetzt. Bei schwachen Bandenintensitäten wurde die doppelte Menge eingesetzt und der H₂O-Anteil entsprechend im Ansatz reduziert.

3.4.6 Detektion mittels Kapillarelektrophorese am ABI Prism 3130

Die automatisierte Kapillarelektrophorese wurde mit Hilfe des ABI Prism® 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystem) durchgeführt. Hierbei werden die farbmarkierten SBE-Primer der Größe nach aufgetrennt, indem sie durch ein viskoses Polymer (Pop-4®, Applied Biosystems) laufen. Die Trennstärke dieses Polymers, aus linearen Polymerketten, ist so effizient, dass geringste Größenunterschiede aufgetrennt werden können. Die unterschiedlichen Fragmente passieren nacheinander einen Laser, der die Farbmarkierungen zur Fluoreszenz anregt. Das emittierte Licht wird anschließend von einem Spiegel prismenartig aufgespalten und von einer CCD-Kamera registriert wird. Diese gibt die Daten an das Auswerteprogramm (GeneMapper v3.2, Applied Biosystem) weiter, welches die Emissionswerte in Form eines Elektropherogramms darstellt.

Für die Analyse wurden 0,5 µl SBE-Produkt, 11,7 µl Formamid Hi-Di® (Applied Biosystem) und 0,3 µl LIZ® 120 Größenstandard (Applied Biosystem) eingesetzt. Es wurden folgende Parameter für die kapillarelektrophoretische Auftrennung verwendet: 5 Sekunden Injektionszeit bei einer Voltzahl von 15 kV. Die Elektropherogramme aller analysierten SNPs sind in den Abbildungen 20 (Multiplex I, II), 21 (SNP aus (Walsh et al., 2011)) und 22 (SNPs aus (Branicki et al., 2011)) dargestellt.

Multiplex-PCR I



Multiplex-PCR II

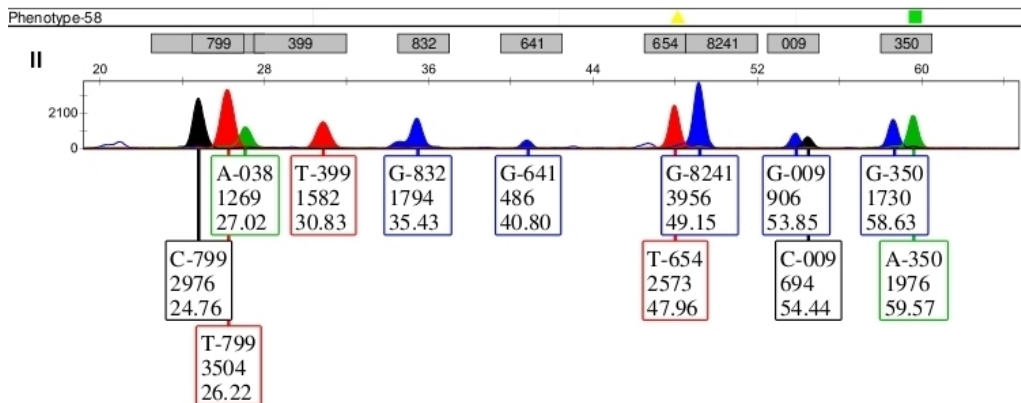


Abbildung 20: Typisierungsergebnis der SNPs aus den Multiplex-PCRs I und II. Die analysierten SNPs wurden durch die letzten Ziffern der SNP-ID Nummer abgekürzt. Zusätzlich sind in den Kästchen die Höhe der Peaks und die Größen der Fragmente angegeben. Das Nukleotid **Guanin (G)** stellt sich im Elektropherogramm als blauer, Cytosin (C) als schwarzer, **Thymin (T)** als roter und **Adenin (A)** als grüner Peak dar. Ein Peak symbolisiert eine homozygote, zwei Peaks eine heterozygote Ausprägung des SNPs. Das obere Elektropherogramm zeigt das Analyseergebnis der Multiplex-PCR I bei 50 pg DNA-Einsatz (Zelllinie 9948, 10 ng/μl, Promega). Beim unteren Elektropherogramm wurden 25 pg der gleichen Zelllinie in die Multiplex-PCR II eingesetzt.

Singleplex-PCR

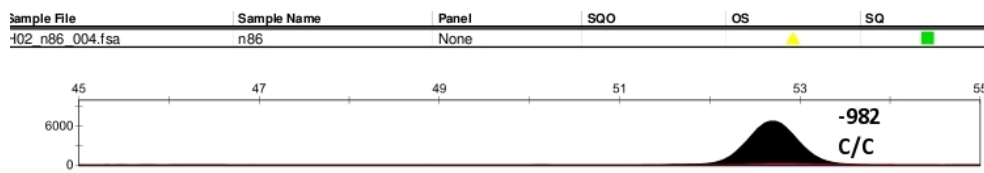
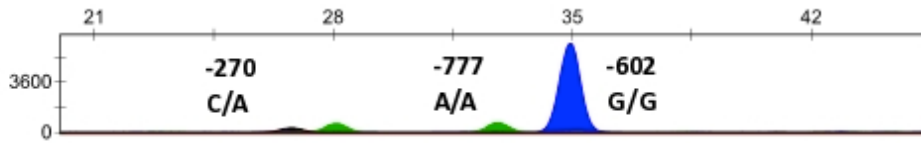


Abbildung 21: Typisierungsergebnis des SNPs rs16891982 (SLC45A2) aus (Walsh et al., 2011) analysiert als Singleplex-PCR. Dargestellt ist das Analyseergebnis des Probanden N86. Der analysierte SNP wurde durch die letzten Ziffern der SNP-ID Nummer abgekürzt. Das Nukleotid **Guanin (G)** stellt sich im Elektropherogramm als blauer, Cytosin (C) als schwarzer, **Thymin (T)** als roter und **Adenin (A)** als grüner Peak dar. Ein Peak symbolisiert eine homozygote, zwei Peaks eine heterozygote Ausprägung des SNPs. Da bei der Probe N86 nur ein schwarzer Peak detektiert wurde, liegt bei dieser Person eine homozygote (C/C) Ausprägung im SNP rs16891982 vor.

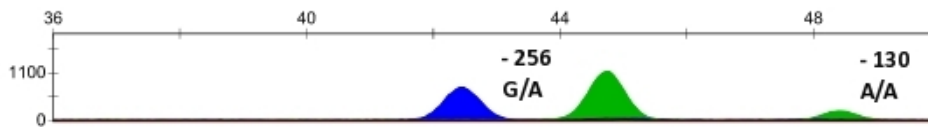
Multiplex-PCR

Sample File	Sample Name	Panel
G08_pcr1-602-270-777-0.25ng_003.fsa	pcr1-602-270-777-0.25ng	None



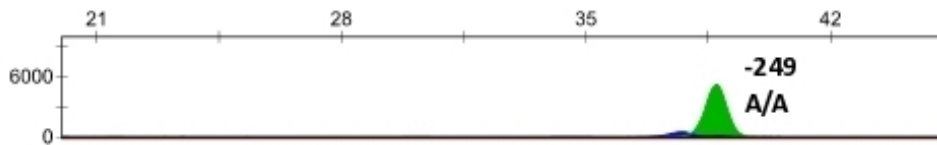
Duplex-PCR

Sample File	Sample Name	Panel	SQO
G12_pcr2-130-256-0.25ng_003.fsa	pcr2-130-256-0.25ng	None	X



Singleplex-PCR I

Sample File	Sample Name	Panel	SQO
C09_asip0.25ng_003.2.fsa	asip0.25ng	None	



D09_asip-ntc_004.2.fsa	asip-ntc	None	
------------------------	----------	------	--



Singleplex-PCR II

Sample File	Sample Name	Panel	SQO	OS	SQ
A12_683-1ng_001.fsa	683-1ng	None			

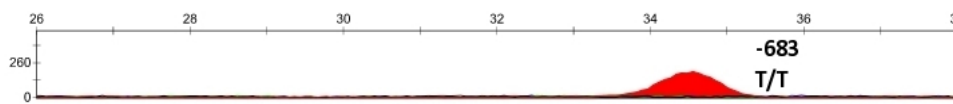


Abbildung 22: Typisierungsergebnisse der SNPs aus (Branicki et al., 2011). Es wurden insgesamt sieben SNPs, aufgeteilt in einer Multiplex-, einer Duplex- und zwei Singleplex-PCRs, analysiert. Die analysierten SNPs wurden durch die letzten Ziffern der SNP-ID Nummer abgekürzt. Das Nukleotid Guanin (G) stellt sich im Elektropherogramm als blauer, Cytosin (C) als schwarzer, Thymin (T) als roter und Adenin (A) als grüner Peak dar. Ein Peak symbolisiert eine homozygote, zwei Peaks eine heterozygote Ausprägung des SNPs. Die ersten drei Elektropherogramme zeigen die Analyseergebnisse der Multiplex-, Duplex- und Singleplex-PCR I beim DNA-Einsatz von 25 pg (Zelllinie 9948, 10 ng/μl, Promega). Beim SNP -249 wurde zusätzlich die Negativkontrolle abgebildet, da sich im blauen Farbbereich regelmäßig ein Artefakt ausbildet. Das letzte Elektropherogramm stellt das Analyseergebnis der Singleplex-PCR II beim DNA-Einsatz von 1 ng der (Zelllinie 9948, 10 ng/μl, Promega) dar.

3.5 statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Amke Caliebe des Instituts für klinische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (= IMIS) durchgeführt. Die statistische Auswertung dieses Projektes bestand aus drei Teilbereichen:

1. Auswertung der Pigmentierungs-SNPs, die anhand der Literatur für dieses Projekt ausgewählt wurden (400 rezente Proben, 12 der 18 analysierten SNPs)
2. Vergleich der Ergebnisse aus 1. mit der Methode von (Walsh et al., 2011) für die Rekonstruktion der Augenfarbe (100 rezente Proben, 6 SNPs)
3. Vergleich der Ergebnisse aus 1. mit der Methode von (Branicki et al., 2011) für die Rekonstruktion der Haarfarbe (108 rezente Proben, 13 SNPs + *MC1R_R*, *MC1R_r*)

Bei der statistischen Auswertung **des ersten Teilbereiches** wurden nur 12 der 18 ausgewählten SNPs statistisch ausgewertet, da drei dieser SNPs nur zur Kontrolle der PCRs dienten und die beiden anderen im Vergleich zu den restlichen SNPs zu geringe Effekte aufwiesen, um genauer ausgewertet zu werden. Die SNPs wurden mit Hilfe einer Regressionsanalyse statistisch ausgewertet. Jeder SNP wurde sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen SNPs getestet und der genotypische und additive Effekt sowie das dominant-rezessive Modell wurden ausgewertet. Ergebnisabhängig wurde eine logistische, lineare, ordinale oder multinominal-logistische Regression durchgeführt. Für die Assoziation der vier verschiedenen Phänotypen wurde eine logistische Regression angewendet, bei denen ein Phänotyp eine abhängige und die anderen Phänotypen unabhängige Variable darstellen. Bei diesen Analysen wurden die SNPs teilweise auch kombiniert. Des Weiteren wurde eine multidimensionale Skalierung sowie eine konfirmatorische Faktorenanalyse angewandt. Die Evaluierung der Aussagekraft der entwickelten Modelle wurde durch Einsatz der Vorhersagewahrscheinlichkeiten der logistischen Regression durchgeführt. Dies wurde nur bei dichotomischen Ergebnissen wie z.B. blau gegen nicht blau angewendet. Wenn π über 0,5 lag, wurde das entsprechende Merkmal als das vorhandene angenommen.

Für die **Teilbereiche zwei und drei** wurden diverse diagnostische Kriterien wie die Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit und der *area under the curve*-Wert (= *AUC*) berechnet, um verschiedene Modelle im Hinblick auf ihre Vorhersagegenauigkeit zu vergleichen.

Material und Methoden

Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm R (version 2.10.1). Zum Überprüfen des Hardy-Weinberg-Gesetzes wurde der Hardy-Weinberg-Exakt Test des R-Programms verwendet. Das Programm MASS wurde für die ordinale und multinominale Regression und das Programm cfa für die konfirmatorische Faktorenanalyse benutzt. Für die Beurteilung diagnostischer und prädiktiver Eigenschaften wurde das Programm DiagnosisMed angewendet. Alle Analysen wurden in zwei Stufen (Stufe 1= 300 Personen, Stufe 2= 100 Personen) und zudem zweiseitig durchgeführt. Ein p-Wert unter 0,5 wurde als signifikant angesehen. Die Adjustierung für das multiple Testen wurde mit der Bonferroni Methode durchgeführt.

4. Material & Methoden (alte DNA)

4.1 Material

In dieser Arbeit wurde sowohl neolithisches als auch mittelalterliches Probenmaterial untersucht. In den folgenden Abschnitten wird im Detail auf die verschiedenen Fundorte und Probenmengen eingegangen.

4.1.1 Neolithische Proben

Im Rahmen des DFG-geförderten Sonderschwerpunkt Programmes "*Kinship, descent and phenotype of Middle Neolithic populations and its relation to social differentiation 3 400-3 000 cal BC*" wurden 185 neolithische Skelette der Fundorte Calden, Odagsen, Großenrode, Kromsdorf, Panker und Wittmar beprobt. Eine detaillierte Übersicht ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der neolithischen Proben. Es sind der Fundort, die Probenmenge, die zeitliche Einordnung sowie die kulturelle Zuordnung angegeben.

Fundort	Anzahl der beprobten Skelette (n= 185)	Zeit	Kultur
Calden	57	3 400 - 3 000 BC	Wartberg
Odagsen	63		Wartberg/Trichterbecher
Großenrode	25		Wartberg
Panker	6	2 800 BC	Trichterbecher
Wittmar	34	4 500 BC	Stichbandkeramik

4.1.2 Mittelalterliche Proben

Für die Analyse einer moderneren Population wurde ergänzend mittelalterliches Skelettmaterial aus dem Fundort Diepensee untersucht (Tabelle 11).

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der mittelalterlichen Proben. Es sind der Fundort, die Probenmenge, sowie die zeitliche Einordnung angegeben.

Fundort	Anzahl der beprobten Skelette	Zeit
Diepensee	142	13./14. Jahrhundert

4.2 Kontaminationsprävention

Da bei prähistorischem und forensischem Material in der Regel nur noch geringste Menge an DNA vorhanden sind, muss in besonderem Maße auf eine Kontaminationenprävention geachtet werden. Die häufigsten Probleme treten durch **carry over-Kontaminationen** (Longo et al., 1990), **Kreuzkontaminationen** zwischen Proben (Kitchin et al., 1990) sowie durch **kontaminierte Reagenzien und Verbrauchsmaterialien** auf (Tamariz et al., 2006; Schmidt et al., 1995). Des Weiteren können **Kontaminationen durch Bearbeiter** zu Problemen im Labor führen (Kitchin et al., 1990). In den folgenden Abschnitten wird geschildert welche Laborstandards und Präventionsmaßnahmen im Rahmen dieser Arbeit im Labor sowie bei der Beprobung erfolgten.

4.2.1 bei der Beprobung

Um **Kontaminationen von Seiten der Archäologen und Anthropologen** zu vermeiden, trugen diese bei Kontakt mit dem Probenmaterial stets Einmalhandschuhe (Hartmann), einen Mundschutz (Johnson & Johnson) sowie eine Schutzbrille (Uvex) und Haarhaube (Barrier).

4.2.2 im Labor

Zur Vermeidung von **carry over-Kontaminationen** wurde eine strikte Trennung der Prä- und Post-PCR-Bereiche eingehalten. Dies erfolgte sowohl durch die räumliche Trennung als auch durch die Anwendung der "Einbahnstraßenregelung". Diese besagt, dass kein Wechsel vom Post-PCR-Bereich in den Prä-PCR-Bereich stattfinden darf.

Kreuzkontaminationen wurde entgegengewirkt indem alle Laboroberflächen nach dem Benutzen mit einer 0,2 %-igen Danklorix-Lösung (Colgate-Palmolive) gereinigt und alle mehrmals verwendeten Materialien wie Probenständer in der gleichen Lösung über Nacht inkubiert wurden.

Um **Kreuzkontaminationen zwischen den Proben** zu verhindern, wurden die Pipettenspitzen sowie andere Einwegmaterialien nach jedem Probenkontakt gewechselt. Zudem wurden Pipettenspitzen mit Filter (Sarstedt) benutzt, um Kontaminationen des Pipettenschaftes durch Aerosole zu vermeiden.

Oberflächenkontaminationen wurden bei Zahnmaterial durch einen 15 minütigen Inkubationsschritt in unverdünntem Danklorix (Colgate-Palmolive) entfernt. Bei Knochenmaterial hingegen wurde die Oberfläche großflächig mit einem Diamantsägeblatt (Horico) abgetragen.

Zur Vermeidung von **Kontaminationen durch die Labormitarbeiter**, trugen diese bei Kontakt mit dem Probenmaterial stets Einmalhandschuhe (Hartmann), eine Haarhaube (Barrier), einen

Mundschutz (Johnson & Johnson) und Schutzanzug (Tyvek) sowie eine Schutzbrille (Uvek).

Um eventuelle **Kontaminationen durch Reagenzien oder Materialien** auszuschließen, wurden vor jeder PCR alle Einwegmaterialien, Pipettenspitzen sowie PCR-Komponenten wie Puffer, MgCl_2 und H_2O aus kurzer Distanz für 30 Minuten mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) bestrahlt. Polymerasen, Primer und dNTPS wurden nicht bestrahlt, da diese unter Einfluss von UV-Licht entweder degradieren oder inhibierende Wirkungen entwickeln (Ou et al., 1991).

4.3 Authentizitätskriterien

Bei der Analyse von aDNA muss die Authentizität der Ergebnisse sichergestellt werden. Daher wurde von allen Probenbearbeitern sowohl ein autosomales und gonosomales STR-Muster als auch eine Darstellung der mitochondrialen Polymorphismen der hypervariablen Region I (= HVRI) angefertigt. Zur Authentizitätssicherung wurden diese **genetischen Profile der Bearbeiter** regelmäßig mit denen der untersuchten Proben abgeglichen.

Kontaminationen aus Zeiten, die lange vor dem Beprobieren entstanden sind, können hiermit allerdings nicht aufgedeckt werden. In der Literatur wird häufig die Analyse in einem zweiten unabhängigen Labor empfohlen (Cooper et al., 2001). Doch auch die eben beschriebenen Kontaminationen können in einem anderen Labor nicht behoben werden, da diese meist nicht mehr zu entfernen sind (von Wurmb-Schwark N, 2008). Der sicherste Nachweis ist die mehrfache Analyse verschiedener DNA-Extrakte aus unterschiedlichen Skelettbereichen (Montiel et al., 2001). Daher wurden bei allen aDNA Proben **zwei unabhängige Extrakte** angefertigt. Entweder wurden zwei unterschiedliche Zähne eines Individuums oder jeweils ein Knochenstück und ein Zahn zeitlich unabhängig voneinander aufgearbeitet.

4.4 Extraktion aus Knochen und Zähnen

Bei der DNA-Extraktion aus Zähnen erfolgte zunächst ein Dekontaminationsschritt, bei dem die Zähne für 15 Minuten in purem Danklorix (Colgate-Palmolive) inkubiert wurden. Im Anschluss wurden diese mit HPLC gespült und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (Memmert) getrocknet. Bei Verwendung von Knochenmaterial wurde ein $1 \times 1 \text{ cm}$ großes Stück herausgeschnitten und durch großflächiges Abtragen der Oberfläche weitestgehend dekontaminiert. Die Knochenstücke oder Zähne wurden im Anschluss in einer Kugelschwingmühle (MM200, Retsch) pulverisiert. Zur Dekalkifizierung des Knochenmehls wurden standardisiert je $0,1 \text{ g}$ mit $500 \mu\text{l}$ EDTA ($\text{pH } 8$; $0,5 \text{ M}$) versetzt und für 18 Stunden im Probenrotator (Memmert) bei

37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde durch Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml, Bioline) die Zelllyse eingeleitet. Da die Proteinase K ein Temperaturoptimum von 56 °C aufweist, wurde das Gemisch für weitere 2 Stunden im Thermoschüttler (Eppendorf, Typ 5437) konstant bei 56 °C durchmischt. Um danach das nicht gelöste Knochenmehl vom restlichen Gemisch zu trennen folgte ein Zentrifugationsschritt für 3 Minuten bei 6 000 U/min (Eppendorf, Typ 5415C). 200 µl des Überstandes wurden in die entsprechenden Reaktionsgefäße des EZ1 Biorobots (Qiagen) überführt und unter Anwendung des trace protocols extrahiert. Eluiert wurde in 50 µl TE-Puffer. Das Extrakt wurde anschließend bei -20 °C (Gefrierschrank, Liebherr) tiefgefroren. Von jedem Individuum wurden zwei unabhängige Extrakte (zwei unterschiedliche Zähne oder alternativ ein Zahn und ein Knochenstück) angefertigt.

4.5 STR-Analysen

Das Kapitel STR-Analysen gliedern sich in die Abschnitte Screening-PCRs und genetischer Fingerabdruck. In beiden Abschnitten wird zwischen der Analyse der neolithischen und der mittelalterlichen Proben differenziert, da unterschiedliche Analysemethoden verwendet wurden. Bei den Screening-PCRs wurde zunächst für die Analyse der neolithischen Proben eine selbstentwickelte PCR verwendet. Im Laufe der Arbeit wurde das kommerzielle Powerplex® S5 Kit (Promega) durch Zugabe von mitochondrialen Primern modifiziert, welches in der veränderten Form sehr gute Ergebnisse lieferte. Aufgrund der guten Resultate, die sich bei der Validierung zeigten, erfolgte eine Umstellung auf das modifizierte Powerplex® S5 Kit.

Die Analyse des genetischen Fingerabdrucks wurde mit Hilfe wesentlich umfangreicherer STR-Kits durchgeführt, die im Laufe dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit an aDNA getestet wurden. Da das AmpFISTR® NGM™ Kit von Applied Biosystems überzeugende Ergebnisse bei der Austestung zeigte, erfolgte auch in diesem Fall ein Kitwechsel vom PowerPlex® 16HS Kit (Promega) zum AmpFISTR® NGM™ Kit (Applied Biosystems) (Paper ist bereits im Croatian Journal eingereicht).

4.5.1 Screening-PCRs

Um die angefertigten DNA-Extrakte auf die Anwesenheit von chromosomaler und mitochondrialer DNA zu untersuchen, wurden Screening-PCRs durchgeführt. Für die neolithischen Proben wurde eine Hexaplex-PCR angewendet, die im Jahre 2009 am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelt wurde (Apelt, 2009). Die mittelalterlichen Proben wurden mit Hilfe des modifizierten Powerplex® S5 Kits von Promega analysiert. Das jeweilige Ergebnis der Screening-PCR hat über die Weiterbearbeitung der Probe entschieden. Nach welchen Kriterien dies erfolgte, kann der Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Tabellarische Übersicht über die Vorgehensweise der anschließenden Probenbearbeitung basierend auf den Ergebnissen der Screening-PCRs. Es wurde hierbei zwischen den Ergebnissen der chromosomalen und mitochondrialen DNA differenziert.

chromosomale DNA	mitochondriale DNA	weitere Bearbeitung
+	+	PowerPlex® 16HS Kit (Promega) oder AmpFiSTR® NGM™ Kit (Applied Biosystems) und HVRI, HVRII
-	+	HVRI, HVRII
-	-	keine Weiterbearbeitung
+	-	keine Weiterbearbeitung
Probe a und b zeigen stark abweichende Ergebnisse	-/+	keine Weiterbearbeitung

4.5.1.1 Hexaplex-PCR

Die Hexaplex ist eine Screening-PCR, die drei autosomale STR-Systeme (TH01, D3S1358 und D8S1179), ein Y-chromosomales STR-System (DYS391), den Geschlechtsmarker Amelogenin sowie ein mtDNA Fragment (179 bp) darstellt. Von jeder aDNA-Probe wurden 5 µl Extrakt eingesetzt. Detaillierte Angaben zu den Primersequenzen, dem Reaktionsansatz und Temperaturprofil sind den Tabellen 13a, b und c im Anhang zu entnehmen. In Abbildung 23 sind zur Veranschaulichung die Screening-Ergebnisse der neolithischen Proben a90a und a90b in Form eines Elektropherogramms dargestellt.

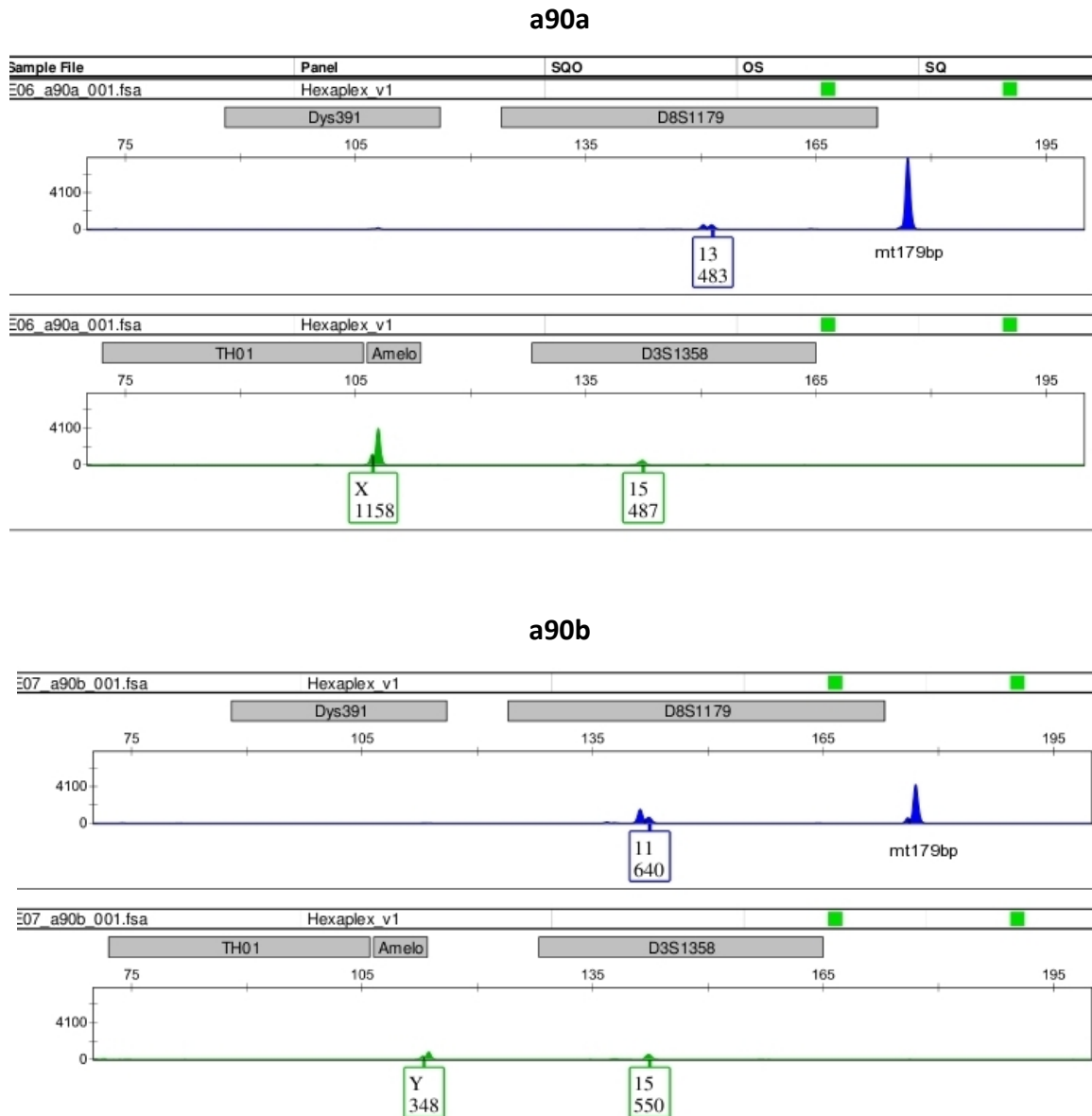


Abbildung 23: Typisierung von zwei neolithischen Proben mit der Hexaplex-PCR. Dargestellt sind die Screening-Ergebnisse in Form von Elektropherogrammen der neolithischen Proben a90a und a90b detektiert am ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) und ausgewertet mit dem GeneMapper v3.2 Programm (Applied Biosystem). Die Amplifikation erfolgte mit der Hexaplex-PCR, die insgesamt vier STR-Systeme (DYS392, D8S1179, TH01 und D3S1358), den Geschlechtsmarker Amelogenin sowie ein Fragment der mitochondrialen DNA (mt179 bp) analysiert. In den Kästchen ist das jeweilige Allel sowie die Peakhöhe angegeben.

4.5.1.2 Modifiziertes Powerplex S5 Kit

Das Powerplex® S5 Kit (Promega) analysiert neben dem Geschlechtsmarker Amelogenin vier STR-Systeme (D18S51, D8S1179, TH01 und FGA). Um zusätzlich die Qualität und Quantität der mtDNA in der Probe zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Primerpaare für die Amplifikation eines 280 bp sowie eines 439 bp Fragmentes der mtDNA dem kommerziellen Reaktionsansatz hinzugefügt. Von jeder aDNA-Probe wurden 5 µl Extrakt eingesetzt. Detaillierte Angaben zum

Reaktionsansatz und Temperaturprofil sind den Tabellen 14a, b und c im Anhang zu entnehmen. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 24 das Screening-Ergebnis der mittelalterlichen Probe 390a und 390b in Form eines Elektropherogramms dargestellt.

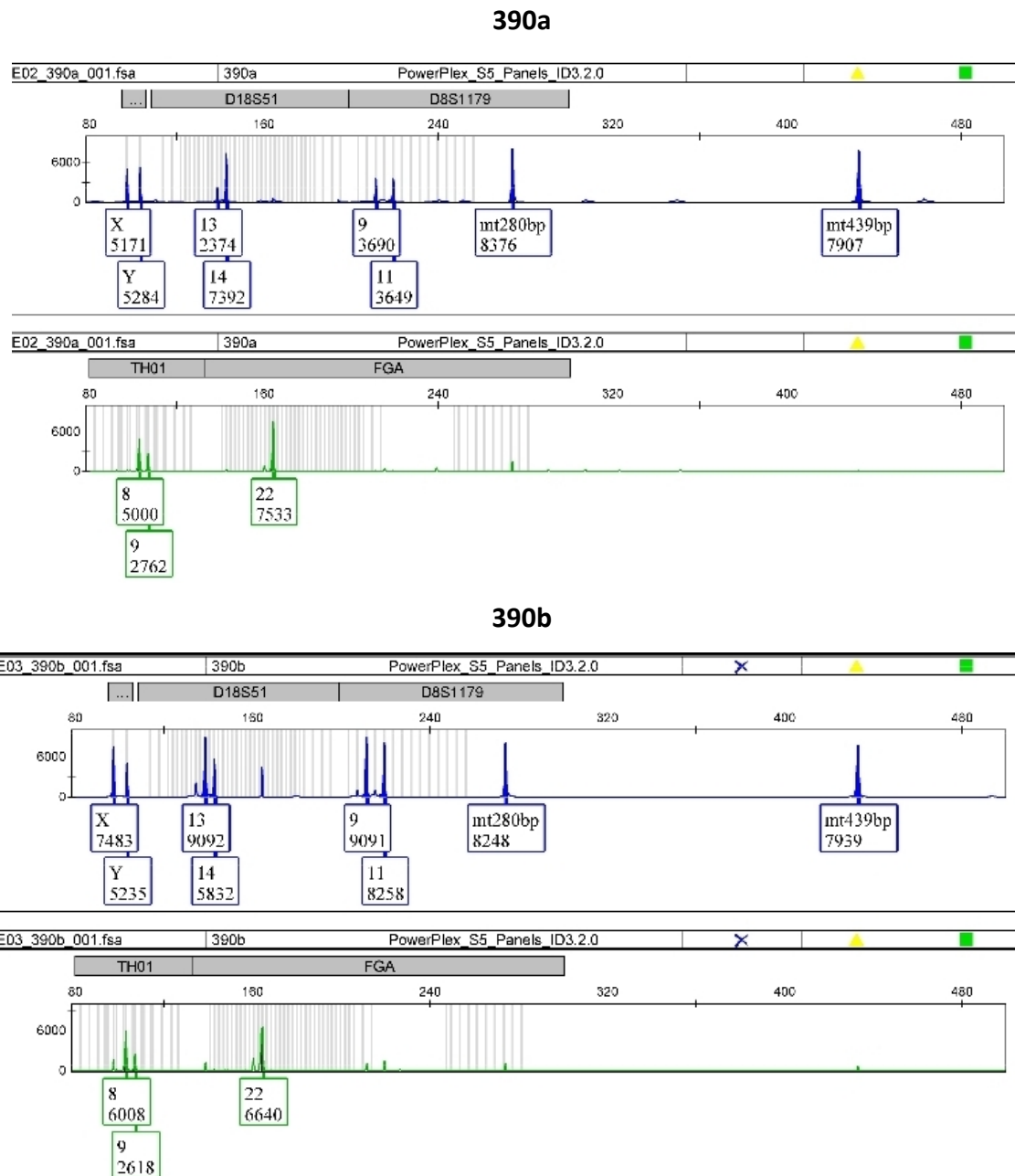


Abbildung 24: Typisierung von zwei mittelalterlichen Probe mit dem modifizierten Powerplex® S5 Kit (Promega). Dargestellt sind die Screening-Ergebnisse in Form von Elektropherogrammen der mittelalterlichen Proben 390 a und 390b detektiert am ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) und ausgewertet mit dem GeneMapper v3.2 Programm (Applied Biosystem). Die Amplifikation erfolgte mit dem modifiziertem PowerPlex® S5 Kit (Promega), das vier STR-Systeme (D18S51, D8S1179, TH01 und FGA), den Geschlechtmarker Amelogenin sowie zwei Fragmente der mitochondrialen DNA (mt280 bp, mt439 bp) analysiert. In den Kästchen ist das jeweilige Allel sowie die Peakhöhe angeben.

4.5.2 Genetischer Fingerabdruck

Für die Analyse zusätzlicher STR-Systeme wurden zwei kommerziell erhältliche Kits verwendet. Die neolithischen Proben wurde mit Hilfe des PowerPlex® 16HS Kits von Promega analysiert und die mittelalterlichen Proben mittels AmpFiSTR® NGM™ Kit von Applied Biosystem. Warum zwei unterschiedliche Kits verwendet wurden, wird im Abschnitt 4.5 genauer erklärt.

4.5.2.1 PowerPlex 16HS Kit

Für die Analyse der neolithischen Proben wurde das PowerPlex® 16HS Kit von Promega verwendet. Dieses analysiert insgesamt 15 STR-Systeme (Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, vWA, D8S1179) sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin. Für die Analyse der aDNA Proben wurden, bei einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl, jeweils 5 µl DNA-Extrakt eingesetzt. Die vom Hersteller angegebene Zyklenzahl von 32 wurde auf 35 erhöht. Detaillierte Angaben zum Reaktionsansatz und dem Temperaturprofil sind den Tabellen 15a und b im Anhang zu entnehmen. Die Detektion der farbmarkierten PCR-Produkte erfolgte mittels Kapillarelektrophorese (siehe Kapitel 4.7.6). Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 25 das Analyse-Ergebnis der neolithischen Probe a90a in Form eines Elektropherogramms dargestellt.

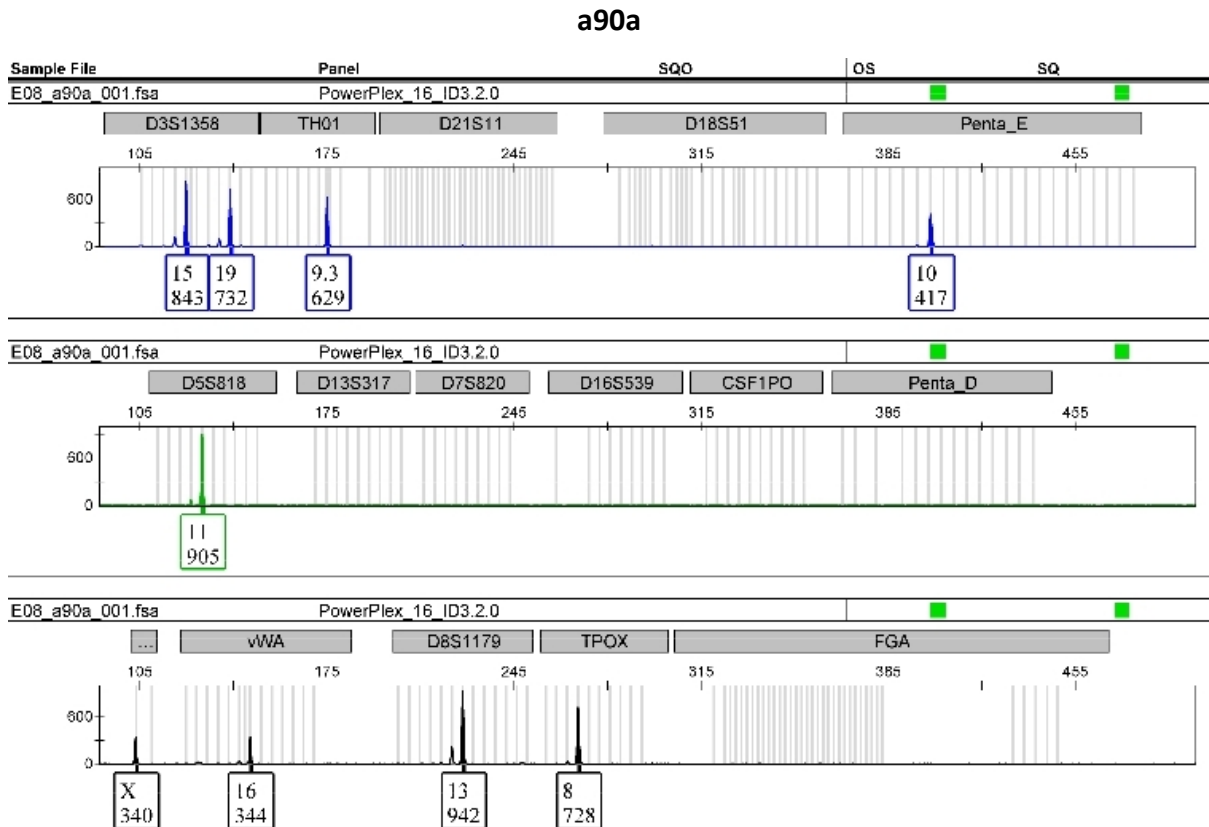


Abbildung 25: Typisierung einer neolithischen Probe mit dem PowerPlex® 16HS Kit (Promega). Dargestellt ist das Analyseergebnis in Form eines Elektropherogramms der neolithischen Probe a90a detektiert am ABI Prism™3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) und ausgewertet mit dem GeneMapper v3.2 Programm (Applied Biosystem). Die Amplifikation erfolgte mit dem PowerPlex® 16HS Kit (Promega), das 15 STR-Systeme (Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, vWA, D8S1179) sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin analysiert. In den Kästchen ist das jeweilige Allel sowie die Peakhöhe angeben.

4.5.2.2 AmpFiSTR NGM™ Kit

Für die Analyse der mittelalterlichen Proben wurde das AmpFiSTR® NGM™ Kit von Applied Biosystems verwendet. Dieses analysiert ebenfalls insgesamt 15 STR-Systeme (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391) sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin. Für die Analyse der aDNA Proben wurden, bei einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl, jeweils 5 µl DNA-Extrakt eingesetzt. Die vom Hersteller angegebene Zyklenzahl von 29 wurde auf 35 erhöht. Detaillierte Angaben zum Reaktionsansatz und dem Temperaturprofil sind den Tabellen 16a und b im Anhang zu entnehmen. Die Detektion der farbmarkierten PCR-Produkte erfolgte mittels Kapillarelektrophorese (siehe Kapitel 4.7.6). Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 25 das Analyse-Ergebnis der mittelalterlichen Probe 390b in Form eines Elektropherogramms dargestellt.

390b

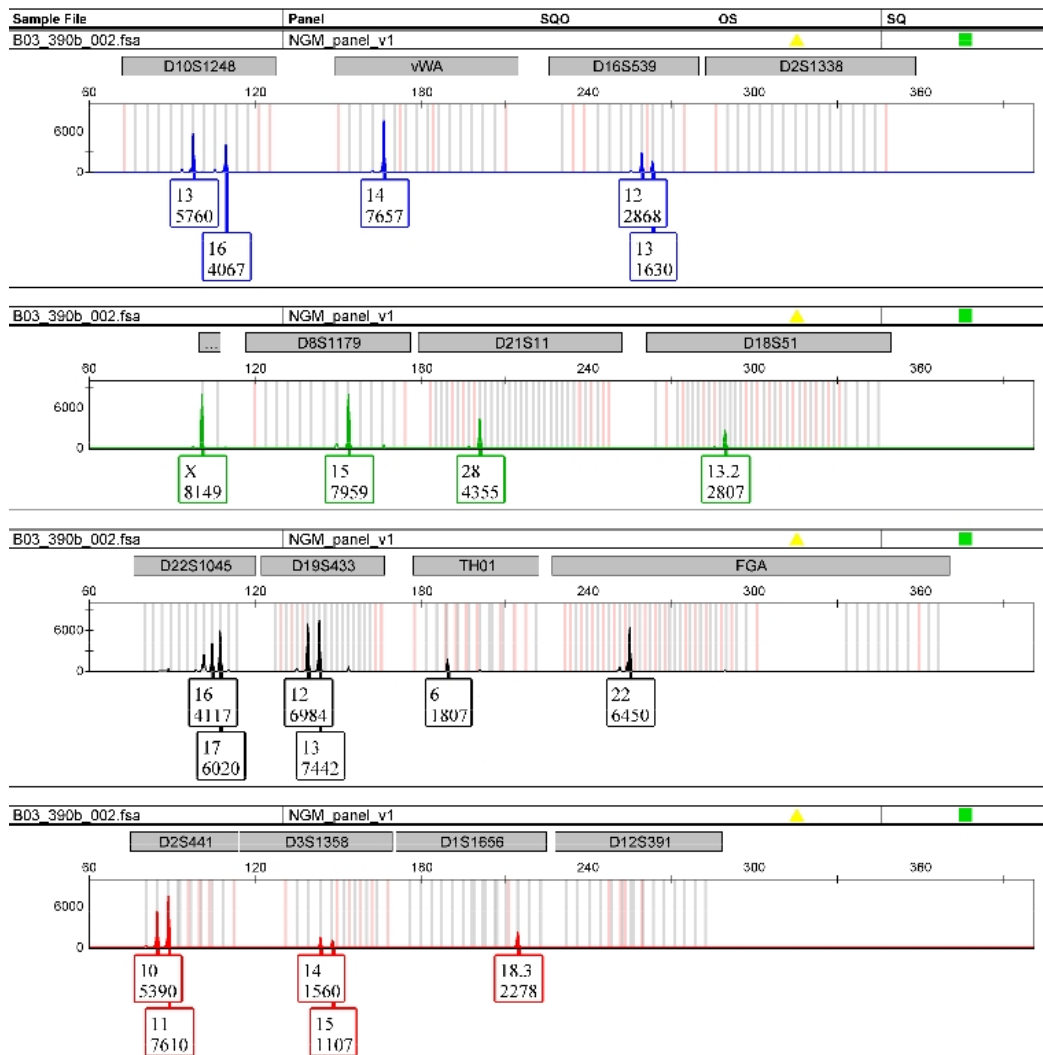


Abbildung 25: Typisierung einer mittelalterlichen Probe mit dem AmpFISTR® NGM™ Kit (Applied Biosystem). Dargestellt ist das Analyseergebnis in Form eines Elektropherogramms der mittelalterlichen Probe 390b detektiert am ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) und ausgewertet mit dem GeneMapper v3.2 Programm (Applied Biosystem). Die Amplifikation erfolgte mit dem AmpFISTR® NGM™ Kit (Applied Biosystem), das 15 STR-Systeme (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391) sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin analysiert. In den Kästchen ist das jeweilige Allel sowie die Peakhöhe angegeben.

4.6 Sequenzierung des mtDNA D-Loops

Der D-Loop stellt einen nicht kodierenden Bereich der mitochondrialen DNA dar und besteht aus den hypervariablen Regionen I, II und III (= HVRI, HVRII, HVRIII). Zur Bestimmung der Haplogruppen, die anhand der Haplotypen ermittelt werden, wurden in dieser Arbeit die hypervariablen Regionen I und II sequenziert. Die Sequenzierung gliedert sich in folgende Schritte:

Herstellung des zu sequenzierenden

Fragmentes mittels PCR

(Kapitel 4.6.1)



Überprüfung des Amplifikationserfolges

mittels Agarose-Gelelektrophorese

(Kapitel 4.6.2)



Aufreinigung der Amplifikate

mittels MinElute[®] PCR Purification

Kit (Qiagen)

(Kapitel 4.6.3)



Sequenzierreaktion

mittels BigDye[®] Terminator v3.1

Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem)

(Kapitel 4.6.4)



Aufreinigung der Sequenzierprodukte

mittels DyeEx 2.0 Spin Kit; (Qiagen)

(Kapitel 4.6.5)



Kapillarelektrophorese am ABI Prism[™] 3130

Genetic Analyzer (Applied Biosystem)

(Kapitel 4.6.6)



Sequenzierung der mittelalterlichen

Proben am IKMB des Universitäts-

Klinikums Schleswig-Holstein

4.6.1 PCR

Um eine bestimmte Region der DNA sequenzieren zu können, müssen die zu untersuchenden Abschnitte im Vorwege mittels PCR amplifiziert werden. Für die Vervielfältigung der Fragmente aus HVRI und HVRII standen mehrere Primerpaare zur Verfügung (Abbildung 26). Hierbei wurde auf überlappende Amplifikate geachtet, so dass auch die mittleren Primerregionen sequenziert werden können. Grundsätzlich wurden als erstes die Primerpaare der größeren PCR-Fragmente (434 bp HVRI, 253 bp HVRII) getestet. Konnte hierbei kein Amplifikationserfolg erzielt werden, wurden entsprechend kleinere Fragmente ausgewählt (150-179 bp).

Die detaillierten PCR-Ansätze, die Primersequenzen und Temperaturprofile sind den Tabellen 17a, b und c im Anhang zu entnehmen. Zur Überprüfung des Amplifikationserfolges wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Kapitel 4.7.2).

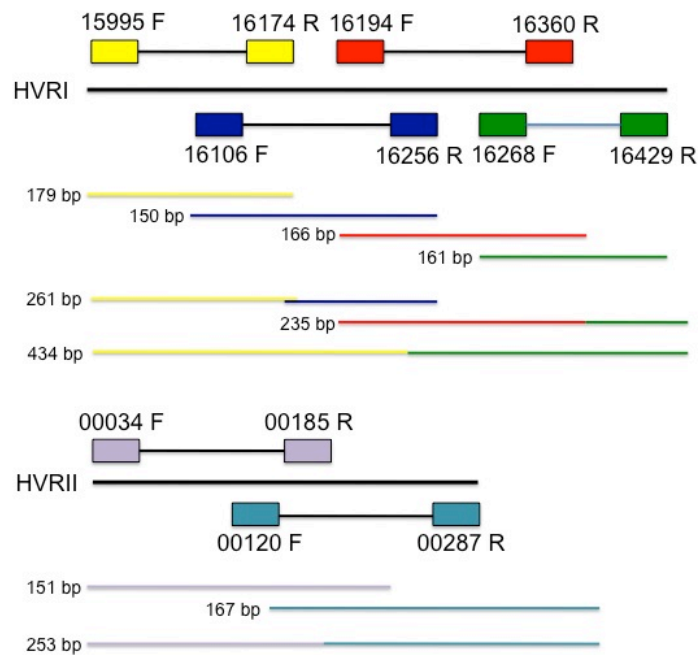


Abbildung 26: Verwendete Primerpaare zur Amplifikation der D-Loop Regionen HVI und HVII. Es sind alle verwendeten forward (F)- und reverse (R)-Primer und deren Kombinationsmöglichkeiten mit den jeweiligen Fragmentgrößen in Basenpaaren (= bp) dargestellt. Die Primer sind aus folgenden Publikationen: (Fehren-Schmitz et al., 2011; Lee et al., 2009; Schilz, 2006).

4.6.2 Überprüfung des Amplifikationserfolges mittels Agarose-Gelelektrophorese

Der Amplifikationserfolg der PCRs wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Agarosegele wurden nach der in Kapitel 3.5.3.1 beschriebenen Anleitung angefertigt und ausgewertet. Für die anschließende Sequenzierreaktion (siehe Kapitel 4.7.4) wurde die einzusetzende DNA-Menge über die Intensität der Bande auf dem Agarosebild abgeschätzt (siehe Abbildung 27).

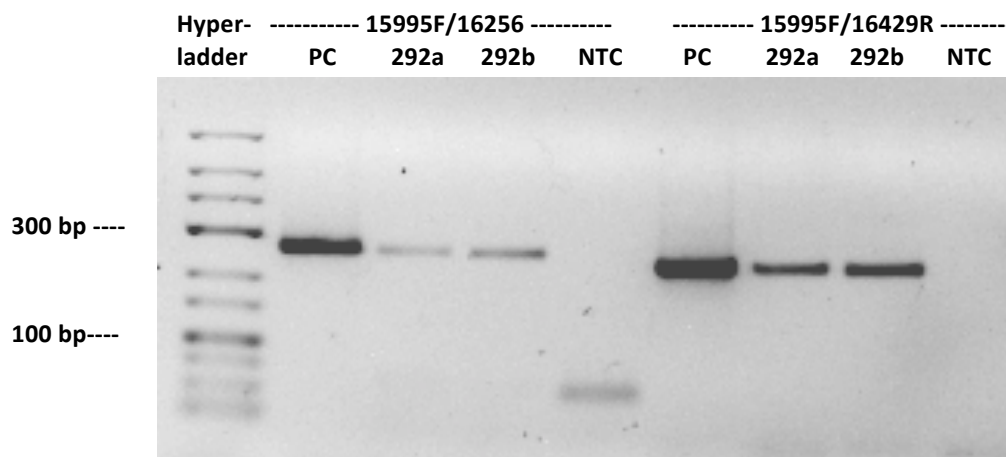


Abbildung 27: Bild eines 2 %-igen Agarosegels nach der Gelelektrophorese. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 45 Minuten. Aufgetragen wurden die amplifizierten mitochondrialen Fragmente 15995-16256 (261 bp) und 15995-16429 (434 bp) der mittelalterlichen Proben 292a und 292b sowie der Negativ- (= NTC) und Positivkontrolle (= PC). Zusätzlich ist der Hyperladder LR (Fermentas) als Größenvergleich mit aufgetragen worden. Anhand der Bandenintensitäten wurde die einzusetzende Menge an PCR-Produkt für die anschließende Sequenzierreaktion abgeschätzt. Bei sehr guten Bandenintensitäten wie bei der Positivkontrolle wurden 1,0 µl PCR-Produkt eingesetzt. Bei schwächeren Intensitäten wie beim Fragment 15995-16429 (434 bp) der Proben 292a und 292b wurde die Menge auf 2 µl PCR-Produkt verdoppelt. Lagen ganz schwache Bandenintensitäten wie beim Fragment 15995-16256 (261 bp) der Proben 292a und 292b vor, wurde die Menge des einzusetzenden PCR-Produktes auf 4 µl erhöht. NTC= engl. *negative template control*, PC= engl. *positiv control*, Basenpaare= bp

4.6.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte mit dem MinElute Purification Kit

Vor der Sequenzierreaktion müssen überschüssige Reaktionskomponenten wie dNTPs, Primer und Polymerasereste der ersten PCR entfernt werden. Dieser Aufreinigungsschritt erfolgte mit Hilfe des MinElute[®] PCR Purification Kits von Qiagen. Es wurde hierbei nach Herstellerangaben gearbeitet.

4.6.4 Sequenzierreaktion mit dem BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit

Die Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits von Applied Biosystems durchgeführt. Hierfür wurde jeweils nur der forward- oder der reverse-Primer des vorher verwendeten Primerpaares in einer 1/20 Verdünnung eingesetzt. Zusätzlich zum Primer wurden unterschiedliche Mengen des aufgereinigten PCR-Produktes verwendet. Diese wurde über das angefertigte Agarosegel abgeschätzt (siehe Abbildung 24, Kapitel 4.6.2).

Bei gut sichtbaren Bandenintensitäten wurden 2,0 µl des aufgereinigten PCR-Produktes eingesetzt. Bei leicht bis sehr schwachen Bandenintensitäten wurde die Menge auf 3,0 - 4,0 µl erhöht und die Menge des H₂O-Anteils entsprechend reduziert. Bei der Analyse der aDNA Proben wurde überwiegend das höchste Einsatzvolumen von 4,0 µl verwendet. Der detaillierte Sequenzieransatz sowie das Temperaturprofil sind den Tabellen 18a und b im Anhang zu entnehmen.

4.6.5 Aufreinigung mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit

Vor der kapillarelektrophoretischen Auftrennung müssen die Sequenzierprodukte von überschüssigen dNTPs, ddNTPs, Primern und Polymeraseresten befreit werden, da die Anwesenheit der genannten PCR-Komponenten zu einer eingeschränkten Analysierbarkeit in Form eines starken Hintergrundrauschens führt. Für diesen Schritt wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

4.6.6 Detektion mittels Kapillarelektrophorese am ABI Prism 3130

Die Analyse der Sequenzierprodukte wurde am ABI Prism® 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems durchgeführt. Hierfür wurde das gesamte aufgereinigte Sequenzierprodukt (circa 16 - 18 µl) in entsprechende 0,5 ml Gefäße (Applied Biosystem) überführt, mit einem Gummisepta (Applied Biosystem) verschlossen und im Sequenzierer positioniert. Für die kapillarelektrophoretische Auftrennung wurde das Polymer POP-6® (Applied Biosystem) verwendet. Die Datendarstellung erfolgte mit Hilfe der Software ABI Prism® Sequencing Analysis (Applied Biosystem), die alle gemessenen Werte in farbige Peaks umwandelt. Die Farben dieser Peaks werden folgenden Basen zugeordnet: Guanin = schwarz, **Adenin** = grün, **Cytosin** = blau, **Thymin** = rot. Die ermittelten Sequenzdaten wurden anschließend mit der SeqMan Software (DNASTar, Lasergene) ausgewertet und manuell von Lesefehlern bereinigt. An Positionen mit mehr als einer Base wurde entsprechend der internationale Code der Biochemie (= *IUB-Code, Code of the International Union of Biochemistry*) verwendet (Cornish-Bowden, 1985).

4.7 Analyse der Pigmentierungs-SNPs

Die statistische Auswertung der 400 rezenten Proben (siehe Kapitel 3.5.2.1) wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Amke Caliebe vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik (= IMIS) durchgeführt. Welche statistischen Verfahren hierfür verwendet wurden, beschreibt das Kapitel 3.6. Die Auswertung ergab, dass unterschiedliche SNPs sowohl einzeln als auch in Kombination an der Determinierung der Augen-, Haar- und Hautfarbe beteiligt sind. Folgende SNPs zeigten diesbezüglich signifikante Ergebnisse:

- Augenfarbe: rs12913832
- Haarfarbe: rs12913832, rs12896399, rs12203592
- Rotstich im Haar: rs1805007, rs1805008
- Hauttyp: rs4778138, rs1805007, rs1805008

4.7.1 Primerdesign

Da aDNA größtenteils starke Degradierungserscheinungen aufweist, können in den meisten Fällen lediglich kleinere PCR-Fragmente erfolgreich amplifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die PCR-Amplikons zur Analyse der SNPs rs12913832, rs4778138, rs1805007 und rs1805008 Größen über 160 bp aufweisen, wurden speziell für die aDNA-Analysen dieser Arbeit neue Primerpaare für kleinere Amplikonlängen entworfen. Hierfür wurde die Software Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) verwendet.

Das PCR-Fragment für die Analyse des SNPs rs12913832 wurde von 167 bp auf 81 bp und das für die Analyse der SNPs rs1805007 und rs1805008 von 171 bp auf 100 bp verkleinert. Ebenfalls konnte die Fragmentgröße für die Analyse des SNPs rs4778138 von 164 bp auf 102 bp minimiert werden.

4.7.2 PCRs

Für die Analyse der sechs signifikanten Pigmentierungs-SNPs (rs12913832, rs12896399, rs12203592, rs1805007, rs1805008 und rs4778138) wurden fünf unterschiedliche Singleplex-PCRs entwickelt. Bei der Analyse der aDNA Proben wurde nach folgendem Schema verfahren:

Augenfarbe	Rotstich im Haar
Singleplex (1)	Singleplex (2)
rs12913832	rs1805007 + rs1805008
Ergebnis positiv ↓ ⊥ Ergebnis negativ	Ergebnis positiv ↓ ⊥ Ergebnis negativ
Haarfarbe	Hauttyp
Singleplex (3) + (4)	Singleplex (5)
rs12896399 + rs12203592	rs4778138

Zunächst wurden die Singleplex-PCRs (1) und (2) zur **Rekonstruktion der Augenfarbe** und des **Rotstichs im Haar** angewendet. Da für die **Rekonstruktion der Haarfarbe und des Hauttyps** auch die Ergebnisse der Singleplex-PCRs (1) und (2) entscheidend sind, wurden die Singleplex-PCRs (3), (4) und (5) nur nach erfolgreicher Analyse der beiden ersten PCRs durchgeführt.

4.7.2.1 Augenfarbe

Für die Determinierung der Augenfarbe ist die Ausprägung des SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen) ausschlaggebend. Für dessen Analyse wurde eine Singleplex-PCR entwickelt, die ein 121 bp PCR-Fragment amplifiziert und eine Sensitivität von 33 pg aufweist. Bei einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl wurden zunächst 5 µl eingesetzt. Sobald Peaks unter 50 rfu erkennbar waren, wurde das Reaktionsvolumen auf 25 µl und die einzusetzende Menge des Extraktes auf 10 µl erhöht. Der detaillierte PCR-Ansatz, die Primersequenzen sowie das Temperaturprofil sind den Tabellen 19a, b und c im Anhang zu entnehmen.

4.7.2.2 Rotstich

Die Determinierung des Rotstichs im Haar ist abhängig von der Ausprägung der SNPs rs1805007 und rs1805008 des *MC1R*-Gens. Beide SNPs wurden in einer Singleplex-PCR, mit einer Sensitivitätsgrenze von 3,3 pg, in Form eines 100 bp PCR-Fragmentes amplifiziert. Bei einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl wurden zunächst 5 µl eingesetzt. Sobald Peaks unter 50 rfu erkennbar waren, wurde das Reaktionsvolumen auf 25 µl und die einzusetzende Menge des Extraktes auf 10 µl erhöht. Der detaillierte PCR-Ansatz, die Primersequenzen sowie das Temperaturprofil sind den Tabellen 20a, b und c im Anhang zu entnehmen.

4.7.2.3 Haarfarbe

Für die Determinierung der Haarfarbe sind die Ausprägungen der drei SNPs rs12896399, rs12203592 und rs12913832 ausschlaggebend. Die Amplifikation des SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen) erfolgte nach der im Kapitel 4.7.2.1 (Singleplex-PCR (1)) beschriebenen Vorgehensweise. Die zusätzlichen SNPs rs12896399 und rs12203592 wurden ebenfalls in zwei Singleplex-PCRs ((3) und (4)) amplifiziert. Diese weisen Sensitivitäten von 16,5 pg auf. Die Amplifikation des SNPs rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) erfolgte in Form eines 114 bp und die des SNPs rs12203592 (*IRF4*-Gen) in Form eines 121 bp PCR-Fragmentes. Bei einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl wurden zunächst 5 µl eingesetzt. Sobald Peaks unter 50 rfu erkennbar waren, wurde das Reaktionsvolumen auf 25 µl und die einzusetzende Menge des Extraktes auf 10 µl erhöht. Die detaillierten PCR-Ansätze, die Primersequenzen sowie die Temperaturprofile sind den Tabellen 21a, b und c im Anhang zu entnehmen.

4.7.2.4 Hauttyp

Die Determinierung des Hauttyps ist abhängig von den Ausprägungen der SNPs rs4778138 (*OCA2*-Gen), rs1805007 und rs1805008 (*MC1R*-Gen). Die Amplifikation der SNPs rs1805007 und rs1805008 erfolgte nach der im Kapitel 4.7.2.2 (Singleplex-PCR (2)) beschriebenen Vorgehensweise. Für die Analyse des SNPs rs4778138 wurde eine Singleplex-PCR entwickelt, die ein 102 bp PCR-Fragment amplifiziert und eine Sensitivität von 33 pg aufweist. Bei einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl wurden zunächst 5 µl eingesetzt. Sobald Peaks unter 50 rfu erkennbar waren, wurde das Reaktionsvolumen auf 25 µl und die einzusetzende Menge des Extraktes auf 10 µl erhöht. Der detaillierte PCR-Ansatz, die Primersequenzen sowie das Temperaturprofil sind den Tabellen 22a, b und c im Anhang zu entnehmen.

4.7.3 Überprüfung des Amplifikationserfolges mittels Polyarylamid-Gelelektrophorese

Für die Überprüfung des Amplifikationserfolges der verschiedenen PCRs, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die genaue Beschreibung dieser ist dem Kapitel 3.5.3.2 zu entnehmen. Abweichungen diesbezüglich liegen hinsichtlich der Menge an eingesetztem PCR-Produkt vor. Statt der in Kapitel 3.5.3.2 angegebenen 5 µl wurden im Fall der aDNA Proben 10 µl PCR-Produkt aufgetrennt. Um beim doppelten Produktvolumen optimale

Laufbedingungen bei der Gelelektrophorese zu gewährleisten, wurde die Menge des Ladepuffers ebenfalls von 5 µl auf 10 µl erhöht.

4.7.4 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels ExoSAP-IT

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte analog zu den rezenten Proben (siehe Kapitel 3.5.4).

4.7.5 Einzelbasenverlängerung mittels SNaPshot Multiplex System

Für die Analyse der sechs wichtigen Pigmentierungs-SNPs, deren Amplifikation in unterschiedlichen Singleplex-PCRs ((1)-(5)) erfolgte (siehe Kapitel 4.7.2), wurde die Methode der Einzelbasenverlängerung (engl. *single base extension*= *SBE*) mit Hilfe des SNaPshot® Multiplex Systems von Applied Biosystems, durchgeführt. Eine detaillierte Methodenbeschreibung ist dem Kapitel 3.5.5 zu entnehmen. Analog zum ersten Amplifikationsschritt erfolgte die Farbmarkierung des zu untersuchenden Sequenzabschnittes mittels SBE-Reaktion in Einzelansätzen. Für jede Singleplex-PCR wurde entsprechend eine SBE-Reaktion in einem Reaktionsvolumen von 5 µl angesetzt. Die einzusetzende Menge der PCR-Produkte wurde anhand der Bandenintensitäten auf dem Polyacrylamidgel abgeschätzt. Bei gut sichtbaren Bandenintensitäten wurden 0,5 µl des aufgereinigten PCR-Produktes eingesetzt. Bei leicht bis sehr schwachen Bandenintensitäten wurde die Menge auf 1,0 - 2,0 µl erhöht und die Menge des H₂O-Anteils entsprechend reduziert. Bei der Analyse der aDNA Proben wurde überwiegend das höchste Einsatzvolumen von 2,0 µl verwendet. Detaillierte Angaben zu den SBE-Ansätzen, den Sequenzen der SBE-Primer sowie zum Temperaturprofil sind den Tabellen 19, 20, 21 und 22 (jeweils d, e und f) im Anhang zu entnehmen.

4.7.6 Detektion mittels Kapillarelektrophorese am ABI Prism 3130 Genetic Analyzer

Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach der Beschreibung des Kapitels 3.5.6. Es wurde lediglich bei der Analyse der aDNA Proben die eingesetzte Menge des SBE-Produktes von 0,5 µl auf 1,0 µl erhöht.

5. Ergebnisse (rezentes Material)

5.1 Realtime-PCR

Die Quantifizierung der nukleären DNA wurde mit Hilfe einer selbstentwickelten Realtime-PCR durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Um bei der Anwendung der Multiplex-PCRs I und II optimale DNA-Konzentrationen von 0,2 - 0,5 ng/μl einsetzen zu können, wurde der nukleäre DNA-Gehalt der angefertigten Extrakte ermittelt.

Generell konnte bei allen Proben nukleäre DNA nachgewiesen werden. Bei den berechneten Mittelwerten an nukleärer DNA zeigt sich, dass die DNA-Extrakte aus Blut mit einem Mittelwert von 343,2 ng/μl die 170-fache Menge im Vergleich zu den Extrakten aus Mundschleimhautzellen mit einem Mittelwert von 1,9 ng/μl aufweisen (Abbildung 28). Detaillierte Ergebnisse sind der Tabelle 23 im Anhang zu entnehmen.

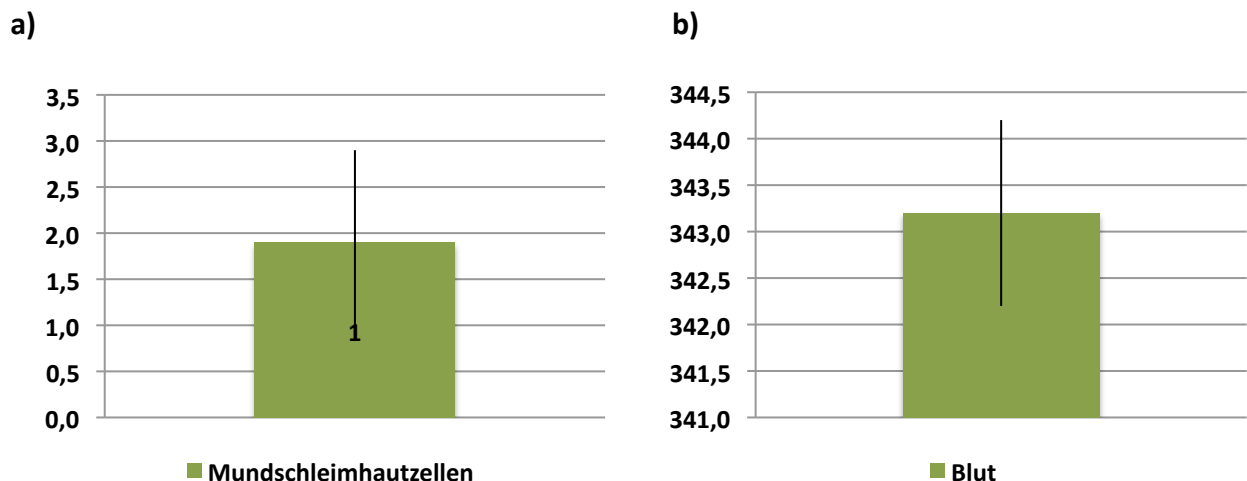


Abbildung 28: Graphische Darstellung der mittleren Menge an nukleärer DNA in den DNA-Extrakten aus Blut und Mundschleimhautzellen. Die DNA-Menge an nukleärer DNA wurde mittels Realtime-PCR am Real-Time PCR System 7300 von Applied Biosystem ermittelt. Darstellt sind die mittleren Konzentrationen der nukleären DNA bei den Extrakten aus Mundschleimhautzellen (a)) und Blut (b)).

5.2 Pigmentierungs-SNPs

Der Ergebnisteil hinsichtlich der Pigmentierungs-SNPs gliedert sich in insgesamt drei Abschnitte. Der erste Abschnitt befasst sich mit den statistischen Ergebnissen der SNPs, die speziell für diese Arbeit ausgewählt und analysiert wurden. In den beiden weiteren Abschnitten wurden die Methode aus Walsh et al. 2011 und Branicki et al. 2011 zur Augenfarben- und Haarfarbenrekonstruktion statistisch mit den Ergebnissen des eigenen Verfahrens verglichen.

5.2.1 Pigmentierungs-SNPs (eigenes Projekt)

Zwölf der insgesamt 18 analysierten SNPs wurden nach dem in Kapitel 3.6 beschriebenen Verfahren statistisch ausgewertet. Warum lediglich nur ein Teil der SNPs in die Statistik mit eingegangen ist, wird ebenfalls in dem Kapitel 3.6 detailliert beschrieben.

Bei der statistischen Auswertung hinsichtlich der **Augenfarbe** wurden blauäugige gegen nicht-blauäugige Personen getestet. Hierbei zeigt der SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen) sowohl in beiden Phasen der simplen, als auch in denen der multiplen Analyse signifikante Ergebnisse. Die Signifikanzwerte (engl. *probability-value*= p-Wert) dieses SNPs liegen zwischen $<10^{-16}$ - 10^{-4} und die der Quotenverhältnisse (engl. *Odds ratios*= ORs) zwischen 10,32 - 39,65 (siehe Tabelle 24a).

Tabelle 24a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Augenfarbe. Getestet wurden blauäugige gegen nicht-blauäugige Personen mittels logistischer Regressionsanalyse (simple und multiple). Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfolgte die Auswertung in zwei verschiedenen Stufen (I, II). Dargestellt ist das Ergebnis des SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), der als einziger in allen Analysen signifikante Ergebnisse aufweist. Angegeben sind das Quotenverhältnis (= OR), der Signifikanzwert (= p-Werte) sowie die SNP-ID, das Gen und das Referenz-Allel mit dem bevorzugt auftretendem Allel (ref./bev.) für die Ausprägung blauer Augen.

SNP-ID (ref./bev.) Gen		Stufe 1 (n=300)		Stufe 2 (n=100)	
		simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1	rs12913832 (A/G) <i>HERC2</i>	OR=24.22, p<10 ⁻¹⁶	OR=39.65, p<2·10 ⁻¹⁶ , p _{BF} <2.4·10 ⁻¹⁵	OR=14.59, p=1.5·10 ⁻⁶	OR=10.32, p=9.9·10 ⁻⁶ , p _{BF} =1.1·10 ⁻⁴

Die SNPs rs7495174, rs4778241 und rs4778138 des *OCA2*-Gens sowie der SNP rs916977 des *HERC2*-Gens weisen ausschließlich in der simplen Analyse signifikante Werte auf, die in der multiplen Analyse nicht reproduziert werden konnten. Zusätzlich zeigt der SNP rs1800407 (*OCA2*-Gen) in der multiplen Analyse der Stufe I signifikante Ergebnisse, die sich ebenfalls nicht bestätigen ließen (siehe Tabelle 24b im Anhang).

Mit der Analyse des SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen) kann die Augenfarbe **mit Wahrscheinlichkeiten bis zu 95%** rekonstruiert werden (siehe Tabelle 24c). Eine detaillierte Auflistung der Wahrscheinlichkeiten für die entsprechenden Genotypen, sind der Tabelle 24c zu entnehmen. Anhand dieser ist ersichtlich, dass der Genotyp G/G mit einer Wahrscheinlichkeit von 89% die Augenfarbe blau und der Genotyp A/A mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % die Augenfarbe braun vorhersagt. Die Wahrscheinlichkeiten für die Augenfarbe grün fallen bei allen möglichen Genotypen (G/G, G/A, A/A) mit Werten von 3,4-31 % am niedrigsten aus.

Ergebnisse

Tabelle 24c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Augenfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die Wahrscheinlichkeiten für die jeweiligen Augenfarben (blau, grün, braun) sowie die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten der Genotypen G/G, G/A und A/A für den SNP rs12913832. Die Genotypen sind in Form der Basenabkürzungen (A= Adenin, G= Guanin, C= Cytosin, T= Thymin) dargestellt. Die höchsten Wahrscheinlichkeiten für die Augenfarben blau, grün und braun sind farblich markiert. n= Stichprobengröße

rs12913832 <i>HERC2</i>	blau (n= 287)			grün (n=52)			braun (n=61)		
	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit
G/G	0.89	258	257.21	0.074	26	21.39	0.030	5,0	8,67
G/A	0.25	29	25.25	0.31	26	31.31	0.44	46	44.44
A/A	0.013	0	0.13	0.034	0	0.34	0.95	10	9,50

Bei der statistischen Auswertung hinsichtlich des **Rotstichs im Haar** wurde das Vorkommen gegen das Fehlen eines Rotstichs getestet. Hierbei zeigen die SNPs rs1805007 und rs1805008 des *MC1R*-Gens signifikante Ergebnisse in Stufe I und II der simplen und multiplen Analyse (siehe Tabelle 25a). Die p-Werte des SNPs rs1805007 liegen zwischen 10^{-8} - 0,00392 und die der ORs zwischen 3,66 - 9,68. Für den SNP rs1805008 ergeben sich p-Werte zwischen $3,5 \times 10^{-7}$ - 0,036 und ORs zwischen 2,72 - 5,21. Bis auf den SNP rs1805009 (*MC1R*-Gen), der ausschließlich in der ersten Stufe der Analyse signifikante Ergebnisse aufweist, zeigen alle anderen getesteten SNPs keine Signifikanzen bezüglich des Rotstichs im Haar (siehe Tabelle 25b im Anhang). Bei der Austestung auf mögliche Interaktionen zwischen den SNPs rs1805007 und rs1805008 des *MC1R*-Gens, konnte lediglich in der ersten Stufe der multiplen Analyse eine Interaktion festgestellt werden.

Mit der Analyse der SNPs rs1805007 und rs1805008 (*MC1R*-Gen) kann ein Rotstich im Haar mit einer **Wahrscheinlichkeit von bis zu 99 %** rekonstruiert werden (siehe Tabelle 25c). Eine detaillierte Auflistung der Wahrscheinlichkeiten für die entsprechenden Genotypen, sind der Tabelle 25c zu entnehmen. Anhand dieser ist ersichtlich, dass der Genotyp T/T-T/T (rs1805007-rs1805008) die höchste Wahrscheinlichkeit von 99 % aufweist. Zudem ist auffällig, dass bei bereits einer T/T-Ausprägung in einem der beiden SNPs die Wahrscheinlichkeit für einen Rotstich stark zunimmt. Die niedrigste Wahrscheinlichkeit von 14 % ergibt sich bei dem Genotyp C/C-C/C.

Ergebnisse

Tabelle 25a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich des Rotstichs im Haar. Getestet wurde das Vorkommen gegen das Fehlen eines Rotstichs im Haar mittels logistischer Regressionsanalyse (simple und multiple). Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfolgte die Auswertung in zwei verschiedenen Stufen (I, II). Dargestellt ist das Ergebnis der SNPs rs1805007 und rs1805008 (*MC1R*-Gen), die größtenteils in allen Analysen signifikante Ergebnisse aufweisen. Angegeben ist das Quotenverhältnis (= OR), der Signifikanzwert (= p-Werte) sowie die SNP-ID, das Gen und das Referenz-Allel (ref.) mit dem bevorzugt auftretendem Allel (bev.) für die Ausprägung des Rotstichs im Haar.

SNP-ID (ref./bev.) Gen	Stufe 1 (n=300)		Stufe 2 (n=100)	
	simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1 rs1805007 (C/T) <i>MC1R</i>	OR=5.52, $p=2.5 \cdot 10^{-6}$	OR=9.68, $p=1.0 \cdot 10^{-8}$, $p_{BF}=1.3 \cdot 10^{-7}$	OR=3.66, $p=0.011$	OR=4.77, $p=0.00392$, $p_{BF}=0.047$,
2 rs1805008 (C/T) <i>MC1R</i>	OR=3.37, $p=2.1 \cdot 10^{-5}$	OR=5.21, $p=3.5 \cdot 10^{-7}$, $p_{BF}=4.1 \cdot 10^{-6}$	nicht signifikant	OR=2.72, $p=0.036$, $p_{BF}=0.43$
	nicht signifikant	Interaktion: rs1805007, -008 $p=0.026$, $p_{BF}=0.31$	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 25c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Rotstichrekonstruktion. Angegeben sind die Wahrscheinlichkeiten für die Ausprägung eines Rotstichs sowie die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten der möglichen Genotypen (C/C, C/T, T/T und C/C, C/T, T/T in Kombination) für die SNPs rs1805007/-008. Die Genotypen sind in Form der Basenabkürzungen (A= Adenin, G= Guanin, C= Cytosin, T= Thymin) dargestellt. Die höchste Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung eines **Rotstichs** ist farblich markiert. n= Anzahl der Stichprobe.

rs1805007 <i>MC1R</i>	rs1805008 <i>MC1R</i>	Rotstich			
		Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	n
CC	CC	0.14	37.94	38	271
	CT	0.38	24.32	24	64
	TT	0.70	4,9	6	7
CT	CC	0.51	22.95	24	45
	CT	0.79	4,74	4	6
	TT	0.93	0	0	0
TT	CC	0.87	5,22	6	6
	CT	0.96	0.96	0	1
	TT	0.99	0	0	0

Ergebnisse

Bei der statistischen Auswertung in Bezug auf die **Haarfarbe** wurde blonde gegen nicht-blonde Personen und Haartyp I - IX (Definition siehe Abbildung 11) gegeneinander getestet. Hierbei zeigen die SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen) signifikante Ergebnisse (siehe Tabelle 26a). Die p-Werte des SNPs rs12913832 liegen zwischen $5,9 \times 10^{-11}$ - 0,0057 und die der ORs zwischen 2,74 - 4,77. Für den SNP rs12896399 ergeben sich p-Werte zwischen 0,00013 - 0,013 und ORs zwischen 1,57 - 1,93. Beim dritten SNP rs12203592 liegen die Signifikanzwerte (p-Wert) zwischen $3,4 \times 10^{-9}$ - 0.00034 und die Quotenverhältnisse (OR) zwischen 3,42 - 4,87. Die SNPs rs1805007 (*MC1R*-Gen), rs1800407 (*OCA2*-Gen) und rs1393350 (*TYR*-Gen) zeigen in keiner Analyse signifikante Werte. Für die übrigen SNPs können partiell Signifikanzen festgestellt werden, die sich jedoch in weiteren Analysen nicht bestätigten ließen (siehe Tabelle 26b im Anhang).

Tabelle 26a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Haarfarbe. Mittels logistischer (simple und multiple) Regressionsanalyse wurde zunächst blonde gegen nicht-blonde Personen getestet. Des Weiteren wurden die Haartypen I - IX mittels ordinaler und linearer Regressionsanalyse ausgewertet. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfolgte die Auswertung in zwei verschiedenen Stufen (I, II). Dargestellt ist das Ergebnis der SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen), die in allen Analysen signifikante Ergebnisse aufweisen. Angegeben sind das Quotenverhältnis (= OR), der Signifikanzwert (= p-Werte) sowie die SNP-ID, das Gen und das Referenz-Allel (ref.) mit dem bevorzugt auftretenden Allel (bev.) bei blonden Haaren. S1= Stufe 1, S2= Stufe 2.

SNP-ID (ref./bev.) Gen		blond gegen nicht blond	blond gegen nicht blond	ordinale Regression	ordinale Regression	lineare Regression	lineare Regression
		simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1	rs12913832 (A/G) <i>HERC2</i>	OR _{S1} =2.74, p _{S1} = $2.7 \cdot 10^{-5}$	OR _{S1} =3.06, p _{S1} = $7.5 \cdot 10^{-6}$, p _{S1,BF} = $9.1 \cdot 10^{-4}$	OR _{S1} =3.31, p _{S1} = $2.6 \cdot 10^{-9}$	OR _{S1} =3.89, p _{S1} = $5.9 \cdot 10^{-11}$, p _{S1,BF} = $7.0 \cdot 10^{-10}$	OR _{S1} =4.21, p _{S1} = $5.5 \cdot 10^{-10}$	OR _{S1} =3.66, p _{S1} = $9.4 \cdot 10^{-9}$, p _{S1,BF} = $1.1 \cdot 10^{-7}$
		OR _{S2} =3.94, p _{S2} =0.0051	OR _{S2} =3.94, p _{S2} =0.0051, p _{S2,BF} =0.061	OR _{S2} =4.7, p _{S2} = $6.3 \cdot 10^{-5}$	OR _{S2} =3.65, p _{S2} =0.0018, p _{S2,BF} =0.022	OR _{S2} =4.77, p _{S2} = $1.8 \cdot 10^{-5}$	OR _{S2} =2.90, p _{S2} =0.0057, p _{S2,BF} =0.068
2	rs12896399 (T/G) <i>SLC24A4</i>	OR _{S1} =1.63, p _{S1} =0.0042	OR _{S1} =1.57, p _{S1} =0.013, p _{S1,BF} =0.16	OR _{S1} =1.72, p _{S1} =0.00022	OR _{S1} =1.63, p _{S1} =0.00095, p _{S1,BF} =0.011	OR _{S1} =1.93, p _{S1} =0.00013	OR _{S1} =1.67, p _{S1} =0.00071, p _{S1,BF} =0.0085
3	rs12203592 (T/C) <i>IRF4</i>	OR _{S1} =3.25, p _{S1} =0.00034	OR _{S1} =3.67, p _{S1} =0.00016, p _{S1,BF} =0.0019	OR _{S1} =3.42, p _{S1} = $1.9 \cdot 10^{-6}$	OR _{S1} =4.87, p _{S1} = $3.4 \cdot 10^{-9}$, p _{S1,BF} = $4.1 \cdot 10^{-8}$	OR _{S1} =4.52, p _{S1} = $1.3 \cdot 10^{-6}$	OR _{S1} =4.55, p _{S1} = $8.5 \cdot 10^{-8}$, p _{S1,BF} = $1.0 \cdot 10^{-6}$

Ergebnisse

Tabelle 26c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Haarfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die Wahrscheinlichkeiten für die Haarfarben blond, braun und schwarz sowie die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten der möglichen Genotypen (G/G, G/A, A/A; G/G, G/T, T/T und C/C, C/T, T/T in Kombination) für die SNPs rs12913832, rs12896399 und rs12203592. Die Genotypen sind in Form der Basenabkürzungen (A= Adenin, G= Guanin, C= Cytosin, T= Thymin) dargestellt. Die höchste Wahrscheinlichkeit für die Haarfarben blond, braun und schwarz sind farblich markiert. n= Anzahl der Stichprobe.

rs12913832 HERC2	rs12896399 SLC24A4	rs12203592 IRF4	blond (n=230)			braun (n=147)			schwarz (n=18)			
			Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	n
GG	GG	CC	0.62	49.60	48	0.35	28.00	30	0.025	0.2	2	80
		CT	0.34	6,12	8	0.55	9,9	9	0.11	1,98	1	18
		TT	0.12	0.12	0	0.55	0.55	1	0.33	0.33	0	1
	GT	CC	0.72	79.92	79	0.27	29.97	31	0.0080	0.89	1	111
		CT	0.46	7,82	8	0.50	8,5	8	0.043	0.73	1	17
		TT	0.20	0	0	0.63	0	0	0.16	0	0	0
	TT	CC	0.80	43.20	43	0.20	10,8	11	0.0025	0.14	0	54
		CT	0.57	3,42	2	0.41	2,46	3	0.0015	0.009	1	6
		TT	0.30	0.30	0	0.63	0.63	1	0.067	0.067	0	1
GA	GG	CC	0.34	10,54	11	0.54	16.74	16	0.12	3,72	4	31
		CT	0.12	0.84	1	0.54	3,78	2	0.35	2,45	4	7
		TT	0.026	0	0	0.34	0	0	0.64	0	0	0
	GT	CC	0.47	18.80	20	0.49	19.60	17	0.045	1,8	3	40
		CT	0.21	1,26	0	0.62	3,72	3	0.17	1,02	3	6
		TT	0.061	0.061	0	0.52	0.52	1	0.42	0.42	0	1
	TT	CC	0.58	6,96	8	0.41	4,92	4	0.016	0.19	0	12
		CT	0.31	0.62	1	0.62	1,24	1	0.071	0.14	0	2
		TT	0.11	0	0	0.66	0	0	0.22	0	0	0
AA	GG	CC	0.12	0.48	0	0.52	2,08	4	0.36	1,44	0	4
		CT	0.026	0	0	0.32	0	0	0.65	0	0	0
		TT	0.0040	0	0	0.14	0	0	0.85	0	0	0
	GT	CC	0.21	0.63	0	0.61	1,83	3	0.18	0.54	0	3
		CT	0.061	0	0	0.51	0	0	0.43	0	0	0
		TT	0.012	0	0	0.28	0	0	0.70	0	0	0
	TT	CC	0.31	0.93	1	0.62	1,86	2	0.074	0.22	0	3
		CT	0.12	0	0	0.65	0	0	0.23	0	0	0
		TT	0.029	0	0	0.48	0	0	0.49	0	0	0

Ergebnisse

Mit der Analyse der SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen) kann die Haarfarbe mit einer **Wahrscheinlichkeit von bis zu 85 %** rekonstruiert werden (siehe Tabelle 26c). Eine detaillierte Auflistung der Wahrscheinlichkeiten für die entsprechenden Genotypen, sind der Tabelle 26c zu entnehmen. Anhand dieser ist ersichtlich, dass der Genotyp A/A-G/G-T/T (rs12913832-rs12896399-rs12203592) mit einer Wahrscheinlichkeit von 85 % die Haarfarbe schwarz, der Genotyp G/G-T/T-C/C (rs12913832-rs12896399-rs12203592) mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % die Haarfarbe blond und der Genotyp G/A-T/T-T/T (rs12913832-rs12896399-rs12203592) mit einer Wahrscheinlichkeit von 66 % die Haarfarbe braun vorhersagt. Beim Vergleich des Genotypen A/A-G/G-T/T (rs12913832-rs12896399-rs12203592), der die höchste Wahrscheinlichkeit für schwarze Haare aufzeigt, und G/G-T/T-C/C (rs12913832-rs12896399-rs12203592) der wiederum die höchste Wahrscheinlichkeit für blonde Haare aufweist, fällt die exakt gegensätzliche Ausprägung der SNPs auf. Der Genotyp G/A-T/T-T/T (rs12913832-rs12896399-rs12203592) hingegen, der die höchsten Wahrscheinlichkeiten für braune Haare aufzeigt, setzt sich jeweils zur Hälfte aus den beiden erst genannten Genotypen zusammen.

Bei der statistischen Auswertung in Bezug auf den **Hauttyp** wurde der Hauttyp I, II gegen den Hauttyp III, IV sowie die Hauttypen I - IV (Definition siehe Tabelle 2) gegeneinander getestet. Hierbei zeigen die SNPs rs1805007, rs1805008 (*MC1R*-Gen) und rs4778138 (*OCA2*-Gen) signifikante Ergebnisse (siehe Tabelle 27a). Für den SNP rs1805007 ergeben sich p-Werte zwischen 0,0021 - 0,025 und ORs zwischen 2,16 - 3,50. Beim SNP rs1805008 liegen p-Werte zwischen $8.5 \cdot 10^{-5}$ - 0,28 und die ORs zwischen 2,70 - 3,35. Beim dritten SNP rs4778138 liegen die p-Werte zwischen 0,00027 - 0,028 und die ORs zwischen 2,13 - 3,72. Die SNPs rs1800407 (*OCA2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen), rs1393350 (*TYR*-Gen) und rs1805009 (*MC1R*-Gen) zeigten partiell Signifikanzen, die sich in weiteren Analysen nicht bestätigen ließen. Für die übrigen SNPs konnten keine Signifikanzen festgestellt werden (siehe Tabelle 27b im Anhang).

Ergebnisse

Tabelle 27a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich des Hauttyps. Mittels logistischer (simple und multiple) Regressionsanalyse wurde der Hauttyp I,II gegen den Hauttyp III, IV getestet. Des Weiteren wurden die Hauttypen I - IV mittels ordinaler Regressionsanalyse ausgewertet. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfolgte die Auswertung in zwei verschiedenen Stufen (I, II). Dargestellt ist das Ergebnis der SNPs rs1805007, rs1805008 (MC1R-Gen) und rs4778138 (OCA2-Gen), die in allen Analysen signifikante Ergebnisse aufweisen. Angegeben sind das Quotenverhältnis (= OR), der Signifikanzwert (= p-Werte) sowie die SNP-ID, das Gen und das Referenz-Allel (ref.) mit dem bevorzugt auftretendem Allel (bev.) für die Ausprägung des Hauttyps I und II.

SNP-ID (ref./bev.) Gen		Typ I, II vs. Typ III, IV	Typ I, II vs. Typ III, IV	ordinale Regression	ordinale Regression
		simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1	rs1805007 (T/C) MC1R	OR _{S1} =2.34, p _{S1} =0.0040	OR _{S1} =2.63, p _{S1} =0.0021, p _{S1,BF} =0.025	OR _{S1} =2.16, p _{S1} =0.0052	OR _{S1} =2.36, p _{S1} =0.0035, p _{S1,BF} =0.042
				OR _{S2} =2.77, p _{S2} =0.022	OR _{S2} =3.50, p _{S2} =0.0068, p _{S2,BF} =0.082
2	rs1805008 (T/C) MC1R	OR _{S1} =2.71, p _{S1} =0.00034	OR _{S1} =3.35, p _{S1} =4.3·10 ⁻⁵ , p _{S1,BF} =5.2·10 ⁻⁴	OR _{S1} =2.79, p _{S1} =8.5·10 ⁻⁵	OR _{S1} =2.99, p _{S1} =4.6·10 ⁻⁵ , p _{S1,BF} =5.5·10 ⁻⁴
					OR _{S2} =2.70, p _{S2} =0.023, p _{S2,BF} =0.28
3	rs4778138 (A/G) OCA2	OR _{S1} =2.13, p _{S1} =0.0284	nicht signifikant	OR _{S1} =3.20, p _{S1} =0.00027	OR _{S1} =3.15, p _{S1} =0.00043, p _{S1,BF} =0.0052
		OR _{S2} =3.31, p _{S2} =0.0082		OR _{S2} =3.38, p _{S2} =0.0024	OR _{S2} =3.72, p _{S2} =0.0016, p _{S2,BF} =0.019

Ergebnisse

Tabelle 27c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Hauttyprekonstruktion. Angegeben sind die Wahrscheinlichkeiten für die Hauttypen I, II, III und IV sowie die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten der möglichen Genotypen (C/C, C/T, T/T; C/C, C/T, T/T und A/A, A/G, G/G in Kombination) für die SNPs rs1805007, rs1805008 und rs4778138. Die Genotypen sind in Form der Basenabkürzungen (A= Adenin, G= Guanin, C= Cytosin, T= Thymin) dargestellt. Die höchste Wahrscheinlichkeit für die Hauttypen I, II, III und IV sind farblich markiert. n= Anzahl der Stichprobe.

rs1805007 MC1R	rs1805008 MC1R	rs4778138 OCA2	Hauttyp I (n=19)			Hauttyp II (n=126)			Hauttyp III (n=241)			Hauttyp IV (n=14)			
			Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	Wahrscheinlichkeit	beobachtete Häufigkeit	erwartete Häufigkeit	n
CC	CC	AA	0.026	5,46	5	0.29	60.90	60	0.67	140.70	142	0.019	3,99	3	210
		AG	0.0045	0.26	0	0.16	9,12	10	0.72	41.04	38	0.11	6,27	9	57
		GG	0.00051	0.0020	0	0.062	0.25	0	0.51	2,04	4	0.42	1,68	0	4
	CT	AA	0.12	6,12	7	0.42	21.42	20	0.46	23.46	24	0.0063	0.32	0	51
		AG	0.025	0.33	1	0.30	3,9	4	0.63	8,19	7	0.046	0.60	1	13
		GG	0.0038	0	0	0.15	0	0	0.61	0	0	0.23	0	0	0
	TT	AA	0.36	1,8	1	0.42	2,1	4	0.22	1,1	0	0.0014	0.007	0	5
		AG	0.11	0.22	0	0.44	0.88	1	0.43	0.86	1	0.015	0.030	0	2
		GG	0.023	0	0	0.31	0	0	0.57	0	0	0.10	0	0	0
CT	CC	AA	0.068	2,31	2	0.48	16.32	18	0.44	14.96	14	0.0081	0.28	0	34
		AG	0.014	0.15	0	0.34	3,74	3	0.59	6,49	7	0.058	0.64	1	11
		GG	0.0021	0	0	0.17	0	0	0.54	0	0	0.29	0	0	0
	CT	AA	0.23	1,38	2	0.54	3,24	1	0.23	1,38	3	0.0020	0.012	0	6
		AG	0.064	0	0	0.51	0	0	0.41	0	0	0.019	0	0	0
		GG	0.013	0	0	0.34	0	0	0.52	0	0	0.13	0	0	0
	TT	AA	0.52	0	0	0.40	0	0	0.082	0	0	0.00033	0	0	0
		AG	0.22	0	0	0.56	0	0	0.22	0	0	0.0048	0	0	0
		GG	0.059	0	0	0.52	0	0	0.38	0	0	0.044	0	0	0
TT	CC	AA	0.14	0.70	1	0.63	3,15	4	0.23	1,15	0	0.0027	0.014	0	5
		AG	0.036	0.036	0	0.56	0.56	1	0.38	0.38	0	0.024	0.024	0	1
		GG	0.0070	0	0	0.37	0	0	0.47	0	0	0.16	0	0	0
	CT	AA	0.36	0.36	0	0.55	0.55	0	0.092	0.092	1	0.00052	0.00052	0	1
		AG	0.13	0	0	0.66	0	0	0.21	0	0	0.0062	0	0	0
		GG	0.033	0	0	0.57	0	0	0.34	0	0	0.054	0	0	0
	TT	AA	0.65	0	0	0.33	0	0	0.026	0	0	0.000059	0	0	0
		AG	0.34	0	0	0.57	0	0	0.087	0	0	0.0012	0	0	0
		GG	0.12	0	0	0.67	0	0	0.19	0	0	0.014	0	0	0

Mit der Analyse der SNPs rs1805007, rs1805008 (*MC1R*-Gen) und rs4778138 (*OCA2*-Gen) kann der Hauttyp **mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 72 %** rekonstruiert werden (siehe Tabelle 27c). Eine detaillierte Auflistung der Wahrscheinlichkeiten für die entsprechenden Genotypen, sind der Tabelle 27c zu entnehmen. Anhand dieser ist ersichtlich, dass der Genotyp T/T-T/T-A/A (rs1805007-rs1805008-rs4778138) mit einer Wahrscheinlichkeit von 65 % den Hauttyp I, der Genotyp T/T-C/T-A/G (rs1805007-rs1805008-rs4778138) mit einer Wahrscheinlichkeit von 66 % den Hauttyp II, der Genotyp C/C-C/C-A/G (rs1805007-rs1805008-rs4778138) mit einer Wahrscheinlichkeit von 72 % den Hauttyp III und der Genotyp C/C-C/C-G/G (rs1805007-rs1805008-rs4778138) mit einer Wahrscheinlichkeit von 42 % den Hauttyp IV vorhersagt. Generell ist erkennbar, dass die Wahrscheinlichkeiten für die Hauttyprekonstruktion im Vergleich zur Augenfarben-, Haarfarben- und Rotstichrekonstruktion bedeutet geringer ausfallen.

5.2.2 Vergleich mit der Irisplex von (Walsh et al., 2011)

Da im Laufe dieser Arbeit eine Publikation bezüglich der **Augenfarbenrekonstruktion** von der Arbeitsgruppe Walsh et al. 2011 erschienen ist, wurde die Methode dieser Arbeit (SNP: rs12913832, siehe Kapitel 5.2.1) der aus der genannten Publikation (Irisplex, sechs SNPs: rs16891982, rs12203592, rs1800407, rs12896399, rs12913832, rs1393350, rs16891982) gegenübergestellt. Für diesen Vergleich wurden insgesamt 200 norddeutsche Probanden mittels Irisplex analysiert und in den Stufen I (Austestung, n=100) und II (Validierung, n=100) statistisch ausgewertet.

Dabei zeigt sich, dass beide Verfahren identische Ergebnisse bezüglich der Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und dem *area under the curve*-Wert (= AUC-Wert) aufweisen (siehe Tabelle 28).

Ergebnisse

Tabelle 28: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse des SNPs rs12913832 im Vergleich zu den sechs SNPs aus (Walsh et al., 2011). Dargestellt sind die berechneten Werte der Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und dem *area under the curve*-Wert (= AUC-Wert) in Prozent. Die statistischen Daten wurden in den Stufen I und II erhoben.

	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	AUC	Prävalenz
Walsh et al. 2011, Stufe I (n= 100)	92%	76%	82%	84%	37%
rs12913832 (HERC2), Stufe I (n= 100)	92%	76%	82%	84%	37%
Walsh et al. 2011, Stufe II (n= 100)	90%	63%	83%	77%	73%
rs12913832 (HERC2), Stufe II (n= 100)	90%	63%	83%	77%	73%

5.2.3 Vergleich mit der Methode von (Branicki et al., 2011)

Zur **Haarfarbenrekonstruktion** wurde kürzlich eine Publikation von der Arbeitsgruppe Branicki et al. 2011 veröffentlicht. In dieser wurden insgesamt 13 SNPs und die *MC1R*-Varianten *MC1R_r* und *MC1R_R* untersucht. Um die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Assays (drei SNPs: rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) rs12203592 (*IRF4*-Gen) für die Haarfarbenrekonstruktion, zwei SNPs: rs1805007/-008 (*MC1R*-Gen) für die Rotstichrekonstruktion, siehe Kapitel 5.2.1) mit dem der genannten Publikation vergleichen zu können, wurden 108 Probanden nach dem Verfahren von Branicki et al. 2011 analysiert und statistisch ausgewertet. Zusätzlich zum Vergleich beider Methode wurden die Einzel-SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen) und rs1805007 (*MC1R*-Gen) mit dem Assay von Branicki et al. 2011 in Bezug auf die Haarfarbe und den Rotstich verglichen.

Hierbei zeigt sich, dass die Analyse der drei SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen) als auch die des einzelnen SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen) im Vergleich zum Assay von Branicki et al. 2011 deutlich höhere Werte bezüglich der Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und dem *area under the curve*-Wert (= AUC-Wert) liefert. Zusätzlich fällt auf, dass die Werte des einzelnen SNPs (rs12913832) fast identisch zu denen der drei SNPs (rs12913832, rs12896399 und rs12203592) ausfallen (siehe Tabelle 29a).

Ergebnisse

Tabelle 29a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Haarfarbenrekonstruktion, die beim Vergleich der Methode von (Branicki et al., 2011) mit der selbstentwickelten Methode (rs12913832, rs12896399, rs12203592) und dem einzelnen SNP rs12913832, erzielt wurden. Dargestellt sind die berechneten Werte der Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und dem *area under the curve*-Wert (= AUC-Wert) in Prozent. Die statistischen Daten wurden in den Stufen I und II erhoben.

	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	AUC	Prävalenz
Branicki et al. 2011	67%	31%	49%	49%	50%
3 SNPs: rs12913832 (HERC2-Gen) rs12896399 (SLC24A4-Gen) rs12203592 (IRF4-Gen)	87%	60%	73%	73%	50%
rs12913832 (HERC2-Gen)	87%	58%	72%	72%	50%

Zusätzlich wurde die Aussagekraft der erhobenen Daten bezüglich des **Rotstichs im Haar** überprüft. Hierbei zeigt sich, dass das Verfahren von Branicki et al. 2011 mit einem Wert von 33 % im Vergleich zu den beiden SNPs rs1805007/-008 und dem Einzel-SNP rs1805007 mit Werten von 13 % und 7 % deutlich sensitiver ausfällt. Hinsichtlich der Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und dem *area under the curve*-Wert (= AUC-Wert) weisen alle drei Assays ähnliche Werte auf (siehe Tabelle 29b).

Tabelle 29b: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Rotstichrekonstruktion, die beim Vergleich der Methode von (Branicki et al., 2011) mit der selbstentwickelten Methode (rs1805007, rs1805008) und dem einzelnen SNP rs1805007, erzielt wurden. Dargestellt sind die berechneten Werte der Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und dem *area under the curve*-Wert (= AUC-Wert) in Prozent. Die statistischen Daten wurden in den Stufen I und II erhoben.

	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	AUC	Prävalenz
Branicki et al. 2011	33%	90%	74%	62%	28%
2 SNPs: rs1805007, rs1805008 (MC1R)	13%	97%	74%	55%	28%
rs1805007 (MC1R)	7%	97%	72%	52%	28%

5.3 Exkurs Pigmentierungs-SNPs

Neben den Analysen der rezenten und alten Proben, wurden zusätzlich zwei Familienquartetts (Kindesmutter, Kindesvater, Kind eins, Kind zwei) sowie eine Probandin mit Iris-Heterochromie untersucht.

5.3.1 Familien

Anhand der Familienquartetts soll sowohl die Vererbung der Pigmentierungs-SNPs als auch die Rekonstruktion der Pigmentausrägungen mittels SNP-Analyse überprüft werden.

Bei der **Familienkonstellation a)** wurde auf die Vererbung der Augen- und Haarfarbe wertgelegt. Für die Analyse dieser Merkmale sind die Ausprägungen der SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12203592 (*IRF4*-Gen) und rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) entscheidend (siehe Kapitel 5.2.1). Die Abbildung 29 stellt die Untersuchungsergebnisse der genannten SNPs für das Familienquartetts a) dar.

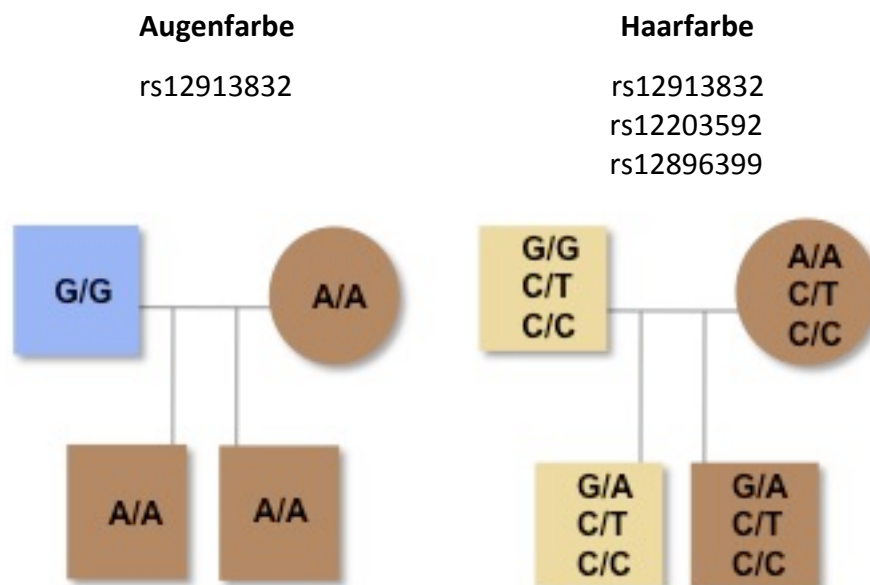


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Pigmentausrägungen des Familienquartetts a) und den Analyseergebnissen der SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12203592 (*IRF4*-Gen) und rs12896399 (*SLC24A4*-Gen). Angegeben sind die der SNP-ID Nummern sowie die unterschiedlichen Allelausrägungen in Form der Basenabkürzungen (A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin). Vater: dunkelblonde Haare (III), blaue Augen (1); Mutter: dunkelbraune Haare (VII), braune Augen (9); Sohn 1 (links): dunkelblonde Haare (III), braune Augen (9); Sohn 2 (rechts): braune Haare (VI), braune Augen (9)

Ergebnisse

Inwieweit die ermittelten Wahrscheinlichkeiten für die Augen- und Haarfarbenrekonstruktion anhand der Genotypenanalyse der SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12203592 (*IRF4*-Gen) und rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) zutreffen, kann der Tabelle 30a entnommen werden. Diese zeigt die Genotypen und die daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten für die Augenfarben blau, grün und braun (aus Tabelle 24c, Kapitel 5.2.1) sowie für die Haarfarben blond, braun und schwarz (aus Tabelle 26c, Kapitel 5.2.1). Die grünen Felder stellen die richtigen und die roten die falschen Typisierungen hinsichtlich der Augen- und Haarfarbe dar. Anhand der Tabelle 30a wird ersichtlich, dass bei der Familienkonstellation jeweils eine Variante vom Vater und eine von der Mutter, an die Kinder, vererbt wurde. Hinsichtlich der Interpretation der Analyseergebnisse in Bezug auf die jeweiligen Pigmentausprägungen der einzelnen Personen, wurde die Haarfarbe des ersten Sohns mit einer Wahrscheinlichkeit von 49 % für braune Haare nicht exakt bestimmt.

Tabelle 30a: Tabellarische Darstellung der Genotypen rs12913832 und rs12913832/ rs12203592/ rs12896399 zur Augenfarben- und Haarfarbenrekonstruktion und den daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten des Familienquartetts a). Angegeben sind die letzten drei Ziffern der SNP-ID Nummer, die unterschiedlichen Allelausprägungen in Form der Basenabkürzungen (A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin), die Wahrscheinlichkeiten bezüglich der Augenfarben blau, grün und braun sowie die Wahrscheinlichkeiten für die Haarfarben blond, braun und schwarz. Die fett markierten Wahrscheinlichkeiten stellen die tatsächlichen Pigmentausprägungen der Probanden dar. Grün hinterlegt sind die Felder, bei denen die tatsächliche Pigmentausprägung mit der höchsten Wahrscheinlichkeit übereinstimmt. Rot hinterlegt sind die Felder, bei denen die höchste Wahrscheinlichkeit von der tatsächlichen Pigmentausprägung abweicht.

Proband	-832	Wahrscheinlichkeiten für die Augenfarbenrekonstruktion			-832	-399	-592	Wahrscheinlichkeiten für die Haarfarbenrekonstruktion		
		blau	grün	braun				blond	braun	schwarz
Mutter	A/A	0,013	0,034	0,95	A/A	G/T	C/C	0,21	0,61	0,18
Vater	G/G	0,89	0,074	0,030	G/G	G/T	C/C	0,72	0,27	0,080
Sohn 1	G/A	0,25	0,31	0,44	G/A	G/T	C/C	0,47	0,49	0,045
Sohn 2	G/A	0,25	0,31	0,44	G/A	G/T	C/C	0,47	0,49	0,045

Ergebnisse

Bei der **Familienkonstellation b)** wurde auf die Vererbung des Rotstichs im Haar und den Hauttyp wertgelegt. Für die Analyse dieser Merkmale sind die Ausprägungen der SNPs rs1805007, rs1805008 (*MC1R*-Gen) und rs4778138 (*OCA2*-Gen) entscheidend (siehe Kapitel 5.2.1). Die Abbildung 30 stellt die Untersuchungsergebnisse der genannten SNPs für das Familienquartetts b) dar.

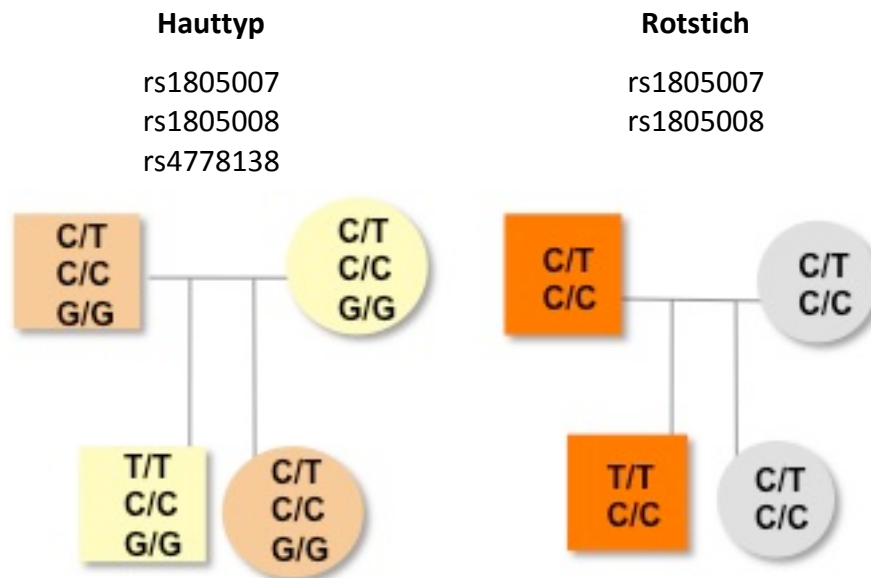


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Pigmentausprägungen des Familienquartetts b) und den Analyseergebnissen der SNPs rs1805007, rs1805008 (*MC1R*-Gen) und rs4778138 (*OCA2*-Gen). Angegeben sind die SNP-ID Nummern sowie die unterschiedlichen Allelausprägungen (A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin). Vater: dunkelblonde Haare (III) mit Rotstich, Hauttyp III; Mutter: dunkelblonde Haare (III), Hauttyp II, Sohn: hellblonde Haare (I) mit Rotstich, Hauttyp II; Tochter: dunkelblonde Haare (III), Hauttyp III.

Inwieweit die ermittelten Wahrscheinlichkeiten für die Rotstich- und Hauttyprekonstruktion anhand der Genotypenanalyse der SNPs rs1805007, rs1805008 (*MC1R*-Gen) und rs4778138 (*OCA2*-Gen) zutreffen, kann der Tabelle 30b entnommen werden. Diese zeigt die Genotypen und die daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten für die Hauttypen I, II, III und IV (aus Tabelle 27c, Kapitel 5.2.1) sowie für das Auftreten eines Rotstichs im Haar (aus Tabelle 25c, Kapitel 5.2.1). Die grünen Felder stellen die richtigen und die roten die falschen Typisierungen hinsichtlich der Rotstich- und Hauttypausprägung dar. Anhand der Tabelle 30b wird ersichtlich, dass bei der Familienkonstellation jeweils ebenfalls eine Variante vom Vater und eine von der Mutter, an die Kinder, vererbt wurde. Hinsichtlich der Interpretation der Analyseergebnisse in Bezug auf die jeweiligen Pigmentausprägungen der einzelnen Personen, erfolgte sowohl die Rotstichrekonstruktion im Fall der Mutter und Tochter als auch die Hauttyprekonstruktion bei Mutter und Sohn nicht fehlerfrei.

Ergebnisse

Tabelle 30b: Tabellarische Darstellung der Genotypen rs1805007/ rs1805008 und rs1805007/ rs1805008/ rs4778138 zur Rotstich- und Hauttyprekonstruktion und den daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten des Familienquartetts b). Angegeben sind die letzten drei Ziffern der SNP-ID Nummer, die unterschiedlichen Allelausprägungen in Form der Basenabkürzungen (A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin), die Wahrscheinlichkeiten bezüglich der Hauttypen I, II, III und IV sowie die Wahrscheinlichkeiten für die Ausprägung eines Rotstichs im Haar. Die grün hinterlegten Wahrscheinlichkeiten entsprechen den tatsächlichen Pigmentausprägungen der Probanden. Die fett markierten Wahrscheinlichkeiten stellen die tatsächlichen Pigmentausprägungen der Probanden dar. Grün hinterlegt sind die Felder, bei denen die tatsächliche Pigmentausprägung mit der höchsten Wahrscheinlichkeit übereinstimmt. Rot hinterlegt sind die Felder, bei denen die höchste Wahrscheinlichkeit von der tatsächlichen Pigmentausprägung abweicht.

Proband	-007	-008	Wahrscheinlichkeiten für einen Rotstich		-007	-008	-138	Hauttyp I			
			+	-				I	II	III	IV
Mutter	C/T	C/C	0,51	0,49	C/T	C/C	G/G	0,0021	0,17	0,54	0,29
Vater	C/T	C/C	0,51	0,49	C/T	C/C	G/G	0,0021	0,17	0,54	0,29
Sohn	T/T	C/C	0,87	0,13	T/T	C/C	G/G	0,0070	0,37	0,47	0,16
Tochter	C/T	C/C	0,51	0,49	C/T	C/C	G/G	0,0021	0,17	0,54	0,29

5.3.2 Iris-Heterochromie

Bei der Probandin mit **Iris-Heterochromie** steht die Ausprägung der Augenfarbe im Vordergrund. Da sich linksseitig ein **blau-braunes Auge** und rechtsseitig ein **braun-gelb-grünes Auge** ausgebildet hat, stellt sich die Frage, welche der beiden Augenfarben in der DNA kodiert vorliegt. Für die Rekonstruktion der Augenfarbe ist die Ausprägung des SNPs rs12913832 aus dem *HERC2*-Gen entscheidend. Was die Rekonstruktion der Augenfarbe durch die Analyse dieses SNPs ergeben hat, zeigt die Tabelle 31. In dieser sind der detektierte Genotype und die daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten für die Augenfarben blau, grün und braun dargestellt (aus Tabelle 24c, Kapitel 5.2.1). Aus dieser wird ersichtlich, dass die Probandin mit einer Wahrscheinlichkeit von 89 % eine blau Augenfarbe, mit einer Wahrscheinlichkeit von 7,4 % eine grüne Augenfarbe und mit einer Wahrscheinlichkeit von 3,0 % eine braune Augenfarbe aufweist.

Tabelle 31: Tabellarische Darstellung des Genotyps rs12913832 zur Augenfarbenrekonstruktion und die daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten. Angegeben sind die letzten drei Ziffern der SNP-ID Nummer, die unterschiedlichen Allelausprägungen in Form der Basenabkürzungen (A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin) sowie die Wahrscheinlichkeiten bezüglich der Augenfarben blau, grün und braun. Die fett markierten Wahrscheinlichkeiten stellen die tatsächlichen Pigmentausprägungen der Probanden dar.

Probandin mit Iris-Heterochromie	-832	Wahrscheinlichkeiten bezüglich der Augenfarbe		
		blau	grün	braun
	G/G	0.89	0,074	0,030

6. Ergebnisse (altes Probenmaterial)

6.1 Screening-PCR

Das Screening der aDNA-Proben erfolgte zum einen mit der Hexaplex-PCR (siehe Kapitel 4.5.1.1) und zum anderen mit dem modifiziertem Powerplex® S5 Kit von Promega (siehe Kapitel 4.5.1.2)

6.1.1 Neolithische Proben

Für das Screening der neolithischen Proben wurde die Hexaplex-PCR angewendet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach folgenden Einteilungen:

- keine mtDNA und keine chromosomale DNA (mtDNA - / chr. DNA -)
- mtDNA aber keine chromosomale DNA (mtDNA + / chr. DNA -)
- keine mtDNA aber chromosomale DNA (mtDNA - / chr. DNA +)
- mtDNA und chromosomale DNA (mtDNA + / chr. DNA +)

Die Abbildung 31 stellt die Screeningergebnisse in Form eines Tortendiagrammes dar.

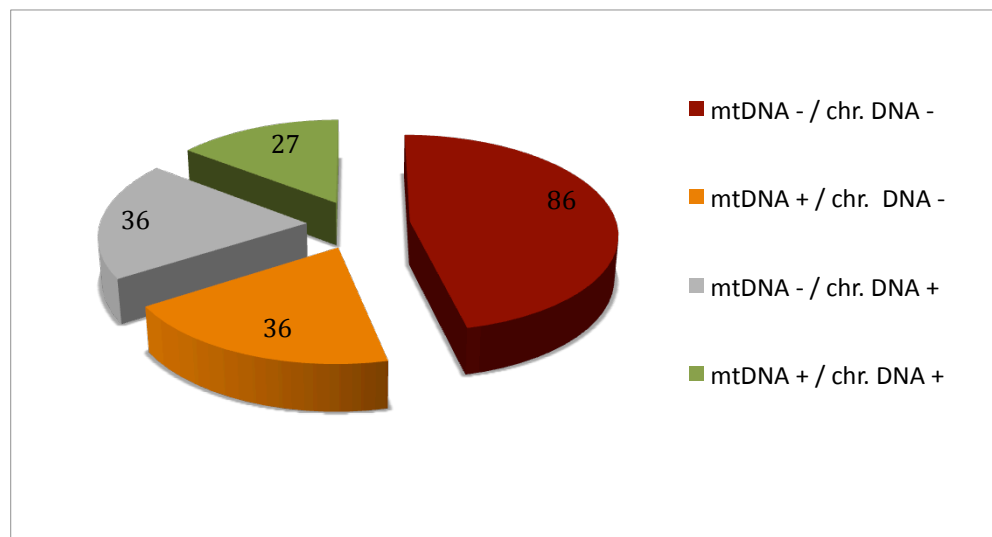


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Screening-Ergebnisse mittels Hexaplex-PCR in Form eines Tortendiagrammes. Es wurde hierbei zwischen den Einteilungen: keine mtDNA und keine chromosomale DNA (mtDNA - / chr. DNA -), mtDNA aber keine chromosomale DNA (mtDNA + / chr. DNA -), keine mtDNA aber chromosomale DNA (mtDNA - / chr. DNA +), mtDNA und chromosomale DNA (mtDNA + / chr. DNA +) differenziert.

Ergebnisse

Rot eingefärbt ist der Anteil der Proben (n= 86; 47 %), die weder mitochondriale noch chromosomale DNA aufweisen und daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. In Bezug auf die gesamte Probenanzahl (n= 185) fallen circa die Hälfte der untersuchten Proben in diese Kategorie. Der **orange** Teil stellt die Proben dar, die lediglich mitochondriale DNA und keine chromosomale DNA aufweisen (n=36, 19 %). Der **grau** eingefärbt Anteil zeigt die Proben, bei denen zwar chromosomale DNA jedoch keine mtDNA detektiert werden konnte (n= 36; 19 %). Diese Proben wurden aufgrund des abnormen Ergebnisses von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Der kleinste Anteil, der **grau** hinterlegt ist, stellt die Proben dar, die sowohl mitochondriale als auch chromosomale DNA besitzen (n= 27; 15 %). Diese als auch die Proben mit mitochondrialer DNA (n= 36) wurden für weitere Untersuchungen genauer betrachtet. Bei der ersten Auswertung wurde lediglich berücksichtigt ob in einer der beiden analysierten Proben (a oder b) mitochondriale DNA vorliegt. Da bei aDNA Analysen die Reproduzierbarkeit und Authentizität der Ergebnisse von großer Bedeutung ist, wird in dieser Arbeit darauf Wert gelegt sowohl in dem a als auch dem b Extrakt Ergebnisse zu erzielen. Daher wurde überprüft inwieweit in beiden Extrakten mtDNA nachgewiesen werden konnte. In Abbildung 32 wird innerhalb der beiden Einteilungen (mtDNA + / chr. DNA - und mtDNA + / chr. DNA +) zwischen den Proben mit mtDNA in a und b sowie den Proben mit mtDNA in a oder b differenziert. Hierbei zeigt sich, dass bei 14 von 36 Proben ($\approx 40\%$) der Gruppe mtDNA + / chr. DNA - , mitochondriale DNA in a und b detektiert werden konnte. Bei der Gruppe mtDNA + / chr. DNA + konnte dies bei neun der insgesamt 27 Proben ($\approx 30\%$) festgestellt werden. Daraus ergeben sich insgesamt **23 Proben** (jeweils a und b), die für die **Sequenzierung der hypervariablen Regionen I und II** ausgewählt wurden.

Ergebnisse

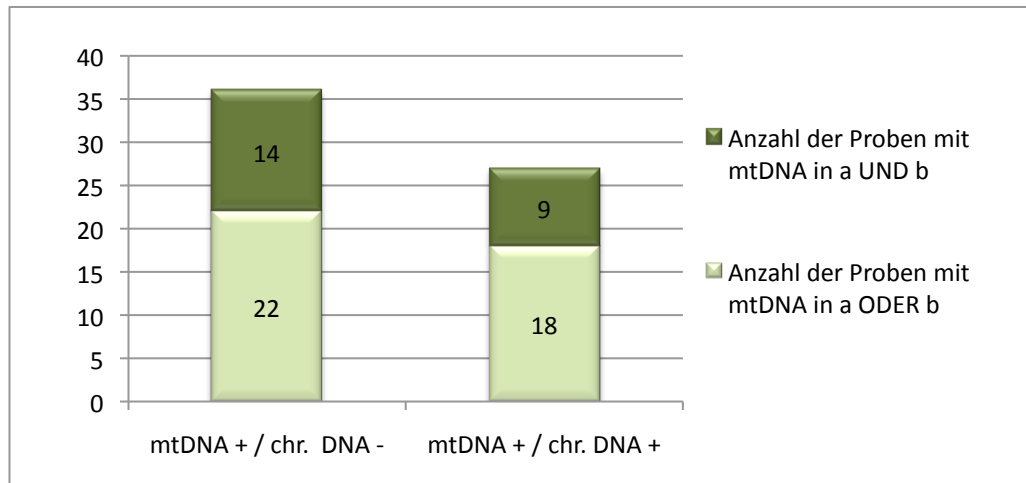


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Proben mit mitochondrialer DNA (= mtDNA) differenziert nach mtDNA in den Extrakten a und b sowie a oder b. Für die Form der Darstellung wurde ein Balkendiagramm gewählt, bei dem der komplette Balken die Gesamtanzahl der Proben darstellt. Diese wurden wiederum unterteilt in die Anzahl der Proben mit mtDNA in beiden Extrakten und in die Anzahl der Proben mit mtDNA in jeweils einem der Extrakte. Das Screening der Proben erfolgte mittels Hexaplex-PCR.

Die Proben mit chromosomaler DNA (n=27) wurden ebenfalls genauer ausgewertet. Die Abbildung 33 zeigt, dass bei etwas mehr als 50 % (15 von 27) der Proben sowohl in dem a als auch b Extrakt chromosomale DNA detektiert werden konnte. Diese **15 Proben** wurden mit zusätzlichen kommerziell erhältlichen **STR-Kits** analysiert. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Ergebnissen sind der Tabelle 32 im Anhang zu entnehmen.

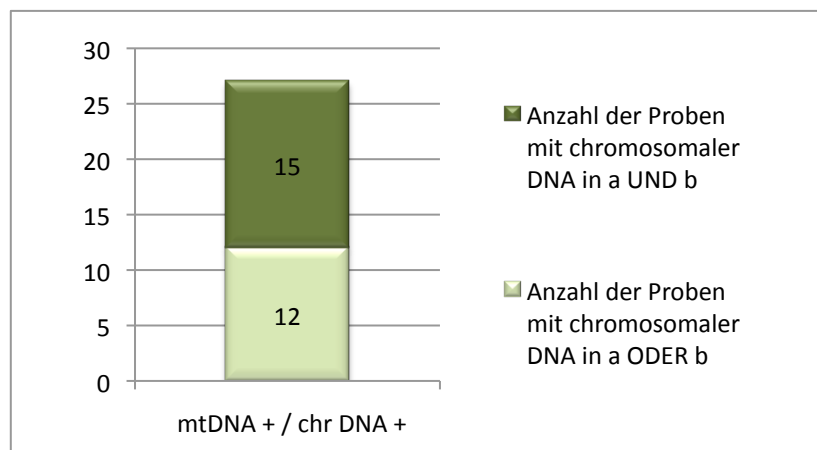


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Proben mit chromosomaler DNA differenziert nach chromosomaler DNA in den Extrakten a und b sowie a oder b. Für die Form der Darstellung wurde ein Balkendiagramm gewählt, bei dem der komplette Balken die Gesamtanzahl der Proben darstellt. Diese wurden wiederum unterteilt in die Anzahl der Proben mit chromosomaler DNA in beiden Extrakten und in die Anzahl der Proben mit chromosomaler DNA in jeweils einem der Extrakte. Das Screening der Proben erfolgte mittels Hexaplex-PCR.

6.1.2 Mittelalterliche Proben

Das Screening der insgesamt 142 mittelalterlichen Proben wurde mit Hilfe des Powerplex S5 Kits von Promega durchgeführt. Dieses wurde durch das Ergänzen zweier mtDNA Primerpaare modifiziert, so dass zusätzlich zu den 4 STRs und dem Geschlechtsmarker Amelogenin die mtDNA in einer Probe detektiert werden kann. Die Auswertung der Daten erfolgte nach dem in Kapitel 6.1.1 beschriebenen Verfahren. In Abbildung 34 sind die Screeningergebnisse in Form eines Tortendiagramms dargestellt.

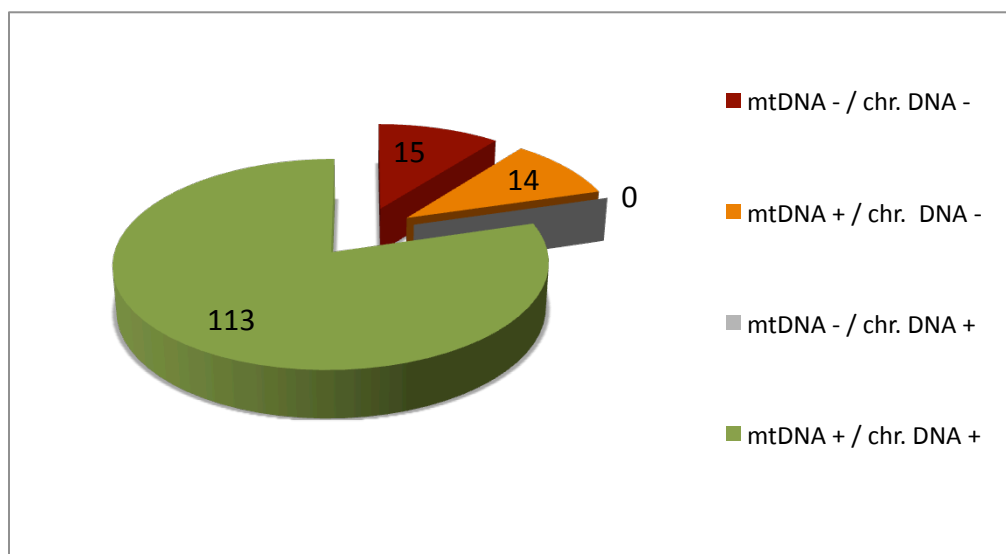


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Screening-Ergebnisse mittels modifiziertem Powerplex® S5 Kit in Form eines Tortendiagramms. Es wurde hierbei zwischen den Einteilungen: keine mtDNA und keine chromosomale DNA (mtDNA - / chr. DNA -), mtDNA aber keine chromosomale DNA (mtDNA + / chr. DNA -), keine mtDNA aber chromosomale DNA (mtDNA - / chr. DNA +), mtDNA und chromosomale DNA (mtDNA + / chr. DNA +) differenziert.

Anhand der Abbildung 34 wird deutlich, dass circa 80 % (113 von insgesamt 142) der mittelalterlichen Proben, hier **grün** hinterlegt, sowohl mitochondriale als auch chromosomale DNA aufweisen. Proben mit abnormen Ergebnissen wie beim neolithischen Probenkollektiv lagen bei den mittelalterlichen Proben nicht vor. Der **orangegefärbte** Anteil stellt die Proben dar, bei denen lediglich mitochondriale und keine chromosomale DNA detektiert werden konnte (n= 14; 10 %). Zusätzlich zeigten 15 der Proben (10 %) in der Analyse, hier **rot** eingefärbt, weder mitochondriale noch chromosomale DNA. Diese Proben wurden komplett von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen. Die übrigen Proben der Einteilungen mtDNA + / chr. DNA - und mtDNA + / chr.

Ergebnisse

DNA + wurden wie im vorherigen Abschnitt genauer ausgewertet. Anhand der Abbildung 35 wird deutlich, dass sowohl bei den Proben mit mitochondrialer DNA als auch bei den Proben mit mitochondrialer und chromosomaler DNA die Anzahl der Proben mit positiven Ergebnissen im a und b Extrakt bei über 90 % (13 von 14, 103 von 113) liegt. Insgesamt wurden **116** Proben für die **Sequenzierung der hypervariablen Regionen I und II** der mtDNA ausgewählt.

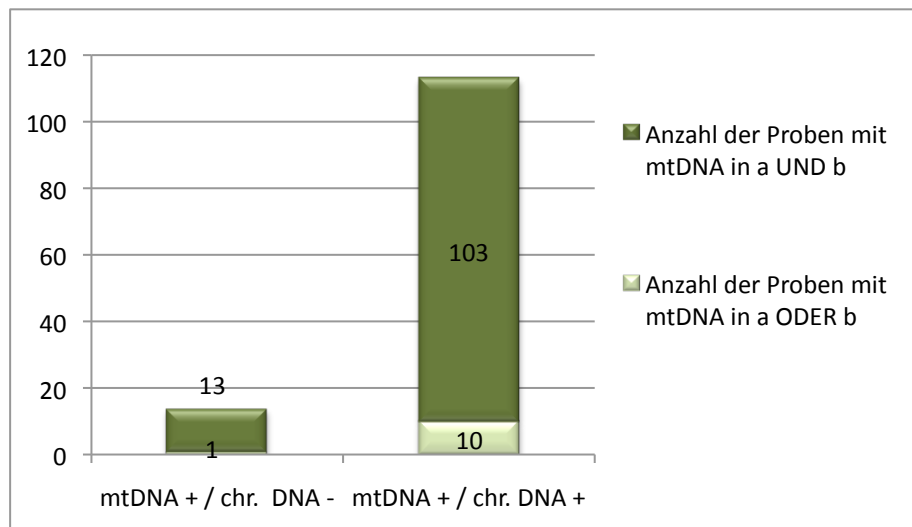


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Proben mit mitochondrialer DNA (= mtDNA) differenziert nach mtDNA in den Extrakten a und b sowie a oder b. Für die Form der Darstellung wurde ein Balkendiagramm gewählt, bei dem der komplette Balken die Gesamtanzahl der Proben darstellt. Diese wurden wiederum unterteilt in die Anzahl der Proben mit mtDNA in beiden Extrakten und in die Anzahl der Proben mit mtDNA in jeweils einem der Extrakte. Das Screening der Proben erfolgte mittels Powerplex® S5 Kit .

Für die Untersuchung zusätzlicher STRs wurden die Proben mit chromosomaler DNA (n= 113) ebenfalls genauer ausgewertet. Die Abbildung 36 zeigt, dass analog zur mtDNA bei über 90 % (105 von 113) der Proben, im a und b Extrakt, chromosomale DNA detektiert werden konnte. Diese **105 Proben** wurden mit zusätzlichen kommerziell erhältlichen **STR-Kits** analysiert. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Ergebnissen sind der Tabelle 33 im Anhang zu entnehmen.

Ergebnisse

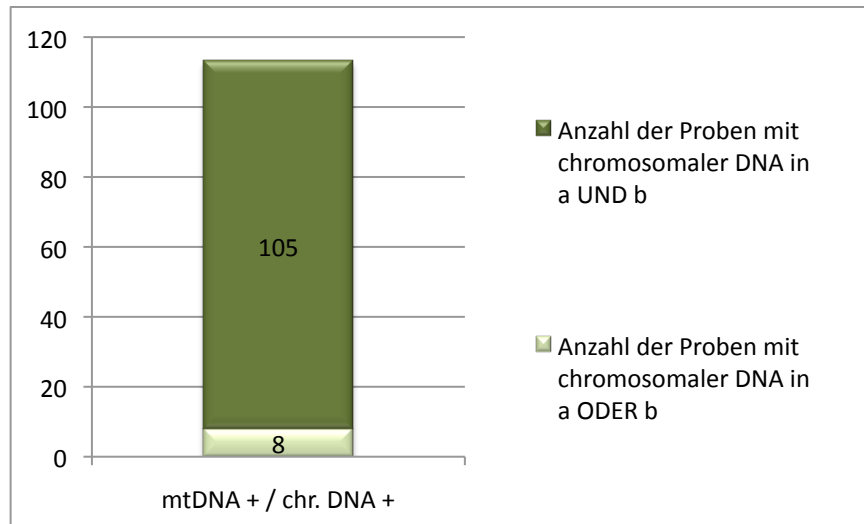


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Proben mit chromosomaler DNA differenziert nach chromosomaler DNA in den Extrakten a und b sowie a oder b. Für die Form der Darstellung wurde ein Balkendiagramm gewählt, bei dem der komplette Balken die Gesamtanzahl der Proben darstellt. Diese wurden wiederum unterteilt in die Anzahl der Proben mit chromosomaler DNA in beiden Extrakten und in die Anzahl der Proben mit chromosomaler DNA in jeweils einem der Extrakte. Das Screening der Proben erfolgte mittels Powerplex® S5 Kit.

6.2 mtDNA

Die Proben, die in der Screening-PCR im a und b Extrakt mitochondriale DNA aufzeigten, wurden für die Sequenzierung der hypervariablen Regionen I und II (= HVRI, HVRII) ausgewählt.

6.2.1 Neolithische Proben

Bei insgesamt 23 (4 %) neolithischen Proben (n= 185) konnte mitochondriale DNA im a und b Extrakt mittels Screening-PCR detektiert werden. Die Amplifikation der Fragmente aus HVRI und HVRII erfolgte mit Hilfe diverser Primerpaarkombinationen (siehe Kapitel 4.6.1). Es zeigten hierbei überwiegend die kürzeren PCR-Fragmente (150 - 180 bp) Amplifikationserfolge.

Letztlich konnten bei acht der 23 Proben (35%) beide Sequenzabschnitte komplett sequenziert werden (siehe Tabelle 34). Vier der acht Proben konnten der **Haplogruppe H** (1x H1, 3x H2), drei der **Haplogruppe HV0** und eine der **Haplogruppe X2** zugeordnet werden. Drei dieser Proben stammen aus Odagsen, vier aus Calden und eine aus Panker. Die übrigen Proben lieferten entweder unvollständige oder von einander abweichende Ergebnisse.

Ergebnisse

Tabelle 34: Tabellarische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der hypervariablen Regionen I und II (HVRI, II) und den daraus resultierenden Haplogruppen der neolithischen Proben. Angegeben sind die Abweichungen zur revised Cambridge Reference Sequence (= rCRS) mit entsprechender Nukleotidposition. Eingerahmt wird diese durch die Abkürzungen der Basenveränderungen (A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin und T= Thymin). Zudem sind die aDNA-Nummern und Fundort mit abgebildet.

aDNA Nummer	Fundort	Polymorphismen aus HVRI	Polymorphismen aus HVRII	Haplogruppe
Haplogruppe H				
a56	Panker	C16263T	A263G	H1
a65	Calden		A263G	H2
a90	Calden		A263G	H2
a164	Odagsen		A263G	H2
Haplogruppe HV0				
a168	Odagsen	T16298C	T72C, A263G	HV0
a186	Odagsen	T16298C	T72C, A263G	HV0
a116	Calden	T16298C	T72C, A263G	HV0
Haplogruppe X				
a125	Calden	G16042A, C16179T, T16189C, C16223T, G16255A, C16278T, T16297C, T16362C	A73G, A153G, T19C, G225A, 5A263G	X2

6.2.2 Mittelalterliche Proben

Bei insgesamt 116 (80 %) mittelalterlichen Proben (n= 142) des Fundorts Diepensee konnte mitochondriale DNA im a und b Extrakt mittels Screening-PCR detektiert werden. Die Amplifikation der Fragmente aus HVRI und HVRII erfolgte mit Hilfe diverser Primerpaarkombinationen (siehe Kapitel 4.6.1). Da die mittelalterlichen Proben größtenteils gute DNA-Qualitäten und -Quantitäten aufweisen, zeigten die größeren PCR-Fragmente (180 - 434 bp) überwiegend gute Amplifikationserfolge. Letztlich konnten bei 32 der 116 Proben (28%) beide Sequenzabschnitte komplett sequenziert werden (siehe Tabelle 35).

Elf Proben konnten der **Haplogruppe H** (7x H, 3x H3d, 1x H5), acht der **Haplogruppe T** (1x T, 2x T1a, 4x T2b, 1x T2f), weitere acht der **Haplogruppe U** (1x U5, 1x U4, 1x U2, 1x U5b1c, 1x U5b3, 1x U5a, 1x U2e1, 1x U4a1), zwei der **Haplogruppe W** (2x W), eine der **Haplogruppe K** (1x K) und zwei der **Haplogruppe J** (1x J, 1x J2b) zugeordnet werden. Die übrigen Proben lieferten entweder unvollständige oder von einander abweichende Ergebnisse.

Ergebnisse

Tabelle 35: Tabellarische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der hypervariablen Regionen I und II (= HVRI, II) und den daraus resultierenden Haplogruppenzuordnungen der mittelalterlichen Proben. Angegeben sind die Abweichungen zur revised Cambridge Reference Sequence (= rCRS) mit entsprechender Nukleotidposition. Eingehrahmt wird diese durch die Abkürzungen der Basenveränderungen (A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin und T= Thymin). Zudem sind die aDNA-Nummern und Fundort mit abgebildet.

aDNA Nummer	Polymorphismen aus HVRI	Polymorphismen aus HVRII	Haplogruppe
Haplogruppe H			
127			H
129			H
291			H
64			H
390			H
108	A16240G		H
268	C16245T		H
288		A73G	H3d
59		A73G	H3d
305		A73G	H3d
238	T16304C, T16356C		H5
Haplogruppe T			
1	T16126C, A16163G, C16186T, T16189C, A16194G, C16294T	A73G	T1a
97	C16294T, T16126C	A73G	T1a
332	T16126C, C16294T, C16187T	A73G	T
205	T16126C, C16294T, T16304C	A73G	T2b
162	T16126C, C16294T, C1629T6, T16304C	A73G	T2b
188	T16126C, C16279T, C16294T, C16296T, T16304C, C16306G	A73G	T2b
383	T16126C, C16294T, C16296T, C16301T	A73G	T2b
227	T16126C, A16182C, A16183C, T16189C, C16294T, C16296T, T16298C	A73G	T2f
Haplogruppe U			
326II	C16192T, T16311C	A73G, C150T, A263G	U5b1c
410	C16270T, T16304C	A73G, C150T, A263G	U5b3
125	C16223T, C16256T, C16270T	A73G	U5a
228	A16183C, T16189C, C16270T	A73G	U5
138	G16129A, T16362C	A263G, 309.1insC, 315.1insC	U2e1
348	A16051G, G16129A, A16183C	A73G	U2
217	C16134T, T16356C	A73G, T152C, T195C, A215G, A263G	U4a1
142	C16095T, T16356C	A73G, C145T, C150T, T195C, A263G	U4
Haplogruppe W			
226	16193insC, C16223T, C16292T	A73G	W
292	C16223T, C16292T, C16320T, T16352C	A189G, T195C, T204C, T207C, A263G	W
Haplogruppe K			
164	T16224C, T16311C	A73G	K1
Haplogruppe J			
403	C16069T, T16126C, 16193insC, C16278T, G16319A	A73G	J
67	T16231C, T16261C, C16290T	A73G	J2a

6.3 Genetischer Fingerabdruck

Bei einigen Proben wurde, zusätzlich zur Sequenzierung der mitochondrialen DNA, ein genetischer Fingerabdruck angefertigt.

6.3.1 Neolithische Proben

15 der insgesamt 185 Proben zeigten in der Hexaplex-Screening-PCR sowohl im a) als auch im b) Extrakt chromosomale DNA (siehe Kapitel 6.1.1), so dass anschließend eine weitere STR-Analyse an diesen Proben erfolgte. Hierfür wurde das PowerPlex®16HS System Kit von Promega verwendet. Da für die Interpretation der Ergebnisse nur die Proben von Interesse sind, bei denen auch eine Haplogruppe ermittelt werden konnte (siehe 6.2.1), sind nur die STR-Ergebnisse dieser Proben in Tabelle 15c angegeben. Es zeigt sich hierbei, dass **in vielen Systemen keine Ergebnisse** erzielt werden konnten. Eine Aussage über mögliche Verwandtschaftsverhältnisse ist in diesem Fall unmöglich. Der **Geschlechtsmarkers Amelogenin** konnte **in sieben der acht Individuen** erfolgreich typisiert werden. Es muss allerdings hierbei erwähnt werden, dass dies teilweise nur als Einzeltypisierung in einer der beiden Extrakte möglich war. **Drei der acht Individuen** konnten als **männlich** typisiert werden, bei alle anderen Ergebnissen mit nur einem X/- konnte keine Aussage übers Geschlecht getroffen werden. Zusätzlich wurden nach jeder Analyse die Ergebnisse mit den STR-Profilen der Labormitarbeiter abgeglichen. Hierbei konnte bei keiner Probe eine Kontamination festgestellt werden.

Ergebnisse

Tabelle 15c: Ergebnisse des PowerPlex 16HS System Kits (Promega) für die neolithischen Proben. Angegeben sind die einzelnen STR-Systeme, die aDNA-Nummern sowie die Analyseergebnisse beider Extrakte für die Proben deren Haplogruppe ebenfalls ermittelt werden konnte. k.E.= kein Ergebnis

STR-Systeme	aDNA-Nummer															
	a56a	a56b	a65a	a65b	a90a	a90b	a116a	a116b	a125a	a125b	a164a	a164b	a168a	a168b	a186a	a186b
Amelo	Y/-	k.E.	k.E.	X/-	X/-	Y/-	X/-	X/-	X/-	X/-	k.E.	X/-	X/-	X/Y	k.E.	k.E.
D3S1358	17/-	k.E.	k.E.	15/-	15/19	15-	14/16	k.E.	k.E.	14/-	17/-	k.E.	16/-	19/-	k.E.	k.E.
vWA	16/-	k.E.	k.E.	k.E.	16/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	16/-	15/17	k.E.	k.E.	21/-	k.E.	k.E.
FGA	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
D8S1179	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	12/13	12/13	12/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
D21S11	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	32.2	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	31.2/-	31.2/-	31/-	k.E.	k.E.	k.E.
D18S51	k.E.	k.E.	k.E.	13/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	12/-	k.E.	k.E.	k.E.	12/-	k.E.	k.E.	k.E.
D5S818	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	11/-	k.E.	k.E.	11/-	11/-	k.E.	11/-	k.E.	k.E.	15/-	k.E.	k.E.
D13S317	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	11/-	k.E.	k.E.	k.E.	12/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
D7S820	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	8/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
CSF1PO	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
TH01	k.E.	k.E.	k.E.	9/-	9.3/-	9.3/-	9/-	k.E.	k.E.	6/-	k.E.	k.E.	6/-	9/-	k.E.	k.E.
TPOX	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	8/-	k.E.	10/11	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	8/-	9/-	k.E.	k.E.	k.E.
D16S536	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	11/14	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
PentaE	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	10/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
Penta D	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	12/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.

6.3.2 Mittelalterliche Proben

105 der insgesamt 142 Proben zeigten in der modifizierten Powerplex® S5 Screening-PCR (Promega) sowohl im a) als auch im b) Extrakt chromosomale DNA (siehe Kapitel 6.1.2), so dass anschließend eine weitere STR-Analyse an diesen Proben erfolgte. Hierfür wurde das AmpFiSTR® NGM™ Kit von Applied Biosystems verwendet. Da für die Interpretation der Ergebnisse nur die Proben von Interesse sind, bei denen auch eine Haplogruppe ermittelt werden konnte (siehe 6.2.2), sind nur die STR-Ergebnisse dieser Proben in Tabelle 15c angegeben.

Es zeigt sich hierbei, dass **bei insgesamt fünf Individuen** (1, 108, 127, 390 und 403) **fast vollständige genetische Profile** erstellt werden konnten. Bei den restlichen Individuen konnten entweder Teilprofile oder wie bei den Individuen 332 und 226 gar keine Systeme detektiert werden.

Der **Geschlechtsmarkers Amelogenin** konnte **in 25 der 30** erfolgreich typisiert werden. Es muss allerdings hierbei erwähnt werden, dass dies teilweise nur als Einzeltypisierung in einer der beiden

Ergebnisse

Extrakte möglich war. **11 der 30 Individuen** konnten als **männlich** typisiert werden, bei allen anderen Ergebnissen mit nur einem X/- konnte keine Aussage über das Geschlecht getroffen werden. Zusätzlich wurden nach jeder Analyse die Ergebnisse mit den STR-Profilen der Labormitarbeiter abgeglichen. Hierbei konnte bei keiner Probe eine Kontamination festgestellt werden.

Tabelle 16c: Ergebnisse des AmpFISTR®NGM™ Kits (Applied Biosystems) für die mittelalterlichen Proben. Angegeben sind die einzelnen STR-Systeme, die aDNA-Nummern sowie die Analyseergebnisse beider Extrakte für die Proben deren Haplogruppe ebenfalls ermittelt werden konnte. k.E.= kein Ergebnis

	aDNA-Nummer															
Systeme	1a	1b	59a	59b	64a	64b	67a	67b	97a	97b	108a	108b	125a	125b	127a	127b
Amelogenin	X/-	X/-	k.E.	X/-	X/-	k.E.	k.E.	X/Y	X/-	X/-	X/-	X/-	X/-	X/-	X/-	X/-
D10S1248	13/14	13/16	k.E.	14/15	15/16	k.E.	k.E.	14/-	13/17	13/17	14/16	14/16	14/-	13/14	13/-	13/-
vWA	17/18	17/-	k.E.	k.E.	17/18	k.E.	k.E.	14/15	17/-	17/-	15/21	21/-	17/-	18/-	14/-	14/-
D16S539	11/-	13/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	9/-	9/-	13/-	13/-	k.E.	k.E.	11/-	11/-
D2S1338	k.E.	16/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	30/-	k.E.	k.E.	k.E.	17/-		k.E.	k.E.	20/-	k.E.
D8S1179	13/15	13/-	15/-	15/16	11/12	k.E.	k.E.	13/14	11/15	11/15	13/15	13/15	14/-	13/14	12/14	12/14
D21S11	29/32.2	29/32.2	k.E.	k.E.	29/30	k.E.	k.E.	27/30	28/31.2	28/31.2	k.E.	28/30	k.E.	28/-	27/-	31.2/-
D18S51	13/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	16/-	15/16	k.E.	k.E.	16/-	k.E.
D22S1045	k.E.	11/15	k.E.	16/-	15/16	k.E.	k.E.	16/-	15/-	15/-	11/15	11/15	15/-	15/-	16/17	17/-
D19S433	14/15	14/15	k.E.	13/14	12/15	12/15	13.2/-	13.2/-	13/15.2	13/15.2	14/15	14/15	14/-	14/-	13/14	13/14
TH01	10/-	8/-	k.E.	k.E.	7/-	k.E.	11/-	9/-	6/9	6/9	8/-	7/-	9.3/-	6/-	9/-	9/-
FGA	21/-	21/-	k.E.	20/23	22/23	k.E.	k.E.	21/-	k.E.	20/23	20/25	25/-	k.E.	20/21	21/24	24/-
D2S441	11/11.3	11/11.3	11/-	11/-	10/11	10/11	14/-	11/14	11/-	11/-	11/14	11/14	10/11	10/11	11/-	11/-
D3S1358	14/18	18/-	k.E.	18/-	16/17	k.E.	k.E.	16/-	15/-	15/-	14/17	14/17	16/-	16/-	16/-	14/16
D1S1656	16.3/19.3	k.E.	k.E.	k.E.	16/-	k.E.	12/-	k.E.	15.3/-	15.3/18.3	11/12	11/-	16.3/-	15/-	13/15	13/15
D12S391	23/-	17/-	k.E.	k.E.	20/21	k.E.	k.E.	22/-	18/-	k.E.	15/20	k.E.	19/-	19/20	k.E.	16/-

Systeme	129a	129b	138a	138b	142a	142b	162a	162b	164a	164b	188a	188b	205a	205b	217a	217b
Amelogenin	X/-	X/-	k.E.	X/-	Y/-	X/-	k.E.	k.E.	X/-	X/-	k.E.	k.E.	X/-	X/-	X/Y	X/Y
D10S1248	14/16	14/16	13/14	13/-	16/-	k.E.	k.E.	k.E.	13/-	13/14	k.E.	13/-	14/15	k.E.	14/-	14/-
vWA	17/-	14/-	16/-	k.E.	16/18	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	14/-	16/-	12/-	k.E.	15/17
D16S539	k.E.	k.E.	k.E.	9/10	k.E.	12/-	k.E.	k.E.	12/-	11/-	k.E.	9/-	k.E.	k.E.	11/-	11/-
D2S1338	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	14/-	25/-	k.E.
D8S1179	14/-	10/-	k.E.	14/-	14/-	14/-	15/-	k.E.	8/-	8/12	k.E.	18/-	k.E.	k.E.	11/12	11/12
D21S11	k.E.	31.2/-	k.E.	k.E.	30/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	29/30	31.2/-	k.E.	29/-	29/30
D18S51	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	14/-	k.E.	k.E.	11/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	14/-	k.E.	20/-
D22S1045	14/-	14/16	14/15	14/15	15/-	k.E.	k.E.	k.E.	15/-	12/15	11/-	11/-	15/-	k.E.	15/17	15/17
D19S433	15.2/-	14/-	k.E.	14.2/-	13/14	13/-	15.2/-	k.E.	13.2/14	13.2/14	k.E.	13/14	15.2/-	13/-	13/14	13/14
TH01	k.E.	9.3/-	k.E.	6/-	11/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	6/9	k.E.	9.3/-	6/-	k.E.	7/-	7/8
FGA	k.E.	23/25	23/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	19/24	19/24
D2S441	k.E.	11/14	11/-	10/-	k.E.	11/-	k.E.	k.E.	k.E.	11/15	11/-	9/11	12.3/-	11/-	11/11.3	11/11.3
D3S1358	k.E.	15/17	k.E.	15/-	18/-	18/-	k.E.	k.E.	k.E.	14/15	k.E.	16/17	15/18	18/-	16/-	16/18
D1S1656	11/-	k.E.	17/-	k.E.	17.3/-	k.E.	k.E.	k.E.	14/-	k.E.	k.E.	17.3/-	k.E.	k.E.	13/19.3	12/13
D12S391	k.E.	k.E.	21/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	18/-	k.E.	k.E.	21/-

Ergebnisse

Systeme	226a	226b	227a	227b	228a	228b	238a	238b	268a	268b	288a	288b	291a	291b	292a	292b
Amelogenin	k.E.	k.E.	X/-	X/-	k.E.	X/-	k.E.	X/Y	k.E.	k.E.	X/Y	X/Y	X/-	Y/-	X/-	X/-
D10S1248	k.E.	k.E.	13/-	13/-	k.E.	15/-	k.E.	13/14	k.E.	k.E.	13/14	13/14	k.E.	14/15	12/-	12/-
vWA	k.E.	k.E.	16/-	16/-	k.E.	k.E.	k.E.	15/-	k.E.	k.E.	19/-	16/19	k.E.	16/-	14/-	14/-
D16S539	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	9/11	k.E.	k.E.	9/-	9/-	k.E.	k.E.	k.E.	9/-
D2S1338	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	25/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	24/25
D8S1179	k.E.	k.E.	14/-	14/-	14/-	k.E.	k.E.	14/-	k.E.	k.E.	13/14	13/14	k.E.	16/18	12/-	12/13
D21S11	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	29/30	k.E.	k.E.	29/30	k.E.	k.E.	k.E.	28/30	30/-
D18S51	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	14/17	k.E.	k.E.	16/17	k.E.	k.E.	k.E.	13/-	k.E.
D22S1045	k.E.	k.E.	15/16	k.E.	11/16	11/16	k.E.	11/15	k.E.	15/-	11/16	11/16	k.E.	16/-	16/-	k.E.
D19S433	k.E.	k.E.	13/14.2	13/14.2	14/15	14/15	k.E.	13/17	14/-	k.E.	14/15	14/15	12/-	k.E.	k.E.	14/-
TH01	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	6/7	k.E.	k.E.	7/-	6/7	k.E.	k.E.	k.E.	6/9.3
FGA	k.E.	k.E.	20/-	20/-	k.E.	20/-	k.E.	21/22	k.E.	k.E.	22/24	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
D2S441	k.E.	k.E.	11/14	11/14	12/12.3	12/-	k.E.	10/14	k.E.	11/-	12/14	12/14	14/-	11/-	10/14	10/14
D3S1358	k.E.	k.E.	k.E.	17/18	k.E.	k.E.	k.E.	14/17	k.E.	k.E.	15/16	15/-	k.E.	k.E.	k.E.	15/17
D1S1656	k.E.	k.E.	15/16	15/16	k.E.	k.E.	k.E.	11/14	k.E.	k.E.	16.3/-	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	13/-
D12S391	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	17/19	k.E.	k.E.	22/25	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	18/-

Systeme	332a	332b	348a	348b	383a	383b	390a	390b	403a	403b	410a	410b
Amelogenin	k.E.	k.E.	X/-	Y/-	k.E.	X/Y	X/-	X/-	X/Y	X/-	k.E.	X/-
D10S1248	k.E.	k.E.	13/14	13/-	k.E.	13/-	16/-	13/16	14/-	13/16	14/-	13/15
vWA	k.E.	k.E.	k.E.	16/-	k.E.	19/-	17/-	14/-	17/-	14/-	k.E.	16/-
D16S539	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	11/12	12/-	12/13	9/13	12/13	k.E.	9/11
D2S1338	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	18/23	k.E.	k.E.	19/20	17/19	k.E.	12/13
D8S1179	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	14/-	12/14	15/18	11/-	11/15	k.E.	30/-
D21S11	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	28/32.2	31.2/-	28/-	29/-	34.2/-	k.E.	12/-
D18S51	k.E.	k.E.	16/-	k.E.	k.E.	12/-	k.E.	13.2/-	13/14	13.2/-	k.E.	16/-
D22S1045	k.E.	k.E.	16/-	16/-	k.E.	16/-	15/-	16/17	11/15	16/17	16/-	13/-
D19S433	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	12/13	14/16	12/13	13/14	12/13	k.E.	8/-
TH01	k.E.	k.E.	22/-	9.3/-	k.E.	6/9	6/8	6/9	9/-	6/-	9/-	23/24
FGA	k.E.	k.E.	11/-	k.E.	k.E.	23/-	21/-	22/-	22/-	22/-	16/25	10/13
D2S441	k.E.	k.E.	k.E.	11/-	k.E.	11/11.3	10/11	10/11	10/14	10/11	k.E.	16/17
D3S1358	k.E.	k.E.	k.E.	16/-	k.E.	17/18	15/16	14/15	17/18	14/15	17/-	k.E.
D1S1656	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	14/17	15.3/-	18.3/-	12/15	16.3/18.3	k.E.	17/21
D12S391	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	17.3/20	19.3/20	k.E.	17/22	20.3/-	k.E.	k.E.

6.4 Pigmentierungsrekonstruktion mittels SNP-Analyse

Die Proben, bei denen eine Haplogruppe bestimmt werden konnte, wurden zusätzlich mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Pigmentierungs-SNPs, analysiert. Dafür wurden die Assays aus Kapitel 4.7 verwendet, die speziell für aDNA-Analysen etabliert wurden.

6.4.1 Neolithische Proben

Bei sechs der insgesamt acht Proben mit Haplogruppenzuordnung konnten zusätzlich einige der beschriebenen Pigmentierungs-SNPs detektiert werden. Die Analyseergebnisse sind in Tabelle 36 dargestellt. Nur reproduzierte Ergebnisse wurden angegeben und anschließend interpretiert.

Ergebnisse

Der SNP **rs12913832** aus dem HERC2-Gen konnte bei **vier Proben der acht Proben** typisiert werden. Drei dieser Proben stammen aus Calden und eine aus Panker. Zusätzlich lieferten die SNPs **rs1805007** und **rs1805008** aus dem MC1R-Gen Typisierungserfolge bei **vier Proben** (zwei aus Odagsen, eine aus Calden und Panker), die zum Teil ebenfalls Ergebnisse im SNP rs12913832 erbrachten. Die Analyse des SNPs **rs12896399** (SLC24A4-Gen) gelang lediglich im Fall **einer Probe**. Diese stammt aus Calden und zeigte ebenfalls Ergebnisse im SNP rs12913832. Für die SNPs **rs4778138** (OCA2-Gen) und **rs12203592** (IRF4-Gen) konnten **keine Ergebnisse** erzielt werden.

Tabelle 36: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der neolithischen Proben, bei denen die Pigmentierungs-SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 untersucht wurden. Angegeben sind die Ergebnisse die im a und b Extrakt identisch ausfielen. Die SNP Variante wird durch die Abkürzungen der Basen (**G**= Guanin, **T**= Thymin, **C**= Cytosin und **A**= Adenin) angegeben. Zusätzlich sind die aDNA-Nummern, der Fundort sowie die Haplogruppe mit aufgelistet. k.E=kein Ergebnis.

aDNA Nummer	Fundort	Haplogruppe	-832	-007	-008	-138	-592	399
a56a	Panker	H1	G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a56b			G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a65a	Calden	H2	G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a65b			G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a90a	Calden	H2	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E
a90b			k.E	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E
a116a	Calden	HV0	-/A	k.E	k.E	k.E	k.E	-/T
a116b			-/A	k.E	k.E	k.E	k.E	-/T
a125a	Calden	X2	G/-	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E
a125b			G/-	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E
a164a	Odagsen	H2	k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a164b			k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a168a	Odagsen	HV0	k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a168b			k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
a186a	Odagsen	HV0	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E
a186b			k.E	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E

Resultierend aus dem Genotyp kann die Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung der Augen-, Haar- und Hautfarbe jeder einzelnen Individuums ermittelt werden (siehe Kapitel 5.2.1). Die Tabelle 37 stellt die Phänotypen der analysierten Proben basierend auf den ermittelten Genotypen der Tabelle 36 dar. In dieser sind die Pigmentierungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit in farbiger

Ergebnisse

Form dargestellt. Es zeigt sich, dass **drei Individuen** eine hohe Wahrscheinlichkeit (89%) für die Ausprägung **blauer Augen** aufweisen. Zusätzlich lässt der Genotyp der **Probe a116** vermuten, dass dieses Individuum **braunäugig** (Wahrscheinlichkeit von 95 %) und **schwarzhaarig** (Wahrscheinlichkeiten von 49 %, 70 % oder 85 %) war. Teilweise kann keine exakte Wahrscheinlichkeit ermittelt werden, da die Informationen zu einem oder mehreren SNPs des nötigen Genotyps fehlen. Somit wurden die jeweils höchsten Wahrscheinlichkeiten der möglichen Genotypen angegeben. Dies betrifft ebenso die Hauttypenwahrscheinlichkeiten der Proben a56, a65, a164 und a168. Hier liegen lediglich Ergebnisse der SNPs rs1805007 und rs1805008 vor. Aufgrund fehlender Ergebnisse des SNPs rs4778138 kommen somit insgesamt drei Genotypen in Frage. Die bereits genannten **vier Individuen** weisen in allen drei Genotypkonstellationen Wahrscheinlichkeiten von über 50 % für den **Hauttyp III** (51 %, 67 % und 72 %). Eine Zusammenfassung der ermittelten Pigmentierungen der neolithischen Individuen ist in Abbildung 37 in Form eines Tortendiagramms dargestellt. Zusätzlich ist in Abbildung 38 eine weitere Darstellung der Ergebnisse in Kombination mit den ermittelten Haplogruppen zu finden.

Tabelle 37: Tabellarische Darstellung der Pigmentausprägungen der neolithischen Proben basierend auf den Wahrscheinlichkeiten, die sich aus den unterschiedlichen Genotypen der SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 ergeben. Angegeben sind immer die höchsten Wahrscheinlichkeiten eines oder mehrerer Genotypen. Zusätzlich sind die aDNA-Nummern, der Fundort, die zeitliche Einordnung sowie das Analyseergebnis des Geschlechtsmarkers Amelogenin aufgelistet. k.E.=kein Ergebnis.

aDNA Nummer	Haplogruppe (Geschlechtsmarker)	Fundort	Zeit	Augenfarbe	Hauttyp	Haarfarbe	Rotstich
a56a	H1 (Y/-)	Panker	2 800 BC	blau, 0,89	III, 0,67; 0,72; 0,51	k.E.	kein Rotstich
a56b							
a65a	H2 (X/-)	Calden	3400 - 3000 BC	blau, 0,89	III, 0,67; 0,72; 0,51	k.E.	kein Rotstich
a65b							
a116a	HV0 (X/-)	Calden		braun, 0,95	k.E.	schwarz, 0,85, 0,70, 0,49	k.E.
a116b							
a125a	X2 (X/-)	Calden		blau, 0,89	k.E.	k.E.	k.E.
a125b							
a164a	H2 (X/-)	Odagsen		k.E.	III, 0,67; 0,72; 0,51	k.E.	kein Rotstich
a164b							
a168a	HV0 (X/Y)	Odagsen		k.E.	III, 0,67; 0,72; 0,51	k.E.	kein Rotstich
a168b							

Ergebnisse

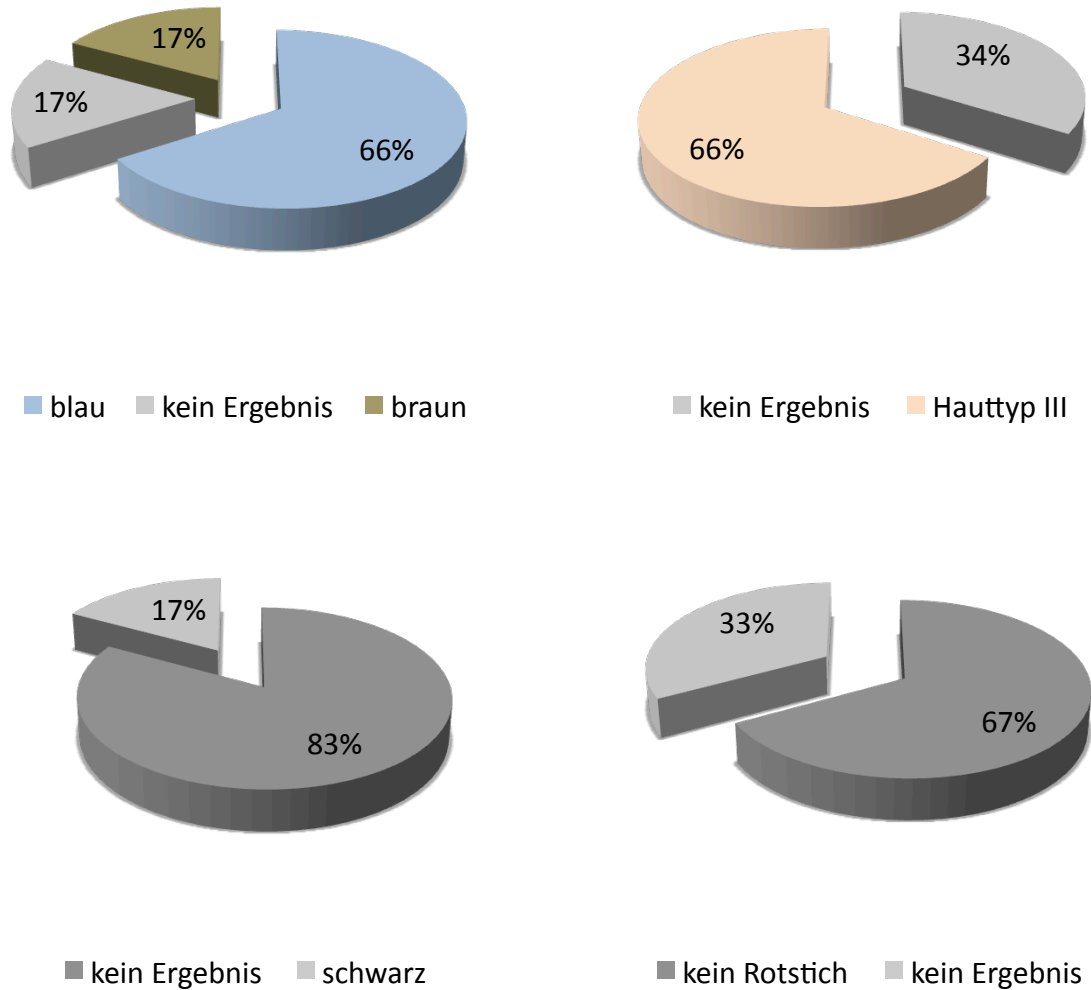


Abbildung 37: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Augen-, Haar- und Hauttypen in Form eines Tortendiagramms (neolithische Proben). Dargestellt sind die Verteilungen der sechs typisierten neolithischen Proben in Prozent. a) Augenfarben eingeteilt nach blau, grün und braun; b) Hauttypen eingeteilt nach I,II,III und IV; c) Haarfarben eingeteilt nach blond, braun und schwarz; d) Rotstich eingeteilt nach Vorhandensein oder Fehlen.

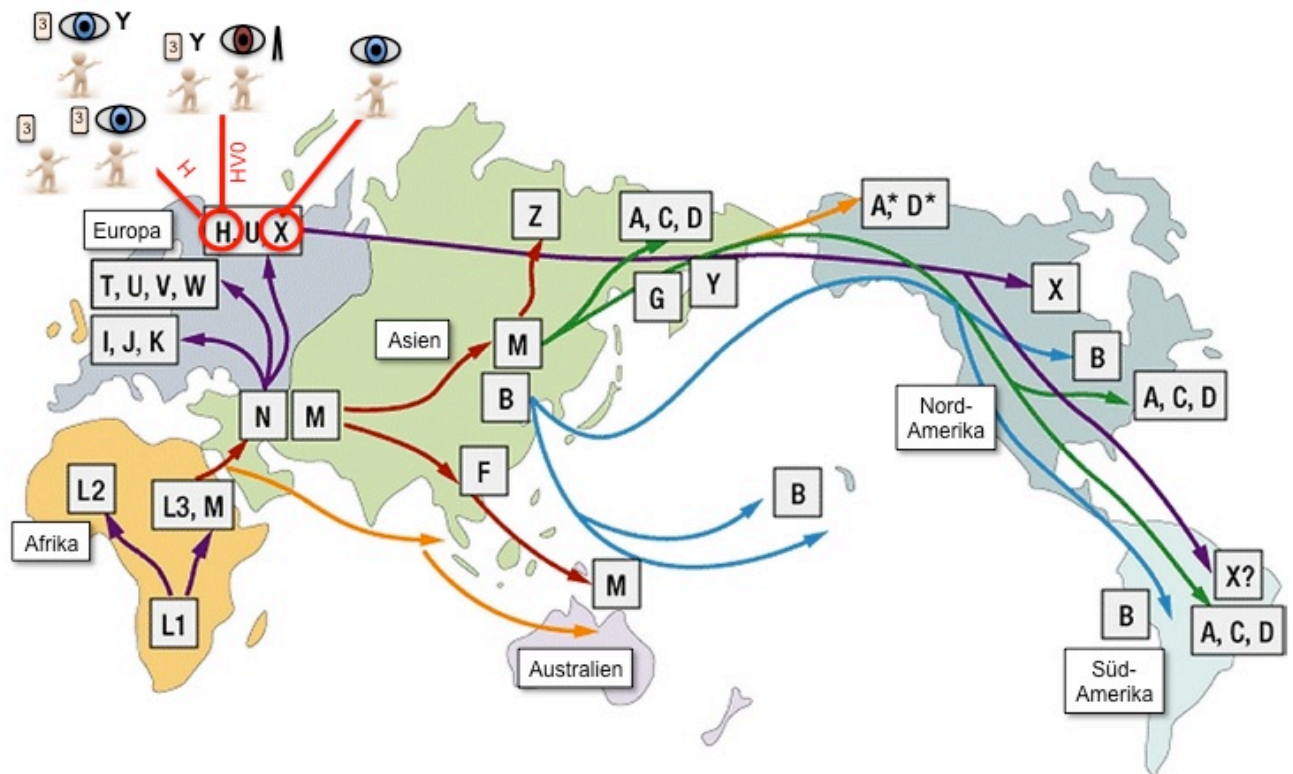





Abbildung 38: Schematische Darstellung der Wanderbewegung aller mitochondrialen Haplogruppen sowie die Pigmentierungserscheinungen und Haplogruppen der typisierten neolithischen Proben (verändert nach www.igeneea.com Stand: 04.12.12). Die ermittelten Haplogruppen sind rot eingekreist und die Individuen der jeweiligen Haplogruppen sind in Form kleiner Figuren dargestellt. Folgende Symbole wurden für die Darstellung der Pigmentierungsmerkmale eingesetzt:

 = Augenfarbe blau,  = Augenfarbe braun, I = Haarfarbe schwarz,  = Hauttyp III

6.4.2 Mittelalterliche Proben

Bei 21 der insgesamt 32 Proben mit Haplogruppenzuordnung konnten einige der Pigmentierungs-SNPs detektiert werden. Die Analyseergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt. Nur reproduzierte Ergebnisse wurden angegeben und anschließend interpretiert. Proben ohne eindeutiges Ergebnis wurden in der Tabelle 38 nicht mit aufgelistet.

Der SNP **rs12913832** aus dem *HERC2*-Gen konnte aus **17 Proben** der insgesamt 32 Proben typisiert werden. Zusätzlich lieferten die SNPs **rs1805007** und **rs1805008** aus dem *MC1R*-Gen Typisierungserfolge bei **20** der insgesamt 32 Proben. Die Ausprägung des SNPs **rs4778138** (*OCA2*-Gen) und die des SNPs **rs12896399** (*SLC24A4*-Gen) konnte jeweils bei **11 Proben** bestimmt werden. Die Typisierung des SNPs **rs12203592** (*IRF4*-Gen) gelang bei **13 Proben**.

Ergebnisse

Tabelle 38: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der mittelalterlichen Proben, bei denen die Pigmentierungs-SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 untersucht wurden. Angegeben sind die Ergebnisse die im a und b Extrakt identisch ausfielen. Die SNP Variante wird durch die Abkürzungen der Basen (G= Guanin, T= Thymin, C= Cytosin und A= Adenin) angegeben. Zusätzlich sind die aDNA-Nummern und die Haplogruppe mit aufgelistet. k.E=kein Ergebnis.

aDNA Nummer	Haplogruppe	-832	-007	-008	-138	-592	-399
59a	H3d	G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
59b		G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
97a	T1a	k.E	C/-	C/-	- /A	k.E	k.E
97b		k.E	C/-	C/-	- /A	k.E	k.E
125a	U5a	k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
125b		k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
127a	H	k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
127b		k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
129a	H	G/A	C/T	C/-	G/A	C/-	k.E
129b		G/A	C/T	C/-	G/A	C/-	k.E
138a	U2e1	G/-	C/-	C/-	k.E	T/-	G/-
138b		G/-	C/-	C/-	k.E	T/-	G/-
162a	T2b	G/A	C/-	C/-	G/A	k.E	G/-
162b		G/A	C/-	C/-	G/A	k.E	G/-
164a	K1	G/-	C/-	C/-	k.E	C/-	G/T
164b		G/-	C/-	C/-	k.E	C/-	G/T
188a	T2b	k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
188b		k.E	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
226a	W	G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
226b		G/-	C/-	C/-	k.E	k.E	k.E
227a	T2f	G/-	C/-	C/-	- /A	C/-	k.E
227b		G/-	C/-	C/-	- /A	C/-	k.E
238a	H5	G/-	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E
238b		G/-	k.E	k.E	k.E	k.E	k.E
268a	H	G/-	C/-	C/-	- /A	C/-	G/T
268b		G/-	C/-	C/-	- /A	C/-	G/T
288a	H3d	G/	C/-	C/-	k.E	C/-	G/
288b		G/-	C/-	C/-	k.E	C/-	G/
305a	H3d	G/A	C/-	C/-	- /A	C/-	- /T
305b		G/A	C/-	C/-	- /A	C/-	- /T
326IIa	U5b1c	G/	- /T	C/-	- /A	C/-	G/-
326IIb		G/	- /T	C/-	- /A	C/-	G/-
348a	U2	G/A	C/-	C/-	- /A	C/-	G/-
348b		G/A	C/-	C/-	- /A	C/-	G/-
383a	T2b	G/-	C/-	C/-	k.E	C/-	k.E
383b		G/-	C/-	C/-	k.E	C/-	k.E
390a	H	G/-	C/-	C/-	- /A	C/-	- /T
390b		G/-	C/-	C/-	- /A	C/-	- /T
403a	J	G/A	C/-	C/-	G/A	C/-	G/-
403b		G/A	C/-	C/-	G/A	C/-	G/-
410a	U5b3	G/-	C/-	C/T	- /A	C/T	G/-
410b		G/-	C/-	C/T	- /A	C/T	G/-

Ergebnisse

Resultierend aus dem Genotyp kann auch für die mittelalterlichen Proben die Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung der Augen-, Haar- und Hautfarbe jeder einzelnen Probe ermittelt werden (siehe Kapitel 5.2.1). Die Tabelle 39 stellt die Phänotypen der analysierten Proben basierend auf den ermittelten Genotypen der Tabelle 38 dar. In dieser sind die Pigmentierungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit in farbiger Form dargestellt.

Es zeigt sich, dass **zwölf der Individuen** hohe Wahrscheinlichkeiten (89 %) für die Ausprägung eines **blauen Auges** aufweisen. Bei **fünf weiteren Proben** ist die Ausprägung **brauner Augen** sehr wahrscheinlich (44%). Bezüglich des Hauttyps kann bei **19 Proben** mit Wahrscheinlichkeiten von 51 - 72 % der **Hauttyp III** und bei **einer Probe der Hauttyp II** (63 %) angenommen werden. Zusätzlich liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 51 % und 87 % bei **zwei** der insgesamt 21 analysierten Proben, ein **Rotstich im Haar** vor. Es zeigen sich zudem bei den Haarfarben insgesamt **12 blonde Individuen** mit Wahrscheinlichkeiten von 58 % bis 80 % sowie **vier braunhaarige** mit Wahrscheinlichkeiten von 54 % und 55 %. Bei zwei Individuen konnte aufgrund fehlender SNP-Ergebnisse nicht zwischen den Haarfarben blond und braun sowie braun und schwarz differenziert werden.

Eine Zusammenfassung der ermittelten Pigmentierungen der neolithischen Individuen ist in Abbildung 39 in Form eines Tortendiagramms dargestellt. Zusätzlich ist in Abbildung 40 eine weitere Darstellung der Ergebnisse in Kombination mit den ermittelten Haplogruppen zu finden.

Ergebnisse

Tabelle 39: Tabellarische Darstellung der Pigmentausprägungen der mittelalterlichen Proben basierend auf den Wahrscheinlichkeiten, die sich aus den unterschiedlichen Genotypen der SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 ergeben. Angegeben sind immer die höchsten Wahrscheinlichkeiten eines oder mehrerer Genotypen. Zusätzlich sind die aDNA-Nummern, die zeitliche Einordnung sowie das Analyseergebnis des Geschlechtsmarkers Amelogenin aufgelistet. k.E.=kein Ergebnis.

aDNA Nummer	Haplogruppe	Zeit	Augenfarbe	Hauttyp	Haarfarbe	Rotstich
59a	H3d (X/-)	13./14. Jahrhundert	blau, 0,89	III, 0,67, 0,72, 0,51	k.E.	kein Rotstich
59b						
97a	T1a (X/-)		k.E.	III, 0,67	k.E.	kein Rotstich
97b						
125a	U5a (X/-)		k.E.	III, 0,67, 0,72, 0,51	k.E.	kein Rotstich
125b						
127a	H (X/-)		k.E.	III, 0,67	k.E.	kein Rotstich
127b						
129a	H (X/-)		braun, 0,44	III, 0,59	blond 0,58	Rotstich 0,51
129b					braun 0,54, 0,49	
138a	U2e1 (X/-)		blau, 0,89	III, 0,67, 0,72, 0,51	braun, 0,55	kein Rotstich
138b						
162a	T2b (k.E.)		braun, 0,44	III, 0,67, 0,72, 0,51	braun 0,54	kein Rotstich
162b					schwarz 0,64	
164a	K1 (X/-)		blau, 0,89	III, 0,67, 0,72, 0,51	blond 0,72	kein Rotstich
164b						
188a	T2b (k.E.)		k.E.	III, 0,67, 0,72, 0,51	k.E.	kein Rotstich
188b						
226a	W (k.E.)		blau, 0,89	III, 0,67, 0,72, 0,51	k.E.	kein Rotstich
226b						
227a	T2f (X/-)		blau, 0,89	III, 0,67	blond 0,62, 0,72, 0,80	kein Rotstich
227b						
238a	H5 (X/Y)		blau, 0,89	k.E.	k.E.	k.E.
238b						
268a	H (k.E.)		blau, 0,89	III, 0,67	blond 0,72	kein Rotstich
268b						
288a	H3d (X/Y)		blau, 0,89	III, 0,67, 0,72, 0,51	blond 0,62	kein Rotstich
288b						
305a	H3d (X/Y)		braun, 0,44	III, 0,67	blond 0,58	kein Rotstich
305b						
326IIa	U5b1c (X/-)		blau, 0,89	II 0,63	blond 0,62	Rotstich 0,87
326IIb						
348a	U2 (X/Y)		braun, 0,44	III, 0,67	braun 0,54	kein Rotstich
348b						
383a	T2b (X/Y)		blau, 0,89	III, 0,67, 0,72, 0,51	blond 0,62, 0,72, 0,80	kein Rotstich
383b						
390a	H (X/-)		blau, 0,89	III, 0,67	blond 0,80	kein Rotstich
390b						
403a	J (X/Y)		braun, 0,44	III, 0,72	braun 0,54	kein Rotstich
403b						
410a	U5b3 (X/-)		blau, 0,89	III, 0,63	braun 0,55	kein Rotstich
410b						

Ergebnisse

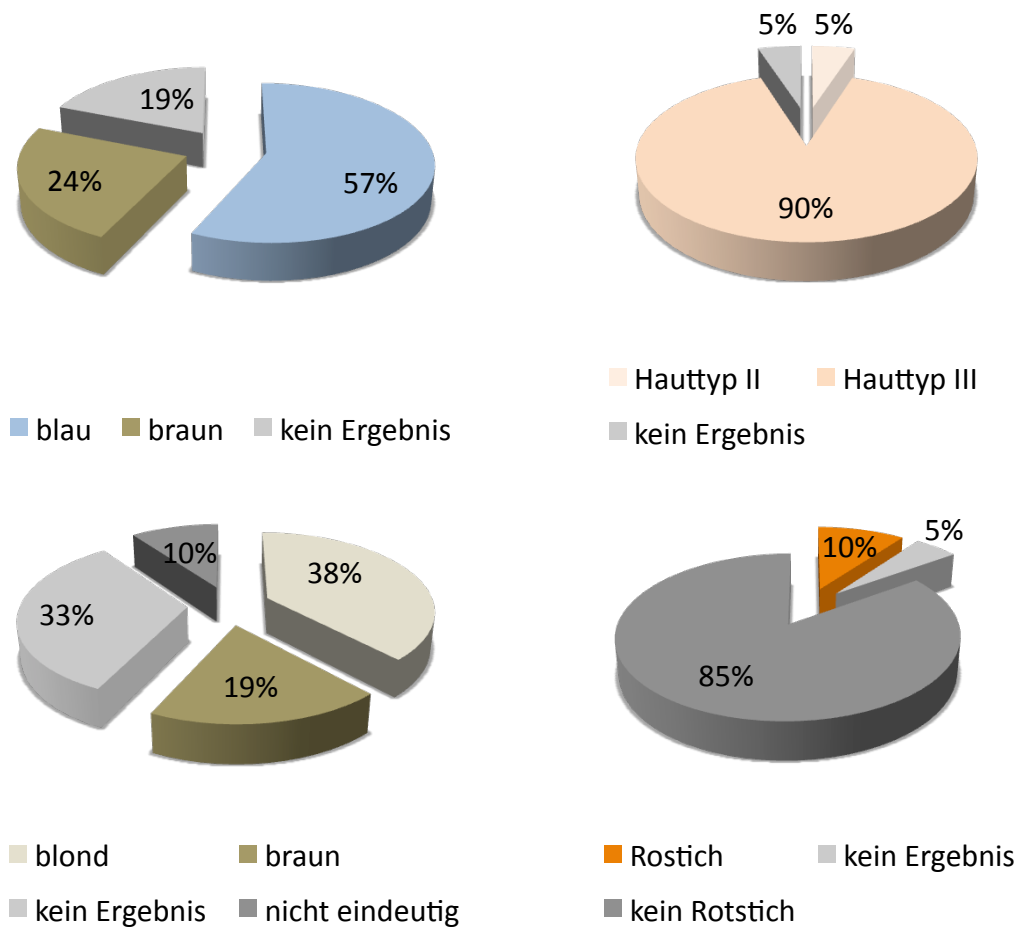


Abbildung 39: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Augen-, Haar- und Hauttypen in Form eines Tortendiagramms (mittelalterliche Proben). Dargestellt sind die Verteilungen der 21 typisierten mittelalterlichen Proben in Prozent. a) Augenfarben eingeteilt nach blau, grün und braun; b) Hauttypen eingeteilt nach I,II,III und IV; c) Haarfarben eingeteilt nach blond, braun und schwarz; d) Rotstich eingeteilt nach Vorhandensein oder Fehlen.

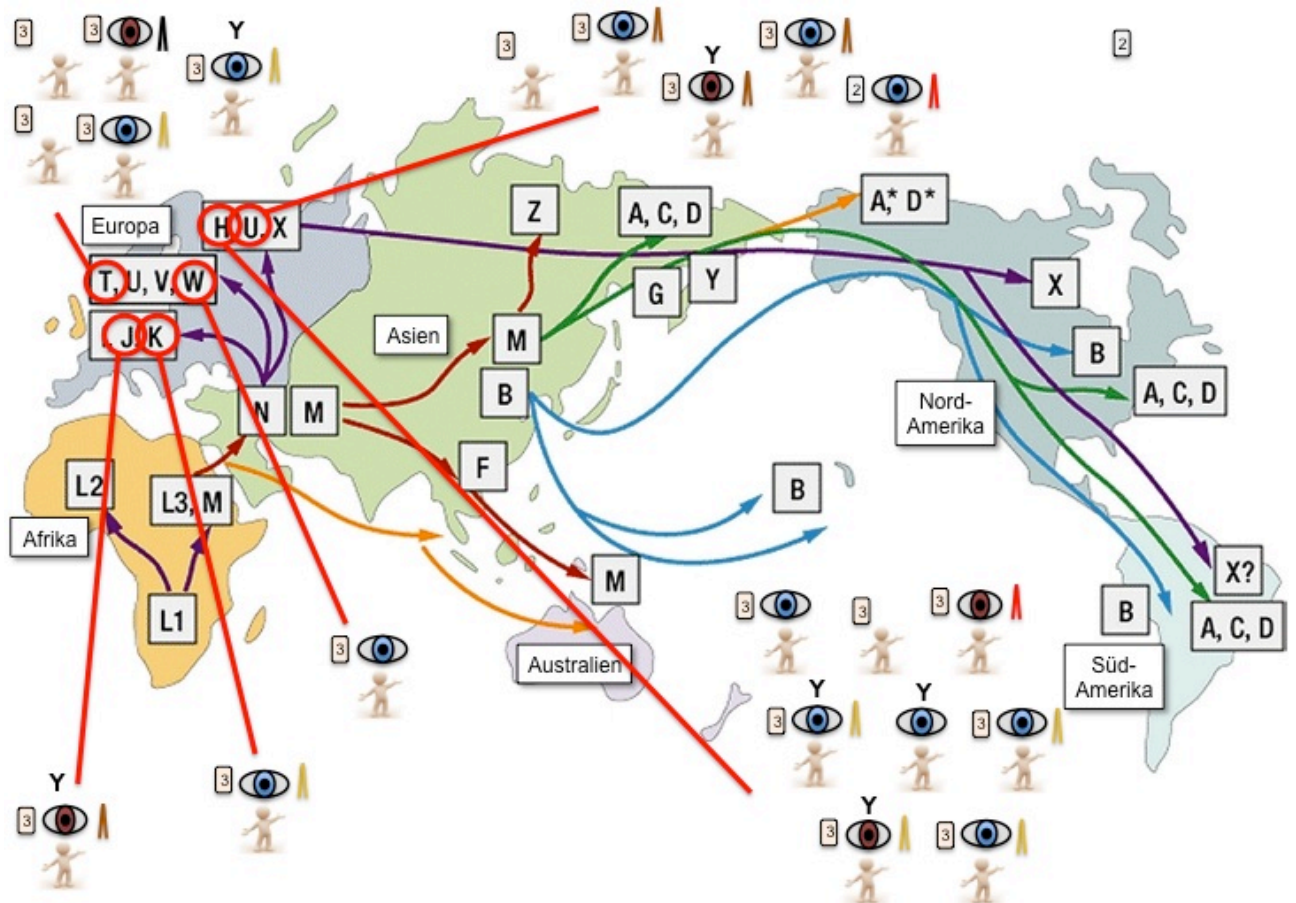


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Wanderbewegung aller mitochondrialen Haplogruppen sowie die Pigmentierungserscheinungen und Haplogruppen der typisierten mittelalterlichen Proben (verändert nach www.igeneea.com Stand: 04.12.12). Die ermittelten Haplogruppen sind rot eingekreist und die Individuen der jeweiligen Haplogruppen sind in Form kleiner Figuren dargestellt. Folgende Symbole wurden für die Darstellung der Pigmentierungsmerkmale eingesetzt:

= Augenfarbe blau; = Augenfarbe braun; = Haarfarbe schwarz; = Haarfarbe blond;
 = Haarfarbe braun; = Haarfarbe mit Rotstich; = Hauttyp II; = Hauttyp III

7. Diskussion

7.1 Aussagekraft der entwickelten Methode

Mit der entwickelten Methode zur **Augenfarbenrekonstruktion** (SNP rs12913832, *HERC2*-Gen) kann mit Wahrscheinlichkeiten bis zu 95 % zwischen den Augenfarben blau, grün und braun unterschieden werden. Hierbei fällt auf, dass der Genotyp G/G mit einer Wahrscheinlichkeit von 89 % die Augenfarbe blau und der Genotyp A/A mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % die Augenfarbe braun vorhersagt. Somit sind beide **homozygoten Varianten stark in ihrer Aussagekraft** und entscheiden über die Ausprägung einer blauen oder braunen Augenfarbe. Detaillierte Differenzierungen zwischen den Augenfarben blau, blau-grün, blau-braun und blau-grün-braun oder braun und braun-grün sind durch die alleinige Analyse des SNPs rs12913832 jedoch nicht möglich. Für die Augenfarbe grün konnte kein Genotyp ermittelt werden, welcher die genannte Ausprägung mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit rekonstruiert. Der höchste Wert von 31 % kann bei der heterozygoten Variante G/A erreicht werden. Diese zeigt jedoch ebenfalls bei der blauen und braunen Augenfarbe Wahrscheinlichkeiten von 25 % und 44 %. Somit kann bei **heterozygoter Ausprägung** des SNP rs12913832 **keine eindeutige Aussage** hinsichtlich der Augenfarbe getroffen werden.

Hinsichtlich der **Haarfarbenrekonstruktion** kann mit Wahrscheinlichkeiten bis zu 85 % zwischen blond, braun und schwarz differenziert werden. Analog zur Augenfarbenausprägung können **kleinere Farbnuancen** innerhalb der einzelnen Kategorien wie z.B. hellblond und dunkelblond **nicht voneinander abgegrenzt werden**. Des Weiteren können Probleme auftreten, wenn zwei ähnliche Farbnuancen aus verschiedenen Kategorien, wie z.B. dunkelblond und hellbraun oder braun-schwarz und schwarz, differenziert werden sollen.

Anhand der Tabelle 26c (Kapitel 5.2.1) ist ersichtlich, dass **einige Genotypen** der SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen) **sehr hohe Wahrscheinlichkeiten** für die Ausprägung einer blonden, braunen oder schwarzen Haarfarbe aufweisen. Hierbei zeigt sich, dass der Genotyp G/G-T/T-C/C (rs12913832-rs12896399-rs12203592) die höchste Wahrscheinlichkeit von 80 % für blonde Haare, der Genotyp G/A-T/T-T/T (rs12913832-rs12896399-rs12203592) die höchste Wahrscheinlichkeit von 66 % für braune Haare und der Genotyp A/A-G/G-T/T (rs12913832-rs12896399-rs12203592) die höchste Wahrscheinlichkeit von 85 % für schwarze Haare aufweist. Die Wahrscheinlichkeiten der übrigen Kategorien für die genannten Genotypen fallen somit entsprechend gering aus und ermöglichen

eine relativ exakte Haarfarbenrekonstruktion. Es gibt wiederum einige Genotypen wie z. B. A/A-T/T-T/T (rs12913832-rs12896399-rs12203592) mit Werten von 48 % für braune und 49 % für schwarze Haare, bei denen keine eindeutige Eingruppierung möglich ist. Es zeigt sich jedoch, dass in diesen Fällen die Wahrscheinlichkeiten für blond und braun oder für braun und schwarz annähernd hoch ausfallen. Somit kann grundsätzlich **eine Tendenz zur hellen oder dunklen Haarfarbe** ausgemacht werden.

Zusätzlich zur Haarfarbe kann die Anwesenheit eines **Rotstichs im Haar** ermittelt werden. Die Analyse der SNPs rs1805007 und rs1805008 des *MC1R*-Gens ermöglicht eine Vorhersage mit Wahrscheinlichkeiten bis zu 99 %. Da hierbei lediglich zwischen der Anwesenheit und dem Fehlen des Rotstichs im Haar differenziert wird, fällt **das Ergebnis im Vergleich zu den anderen Pigmentierungsmerkmalen wesentlich eindeutiger** aus. Die niedrigsten Wahrscheinlichkeiten von 14 % und 38 % ergeben sich bei den Genotypen C/C-C/C und C/C-C/T (rs1805007-rs1805008). In diesen Fällen kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass kein Rotstich im Haar vorliegt. Bei allen anderen Genotypen liegen die Wahrscheinlichkeiten größtenteils weit über 50 %, so dass eine Ausprägung des Rotstichs angenommen werden kann. Wie intensiv dieser ausgeprägt ist, kann mit dieser Analyse allerdings nicht ermittelt werden. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass **keine Differenzierung zwischen einem Rotstich des Kopfhaares und anderer Körperbehaarungen**, wie z. B. Bart- oder Achselhaaren, möglich ist.

Hinsichtlich der **Hauttyprekonstruktion** kann mit Wahrscheinlichkeiten bis zu 72 % zwischen den Hauttypen I, II, III und IV differenziert werden. Mit dem höchsten Wert von 72 % fällt dieser im Vergleich zu den anderen Pigmentierungsmerkmalen am geringsten aus. Die **Rekonstruktion der Hauttypen I, II, III und IV** erweist sich somit von allen untersuchten Ausprägungen **am problematischsten**. Für den Hauttyp I kann mit dem Genotyp T/T-T/T-A/A (rs1805007-rs1805008, rs4778138) die höchste Wahrscheinlichkeit von 65 % erreicht werden. Beim Hauttyp II zeigt der Genotyp T/T-T/T-G/G (rs1805007-rs1805008, rs4778138) die höchste Wahrscheinlichkeit von 67 % und beim Hauttyp III liegt beim Genotypen C/C-C/C-A/A (rs1805007-rs1805008, rs4778138) die höchste Wahrscheinlichkeit mit einem Wert von 72 % vor. Für den Hauttyp IV kann lediglich eine maximale Wahrscheinlichkeit von 42 % beim Genotypen C/C-C/C-G/G (rs1805007-rs1805008, rs4778138) erreicht werden. Bei diesem Genotypen liegt allerdings ebenfalls eine Wahrscheinlichkeit von 51 % für den Hauttyp III vor. Grundsätzlich kann **mit keinem Genotypen (rs1805007-rs1805008-rs4778138) der Hauttyp IV mit höchster Wahrscheinlichkeit vorhergesagt** werden. Da der zuletzt genannte Genotyp eine Wahrscheinlichkeit von 42 % für den Hauttyp IV

und 51 % für den Hauttyp III aufweist, kann bei diesem allerdings eine Tendenz zum Hauttyp IV ausgemacht werden. Zudem ist auffällig, dass eine **ganze Reihe von Genotypen sehr ähnliche Wahrscheinlichkeiten für den Hauttyp II und III** aufzeigen. In diesen Fällen kann zwar nicht eindeutig der Hauttyp II vom Hauttyp III differenziert werden, der sehr helle Hauttyp I und der dunklere Hauttyp IV können allerdings ausgeschlossen werden. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die norddeutschen Probanden lediglich Hauttypen von I bis IV aufweisen und die Hauttypen V und VI in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden konnten. Wie die Genotypen und die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten bei den nicht untersuchten Hauttypen ausfallen würden, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden.

7.2 Vergleich mit bereits publizierten Methoden

Im Laufe dieser Arbeit sind von der Arbeitsgruppe Branicki et al. 2011 und Walsh et al. 2011 PCR-Methoden zur Haarfarben- und Augenfarbenrekonstruktion publiziert worden. Da es ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit war, eine Methode zur Rekonstruktion der Augen-, Haar- und Hautfarbe zu entwickeln, wurde das Verfahren dieser Arbeit mit den bereits publizierten Methoden verglichen.

Die **Augenfarbenrekonstruktion aus Walsh et al. 2011** basiert auf der Analyse von insgesamt sechs SNPs (auch Irisplex genannt) (siehe Kapitel 3.5.2.2), wohingegen die Methode der vorliegenden Arbeit sich auf die Analyse des einen SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen) stützt, der ebenfalls einen Teil der Irisplex ausmacht.

Für den Vergleich wurden insgesamt 100 (2/4 blaue Augenfarbe, 1/4 grüne Augenfarbe, 1/4 braune Augenfarbe) der 400 norddeutschen Probanden mit den SNPs aus Walsh et al. 2011 analysiert. Basierend auf den Ergebnissen wurde die Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und der *area under the curve*-Wert (= AUC-Wert) beider Methoden statistisch berechnet. Wie bereits im Ergebnisteil (Kapitel 5.2.2, Tabelle 28) beschrieben, konnten sowohl mit der Analyse von sechs SNPs (Irisplex) aus Walsh et al. 2011 als auch mit der Analyse eines einzelnen SNP (rs12913832), identische Werte erzielt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Rekonstruktion der Augenfarbe **bei norddeutschen Personen** durch die Analyse des **SNP rs12913832 ebenso exakt** ausfällt, **wie Analyse der insgesamt sechs SNPs aus Walsh et al. 2011**. Auf die Aussagekraft des einzelnen SNP in anderen Populationen kann allerdings an dieser Stelle nicht genauer eingegangen werden.

Die **Haarfarbenrekonstruktion** aus Branicki et al. 2011 basiert auf der Analyse von insgesamt 13 SNPs und den *MC1R*-Varianten *MC1R_r* und *MC1R_R*. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur Haarfarbenrekonstruktion basiert auf der Analyse der drei SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen), sowie den SNPs rs1805007 und rs1805008 (*MC1R*-Gen) zur Rotstichrekonstruktion (siehe Kapitel 5.2.3). Für den Vergleich der Methoden wurden 108 der 400 norddeutschen Probanden zusätzlich nach dem Verfahren von Branicki et al. 2011 analysiert. Statistisch ausgewertet wurden ebenfalls die Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Prävalenz und der *area under the curve*-Wert (= *AUC*-Wert) beider Methoden sowie die Werte für die einzelnen SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen) und rs1805007 (*MC1R*-Gen).

In allen statistischen Kriterien weisen die drei SNPs rs12913832, rs12896399 und rs12203592 sowie der SNP rs12913832 einzeln deutlich höhere Werte im Vergleich zur Methode von Branicki et al. 2011 auf (siehe Tabelle 29a). Für die Rekonstruktion der Haarfarbe stellt **die Analyse der drei SNPs** (rs12913832, rs12896399 und rs12203592) **sowie die des Einzel-SNP** (rs12913832) **die deutlich aussagekräftigere Methode im Vergleich zur Methode von Branicki et al. 2011** dar. Es kann angenommen werden, dass die Stichprobenmenge von 385 in der Studie von Branicki et al. 2011 für die Anzahl der untersuchten Parameter zu gering war, um entsprechend signifikante Ergebnisse zu erzielen. Zudem ist es möglich, dass SNPs untersucht wurden, deren Effekte erst bei extrem großen Stichprobenmengen detektierbar sind.

Hinsichtlich der **Analyse des Rotstichs** zeigt das Verfahren aus der bereits erwähnten Publikation leicht höhere Sensitivitätswerte im Vergleich zur Analyse der beiden SNPs rs1805007/-008 und dem Einzel-SNP rs1805007. Alle anderen Werte fallen jedoch sehr ähnlich aus, so dass bei der wesentlich geringeren Anzahl der untersuchten SNPs der vorliegenden Arbeit **vergleichbare Ergebnisse** erzielt werden konnten.

Analog zur Augenfarbenrekonstruktion kann auch im Fall der Haarfarben- und Rotstichrekonstruktion nicht genauer auf die Aussagekraft der Methode bei anderen Populationen eingegangen werden.

7.3 Einsatz der entwickelten Methode in der forensischen Genetik

Da in der forensischen Genetik kontinuierlich bessere und zusätzliche Methoden zur klassischen STR-Analyse gesucht werden, stellt sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob das entwickelte Verfahren zur Rekonstruktion der Pigmentierungsmerkmale eine hilfreiche Ergänzung darstellt.

Wie bereits im Kapitel 7.1 diskutiert, kann bei homozygoter Ausprägung des SNP rs12913832 mit sehr hohen Wahrscheinlichkeiten eine Aussage über die Ausprägung einer **hellen (blau, blau-grün, blau-braun, blau-grün-braun) oder dunklen (braun, braun-grün) Augenfarbe** getroffen werden. Genauere Aussagen hinsichtlich einzelner Farbnuancen sind zwar nicht möglich, allerdings würde eine grobe Einteilung, in die Augenfarben hell und dunkel, bei forensischen Fragestellungen von großem Nutzen sein. Da in den meisten Fällen die Personenbeschreibungen bezüglich der Augenfarbe ohnehin sehr vage ausfallen, wäre eine **exaktere Rekonstruktion der Augenfarbe** unabhängig von der Möglichkeit **irrelevant**.

Hinsichtlich der Haarfarben blond, braun und schwarz können im Fall bestimmter Genotypen ebenfalls Vorhersagen mit hohen Wahrscheinlichkeiten getroffen werden. Kann keine eindeutige Zuordnung in die Kategorien blond, braun oder schwarz erfolgen, können dennoch **Tendenzen zur hellen (blond-braun) oder dunklen (braun-schwarz) Haarfarbe** ausgemacht werden. Analog zur Augenfarbe können auch bei der Rekonstruktion der Haarfarbe keine einzelnen Farbnuancen differenziert werden. Es ist jedoch möglich mit dem entwickelten Verfahren den **Rotstich im Haar zuverlässig zu bestimmen**. Für forensische Zwecke stellt die Haarfarben- und Rotstichrekonstruktion daher eine zusätzliche Möglichkeit dar den Kreis der Tatverdächtigen, den von vermissten Personen oder unbekannten Straftätern anhand der Haarfarbe genauer einzugrenzen. Die Haarfarbe stellt dennoch im Vergleich zur Augenfarbe ein **deutlich aussageschwächeres Merkmal der Identifizierung** dar. Dies liegt darin begründet, dass sich die Haarfarbe **auf Grund hormoneller Bedingungen** stark verändern kann (Slominski A., 2005). Zusätzlich ist zu beachten, dass das Färben und Bleichen der Haare in der heutigen Gesellschaft nicht ungewöhnlich ist und das Aussehen einer Person nicht immer der genetischen Ausprägung entspricht. Bei gefärbten Haaren müssen in dem Fall der Haaransatz oder die übrigen behaarten Körperstellen als Vergleich herangezogen werden.

In Bezug auf die Hauttyprekonstruktion sind die **Wahrscheinlichkeiten** in den meisten Fällen **nicht sehr eindeutig**. Zudem kann auf Grund der Probenauswahl in dieser Arbeit lediglich zwischen den hellhäutigen Hauttypen I, II, III und IV differenziert werden. Diese vier Hauttypen sind für Nichtkundige kaum zu unterscheiden. Zudem stellt die Hautfarbe analog zur Haarfarbe ein stark

klimaabhängiges Pigmentierungsmerkmal dar. Diese kann sich bei intensiver Sonneneinstrahlung so stark verändern, dass die ursprüngliche Ausprägung nicht mehr ersichtlich ist. Da es mit dem entwickelten Verfahren nicht möglich ist, zwischen hellhäutigen (I-IV) und dunkelhäutigen (V-VI) Hauttypen zu differenzieren, stellt die **Hauttyprekonstruktion für forensische Fragestellungen keine optimale Anwendungsmöglichkeit** dar.

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode lediglich an norddeutschen Probanden etabliert wurde und somit auch nur **zuverlässige Ergebnisse bei norddeutschen Individuen** zu erwarten sind. Die Methode wurde vereinzelt an Personen mit dunkler Pigmentierung und nicht nordeuropäischer Abstammung getestet, bei denen größtenteils braune Augen und braune oder schwarze Haare vorhergesagt wurden. Bei einer Person mit unbekannter Herkunft, kann die Methode Anwendung finden, dennoch ist zu berücksichtigen, dass die Validierung lediglich an norddeutschen Probanden erfolgt ist und **die berechneten Wahrscheinlichkeiten bei anderen Populationen möglicherweise anders** ausfallen würden.

Die Etablierung des entwickelten Analyseverfahrens in anderen forensisch-genetischen Laboren sollte keine großen Probleme mit sich bringen, da alle benötigten Geräte, wie PCR-Maschinen, Gelkammern und Kapillarelektrophorese-Systeme, standardmäßig vorhanden sind. Vom Kosten- und Zeitaufwand ist die Analyse der Pigmentierungsmerkmale mit einer routinemäßigen STR-Analyse zu vergleichen. Die recht **einfache Methodenetablierung** sowie der **kalkulierbare Zeit- und Kostenfaktor** verstärken zusätzlich zu der hohen Aussagekraft der SNPs, den Einsatz dieser Methode in der forensischen Genetik.

7.4 Anwendbarkeit an stark degradiertem DNA und minimalen DNA-Mengen

Da zu Beginn der Arbeit feststand, dass die Methode sowohl bei forensischen als auch bei aDNA Fragestellungen Anwendung finden soll, wurde diese entsprechend auf die Analyse von stark degradiertem Material angepasst (siehe Kapitel 4.7)

Die **Amplikons sind zwischen 81 und 121 Basenpaaren** lang und weisen somit eine geeignete Größe für stark degradiertes Material auf (Coble & Butler, 2005; Welch et al., 2011). Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Methode sehr sensitiv ausfällt, so dass auch minimale DNA-Mengen analysiert werden können. Die **Sensitivitäten der PCRs liegen zwischen 3,3-33 pg**, so dass DNA-Mengen von weniger als fünf Zellen (diploide Zelle = 6,6 pg) detektiert werden können (Butler, 2009).

7.5 Unterschiede bei den aDNA Proben bezüglich der DNA-Erhaltung

Die Ergebnisse der Screening-PCRs zeigen deutlich, dass die Proben aus dem Mittelalter einen wesentlich höheren Probenanteil mit humanem DNA-Gehalt aufweisen. Bei den mittelalterlichen Proben beträgt dieser Anteil 90 % und bei den neolithischen Proben 53 %. Werden diese Werte genauer aufgeschlüsselt, zeigt sich bei den **mittelalterlichen Proben** ebenfalls eine **deutlich bessere DNA-Qualität und Quantität**. Im Fall der neolithischen Proben weisen lediglich 15 % sowohl chromosomale als auch mitochondriale DNA auf und 19 % zeigen mitochondriale aber keine chromosomale DNA oder chromosomale aber keine mitochondriale DNA. Die mittelalterlichen Proben hingegen weisen in 80 % der Fälle sowohl chromosomale als auch mitochondriale DNA auf und lediglich 10 % zeigen mitochondriale aber keine chromosomale DNA. Zudem ist auffällig, dass **bei den Proben aus dem Neolithikum** sofern **chromosomale DNA** vorliegt, **nicht immer mitochondriale DNA** nachgewiesen werden konnte. Dieses Phänomen ist somit auf die neolithischen Proben begrenzt und lässt vermuten, dass es sich bei den chromosomalen Fragmenten um **unspezifische Amplifikationen** handelt. Diese können durch die Anwesenheit von DNA-Bestandteilen diverser Mikroorganismen in den Extrakten entstanden sein (Willerslev & Cooper, 2005). Da das neolithische Material circa 4 000 Jahre älter ist, kann angenommen werden, dass die Bodenbestandteile auf Grund einer stärkeren Porosität der Knochen und Zähne, besser in diese eindringen konnten.

Für die weitere Bearbeitung der Proben wurden nur diejenigen ausgewählt, die **sowohl im a als auch im b Extrakt mitochondriale DNA** (mtDNA + / chr. DNA - oder mtDNA + / chr. DNA +) aufwiesen. Bei 23 (12 %) neolithischen Proben und bei 104 (73 %) mittelalterlichen Proben konnte dieses Kriterium erfüllt werden. Auch diese Werte verdeutlichen erneut den **besseren DNA-Zustand der mittelalterlichen Proben**. Da bei beiden unterschiedlichen Zeitepochen vorzugsweise Zähne und nur in Einzelfällen Knochenstücke extrahiert wurden, können diese Werte direkt miteinander verglichen werden. Somit kann **das Alter** der neolithischen Proben als mögliche **Ursache der schlechten DNA-Erhaltung** angenommen werden.

Der Amplifikationserfolg und -misserfolg von kleinen (≈ 150 bp) bis großen (≈ 300 bp) mtDNA Fragmenten wird in den vielen Untersuchungen ebenfalls als ein **Kriterium für das Einstufen des Degradierungszustandes** einer Probe angesehen (Alonso et al., 2004). Im Fall der neolithischen Proben konnten die HVRI und HVRII Regionen des D-Loops nur in Form diverser kleiner Fragmente amplifiziert werden. Bei den mittelalterlichen Proben hingegen zeigte größtenteils das 415 bp (mt 15995 Forward-16410 Reverse) lange Fragment für die HVRI Region und das 320 bp

(mt 00034 Forward-00354 Reverse) lange Fragment für die HVRII Region Amplifikationserfolge. Anhand dieser Amplifikationserfolge und -misserfolge lassen sich die **mittelalterlichen Proben** als **weniger stark** und die **neolithischen Proben** als **stark degradiert** einstufen.

Auch in Bezug auf die **STR-Analyse**, die bei allen Proben angewendet wurde, konnte bei den neolithischen Proben ein **extremer Abfall des Amplifikationserfolges der größeren System** beobachtet werden. Dies ist ebenfalls ein bekanntes Phänomen, welches bei stark degradiertem Probenmaterial vermehrt auftritt (Butler, 2009).

Abschließend kann gesagt werden, dass ein extremer Unterschied in Bezug auf die DNA-Erhaltung zwischen den mittelalterlichen Proben aus dem 13./14. Jahrhundert und den neolithischen Proben aus der Zeit von 3 400-3 000 cal BC besteht.

7.6 Rekonstruktionserfolge und Unterschiede zwischen den aDNA Proben

Bei insgesamt sechs neolithischen (n= 185) und 21 (n= 142) mittelalterlichen Individuen konnte die Augen-, Haar- und Hautfarbe entweder teilweise oder komplett rekonstruiert werden. Es sind ebenso wie im vorherigen Abschnitt diskutiert auch bei der Analyse der Pigmentierungs-SNPs **schlechtere Amplifikationserfolge der neolithischen Proben** erkennbar. Dies wird besonders bei den Ergebnissen der Rotstich- und Hauttyprekonstruktion deutlich. Im Fall der neolithischen Proben konnte im Mittel bei 34 % (34 % beim Hauttyp; 33 % beim Rotstich; n= 4) kein Ergebnis erzielt werden (siehe Abbildung 37, Kapitel 6.3.1). Im Vergleich hierzu zeigten im Mittel 5 % (5 % beim Hauttyp; 5 % beim Rotstich; n=1) der mittelalterlichen Proben bei den genannten Pigmentierungsmerkmalen keinen Amplifikationserfolg (siehe Abbildung 39, Kapitel 6.3.2). Da in den meisten Fällen sowohl mittelalterliche als auch neolithische Proben gleichzeitig analysiert wurden, ist an dieser Stelle ein technischer Analysefehler auszuschließen. Somit ist anzunehmen, dass die **DNA-Qualität und auch -Quantität ebenfalls ausschlaggebend** für die schlechten Typisierungserfolge der neolithischen Proben ist.

Im folgenden Abschnitt wird auf eine **weitere Auffälligkeit des Amplifikationserfolges** eingegangen. Zum besseren Verständnis werden zunächst einige PCR-Sensitivitäten genauer beschrieben.

Die Rotstich- und Hauttyprekonstruktion basiert auf der Analyse der SNPs rs1805007 und rs1805008 (*MC1R*-Gen), deren Amplifikation in Form eines 100 bp langen Fragmentes die höchste Sensitivität von 3,3 pg bei der Austestung aufzeigte. Die Analyse des SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen) für die Augenfarbenrekonstruktion erfolgt in Form eines 81 bp langen Fragmentes und wies ein

DNA-Minimum von 33 pg auf. Die erst genannte PCR für die Amplifikation der SNPs rs1805007 und rs1805008 fiel somit bei der Austestung um das zehnfache sensitiver aus.

Dennoch zeigte die PCR des SNP rs12913832 für die Augenfarbenrekonstruktion im Fall der neolithischen Proben einen **deutlich höheren Amplifikationserfolg**, mit einer Typisierungsrate von 83 %, **im Vergleich zur hoch sensitiven PCR** der SNPs rs1805007 und rs1805008 mit einem Typisierungserfolg von lediglich 66 % (siehe Abbildung 37, Kapitel 6.3.1). Bei den mittelalterlichen Proben hingegen liegen die Werte von 81 % (rs12913832) und 90 % (rs1805007 und rs1805008) nicht allzu weit auseinander (siehe Abbildung 39, Kapitel 6.3.2). Dieses Phänomen lässt sich möglicherweise wie folgt erklären:

Es kann angenommen werden, dass **die PCR-Sensitivitäten bei stark degradiertem Material anders ausfallen als bei intakter oder leicht degradierter DNA** und die Amplikongröße somit eine entscheidende Rolle spielt. Somit würde bei stark degradierter DNA das kleinere Fragment, in dem Fall das der Augenfarbenrekonstruktion, besser amplifiziert werden. Bei den mittelalterlichen Proben ist der Degradierungsprozess vermutlich noch nicht so weit vorangeschritten, dass auch das längere der beide beschriebenen Fragmente von 100 bp größtenteils amplifiziert werden konnte.

Hinsichtlich der **Haarfarbenrekonstruktion** ist auffällig, dass **bei den neolithischen Proben in 83 % der Fälle kein Ergebnis** erzielt werden konnte. Bei den mittelalterlichen Proben lag dieser Wert lediglich bei 33 %. Dies ist vermutlich ebenfalls auf die **langen Fragmentgrößen von 114 bp und 121 bp**, der zu analysierenden SNPs rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen), zurückzuführen.

Werden nun die erfolgreichen Typisierungen der unterschiedlichen Zeitepochen miteinander verglichen, fällt zunächst auf, dass dies aufgrund der geringen neolithischen Probenanzahl kaum möglich ist. Dennoch soll an dieser Stelle kurz auf einige Auffälligkeiten eingegangen werden.

Bei den **mittelalterlichen Individuen** konnte in **10 % der Fälle ein Rotstich im Haar** (n= 2) rekonstruiert werden. Die **neolithischen Individuen** hingegen zeigten **keinerlei Rotstich im Haar**. Auffällig ist zudem, dass bei **17 %** (n= 2) der typisierten neolithischen Individuen eine **schwarze Haarfarbe** bestimmt werden konnte. Im Vergleich dazu wiesen die mittelalterlichen Individuen bei erfolgreicher Rekonstruktion **lediglich die Haarfarben blond und braun** auf. Hinsichtlich der **Augenfarbe** fiel der Anteil an blauen (66 % bei den neolithischen, 57 % bei den mittelalterlichen Proben) und braunen (17 % bei den neolithischen, 24 % bei den mittelalterlichen Proben) Augenfarben, im Großen und Ganzen, sehr **ähnlich** aus. Auch **beim Hauttyp** konnte **kein Unterschied** festgestellt werden. Für ein mittelalterliches Individuum, welches ebenfalls einen

Rotstich im Haar aufzeigte, konnte zwar der Hauttyp II rekonstruiert werden, alle übrigen typisierten Individuen wiesen ebenso wie die neolithischen Individuen den Hauttyp III auf.

Abschließend ist zu erwähnen, dass die SNPs der **neolithischen Individuen immer in einer homozygoten Variante G/G oder A/A** (rs12913832) vorlagen und die Augenfarbenrekonstruktionen somit sehr exakt erfolgen konnten. Bei den **mittelalterlichen Proben** hingegen zeigten fünf Individuen die **heterozygote Variante G/A** (rs12913832), so dass bei diesen mit einer Wahrscheinlichkeit von 44 % eine braune Augenfarbe vorhergesagt wurde, die Ausprägung einer blauen oder grünen Augenfarbe an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden kann.

7.7 Mitochondriale Haplogruppen und ermittelte Pigmentierungsmerkmale

In der Abbildung 38 und 40 (Kapitel 6.3.1) sind die ermittelten mitochondrialen Haplogruppen sowie die Typisierungserfolge für die jeweiligen Pigmentierungsmerkmale der neolithischen und mittelalterlichen Individuen dargestellt. Die abgebildete Karte erläutert zusätzlich zu den Typisierungsergebnissen die Wanderbewegungen der einzelnen mitochondrialen Haplogruppen der letzten Jahrtausende.

Es wird sofort deutlich, dass alle acht **Haplogruppen H, HV, X, T, J, K, W und U** der insgesamt 27 typisierten (sechs neolithische und 21 mittelalterliche) Individuen **europäischen Ursprungs** sind. Die Verteilungen der Haplogruppen aller **mittelalterlichen Individuen** (H= 51 %, J= 5 %, T= 24 %, U= 24 %, K= 5 %, W=5 %) **entsprechen größtenteils** den heutigen **europäischen Frequenzen** (www.Eupedia.com, Stand 04.12.12). Da die mittelalterlichen Proben lediglich 800 Jahre alt sind, wurde aufgrund der geringen Zeitspanne auch eine Haplogruppenverteilung entsprechend der heutigen erwartet.

Bei den **neolithischen Individuen** konnte im Fall der **Haplogruppe H mit 50 %** ebenfalls ein Wert erreicht werden, der **mit dem heutigen gleichzusetzen** ist (Roostalu et al., 2007). Zudem konnte ein Individuum der Haplogruppe HV0 zugeordnet werden, die eine Schwestergruppe der Haplogruppe H darstellt und somit dieser auch im weitem Sinne zugeordnet werden kann. Zusätzlich konnte **bei einem neolithischen Individuum** die **Haplogruppe X** nachgewiesen werden. Diese ist im Mittel bei **1-2 % der heutigen europäischen Population** vorzufinden und gehört somit zu den eher selteneren Haplogruppen (Reidla et al., 2003).

Die in dieser Arbeit ermittelten Haplogruppen H, HV0 und X konnten auch an weiteren neolithischen Proben anderer aDNA Studien nachgewiesen werden (Lacan et al., 2011; Haak et al.,

2008). Auffällig ist hierbei allerdings die Haplogruppe X, die bei den doch sehr geringen aDNA-Probenmengen vermehrt bei neolithischen Fundplätzen vorgefunden wurde. Es kann somit angenommen werden, dass die **Haplogruppe X zu Zeiten des Neolithikums in einer höheren Frequenz** vorlag und sich diese im Laufe der Jahrtausende, vermutlich bedingt durch genetische Drift, wieder reduziert hat.

Werden die ermittelten **Haplogruppen mit den Pigmentierungsmerkmalen der einzelnen aDNA Proben verglichen**, kann **kein Zusammenhang** festgestellt werden. Auch das Individuum mit der auffälligen Haplogruppe X, die heutzutage vorzugsweise im Nahen Osten, dem Mittelmeerraum oder dem Kaukasus auftritt, können keine regionalspezifischen Pigmentierungsmerkmale, wie z.B. braune Augen und dunkle Haare, ausgemacht werden.

7.8 Ursprung der Pigmentierungsdiversität und der blauen Augenfarbe

Da insgesamt nur sechs neolithische Individuen hinsichtlich ihrer Pigmentierung rekonstruiert werden konnten, ist es sehr schwierig Rückschlüsse auf eventuelle Ursprünge zu ziehen. Dennoch fällt auf, dass alle typisierten SNPs der neolithischen Individuen **homozygot** ausgeprägt waren. Die insgesamt 400 rezenten sowie die mittelalterlichen Individuen wiesen einen deutlich höheren Heterozygotieanteil auf. Somit kann vermutet werden, dass zu diesem Zeitpunkt noch **keine allzu starke Vermischung der unterschiedlichen Populationen** erfolgt ist. Die sehr geringe Haplogruppendiversität innerhalb der neolithischen Individuen bekräftigt diese Aussage.

In Bezug auf die **Entstehung der blauen Augenfarbe** wurde von der Arbeitsgruppe Eiberg et al. im Jahre 2008 die Hypothese aufgestellt, dass der Ursprung des blauen Augen bzw. die Mutationsentstehung des SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen) in der Region des schwarzen Meeres vor circa 6 000-10 000 Jahren zu finden ist. Bei Betrachtung der ermittelten Augenfarben der neolithischen Individuen, die ein Alter von circa 5 000 Jahren aufweisen, kann ein relativ hoher Anteil der blauen Augenfarbe von 66 % ausgemacht werden. Somit wird belegt, dass die Mutation des SNP rs12913832, welche für die Ausprägung des blauen Auges verantwortlich gemacht wird, älter als 5 000 Jahre ist und die Hypothese von Eiberg et al. 2008 nicht widerlegt wurde. Da allerdings 66 % der neolithischen Individuen bereits die Augenfarbe blau aufwiesen, kann angenommen werden, dass die Mutation **eher vor 10 000 als vor 6 000 Jahren** entstanden ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der **Ursprung der heutigen Pigmentierungsdiversität** vermutlich **nicht im Neolithikum lokalisiert** ist, sondern zwischen dem Neolithikum und dem

Mittelalter. Zudem weist alles darauf hin, dass die **Mutation des SNP rs12913832** für die Ausprägung der blauen Augenfarbe weit vor **dem Neolithikum entstanden** sein muss.

7.9 Familienquartetts und Probandin mit Iris-Heterochromie

Zusätzlich zur Methodenetablierung und den aDNA Analysen wurden **zwei Familienquartetts** sowie **eine Probandin mit Iris-Heterochromie** untersucht.

Beim ersten **Familienquartett a)** stand die Ausprägung der Augenfarbe und die der Haarfarbe im Mittelpunkt. Die Mutter hat sowohl eine braune Augenfarbe als auch eine braune Haarfarbe ausgeprägt. Der Vater hingegen weist eine blaue Augenfarbe und blonde Haare auf. Beide Kinder sind braunäugig, unterscheiden sich allerdings in ihrer Haarfarbe. Einer ist blond und der andere braunhaarig. Für die Rekonstruktion der Augenfarbe wurde der SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen) und für die Haarfarbe die SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12203592 (*IRF4*-Gen) und rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) analysiert. Die Tabelle 30a im Kapitel 5.3.1 zeigt die ermittelten Genotypen mit den entsprechenden Wahrscheinlichkeiten für die unterschiedlichen Augen- und Haarfarben. Lediglich **bei Sohn 1**, der bei der Haarfarbenrekonstruktion den Genotyp G/A-G/T-C/C (rs12913832, rs12203592, rs12896399) aufweist, konnte die **Haarfarbe nicht korrekt** rekonstruiert werden. Für die Haarfarbe braun ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von **49 %** und für die Haarfarbe blond eine Wahrscheinlichkeit von **47 %**. Da diese beiden Werte **sehr ähnlich** ausfallen, ist es nicht allzu verwunderlich, dass an dieser Stelle eine Fehlbestimmung der Haarfarbe erfolgte. Zudem muss erwähnt werden, dass der Sohn zwar blonde Haare aufweist, diese allerdings in die Kategorie dunkelblond fallen. **Farbtöne, die sich an der Grenze zu einer anderen Haarfarbenkategorie befinden**, können wie im Kapitel 7.1 beschrieben, teilweise zu **Problemen bei der Pigmentrekonstruktion** führen. Alle übrigen Pigmentausprägungen dieses Familienquartetts konnten erfolgreich bestimmt werden.

Beim zweiten **Familienquartett b)** stand die Ausprägung des Rotstichs im Haar sowie der Hauttyp im Mittelpunkt der Analyse. Die Mutter weist keinen Rotstich und den Hauttyp II auf, wohingegen der Vater einen Rotstich im Haar sowie den Hauttyp III ausgeprägt hat. Der Sohn hat ebenso wie der Vater einen Rotstich im Haar und weist ebenso wie die Mutter den Hauttyp II auf. Bei der Tochter zeigt sich kein Rotstich im Haar und der Hauttyp III ist ausgeprägt. Für die Rotstich- und Hauttyprekonstruktion wurden die SNPs rs1805007 und rs1805008 (*MC1R*-Gen) sowie die SNPs rs1805007, rs1805008 (*MC1R*-Gen) und rs4778138 (*OCA2*-Gen) analysiert. Die Tabelle 30b im Kapitel 5.3.1 zeigt die ermittelten Genotypen mit den entsprechenden Wahrscheinlichkeiten für

die unterschiedlichen Hauttypen sowie die Wahrscheinlichkeiten für die Anwesenheit und das Fehlen eines Rotstichs. Dabei fällt auf, dass die Rekonstruktion der Pigmentierung beim Familienquartett b) **nicht so erfolgreich** verlief, wie beim Familienquartett a). Sowohl bei der Rotstich- als auch bei der Hauttyprekonstruktion erfolgte die Bestimmung **in insgesamt vier Fällen fehlerhaft**. Bei der Mutter und Tochter wurde, aufgrund des ermittelten Genotypen C/T-C/C (rs1805007-rs1805008) mit einer Wahrscheinlichkeit von 51 %, ein Rotstich im Haar vorhergesagt. Der Vater weist den gleichen Genotypen auf, nur mit dem Unterschied, dass bei diesem auch ein Rotstich im Haar ausgeprägt ist. Somit muss bei Wahrscheinlichkeiten, die nur **leicht über den 50 %** liegen, immer eine **hohe Fehlerquote** mit einkalkuliert werden. Bei den Hauttyprekonstruktionen wurde der Hauttyp II im Fall der Mutter und des Sohnes nicht korrekt ermittelt. Mit Wahrscheinlichkeiten von 54 % und 47 % fielen diese am höchsten für den Hauttyp III aus. Anhand dieses Beispiels wird die bereits in Kapitel 7.1 beschriebene **Problematik der Hauttyprekonstruktion** bestätigt. Da für die meisten Genotypen nur sehr geringe Wahrscheinlichkeiten erzielt werden können, ist eine exakte Bestimmung in den meisten Fällen nicht möglich.

Als letzter Exkurs soll an dieser Stelle das Analyseergebnis der Probandin mit **Iris-Heterochromie** diskutiert werden. Die Pigmentanomalie der Iris-Heterochromie tritt beim Menschen nur sehr selten auf und zeigt sich in Form unterschiedlicher Augenfarben. Die Probandin dieser Arbeit weist rechtsseitig eine braun-grüne und linksseitig ein blau-braune Augenfarbe auf. Für die Bestimmung der genetischen Augenfarbausprägung wurde der SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen) analysiert. Bei dieser Analyse wurde der Genotyp G/G (rs12913832) ermittelt, der mit einer Wahrscheinlichkeit von 89 % eine blaue, mit 7,4 % eine grüne und mit 3,0 % eine braune Augenfarbe vorhersagt. In ihrem Genom liegt somit die Veranlagung für **eine blaue Augenfarbe verankert**. Da es sich bei der Probandin um eine kongenitale Pigmentanomalie handelt, kann angenommen werden, dass es während der Embryogenese zu einer **Hyperpigmentierung des Irisgewebes** gekommen ist.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein **molekulargenetisches Analyseverfahren zur Rekonstruktion der humanen Augen-, Haar- und Hautfarbe** etabliert. Dieses basiert auf der Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen, auch unter dem Begriff **single nucleotide polymorphisms (= SNPs)** bekannt, die auf unterschiedliche Art und Weise die Synthese des Pigmentes Melanin regulieren und somit die individuelle Pigmentierung jedes Einzelnen prägen.

Dem neu entwickelten Verfahren zur Rekonstruktion des äußeren Erscheinungsbildes liegt eine **komplexe statistische Auswertung** an insgesamt 400 norddeutschen unverwandten Probanden zugrunde. Es zeigte sich hierbei, dass sechs (rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen), rs12203592 (*IRF4*-Gen), rs1805007 und rs1805008 (*MC1R*-Gen), rs4778138 (*OCA2*-Gen)) der insgesamt 18 untersuchten SNPs Assoziationen hinsichtlich der Augen-, Haar- und Hautfarbe aufweisen und bei einer Analyse dieser **Vorhersagewahrscheinlichkeiten von bis zu 99 %** erreicht werden können. Bezüglich der **Augenfarbe** kann eine Wahrscheinlichkeit von bis zu **95 %**, bei der **Haarfarbe** von bis zu **85 %**, beim **Hauttyp** von bis zu **72 %** und beim **Rotstich im Haar** von bis zu **99 %** erzielt werden. Somit kann mit der neu entwickelten Analysemethode die individuelle Pigmentierung einer Person mit hohen Wahrscheinlichkeiten zuverlässig rekonstruiert werden kann.

Da diese Methode sowohl in der forensischen Genetik als auch im Bereich historischer und archäologischer Fragenstellungen Anwendung finden soll, wurde die Analyse der sechs signifikanten SNPs **speziell auf stark degradiertes DNA-Material abgestimmt**. Resultierend daraus ergaben sich insgesamt fünf Singleplex-PCRs mit **Sensitivitäten von bis zu 3,3 pg**, was der DNA-Menge einer halben diploiden Zelle entspricht.

Um zusätzlich die Aussagekraft der neu etablierten Methode zu überprüfen, wurde diese mit bereits publizierten Verfahren zur Augenfarben- und Haarfarbenrekonstruktion verglichen. Hinsichtlich der **Augenfarbenrekonstruktion** konnte gezeigt werden, dass die Analyse des SNP rs12913832 (*HERC2*-Gen), der in dieser Arbeit als Einzel-SNP untersucht wird, **ebenso exakt die Augenfarbe vorhersagt**, wie eine Analyse der insgesamt sechs SNPs aus Walsh et al. 2011. Bezüglich der **Haarfarbenrekonstruktion** konnte durch die Anwendung des eigenen Verfahrens, bei dem die drei SNPs rs12913832 (*HERC2*-Gen), rs12896399 (*SLC24A4*-Gen) und rs12203592 (*IRF4*-Gen) untersucht werden, ein **aussagekräftigeres Ergebnis** im Vergleich zur der Methode von Branicki et al. 2011, mit insgesamt 13 SNPs und den Varianten *MC1R_r* und *MC1R_R*, erzielt werden. Auch bei der **Rekonstruktion des Rostichs** im Haar zeigte sich, dass die Methode dieser

Arbeit, bei der lediglich die SNPs rs1805007 und rs1805008 des *MC1R*-Gens untersucht werden, **fast identische Werte** im Vergleich zum Analyseverfahren von Branicki et al. 2011 liefert, bei dem wesentlich mehr SNPs untersucht wurden.

Zusätzlich zur Methodenetablierung erfolgte ein **Exkurs**, bei dem zwei Familienquartetts sowie eine Probandin mit Iris-Heterochromie hinsichtlich ihrer Pigmentausprägungen untersucht wurden. Bei der Analyse der Familienquartetts zeigte sich, dass die Rekonstruktion der Augen-, Haar- und Hautfarbe mit dem neu entwickeltem Verfahren **größtenteils sehr zuverlässige Ergebnisse** liefert. Hierbei fiel lediglich auf, dass sich bei Wahrscheinlichkeiten um die 50 % eine höhere Fehlerquote zu erwarten ist. Da ebenfalls die **Anwendbarkeit der Methode bei speziellen Pigmentanomalien** demonstriert werden soll, wurde eine Probandin mit Iris-Heterochromie untersucht. Diese Pigmentanomalie stellt sich in Form verschiedener Pigmentausprägungen der Iris dar. Mit Hilfe der Augenfarbenrekonstruktion konnte bei der Probandin, die eine blau-braune und eine braun-gelb-grüne Augenfarbe aufweist, eine genetische Determinierung für die blaue Augenfarbe festgestellt werden, so dass in diesem Fall eine Hyperpigmentierung des dunkleren Auges angenommen werden.

Ergänzend zur Methodenentwicklung und -validierung wurde das Analyseverfahren an **archäologischem Skelettmaterial** angewendet. Hierbei wurden den Fragen nachgegangen, wann die heutige europäische Pigmentierungsdiversität und die blaue Augenfarbe entstanden sind. Da sich das Neolithikum (Jungsteinzeit) durch einen extremen Wandel vom Jäger und Sammler hin zum sesshaften Bauern auszeichnet, was mit Gründungen von Dorfgemeinschaften einhergeht, wird diese Phase als möglicher Ursprung der heutigen Diversität angenommen.

Es wurden insgesamt 185 neolithische Individuen aus der Zeit 4 500-2 800 BC und 142 mittelalterliche Individuen aus dem 13./14. Jahrhundert als Vergleichspopulation analysiert. Bei insgesamt **sechs neolithischen** und **21 mittelalterlichen Individuen** konnte dessen Pigmentierung zu Lebzeiten teilweise komplett und teilweise partiell rekonstruiert werden. Bei den **neolithischen Individuen** konnte ein sehr **hoher Homozygotieanteil** im Vergleich zu den mittelalterlichen Individuen festgestellt werden, so dass anzunehmen ist, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine allzu starke Vermischung der unterschiedlichen Populationen erfolgt ist. Die sehr geringe Haplogruppendiversität bekräftigt ebenso diese Aussage. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass der **Ursprung der heutigen Pigmentierungsdiversität** nicht im Neolithikum lokalisiert ist, sondern **zwischen dem Neolithikum und dem Mittelalter** entstanden sein muss.

Bezüglich der **blauen Augenfarbe** wurde von der Arbeitsgruppe Eiberg et al. 2008 die Hypothese aufgestellt, dass der Ursprung dieser vor 6 000-10 000 Jahren lokalisiert ist. Bei Betrachtung der ermittelten Augenfarben der neolithischen Individuen, die ein Alter von circa 5 000 Jahren aufweisen, zeigt sich ein relativ hoher Anteil der blauen Augenfarbe von 66 %. Dies weist darauf hin, dass die Mutation des SNP rs12913832 für die Ausprägung der blauen Augenfarbe weit vor dem Neolithikum entstanden ist. Die Hypothese wurde somit nicht widerlegt, dennoch kann angenommen werden, dass deren **Entstehung eher vor 10 000 als vor 6 000 Jahren** erfolgt ist.

Bei allen Untersuchungen wurde höchster Wert auf Kontaminationsvermeidungen mit moderner DNA gelegt. Durch die zusätzlich Analyse der mitochondrialen Haplogruppen und der individualspezifischen STRs der aDNA-Proben, kann **eine Kontamination von Seiten der Labormitarbeiter ausgeschlossen** werden, was die Authentizität der aDNA-Ergebnisse verstärkt.

Ausblick

Da die neu etablierte Methode zur Rekonstruktion der Pigmentierungsmerkmale im Rahmen dieser Arbeit nur an norddeutschen Probanden validiert wurde, wäre eine zusätzliche Austestung an anderen Populationen sinnvoll. Des Weiteren wäre es empfehlenswert die Analysemethode mit ancestralen Markern zu erweitern, um in der Zukunft sowohl die Herkunft als auch das äußere Erscheinungsbild in Kombination untersuchen zu können. Zudem müsste für viele europäische Länder eine Gesetzesänderung bezüglich der Analyse kodierender DNA-Bereiche im Rahmen der forensischen Genetik erfolgen, um dieses Verfahren auch sinnvoll einsetzen zu können.

Bezüglich der Fragestellung hinsichtlich des Ursprungs der heutigen Pigmentierungsdiversität könnte durch zusätzliche aDNA-Analysen von Individuen anderer Zeitepochen (bsp. aus der Bronzezeit) der Zeitrahmen genauer eingegrenzt werden. Ebenso könnte durch weitere aDNA-Analysen älterer Skelette (bsp. aus dem Paläolithikum) die Entstehungszeit der blauen Augenfarbe besser bestimmt werden.

Summary

In this project a molecular-genetic analysis was set up to the reconstruction of the human eye-, hair and skin colour. This bases on the analysis of single nucleotid polymorphisms which adjust in different ways the synthesis of the pigment melanin and stamp therefore the individual pigmentation of each individual.

A complicated statistical evaluation forms the basis of the new developed method to reconstruct the externally visisble appearance to a total of 400 unrelated german people. It appeared that six (rs12913832 (HERC2 gene), rs12896399 (SLC24A4 gene), rs12203592 (IRF4 gene), rs1805007 and rs1805008 (MC1R gene), rs4778138 (OCA2 gene)) of a total of 18 examined SNPs showed associations concerning the eye-,hair- and skin colour with prediction values up to 99%. For eye colour prediction likelyhoods up to 95%, for hair colour likelyhoods up to 85%, for skin colour likelyhoods up to 72% and for the red tint in the hair likelyhoods up to 99% can be achieved. Therefore the new developed analysis method enables a reliably reconstruction of the individual pigmentation with high likelyhoods.

Because this method should find application in the forensic genetics as well as in the area of historical and archaeological research, the analysis of the six significant SNPs was tuned especially to very degraded DNA material. Resultant from it a total of five Singleplex-PCRs with sensitivity from up to 3.3 pg was surrendered.

To check the explanatory power of the new established method, this was compared to already published procedures for eye- and hair colour reconstructions. Regarding the eye colour reconstruction it could be shown that the analysis of the SNP rs12913832 (the HERC2 gene), which is examined in this work as single SNP, predicts as precisely the eye colour, how an analysis of a total of six SNPs from Walsh et al. 2011. Concerning the hair colour reconstruction the application of the own procedure with only three SNPs rs12913832 (HERC2 gene), rs12896399 (SLC24A4 gene) and rs12203592 (IRF4 gene) reched a more expressive result in comparison to the method from Branicki et al. 2011, with a total of 13 SNPs and the variants MC1R_r and MC1R_R. Also the method of this work for the reconstruction of the red tint in the hair, achieved almost identical values in comparison to the analysis from Branicki et al. 2011, with substantially more SNPs.

In addition to the establishment an excursion occurred in which two family quartets as well as a test person with iris-heterochromie were examined concerning their pigment traits. The analysis of the family quartet supplies the very reliable results of the new method. It also shows that in case of likelyhoods about 50% a higher mistake rate can be expected. Additionally the applicability

of the method with special pigment anomalies should be demonstrated. Therefore a test person with Iris-heterochromie was examined. This pigment anomaly presents itself in form of different pigment stamping of the irises. With the help of the analysis method the genetic determination of the test person, who shows a blue-brown and a brown-yellow-green eye, for the blue eye could be ascertained. In this case a hyperpigmentation of the darker eye can be assumed.

In addition to the development and validation, the analysis procedure was applied to archaeological skeletal material to answer the questions, when the today's european diversity in pigmentation and the blue eye colour have originated. Because the neolithic period distinguishes itself by an extreme change of the hunter and collector to the established farmer that arise with foundations of village communities. This phase is assumed as a possible origin of the today's diversity.

A total of 185 neolithic individuals from the time 4 500-2 800 BC and 142 medieval individuals from the 13th/14th century were analysed as a comparative population. For a total of six neolithic and 21 medieval individuals the pigmentation could be reconstructed in parts completely and very often partially. The neolithic individuals show a very high ration of homozygous alleles in comparison to the medieval individuals, that it can be supposed that in the neolithic era no mixture between different populations has been occurred. The very low diversity of haplogroups confirms also this statement. Therefore it can said, that the origin of the today's pigmentation diversity is localised not in the neolithic period, but must have originated between the neolithic period and the middle ages.

With regard to the blue eye colour the working group Eiberg et al. 2008 supposed the hypothesis that the origin is localised 6 000-10 000 years ago. In case of the ascertained eye colours of the neolithic individuals, with an age of approximately 5,000 years, a relatively high portion of the blue eyes (66 %) appears. This points out to the fact that the blue eye colour has originated before the neolithic period. The hypothesis was not disproved, but it can be still supposed that the origin has occurred rather before 10 000 than 6 000 years ago.

With the additional analysis of the mitochondrial DNA and the individual-specific STRs of the aDNA samples, a contamination from the side of the lab employees can be excluded, what the authenticity of the aDNA results strengthened.

9. Anhang

Tabelle 1: Analyseergebnis der 18 SNPs und Übersicht über die Pigmentierungsmerkmale der 400 Probanden. Angegeben sind die Probandennummern, die jeweilige Pigmentierungsmerkmale (Augenfarbe, Haarfarbe, Hauttyp, Rotstich, Sommersprossen) sowie die Analyseergebnisse der untersuchten SNPs. Die SNPs rs7495174, rs1805008/-007/-009, rs916977, rs4778138, rs12203592, rs1800407, rs12896399, rs12913832, rs4778241, rs1393350, rs13289, rs1408799, rs6867641, rs1426654, rs1129038 und rs1667394 sind in Form der letzten drei Ziffern der SNP-ID Nummer angegeben. Zusätzlich sind die Genbezeichnungen sowie die Allelausprägungen dargestellt. 1=homozygot (häufigere Ausprägung), 2= homozygot (seltene Ausprägung), 3= heterozygot.

Anhang

	Probanden-Nr.	Geschlecht	Alter	OCA2 Intron1			HERC2				MC1R			OCA2 Exon 13		IRF4	TYRP1	SLC24A4	SLC45A2		TYR	SLC24A5	Augenfarbe	Haartyp	Haarfarbe Nr.	Rotstich	Haut-Typ	Sommer-sprossen				
				174	8241	138	977	394	832	38	008	007	009	407	592				799	399									641	289	350	654
1	4	m	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	III	11	-	III	-					
2	5	w	30	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	2	III	11	ja	III	-					
3	6	m	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	3	1	2	VI	21	-	III	-						
4	8	w	29	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	3	1	2	III	11	-	II	immer im Gesicht						
5	10	m	33	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	2	IV	12/3	-	III	immer im Gesicht					
6	11	w	60	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	1	1	1	II	9	-	III	-					
7	12	w	59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	3	IV	12/3	-	III	-						
8	15	w	34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	4	VI	21	ja	III	-					
9	16	m	45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	VI	20	-	III	-						
10	17	w	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	3	III	11	-	III	-						
11	18	w	32	1	3	3	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	6	IV	12/3	-	III	im Sommer im Gesicht					
12	19	w	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	1	1	3	III	11	-	II	im Sommer im Gesicht						
13	20	w	47	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	3	VI	14	ja	III	-					
14	21	m	48	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	2	VI	20	-	III	im Sommer im Gesicht					
15	22	m	34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	III	11	-	III	-						
16	23	w	57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	4	VI	20	-	III	-					
17	24	w	57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	1	3	VI	20	-	III	-					
18	25	m	30	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	3	IV	12/3	ja	III	-					
19	28	m	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	1	6	VI	20	-	III	-					
20	29	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	3	VI	14	ja	III	im Sommer im Gesicht					
21	30	w	23	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	9	III	11	-	III	-					
22	31	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	3	1	3	VII	22	-	III	-					
23	33	m	25	1	3	1	1	1	3	3	3	1	1	3	1	3	3	1	1	1	1	8	VII	22	-	III	-					
24	34	m	24	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3	2	3	3	1	1	5	II	15/1	ja	II	im Sommer überall					
25	35	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	2	IV	12/3	-	III	-					
26	36	w	24	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	1	3	3	3	1	1	2	III	10	-	III	-					
27	37	w	23	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	1	3	3	2	3	1	4	III	12/3	-	III	-					
28	38	w	23	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	1	2	1	1	VI	20	-	III	im Sommer im Gesicht					
29	40	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	3	III	11	-	II	-					
30	41	m	42	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	2	VI	20	-	III	-					
31	42	w	41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	3	1	1	3	1	4	rot	15	ja	I	immer überall					
32	43	w	28	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	3	1	1	1	1	6	II	15/1	ja	I	immer überall					
33	44	w	33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	1	1	1	IV	12/3	-	III	immer im Gesicht					
34	51	w	28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	III	11	-	III	-					
35	52	w	28	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	6	IV	12/3	-	III	im Sommer im Gesicht					
36	53	w	35	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	3	1	3	2	3	1	2	VII	22	-	II	-					
37	56	w	53	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	3	1	2	III	11	-	III	-					
38	57	w	65	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	2	1	1	5	IX	23	-	III	-					
39	59	w	30	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	5	V	19	-	III	-					
40	60	w	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	V	19	ja	III	-					
41	61	m	31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	6	IV	12/3	ja	III	-					
42	63	w	28	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	1	3	3	1	1	1	1	8	VI	21	ja	III	-					
43	64	w	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	2	3	1	4	VII	22	-	II	-						
44	66	m	32	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	8	VII	22	-	IV	-					
45	67	m	32	1	3	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	3	2	1	1	1	1	2	III	12/3	ja	III	-					
46	68	w	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	2	III	12/3	-	III	-					

Anhang

47	69	w	27	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	3	3	2	1	1	8	VI	21	-	III	im Sommer im Gesicht
48	70	w	24	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	3	1	1	6	VI	20	-	IV	-
49	71	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	1	I	4	-	III	-
50	75	m	38	1	3	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	8	IX	23	-	III	-
51	76	w	27	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1	1	1	2	VI	16	ja	III	immer im Gesicht
52	77	w	55	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	9	VII	22	-	IV	-
53	78	w	60	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	3	1	1	3	1	4	IV	12/3	ja	III	im Sommer im Gesicht
54	79	m	31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	3	3	2	1	1	VI	20	-	III	-
55	80	w	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	4	VI	20	-	III	-
56	83	m	29	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	1	4	VI	20	-	III	-
57	84	w	32	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	5	II	15/1	ja	I	immer im Gesicht + Schultern
58	85	w	31	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	II	15/2	ja	II	-
59	86	w	48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	4	III	12	-	III	-
60	87	m	50	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	3	1	1	1	1	4	IV	12/3	-	III	-
61	88	m	54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	III	12	-	II	-
62	89	w	55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	2	1	1	2	VI	20	-	III	-
63	90	w	36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	III	12	ja	III	im Sommer im Gesicht
64	91	m	32	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	3	3	1	6	II	15/1	ja	II	im Sommer im Gesicht + Schultern
65	92	w	35	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	1	2	1	3	3	3	1	2	II	15/1	ja	III	immer überall
66	93	w	25	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	8	VII	22	ja	II	immer im Gesicht
67	94	w	29	1	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1	3	2	3	1	4a	VII	22	ja	IV	immer im Gesicht
68	95	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	3	1	3	II	5	ja	III	-
69	97	m	28	1	1	3	1	1	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	1	6	VI	20	-	III	-
70	98	w	30	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	II	15/2	ja	II	im Sommer im Gesicht
71	99	w	31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	II	4	-	III	-
72	102	m	35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	2	VI	21	-	III	-
73	103	m	57	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	1	2	3	1	1	3	1	2	VI	21	-	III	-
74	104	w	56	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	2	VI	20	-	II	-
75	105	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	3	3	3	1	6	VI	21	-	III	-
76	107	w	29	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	2	3	2	2	1	8	III	12/3	-	III	-
77	109	w	28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	3	IV	12/3	-	II	im Sommer im Gesicht
78	110	w	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	2	II	4	-	III	-
79	111	w	33	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	3	2	1	1	1	III	11	-	III	-
80	112	w	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3	1	6	VI	16	ja	II	immer überall
81	114	w	28	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	3	3	3	1	1	VII	22	-	III	immer im Gesicht ganz leicht
82	115	w	26	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	3	3	1	1	2	II	15/2	ja	III	immer im Gesicht
83	116	w	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	VI	21	ja	III	-	
84	118	w	45	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	1	3	3	1	1	2	III	11	-	III	immer im Gesicht
85	119	m	28	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	1	3	3	3	3	1	1	6	II	15/2	-	II	immer überall
86	120	m	28	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	1	6	IV	12/3	-	III	-
87	121	w	27	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	1	1	II	7	-	II	-
88	122	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	1	1	III	12	ja	II	-
89	123	m	50	3	2	3	2	2	2	2	1	1	1	3	1	3	3	1	1	3	1	9	VII	22	-	III	-
90	124	w	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	3	3	1	4	II	7	-	III	-
91	127	m	63	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3	1	3	3	2	1	6	IX	23	-	III	-
92	128	m	31	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	2	3	2	3	1	1	VI	16	ja	III	immer überall
93	129	w	33	1	3	1	3	3	3	3	1	3	1	3	1	1	3	1	1	1	1	6	rot	15	ja	III	immer im Gesicht + Arme
94	130	w	32	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	1	1	II	7	-	II	-
95	131	w	24	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	1	I	4	-	II	immer im Gesicht
96	133	w	56	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	3	3	3	3	1	1	4	IX	23	-	IV	-
97	134	w	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	1	III	12	-	III	-
98	135	w	35	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	2	1	1	3	1	3	III	11	-	III	im Sommer im Gesicht
99	136	w	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	II	7	-	III	-

Anhang

153	197	m	27	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	1	3	3	1	1	3	1	6	IV	12/3	-	III	-
154	198	m	27	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	2	1	1	3	1	1	I	1	ja	III	im Sommer im Gesicht
155	199	w	22	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	1	3	1	1	3	1	4	IV	12/3	-	II	-
156	200	m	28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	VII	22	-	III	-	
157	201	m	34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	1	1	1	IV	12/2	-	III	-	
158	202	m	20	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	4	IV	12/3	ja	III	-
159	203	m	20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	1	1	III	11	-	III	-	
160	204	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	1	1	4	VI	20	-	III	-	
161	205	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	2	3	3	1	1	IV	12/2	-	III	-	
162	206	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	3	1	3	3	3	1	4	IV	12/3	ja	II	Immer im Gesicht
163	207	m	61	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	1	2	3	3	1	3	IV	12/2	ja	II	-
164	208	w	57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	2	2	1	1	2	VI	21	-	II	-
165	209	m	23	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	2	2	1	1	6	VI	16	ja	II	Immer im Gesicht
166	210	m	22	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	4	IV	12/3	-	III	-	
167	211	m	20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	3	1	1	3	IV	12/3	-	III	-	
168	212	m	24	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	6	VII	22	-	III	-
169	213	m	24	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	1	1	1	1	1	IV	12/3	-	III	Immer Gesicht + Schultern	
170	214	m	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	2	1	1	3	VI	21	-	III	im Sommer im Gesicht
171	215	m	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	VII	22	-	III	-	
172	216	m	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	IV	12/2	-	III	-	
173	217	w	32	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	2	1	1	1	IV	12/3	-	III	Immer im Gesicht + Schultern
174	218	m	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	2	III	11	-	II	Immer auf der Nase
175	219	m	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	IV	12/2	-	II	im Sommer im Gesicht
176	220	m	23	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	3	3	3	1	1	IV	12/3	ja	II	Immer im Gesicht + Oberkörper
177	221	w	26	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	2	3	3	3	2	1	6	IV	12/2	-	III	Immer Gesicht + Schultern
178	222	m	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	1	2	IV	12/1	-	III	Immer im Gesicht
179	223	w	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	IV	12/3	-	II	-	
180	224	w	20	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	1	3	3	2	3	1	4	VII	22	ja	II	im Sommer im Gesicht
181	225	w	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	2	IV	12/3	-	III	Immer im Gesicht	
182	226	w	21	3	3	3	1	1	3	3	3	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	9	VI	20	ja	III	im Sommer auf der Nase
183	227	m	26	3	3	3	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	8	III	11	ja	II	-
184	228	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	II	9	-	III	-	
185	229	m	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	3	IV	12/3	-	III	-
186	230	w	23	1	1	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	8	VI	13	ja	II	Immer im Gesicht + Hände
187	231	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	3	1	2	I	4	-	III	im Sommer im Gesicht
188	232	w	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	2	3	1	1	IV	12/3	-	III	Immer im Gesicht
189	233	w	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	4	VI	20	ja	III	Immer im Gesicht
190	234	m	32	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	6	IV	12/3	-	III	-
191	235	m	20	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3	1	1	III	11	-	II	-
192	236	m	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	1	III	11	-	III	Immer im Gesicht
193	237	m	24	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3	2	3	2	3	1	6	VII	22	-	IV	-
194	238	m	21	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	6	IV	12/3	-	III	-
195	239	m	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	1	4	IV	12/2	-	III	-
196	240	m	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	1	VI	21	-	III	-
197	241	m	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	IV	12/3	-	III	-	
198	242	m	26	1	1	3	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	3	1	1	3	1	1	III	11	-	III	-
199	243	m	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	1	IV	12/3	-	III	-
200	244	m	22	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	1	3	VII	22	-	III	-
201	245	w	22	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	1	III	12	-	III	im Sommer überall
202	246	m	26	1	2	1	3	3	3	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	IV	12/3	-	III	-
203	247	m	25	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	II	7	ja	II	im Sommer im Gesicht
204	248	w	23	1	1	3	3	3	3	3	1	2	1	1	1	3	3	1	1	1	1	8	VI	18	ja	II	Immer im Gesicht
205	249	m	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	1	6	VI	20	-	III	Immer im Gesicht

Anhang

206	250	m	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1	1	2	II	7	ja	II	-
207	251	w	22	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	2	I	4	-	II	im Sommer Gesicht + Arme
208	252	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	3	3	1	1	3	IV	12/3	-	II	Immer überall
209	253	w	23	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	4	IV	12/3	-	III	-
210	254	m	26	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1	3	2	3	1	6	IV	12/3	-	III	-
211	255	m	31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	1	1	VI	21	-	III	Immer im Gesicht
212	256	m	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	2	IV	12/3	-	III	im Sommer im Gesicht
213	257	m	20	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	2	IX	23	-	IV	-
214	258	m	24	1	1	3	3	3	3	3	1	3	1	1	1	2	3	1	1	1	1	9	IV	12/3	-	III	-
215	259	m	29	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	IV	12/3	-	III	-
216	260	m	25	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	III	11	-	II	im Sommer im Gesicht
217	261	w	21	1	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	2	3	3	3	1	9	IV	12/1	-	III	Immer im Gesicht
218	262	m	24	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1	1	3	2	3	1	1	2	1	1	II	11	-	II	im Sommer überall
219	263	m	35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	IV	12/3	-	III	-
220	264	m	21	1	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	1	3	3	2	1	9	VII	22	-	IV	-
221	265	m	23	1	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	IX	23	-	III	-
222	266	m	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	3	3	3	1	3	II	11	-	III	im Sommer im Gesicht
223	267	m	20	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	9	IX	23	-	IV	-
224	268	m	25	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	VII	22	-	III	-
225	269	m	24	3	3	3	3	3	3	3	1	3	1	1	1	3	3	3	3	3	1	9	VI	20	ja	III	-
226	270	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	1	1	6	II	8	ja	II	im Sommer im Gesicht
227	271	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	III	12/1	-	III	im Sommer im Gesicht
228	272	m	37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	3	3	3	1	1	VI	20	-	III	-
229	273	m	22	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	III	11	ja	III	im Sommer im Gesicht
230	274	m	28	3	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1	3	2	2	1	8	IV	12/3	-	III	-
231	275	m	23	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	I	1	-	II	-
232	276	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	6	VI	20	-	III	-
233	277	m	19	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	2	3	3	3	1	1	IV	12/3	-	III	-
234	278	w	25	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	IV	12/2	-	II	Immer im Gesicht
235	279	m	26	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	II	9	ja	II	Immer überall
236	280	m	25	1	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	3	1	3	2	1	1	1	9	VII	22	-	III	im Sommer im Gesicht
237	281	m	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	IV	12/3	-	III	-
238	282	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	1	1	IV	12/3	-	II	Immer im Gesicht
239	283	m	30	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	1	3	3	3	1	1	4	VII	22	-	II	-
240	284	m	22	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	2	2	1	1	1	II	8	ja	III	im Sommer überall
241	285	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	4	VI	21	-	III	im Sommer im Gesicht
242	286	w	23	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	4	IV	12/3	-	II	im Sommer im Gesicht
243	287	w	30	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	2	VII	22	-	II	im Sommer im Gesicht
244	288	w	33	1	1	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	3	1	1	3	3	1	9	VII	22	-	III	im Sommer im Gesicht
245	289	w	25	1	3	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	1	3	1	1	1	1	4	IX	23	ja	III	im Sommer im Gesicht
246	290	w	22	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	9	III	12	-	III	Immer im Gesicht
247	291	m	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	II	6	-	II	-
248	292	m	22	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	9	VI	20	-	III	-
249	293	m	24	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	3	3	3	2	3	1	4	III	11	-	III	-
250	294	m	27	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	3	1	1	1	1	4	II	7	ja	II	-
251	295	w	29	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	3	3	3	2	3	1	6	III	12	-	I	im Sommer im Gesicht
252	296	m	22	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	2	3	3	1	1	1	I	3	ja	II	Immer im Gesicht
253	297	m	33	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	9	IX	23	-	III	-
254	298	w	23	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	4	I	3	-	II	im Sommer im Gesicht
255	299	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	2	1	1	4	III	11	ja	II	Immer im Gesicht
256	300	w	23	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	3	3	3	1	2	II	7	ja	II	im Sommer im Gesicht
257	301	m	24	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	II	8	ja	II	Immer überall
258	302	w	28	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	1	VI	18	ja	II	Immer überall

Anhang

259	303	m	23	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	3	2	3	2	3	1	1	V	19	ja	II	Immer überall	
260	304	m	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	3	1	2	VII	22	-	III	-	
261	305	m	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	1	3	1	1	IV	12/3	-	III	-	
262	306	w	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	6	V	19	-	III	-	
263	307	w	23	1	3	3	3	3	3	3	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	8	VI	21	ja	III	-	
264	308	m	26	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	4	IX	23	-	IV	Immer im Gesicht
265	309	w	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	4	I	5	-	III	im Sommer im Gesicht	
266	310	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	3	1	2	I	3	-	III	im Sommer im Gesicht	
267	311	w	23	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	1	VI	20	ja	I	-	
268	312	w	23	1	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	3	1	1	3	1	1	3	1	6	VII	22	-	III	-
269	313	m	24	3	3	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	9	VII	22	-	III	-	
270	314	w	26	3	1	1	3	3	3	3	3	1	3	1	1	1	3	3	3	3	3	1	9	VI	20	ja	III	-
271	315	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	1	3	3	1	1	4	III	11	-	III	Immer im Gesicht	
272	316	w	47	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	IV	12/1	ja	II	-	
273	317	w	54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	4	IX	23	-	II	-	
274	318	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	2	III	11	-	II	-	
275	319	m	45	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	2	2	1	1	1	IV	12/2	-	II	-	
276	320	w	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	3	1	4	IV	12/3	-	III	-	
277	321	w	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	III	11	-	III	-		
278	322	m	30	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	III	11	-	III	-	
279	323	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	3	3	1	1	3	VI	21	-	III	-
280	324	m	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	IV	12/3	-	III	-	
281	325	w	24	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	1	3	3	2	1	2	II	15/2	ja	I	Immer überall	
282	327	w	42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	1	1	1	III	11	-	II	-		
283	328	w	18	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	2	1	1	1	I	1	-	I	im Sommer im Gesicht	
284	331	w	54	1	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	3	3	1	3	3	3	1	1	4	VII	21	ja	II	-
285	332	w	55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1	1	2	VI	20	-	III	im Sommer im Gesicht
286	333	w	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	VII	22	-	III	Immer im Gesicht	
287	334	w	51	1	3	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	VII	22	ja	III	Immer im Gesicht	
288	335	w	53	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	6	IX	23	-	II	-	
289	336	w	50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	VI	21	-	III	Immer im Gesicht		
290	337	w	18	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	6	V	19	ja	III	im Sommer im Gesicht	
291	338	w	52	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	3	2	1	1	3	1	1	VI	13	ja	I	Immer überall	
292	339	w	32	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1		3	3	1	1	4	VI	20	-	II	Immer im Gesicht	
293	346	m	55	1	3	3	1	1	3	3	1	3	1	1	3	3	1	3	2	3	1	4	IX	23	-	IV	-	
294	347	m	18	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	1	3	1	1	3	1	9	IX	23	-	III	-	
295	348	m	57	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	1	1	9	IX	23	-	III	-
296	349	m	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	3	3	1	1	V	19	-	III	-	
297	350	w	51	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	2	3	1	1	1	1	6	VII	22	-	III	im Sommer im Gesicht	
298	351	w	25	1	3	1	3	3	3	3	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	8	V	19	-	III	im Sommer im Gesicht	
299	352	w	50	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	1	2	3	1	3	1	1	6	III	11	-	II	Immer überall	
300	353	w	18	1	1	1	1	1	1	2	2	1	3	1	1	1	2	2	1	1	1	1	9	III	11	ja	II	-
301	N1	w	35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	4	VII	22	-	III	-	
302	N2	w	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	3	VI	20	-	III	-	
303	N3	w	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	II	7	-	III	-		
304	N4	m	30	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	III	11	ja	III	-	
305	N5	m	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	3	IV	12/3	-	II	-	
306	N6	w	29	1	1	3	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	3	3	1	4	IV	12	-	II	immer im Gesicht	
307	N7	w	29	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	8	III	11	-	III	immer überall	
308	N9	w	27	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	2	3	3	3	3	1	3	rot	15	ja	I	immer überall	
309	N10	m	42	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	2	3	1	1	2	III	12	-	II	-	
310	N11	m	58	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	3	1	2	III	11	-	II	-		
311	N12	m	45	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	3	1	4	IV	12	-	II	-

Anhang

312	N13	w	35	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	4	VI	20	-	II	immer im Gesicht	
313	N14	m	40	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	2	1	1	3	IV	12	-	I,II	immer im Gesicht + Arme	
314	N15	m	61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	4	IV	12/3	-	III	-		
315	N16	m	65	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	2	1	1	3	1	1	IV	12/3	-	III	-	
316	N17	m	82	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	3	3	3	1	2	III	11	-	II	-	
317	N18	m	50	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	3	1	1	VII	22	-	III	-	
318	N19	m	82	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	2	3	1	1	III	11	-	I	-	
319	N20	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	VI	20	ja	II	-	
320	N21	m	42	3	3	3	1	1	3	3	1	3	1	1	3	3	1	3	2	3	1	6	IX	23	-	III	immer überall	
321	N22	m	71	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	3	2	1	1	4	VI	20	-	II	-
322	N23	w	70	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	V	19	-	II	-	
323	N24	w	52	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	3	1	2	VI	20	-	III	immer überall	
324	N25	m	38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	2	II	7	-	III	-		
325	N26	w	28	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	3	2	1	1	2	1	9	VI	20	-	III	-	
326	N27	m	32	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	1	1	3	1	2	V	19	-	II	-	
327	N28	m	45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	2	1	1	4	III	11	-	II	-	
328	N29	w	37	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	II	8	-	II,III	-	
329	N30	w	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	1	II	8	-	II	-	
330	N31	w	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	2	1	1	6	VI	20	-	III	-
331	N32	w	40	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	1	2	1	1	2	III	11	-	I	immer im Gesicht + Arme	
332	N33	w	42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	3	1	2	IV	12	ja	II	-	
333	N34	w	41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	2	1	1	1	III	11	ja	II	-	
334	N35	m	31	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	1	2	1	1	3	II	8	ja	II	-	
335	N36	m	42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	3	III	11	-	II	immer im Gesicht + Arme		
336	N37	w	20	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	V	19	-	I	-	
337	N38	w	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	2	2	3	1	3	V	19	-	II	immer im Gesicht
338	N39	m	45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	IV	12	-	II	-	
339	N40	m	39	3	3	2	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	3	1	1	2	1	1	9	IX	23	-	III	-
340	N41	w	34	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	3	2	3	1	9	VII	22	-	III	immer im Gesicht	
341	N42	w	28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	2	1	1	6	II	7	-	II	-	
342	N43	m	19	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	3	1	9	VI	20	-	III	-
343	N44	m	48	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	3	1	3	2	1	1	2	IV	12/3	-	III	-
344	N45	w	25	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	4	IV	12	-	III	-	
345	N46	w	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	2	3	1	4	VI	20	ja	III,IV	-
346	N47	w	25	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	6	VI	21	-	III	-	
347	N48	w	24	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	III	8	-	III	-	
348	N49	w	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	3	2	3	1	1	III	8	ja	I	-
349	N50	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	3	3	3	3	1	1	V	19	-	II	-	
350	N51	m	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	9	VI	20	-	III	-	
351	N52	m	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	3	V	19	-	III	-	
352	N53	m	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	4	V	19	ja	III	-	
353	N54	w	27	1	3	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	9	II	15/2	ja	III	immer überall	
354	N55	w	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	2	3	3	1	1	VI	20	-	II	-
355	N56	m	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	IV	12	-	III	-	
356	N57	w	26	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	2	3	1	9	IV	12/3	-	III	-	
357	N58	m	26	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	IV	12	ja im Bart	II	immer überall	
358	N59	m	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	1	4	IV	12/2	ja im Bart	II	-
359	N60	w	25	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	3	1	3	1	1	II	15/2	ja	I,II	immer überall	
360	N61	w	23	1	1	3	3	3	3	3	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	1	8	VI	20	-	II	-	
361	N62	w	24	1	3	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	5	V	19	-	II	-	
362	N63	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	3	1	1	1	II	9	-	II	immer im Gesicht	
363	N64	m	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	IV	12	-	II	-	
364	N65	w	25	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	3	3	1	3	3	1	2	IV	12	ja	II	immer im Gesicht	

Anhang

365	N67	w	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	V	19	-	I	-	
366	N68	m	24	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	3	3	1	2	V	19	-	II	-
367	N69	w	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1	1	3	IV	12	-	II	-		
368	N70	m	26	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	2	3	1	1	3	IV	12	ja	III	-		
369	N71	w	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	1	II	8	-	II	-	
370	N72	w	26	3	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	1	3	2	1	1	3	III	11	-	III	-
371	N73	m	26	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	6	V	19	-	III	-
372	N74	w	27	1	3	3	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	1	1	III	12	-	IV	-
373	N75	w	26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	VI	20	-	III	-
374	N76	m	24	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	II	15/2	ja	II	immer im Gesicht
375	N77	m	27	1	3	1	1	1	3	3	3	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	9	VI	20	-	II	-
376	N80	w	34	1	3	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	1	1	2	3	1	8	II	8	-	III	immer überall
377	N81	m	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	3	III	11	-	II	-
378	N82	w	24	3	2	3	3	3	2	2	3	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	9	VII	22	-	III	-
379	N84	m	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	VI	21	-	III	-
380	N85	m	30	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	5	II	15/2	ja	III	-
381	N86	w	23	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	3	IV	12	ja	II,III	-
382	N87	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	V	19	-	II	-
383	N88	w	25	1	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	3	1	3	3	2	1	1	4	II	15/2	ja	I,II	immer überall
384	N89	w	24	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	2	2	3	1	1	II	8	ja	I,II	immer überall
385	N90	w	24	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	V	19	ja	II	-
386	N91	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	4	VI	20	-	III	immer überall
387	N92	w	24	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	1	3	1	1	3	2	1	8	VI	20	-	II	-
388	N93	m	25	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3	1	1	IV	12	-	II	-
389	N94	m	29	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	3	1	2	2	1	1	9	V	19	-	III	-
390	N95	m	24	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	3	1	1	1	1	3	II	8	-	II	-
391	7	w	30	1	1	3	1	1	3	3	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	6	VI	20	ja	IV	-
392	26	w	24	1	3	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	6	IV	12/3	-	III	immer im Gesicht
393	27	w	24	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	9	III	11	-	III	-
394	32	w	23	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	3	3	1	2	II	15/2	ja	II	-
395	39	w	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	1	VI	20	-	III	-
396	49	w	52	1	3	3	1	1	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	2	II	8	-	III	-
397	55	m	28	1	3	3	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1	5	IV	12/3	ja	III	-
398	58	w	30	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	1	1	3	1	3	3	1	1	9	VII	22	ja	II	-
399	47	m	54	1	1	3	1	1	3	3	3	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	9	VII	22	-	III	-
400	50	w	50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	VI	20	ja	III	-

Anhang

Tabelle 3a: Verwendete Primer und Sonden der Realtime-PCR für die Quantifizierung der nukleären DNA. Angegeben sind die Primer- und Sondensequenzen sowie die Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp). Die Primer sind von der Firma Biomers und die Sonde von Applied Biosystem.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
Telo-Forward	GGCACACGTGGCTTTTCG	98
Telo-Reverse	GGTGAACCTCGTAAGTTTATGCAA	
Sonde-Telo	NED-ACGTCGAGTGGACACG-MGB	

Tabelle 3b: PCR-Ansatz der Realtime-PCR für die Quantifizierung der nukleären DNA. Angegeben sind die einzelnen Komponenten des Realtime-PCR-Ansatzes mit genauen Ausgangs- und Endkonzentrationen sowie deren einzusetzende Volumina in µl. Zusätzlich sind die Firmennamen mit aufgeführt.

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen in µl
Bidest			13,93
Immobuffer (Bioline)	10x		2,5
dNTPs (Bioline)	je 2,5 mM	je 0,2 mM	2
Primermix Telo (Biomers)	je 25 pmol	je 1 µM	2
DMSO	100 %		1
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	37,5 mM	0,75
Sonde Telo (Biomers)	10 pmol (1/10)	0,25 µM	0,625
Immolase (Bioline)	5 U/µl	1 U	0,2
Mastermix			23
Probe			2

Tabelle 3c: Temperaturprofil der Realtime-PCR für die Quantifizierung der nukleären DNA.

Temperatur	Zeit	Zyklen
50 °C	10 sek	1
95 °C	10 min	1
95 °C	30 sek	40
60 °C	1 min	
10 °C	∞	1

Anhang

Tabelle 5b: Analyseergebnis der 100 Probanden mit den SNPs aus (Walsh et al., 2011) (Irisplex). Angegeben sind die Probandennummern, die jeweilige Augenfarbe (1-9, siehe Kapitel 3.1.1) sowie die Analyseergebnisse der untersuchten SNPs. Die SNPs rs12203592, rs1800407, rs12896399, rs12913832, rs1393350 und rs16891982 sind in Form der letzten drei Ziffern der SNP-ID Nummer angegeben. Zusätzlich sind die Genbezeichnungen sowie die Allelausprägungen dargestellt. 1=homozygot (häufigere Ausprägung), 2= homozygot (seltene Ausprägung), 3= heterozygot.

	Probanden-Nr.	SLC45A2	HERC2	OCA2 Exon 13	IRF4	SLC24A4	TYR	Augenfarbe
		982	832	407	592	399	350	
		c=1/g=2	g=1/a=2	g=1/a=2	c=1/t=2	g=1/t=2	g=1/a=2	
1	301	1	1	3	1	1	1	4
2	302	1	1	1	1	3	3	3
3	303	1	1	1	1	3	3	1
4	304	1	1	1	1	3	3	1
5	305	1	1	1	1	3	3	3
6	306	1	1	1	1	3	3	4
7	307	1	1	1	1	1	1	8
8	308	1	1	1	3	3	3	3
9	309	1	1	1	1	2	1	2
10	310	1	1	1	1	3	3	2
11	311	1	3	3	1	3	3	4
12	312	1	1	1	1	1	1	4
13	313	1	1	1	1	3	1	3
14	314	1	1	1	1	3	3	4
15	315	1	1	1	1	2	3	1
16	316	1	1	1	1	1	3	2
17	317	1	1	1	1	2	3	1
18	318	1	1	1	1	3	3	1
19	319	1	1	1	1	1	2	2
20	320	3	3	1	3	1	3	6
21	321	1	3	3	1	1	1	4
22	322	1	1	1	1	3	1	2
23	323	3	1	1	1	1	3	2
24	324	1	1	1	1	3	2	2
25	325	1	2	1	1	2	2	9
26	326	1	1	1	1	2	3	2
27	327	1	1	1	1	1	1	4
28	328	1	1	1	1	2	1	1
29	329	1	1	1	1	1	1	1
30	330	1	1	1	3	1	1	6
31	331	1	1	1	1	3	1	2
32	332	1	1	1	1	2	3	2
33	333	1	1	1	1	3	1	1
34	334	1	1	1	1	2	1	3
35	335	1	1	1	1	1	1	3
36	336	1	1	1	1	2	1	1
37	337	1	1	1	3	3	3	3
38	338	1	1	1	3	1	1	1
39	339	1	3	1	3	1	1	9
40	340	1	3	1	1	1	3	9
41	341	1	1	1	1	1	1	5
42	342	1	3	1	1	1	3	9
43	343	1	3	1	3	1	1	2
44	344	1	1	1	1	1	1	4
45	345	1	1	1	3	1	3	4
46	346	1	1	1	1	1	3	6
47	347	1	1	1	1	2	1	1
48	348	1	1	3	1	2	3	1
49	349	1	1	1	3	3	3	1
50	350	1	1	1	1	1	1	9
51	351	1	1	1	1	1	3	3
52	352	1	1	1	1	1	1	4
53	353	3	3	1	1	3	1	9
54	354	1	1	3	1	3	3	1
55	355	1	1	1	1	1	1	1
56	356	3	1	1	1	1	3	9
57	357	1	1	1	1	1	1	1
58	358	1	1	1	3	1	3	4
59	359	1	1	1	3	1	3	1

Anhang

60	360	1	3	1	3	3	3	8
61	361	1	3	1	1	1	1	5
62	362	1	1	1	1	2	1	1
63	363	1	1	1	1	1	1	1
64	364	1	1	3	1	3	3	2
65	365	1	1	1	1	1	3	1
66	366	1	3	1	3	1	3	2
67	367	1	1	1	1	3	1	3
68	368	1	1	3	1	3	1	3
69	369	1	1	1	1	1	1	1
70	370	1	3	1	1	1	1	3
71	371	3	1	1	1	1	3	6
72	372	1	3	1	1	1	3	1
73	373	1	1	1	1	3	1	1
74	374	3	1	1	1	1	2	1
75	375	1	3	3	1	1	1	9
76	376	1	1	3	1	1	3	8
77	377	1	1	1	1	1	3	3
78	378	1	2	1	1	3	1	9
79	379	1	1	1	1	3	1	1
80	380	3	1	1	1	3	1	5
81	381	1	1	1	1	3	1	3
82	382	1	1	1	1	1	1	1
83	383	1	1	1	3	3	1	4
84	384	1	1	1	1	3	3	1
85	385	1	1	1	1	1	1	3
86	386	1	1	1	1	1	1	4
87	387	1	3	1	1	1	2	8
88	388	1	1	1	1	3	3	1
89	389	1	3	1	1	1	1	9
90	390	1	1	1	1	3	1	3
91	391	1	3	1	1	2	1	6
92	392	1	3	1	1	2	1	6
93	393	1	3	1	1	1	1	9
94	394	1	1	1	1	3	3	2
95	395	1	1	1	1	1	1	1
96	396	1	3	1	1	3	3	2
97	397	3	1	1	1	1	3	5
98	398	1	3	1	3	1	1	9
99	399	1	3	1	1	3	3	9
100	400	1	1	1	1	3	1	1

Anhang

Tabelle 6b: Analyseergebnis der 108 Probanden mit den SNPs und Markern aus (Branicki et al., 2011). Angegeben sind die Probandennummern, die jeweilige Haarfarbe blond, braun, schwarz oder rot/Rotstich sowie die Analyseergebnisse der untersuchten SNPs. Die SNPs rs12913832, rs12203592, rs1042602, rs4959270, rs28777, rs683, rs1800407, rs2402130, rs12821256, rs16891982 und rs2378249 sind in Form der letzten drei Ziffern der SNP-ID Nummer angegeben. Zusätzlich sind die Genbezeichnungen sowie die Allelausprägungen dargestellt. 1=homozygot (häufigere Ausprägung), 2= homozygot (seltene Ausprägung), 3= heterozygot.

	Probanden-Nr.	MC1R_R									MC1R_r					SLC24A4	KITLG	SLC45A2	ASIP	Haarfarben		
			HERC2		IRF4		TYR		EXOC2			SLC45A2		TYRP1							OCA2	
			g=1/a=2	c=1/t=2	g=1/t=2	c=1/a=2	a=1/c=2	t=1/g=2	g=1/a=2	a=1/g=2		a=1/g=2	a=1/g=2	a=1/g=2	a=1/g=2						a=1/g=2	
1	N28	wt/wt	1	1	3	3	1	3	1	r/r	3	1	1	1								
2	N11	wt/wt	1	1	3	1	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1								
3	N29	wt/R	1	1	3	2	1	1	1	wt/wt	1	1	1	1								
4	N30	wt/wt	1	1	1	1	1	1	3	1	wt/r	1	1	1	1							
5	N34	wt/wt	1	1	3	1	1	1	2	1	wt/wt	1	1	1	1							
6	N36	wt/wt	1	1	1	3	1	3	1	wt/r	3	1	1	1	3							
7	N39	wt/wt	1	1	2	3	1	3	3	r/r	1	1	1	3								
8	N42	wt/wt	1	1	2	3	1	3	1	wt/wt	1	3	1	1								
9	N44	wt/wt	3	1	3	2	1	1	3	wt/r	1	1	1	1								
10	N45	wt/wt	1	1	1	3	1	1	1	wt/r	1	1	1	1								
11	N48	wt/R	1	1	1	3	1	1	1	wt/r	1	1	1	3								
12	N5	wt/wt	1	1	1	3	1	1	1	wt/r	3	1	1	3								
13	N6	wt/R	1	1	1	1	1	3	1	wt/wt	1	1	1	3								
14	N7	wt/R	1	1	1	3	1	3	1	wt/r	1	1	1	1								
15	120	wt/wt	3	1	1	3	1	1	1	wt/r	3	1	1	3								
16	130	wt/wt	1	3	1	3	1	1	1	wt/wt	1	1	1	3								
17	135	wt/R	1	1	1	1	1	1	1	wt/wt	1	3	1	1								
18	136	wt/wt	1	1	2	3	1	1	1	wt/wt	3	1	1	1								
19	166	wt/wt	3	1	2	3	1	3	1	wt/r	3	1	1	1								
20	250	wt/wt	1	1	2	1	1	3	1	wt/wt	3	3	1	3								
21	251	wt/wt	1	1	2	3	1	1	1	wt/r	3	1	1	3								
22	171	R/R	3	1	1	3	1	3	1	wt/wt	1	3	1	1								
23	177	wt/wt	1	1	1	3	1	3	1	wt/r	1	1	1	3								
24	266	wt/wt	1	1	3	1	1	3	1	r/r	1	1	1	3								
25	275	R/R	1	1	1	3	1	1	1	wt/wt	1	1	1	1								
26	198	wt/wt	1	1	1	3	1	2	1	wt/r	1	1	1	1								
27	211	R/R	1	1	1	3	3	1	1	wt/r	1	1	3	1								
28	22	wt/wt	1	1	1	3	1	1	1	wt/wt	3	1	1	1								
29	298	wt/R	1	1	3	3	1	3	1	wt/r	1	1	1	3								
30	30	wt/R	3	1	2	1	1	1	1	r/r	3	1	1	1								
31	67	R/R	1	3	3	3	1	2	1	wt/wt	1	1	1	3								
32	68	wt/wt	1	1	3	2	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1								
33	71	wt/wt	1	1	3	3	1	1	1	r/r	1	1	1	1								
34	44	wt/wt	1	1	1	3	1	3	1	wt/r	1	1	1	1								
35	56	wt/wt	1	1	1	2	1	1	1	wt/r	3	1	1	3								
36	86	wt/wt	1	1	2	3	1	3	1	wt/wt	1	1	3	2								
37	87	wt/R	1	1	2	1	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1								
38	78	R/R	1	1	1	3	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1								
39	77	wt/wt	2	1	1	2	1	1	1	r/r	1	1	1	1								
40	79	wt/wt	1	1	1	3	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1								
41	80	wt/wt	1	1	3	3	1	1	1	wt/wt	1	1	1	1								
42	83	wt/wt	1	1	3	3	1	3	1	wt/r	1	1	1	1								
43	33	wt/R	3	3	1	2	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1								
44	41	wt/wt	3	1	3	1	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1								
45	53	wt/wt	1	1	3	3	3	3	2	wt/wt	1	1	3	1								
46	93	wt/wt	3	1	2	3	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1								
47	94	wt/wt	3	1	1	2	1	1	1	r/r	3	1	1	1								
48	70	wt/wt	1	1	1	1	1	3	3	wt/wt	1	1	3	1								
49	N18	wt/wt	1	1	1	2	1	2	1	wt/wt	1	1	1	1								
50	N20	wt/wt	1	1	2	2	1	3	1	wt/r	3	1	1	3								
51	N37	wt/R	1	1	2	3	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1								
52	N22	wt/wt	3	3	3	3	1	1	1	r/r	3	1	1	1								
53	N23	wt/wt	1	1	3	3	1	1	1	r/r	1	1	1	1								
54	N26	wt/wt	2	1	3	2	1	3	1	wt/wt	1	1	1	3								

Anhang

55	N27	R/R	1	1	3	3	1	3	1	wt/wt	1	1	1	3	braun
56	N46	wt/wt	1	1	1	3	1	3	3	wt/r	1	3	1	3	
57	105	wt/wt	1	3	1	2	1	2	1	wt/wt	1	1	1	1	
58	114	wt/wt	1	1	3	2	3	1	3	wt/wt	2	1	1	1	
59	163	wt/wt	2	1	2	2	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1	
60	173	wt/wt	1	1	3	3	1	1	1	wt/wt	1	1	1	1	
61	28	wt/wt	1	1	1	3	1	2	3	wt/wt	1	3	1	3	
62	178	wt/R	3	1	1	2	1	3	1	wt/wt	1	3	1	3	
63	180	wt/wt	3	1	3	3	1	1	1	wt/wt	1	1	1	3	
64	187	wt/wt	3	1	1	2	1	1	2	wt/r	1	3	1	1	
65	194	wt/wt	3	1	1	3	3	1	1	wt/wt	1	1	3	1	
66	212	wt/wt	3	1	3	2	1	1	1	wt/wt	1	3	1	1	
67	237	wt/wt	3	1	1	3	1	3	3	wt/wt	1	3	1	1	
68	59	wt/wt	1	1	3	2	1	3	1	wt/r	1	3	1	1	
69	60	wt/wt	1	1	3	3	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1	
70	63	wt/wt	3	3	3	3	1	3	1	wt/r	1	1	1	2	
71	N84	wt/wt	1	1	3	3	1	1	1	wt/r	1	1	1	1	
72	N91	wt/wt	1	1	2	1	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1	
73	N92	wt/R	3	1	1	3	1	3	1	wt/wt	1	3	1	1	
74	N41	wt/wt	3	1	1	3	1	1	1	wt/r	3	1	1	1	
75	N54	wt/wt	3	1	3	2	3	2	1	wt/wt	1	1	3	1	rot oder Rotstich
76	N60	wt/wt	1	1	1	3	1	1	3	wt/wt	1	3	1	3	
77	N76	wt/wt	1	1	1	1	1	1	1	wt/wt	1	1	3	3	
78	129	wt/R	3	3	3	2	1	1	1	wt/wt	3	1	1	2	
79	N85	wt/R	1	1	3	3	1	3	1	wt/r	3	1	3	3	
80	N88	wt/R	1	1	2	1	1	3	3	wt/r	1	1	1	2	
81	115	wt/R	1	1	1	2	1	3	1	wt/wt	3	3	1	1	
82	119	wt/wt	3	1	3	1	1	1	1	wt/wt	1	1	1	1	
83	167	R/R	1	1	1	1	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1	
84	42	R/R	1	1	1	1	1	2	1	wt/wt	3	3	1	2	
85	43	R/R	1	1	3	2	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1	
86	84	wt/wt	1	1	2	1	1	3	1	wt/wt	1	1	1	3	
87	85	wt/R	1	1	2	1	1	3	1	wt/wt	1	1	1	3	
88	98	wt/wt	1	1	2	1	1	3	1	wt/wt	1	1	1	1	
89	91	wt/R	1	1	3	1	1	1	1	wt/wt	3	3	1	1	
90	92	wt/wt	1	1	1	2	1	2	1	wt/wt	3	1	1	1	
91	N9	R/R	1	1	1	3	1	3	3	wt/wt	1	1	1	1	
92	34	R/R	1	1	3	2	1	1	1	wt/wt	1	1	1	3	
93	N21	wt/wt	3	1	1	3	1	3	3	r/r	3	1	3	3	schwarz
94	289	wt/wt	3	1	2	2	1	1	3	wt/wt	3	1	1	3	
95	297	wt/wt	3	1	1	2	1	3	1	r/r	3	1	1	1	
96	308	wt/wt	3	1	1	1	1	3	1	wt/wt	1	3	1	1	
97	317	wt/wt	1	1	3	1	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1	
98	N40	wt/wt	3	1	2	3	1	3	3	wt/wt	1	1	1	1	
99	127	wt/wt	3	1	1	3	1	1	3	wt/wt	3	1	1	3	
100	257	wt/wt	1	1	1	3	1	1	3	wt/wt	1	1	3	1	
101	265	wt/wt	3	1	2	1	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1	
102	133	wt/wt	3	3	1	1	1	1	1	wt/wt	1	1	1	1	
103	335	wt/wt	3	1	3	3	1	3	1	wt/r	1	1	1	1	
104	346	wt/wt	3	1	1	1	1	1	3	wt/wt	1	1	1	1	
105	347	wt/wt	3	1	3	3	3	3	3	wt/wt	1	1	3	1	
106	348	wt/wt	3	1	3	3	3	1	3	wt/wt	1	1	3	1	
107	75	wt/R	3	1	3	3	1	1	1	wt/r	3	1	1	1	
108	57	wt/R	1	1	3	3	1	3	1	wt/wt	3	1	1	1	

Anhang

Tabelle 7b: Verwendete Primer für die Multiplex I + II. Angegeben sind die Primersequenzen mit den jeweiligen Fragmentgrößen in Basenpaaren (= bp) und den SNP-IDs. Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers.

Multiplex I			
Primer	Sequenz 5`-3	Fragmentgröße in bp	SNP-ID
SLC45A2-Forward	ATGTGTTAAGTACCACGAGGA	137	rs13289
SLC45A2-Reverse	TTTTACTACAAGTTTTCCACACA		
OCA2-Forward	GGCTCCGTCGCACCCGTCTG	64	rs7495174
OCA2-Reverse	GCGGCTTAGGAAGCAAGGCAAG		
OCA2-Forward	TTGGCAGCTTTTCTGTCTTCT	181	rs1667394
OCA2-Forward	AAAATGAGAACTTGGTCAATCC		
MC1R-Forward	GCCGTGGACCGCTACATC	174	rs1805008
MC1R-Reverse	GAAGAAGACCACGAGGCACAG		rs1805007
HERC2-Forward	CACAGTGGGGATGCAGTTTGAGTA	75	rs916977
HERC2-Reverse	TTGGCCTTTCTGTTCTTCTTGACC		
OCA2-Forward	GGAAAATCTGCACACTTAGAAA	167	rs4778138
OCA2-Reverse	GCTGTAAATTTCTCCCATCA		
IRF4-Forward	TCATGTGAAACCACAGGGCA	121	rs12203592
IRF4-Reverse	CTGGCACCAAAAGTACCACA		
OCA2-Forward	GCAGAGGTGCTTGCGTACCTTATGGT	254	rs1800407
OCA2-Reverse	GGGGTAATGTTAGTTTGGCTCCCTGTTCTTA		
Multiplex II			
Primer	Sequenz 5`-3	Fragmentgröße in bp	SNP-ID
TYRP1-Forward	ATCAAAATCAAACTGGTTCATC	96	rs1408799
TYRP1-Reverse	TCACTTTTCTCTCTCAACAACT		
SLC24A4-Forward	ATTGAGTATCCTATATTTTATCTG	114	rs12896399
SLC24A4-Reverse	TCTTGATGTTGTATTGATGAGG		
HERC2-Forward	GCCGACGACAGCAGCGACGAT	176	rs1129038
HERC2-Reverse	CAGACACACCAGGCAGCCTACAGTCT		
HERC2-Forward	AAGAGGCGAGGCCAGTTTC	163	rs12913832
HERC2-Reverse	AGAAACGACAAGTAGACCATTT		
SLC45A2-Forward	ACACGTTATTACACAACGATCA	130	rs6867641
SLC45A2-Reverse	GTAATAACGAGAAAAGCCCCA		
SLC24A5-Forward	GAAGAAAATAAAAATCACACTGAGTAAGC	137	rs1426654
SLC24A5-Reverse	CCTTGGATTGTCTCAGGATGTTGC		
OCA2-Forward	CTGGAAAGCAGTTTGACAGTT	66	rs4778241
OCA2-Reverse	GTGCAATTGTTGGCTGGTAG		
MC1R-Forward	CACCGCGCTCACCAGGAGC	143	rs1805009
MC1R-Reverse	GGCTGCATCTTCAAGAACTTCAACC		
TYR-Forward	TATCCACCAACTCCTACTCTT	73	rs1393350
TYR-Reverse	TTATCATTGTAAAAGACCACAC		

Anhang

Tabelle 7c: PCR-Ansatz für die Multiplex-PCRs I und II. Angegeben sind die Primerpaare (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenparen (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit aufgeführt.

Multiplex I				
Primerpaar	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	x 1 Volumen in μl (Primermix)
MC1R-174 bp	rs1805007, -008	100	0,6	0,15
SLC45A2-137 bp	rs13289	100	0,3	0,075
OCA2-167 bp	rs4778138	100	0,8	0,2
OCA2-181 bp	rs1667394	50	0,2	0,1
OCA2-64 bp	rs7495174	50	0,2	0,1
OCA2-254 bp	rs1800407	50	0,4	0,2
IRF4-121 bp	rs12203592	100	0,4	0,1
HERC2-75 bp	rs916977	10	0,1	0,25
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				3,575
Mastermix				11,5
Probe				1
Multiplex II				
Primerpaar	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	x 1 Volumen in μl (Primermix)
TYRP1-96 bp	rs1408799	20	0,1	0,125
TYR-73 bp	rs1393350	10	0,05	0,125
SLC24A5-137 bp	rs1426654	50	0,2	0,1
MC1R-143 bp	rs1805009	50	0,2	0,1
HERC2-176 bp	rs1129038	20	0,1	0,125
MATP-130 bp	rs6867641	100	0,5	0,125
SLC24A4-114 bp	rs12896399	20	0,1	0,125
OCA2-66 bp	rs4778241	20	0,1	0,125
HERC2-163 bp	rs12913832	10	0,05	0,125
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				3,675
Mastermix				11,5
Probe				1

Anhang

Tabelle 7d: Temperaturprofil der Multiplex-PCRs I und II.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	35
58 °C (Multiplex I), 64 °C (Multiplex II)	90 sek	
72 °C	60 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Tabelle 7e: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion der Multiplex-PCRs I und II. Angegeben sind die Sequenzen der SBE-Primer mit deren 5'-Verlängerungen und der daraus resultierenden Gesamtlänge in Basenpaaren (= bp). Zusätzlich sind die SNP Allele sowie die SNP-IDs mit aufgeführt. Die Reverse-Primer sind in roter Schrift dargestellt.

Multiplex I				
SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	gesamte Primerlänge in bp
rs13289	G/C	ACGAGGAGAAATATCAGGGC		20
rs7495174	G/A (C/T)	AGGCAAGTCCCTAAAGGT	(A) ₅	25
rs1667394	G/A	CATTGTTCTTTGTTTGTGGT	(A) ₇	30
rs1805008	C/T	AGCATCGTGACCCTGCCG	(A) ₁₄	32
rs1805007	C/G/T	TCTCCATCTTCTACGCACTG	(GACT) ₅	40
rs916977	G/A	GTGCAGCCTTGGCCAGCCTTCT	(GACT) ₆	46
rs4778138	G/A	GTGAAAATATAACATATCAAAATTG	(GACT) ₆	49
rs12203592	G/A (C/T)	ACTTTGGTGGGTAAAGAAGG	(GACT) ₈	53
rs1800407	G/A	AGGCATACCGGCTCTCCC	(GACT) ₉	54
Multiplex II				
SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	gesamte Primerlänge in bp
rs1408799	C/T	CATCCAATTAATGAATGAATA		21
rs12896399	G/T	CTTAGGTCAGTATATTTGGG		22
rs1129038	G/A	TGAGCCAGGCAGCAGAGC	(A) ₉	27
rs12913832	G/A	GCCAGTTTCATTTGAGCATTAA	(A) ₁₃	35
rs6867641	C/T (G/A)	GTGGTCATGTGTAATAATGTGT	(A) ₁₈	40
rs1426654	G/A (C/T)	CTGAAGTCCCGCTGCCATGAAAGTTG	(GACT) ₄	43
rs4778241	C/A (G/T)	TGTTGGCTGGTAGTTGCAATT	(GACT) ₆	45
rs1805009	G/C	CTCATCATCTGCAATGCCATCATC	(GACT) ₇	52
rs1393350	G/A	CCTCAGTCCCTTCTCTGCAAC	(GACT) ₉	57
Reverse-Primer				

Anhang

Tabelle 7f: SBE-Ansätze der Multiplex-PCRs I und II. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben.

Multiplex I			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM	1x Volumen in μl
H2O			3,55
SBE-Primer (SNP-ID)			
rs13289	5	0,025	0,035
rs7495174	5	0,025	0,035
rs1667394	10	0,3	0,21
rs1805008	20	0,3	0,105
rs1805007	20	0,3	0,105
rs916977	5	0,025	0,035
rs4778138	20	0,8	0,28
rs12203592	20	0,2	0,07
rs1800407	5	0,05	0,07
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			2
Mastermix			6,5
aufgereinigtes PCR-Produkt			0,5
Multiplex II			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM	1x Volumen in μl
H2O			3,52
SBE-Primer (SNP-ID)			
rs1408799	10	0,3	0,21
rs12896399	5	0,05	0,07
rs1129038	5	0,05	0,07
rs12913832	10	0,15	0,105
rs6867641	10	0,3	0,21
rs1426654	10	0,15	0,105
rs4778241	10	0,1	0,07
rs1805009	10	0,1	0,07
rs1393350	5	0,05	0,07
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			2
Mastermix			6,5
aufgereinigtes PCR-Produkt			0,5

Anhang

Tabelle 7g: Temperaturprofil des SBE-Ansatzes der Multiplex I und II.

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	10 sek.	25
55°C	5 sek.	
60°C	30 sek.	
10°C	∞	1

Tabelle 8b: Verwendete Primer für die Amplifikation des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011). Angegeben sind die Sequenzen der Primer mit der Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp). Die hierfür verwendeten Primer sind von der Firma Biomers.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
SLC45A2-Forward	AGAAACTTTTAGAAGACATCCTTAGGAGAGAGAAA	107
SLC45A2-Reverse	AAGAGGAGTCGAGGTTGGATGTTGG	

Tabelle 8c: Singleplex-PCR-Ansatz für die Amplifikation des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011). Angegeben ist das Primerpaar (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit aufgeführt.

Singleplex				
Primerpaar	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl (Primermix)
SLC45A2-107 bp	rs16891982	50	0,2	0,1
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				4,15
Mastermix				11,5
Probe				1

Tabelle 8d: Temperaturprofil der Singleplex-PCR für die Amplifikation des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	35
58 °C	30 sek	
72 °C	30 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Anhang

Tabelle 8e: Verwendeter Primer für die SBE-Reaktion des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011). Angegeben ist die Sequenz des SBE-Primers (**reverse**) mit dessen 5'-Verlängerung und der daraus resultierenden Gesamtlänge in Basenpaaren (= bp). Zusätzlich ist das SNP Allel sowie die SNP-ID mit aufgeführt.

Singleplex rs16891982				
SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	Gesamt-Primerlänge in bp
rs16891982	C/G (G/C)	AGGTTGGATGTTGGGGCTT	(GACT) ₇	47
Reverse-Primer				

Tabelle 8f: SBE-Ansatz des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011). Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben.

Singleplex rs16891982			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
H ₂ O			2,8
SBE-Primer (SNP-ID)			
rs16891982	5	0,25	0,2
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
Mastermix			3,5
aufgereinigtes PCR-Produkt			0,5

Tabelle 8g: Temperaturprofil der SBE-Reaktion für den SNP rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	10 sek.	25
55°C	5 sek.	
60°C	30 sek.	
10°C	∞	1

Anhang

Tabelle 9b: Verwendete Primer für die SNPs aus (Branicki et al., 2011). Angegeben sind die Primersequenzen mit den jeweiligen Fragmentgrößen in Basenpaaren (= bp) und den SNP-IDs. Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp	SNP-ID
TYR-Forward	ATGACCTCTTTGTCTGGATGC	102	rs1042602
TYR-Reverse	CTATGCCAAGGCAGAAAAGC		
EXOC2-Forward	CTGGGGTTTACGATTCAACA	113	rs4959270
EXOC2-Reverse	AGGATGGAAAAGAACCACCA		
SLC45A2-Forward	GTGGGAGTTCCATGCCTTT	109	rs28777
SLC45A2-Reverse	TCCAAGAGTCGCATAGGACA		
TYRP1-Forward	TTTTCTTCACTTTATTACCTTCTTC	102	rs683
TYRP1-Reverse	AAAGATTCTGAAAGGGTCTTCC		
SLC24A4-Forward	ACCTGTCTCACAGTGCTGCT	152	rs2402130
SLC24A4-Reverse	TTCACCTCGATGACGATGAT		
KITLG-Forward	TTAAGCTCTGTGTTTAGGGTTTT	106	rs12821256
KITLG-Reverse	TGAGTCATGAGTGCTTTGTTC		
ASIP-Forward	GACCTCAGTTCTGGAGAAAGC	135	rs2378249
ASIP-Reverse	AAGGTGGCTGGTTTCAGTCT		

Tabelle 9c: PCR-Ansätze für die Amplifikation der SNPs aus (Branicki et al., 2011). Angegeben ist das Primerpaar (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit aufgeführt.

Multiplex				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	Volumen in μl (Primermix)
TYR-120 bp	rs1042602	25	0,09	0,025
EXOC2-113 bp	rs4959270	50	0,34	0,05
SLC45A2-109 bp	rs28777	50	0,34	0,05
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				3,25
H ₂ O				0,015
Mastermix				3,3
Probe				3,95

Anhang

Duplex				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	Volumen in μl (Primermix)
SLC24A4-152bp	rs2402130	50	0,34	0,05
KITLG-106bp	rs12821256	50	0,17	0,025
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				3,25
H ₂ O				0,025
Mastermix				3,3
Probe				3,95

Singleplex I				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	Volumen in μl (Primermix)
ASIP-135bp	rs2378249	50	0,34	0,05
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				3,25
H ₂ O				0,02
Mastermix				3,3
Probe				3,95

Singleplex II				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	Volumen in μl (Primermix)
TYRP1-102bp	rs683	50	0,17	0,025
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				3,25
H ₂ O				0,025
Mastermix				3,3
Probe				3,95

Tabelle 9d: Temperaturprofil für die Amplifikation der SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	38
58 °C	30 sek	
72 °C	30 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Anhang

Tabelle 9e: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion der SNPs aus (Branicki et al., 2011). Angegeben sind die Sequenzen der SBE-Primer mit deren 5'-Verlängerung und der daraus resultierenden Gesamtlänge in Basenpaaren (= bp). Zusätzlich sind die SNP Allele sowie die SNP-IDs mit aufgeführt. Die verwendeten reverse-Primer sind in roter Schrift dargestellt.

SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	Gesamt-Primerlänge in bp
rs1042602	A/C (T/G)	CAATGTCTCTCCAGATTCA	(GACT) ₃	32
rs4959270	A/C	CCAAACTATGACACTATG	(GACT)	22
rs28777	A/C	CATGTGATCCTCACAGCAG	(GACT) ₂	29
rs683	A/C (T/G)	GCCTAGAACTTTAAT	(GACT) ₃	27
rs2402130	A/G	CATACGGAGCCCCGTG	(GACT) ₇	43
rs12821256	C/T (G/A)	GGGCATGTTACTACGGCAC	(GACT) ₅	39
rs2378249	A/G	CTAGGAAGTACTTTGCACAGTA	(GACT) ₃	34
Reverse				

Tabelle 9f: SBE-Ansätze für die SNPs aus (Branicki et al., 2011). Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben.

Multiplex			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
rs1042602	5	0,125	0,1
rs4959270	5	0,5	0,4
rs28777	5	0,25	0,2
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			
Mastermix			3,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			1,0

Duplex			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
rs2402130	5	0,75	0,6
rs12821256	5	0,125	0,1
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			
Mastermix			3,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			1,0

Anhang

Singleplex I			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
rs2378249	5	0,25	0,2
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			
Mastermix			3,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			1,0

Singleplex II			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
rs683	5	0,5	0,4
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			
Mastermix			3,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			1,0

Tabelle 9g: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	10 sek.	30
55°C	5 sek.	
60°C	30 sek.	
10°C	∞	1

Tabelle 9h: Verwendete Primer für die Amplifikation des MC1R-Exons aus (Branicki et al., 2011). Angegeben sind die Primersequenzen mit der jeweiligen Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp). Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
MC1R-Exon-Forward	GCAGCACCATGAACTAAGCA	1080
MC1R-Exon-Reverse	TGCCAGCACACTTAAAGC	

Anhang

Tabelle 9i: PCR-Ansatz für die Amplifikation des MC1R-Exons aus (Branicki et al., 2011). Angegeben ist das Primerpaar (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit aufgeführt.

Singleplex MC1R			
Primerpaar	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
MC1R- 1080 bp	50	0,25	0,4
Multiplex PCR Mix (Qiagen)			12,5
H ₂ O			10,1
Mastermix			23,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			2,0

Tabelle 9j: Temperaturprofil für die Amplifikation des MC1R-Exons aus (Branicki et al., 2011).

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	35
64 °C	90 sek	
72 °C	60 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Tabelle 13a: Verwendete Primer der Hexaplex-Screening-PCR nach (Apelt, 2009). Angegeben sind die Primersequenzen mit den jeweiligen Fragmentgrößen in Basenpaaren (= bp) und der Farbmarkierung am 5'-Ende. Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers und Applied Biosystems.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
DYS391 Forward	FAM-TATTCATTCAATCATACCCATATCTGT	88-120
DYS391 Reverse	TACAGGGATAGGTAGGCAGGCAGATAG	
D8S1179 Forward	FAM-CCGGGCAACTTATATGTATTTTGTATTTT	133-178
D8S1179 Reverse	CGTGAATATGCCTTAATTTATTTACCTATCCTG	
mt 15995 Forward	FAM-GCTAAGATTTAAACTATTCT	179
mt 16174 Reverse	GGATTGGGTTTTTATGTACTAC	
TH01 Forward	JOE-GCCTGTTCCCTCCCTATTTCCTC	54-98
TH01 Reverse	GCAGGTCACAGGGAACACAGACTCC	
Amelogenin Forward	JOE-CCCTGGGCTCTGTAAGAATAGTG	106/112
Amelogenin Reverse	AACCATCAGAGCTTAACTGGGAAGC	
D3S1358 Forward	JOE-CACTGCAGTTCAATCTGGGTGACAG	129-161
D3S1358 Reverse	GGGCATCTCTTATACTCATGAAATCAACAGA	

Anhang

Tabelle 13b: Hexaplex-PCR-Ansatz nach (Apelt, 2009). Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben.

Hexaplex			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
DYS391 Forward	20	0,2	0,125
DYS391 Reverse	20	0,2	0,125
D8S1179 Forward	20	0,1	0,0625
D8S1179 Reverse	20	0,1	0,0625
mt 15995 Forward	20	0,05	0,03125
mt 16174 Reverse	20	0,05	0,03125
TH01 Forward	20	0,2	0,125
TH01 Reverse	20	0,2	0,125
Amelogenin Forward	20	0,1	0,0625
Amelogenin Reverse	20	0,1	0,0625
D3S1358 Forward	20	0,2	0,125
D3S1358 Reverse	20	0,2	0,125
Multiplex PCR Mastermix (Qiagen)			6,25
H ₂ O			0,1875
Mastermix			7,5
DNA-Menge			5,0

Tabelle 13c: Temperaturprofil der Hexaplex-Screening-PCR nach (Apelt, 2009).

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	15 min	
94°C	1 min	
58°C	1 min	
72°C	1 min	
60°C	30 min	1
10 °C	∞	1

Anhang

Tabelle 14a: Verwendete Primer zur Ergänzung des PowerPlex®S5 System Kits (Promega). Angegeben sind die Primersequenzen mit den jeweiligen Fragmentgrößen in Basenpaaren (= bp) und der Farbmarkierung am 5'-Ende. Die farbmarkierten Primer sind von der Firma Biomers und die unmarkierten von ROTH. Die Primer sind aus der Publikation (von Wurmb-Schwark et al., 2009).

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
mt 15971-Forward	FAM -TTAACTCCACCATTAGCACC	280
mt 16251-Reverse	GGAGTTGCAGTTGATGTGT	
mt 15971-Forward	FAM -TTAACTCCACCATTAGCACC	439
mt 16410-Reverse	GAGGATGGTGGTCAAGGGAC	

Tabelle 14b: PCR-Ansatz des modifizierten PowerPlex®S5 System Kits (Promega). Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben.

PowerPlex® S5			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
Primermix mt280 bp	10	0,1	0,125
Primermix mt439 bp	10	0,1	0,125
Reaktionsmix PowerPlex®S5			2,5
Primermix PowerPlex®S5			1,25
H ₂ O			3,5
Mastermix			7,5
Probe			5

Tabelle 14c: Temperaturprofil des PowerPlex®S5 System Kits (Promega).

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	2 min	1
94°C	30 sek.	35
60°C	2 min	
72°C	90 sek.	
60°C	45 min	1
4°C	∞	1

Anhang

Tabelle 15a: PCR-Ansatz des PowerPlex®16HS System Kits (Promega).

des PowerPlex®16HS	
Reagenzien	1x Volumen in µl
Reaktionsmix	2,5
Primermix	1,25
H ₂ O	3,75
Mastermix	7,5
Probe	5

Tabelle 15b: Temperaturprofil des PowerPlex®16 HSSystem Kits (Promega).

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	2 min	1
94°C	30 sek	10
60°C	30 sek	
70°C	45 sek	
94°C	30 sek	25
60°C	30 sek	
70°C	45 sek	
60°C	45 min	1
4°C	∞	1

Tabelle 16a: PCR-Ansatz des AmpFISTR®NGM™ PCR Amplification Kits (Applied Biosystem).

AmpFISTR®NGM™ PCR	
Reagenzien	1x Volumen in µl
AmpFISTR®NGM Mastermix	5,0
AmpFISTR®NGM Primermix	2,5
Mastermix	7,5
Probe	5,0

Anhang

Tabelle 16b: Temperaturprofil des AmpFISTR®NGM™ PCR Amplification Kits (Applied Biosystem).

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	11 min	1
94°C	20 sek	29
59°C	3 min	
60°C	10 min	1
4°C	∞	1

Tabelle 17a: Verwendete Primer für die Amplifikation der mitochondrialen D-Loop Fragmente aus (Lee et al., 2009)¹, (Fehren-Schmitz et al., 2011)² und (Schilz, 2006)³. Angegeben sind die Sequenzen der Primer und deren Bindestellenposition. Alle Primer sind von der Firma Biomers.

Primer	Sequenz 5`-3
15995 Forward ²	GCTAAGATTCTAATTTAACTATTCT
16106-Forward ¹	GCCAGCCACCATGAATATTGTAC
16194-Forward ¹	ATGCTTACAAGCAAGTACAGCAA
16268-Forward ¹	CATTAGGATACCAACAAACC
00034-Forward ³	GGGAGCTCTCCATGCATTGG
00120-Forward ¹	CGCAGTATCTGTCTTTGATT
16174-Reverse ²	GGATTGGGTTTTATGTACTAC
16256-Reverse ¹	GCTTTGGAGTTGCAGTTGATGTGT
16360-Reverse ²	GAGAAGGGATTGACTGTAATGTG
16429-Reverse ²	GCGGGATATTGATTTACGGA
00185-Reverse ³	CCTGTAATATTGAACGTAGGTGCGATAA
00287-Reverse ¹	TTGTTATGATGTCTGTGTGG

Tabelle 17b: PCR-Ansatz für die Amplifikation der mitochondrialen D-Loop Fragmente. Angegeben sind die einzelnen Komponenten des PCR-Ansatzes mit genauen Ausgangs- und Endkonzentrationen sowie deren einzusetzende Volumina in µl. Zusätzlich sind die Firmennamen mit aufgeführt.

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen in µl
Bidest			14,3
Immobuffer (Bioline)	10x		2,5
dNTPs (Bioline)	je 2,5 mM	je 0,2 mM	2,0
Primermix mt-Divers (Biomers)	10 pmol (Einzelprimer)	0,4 µM (Einzelprimer)	2,0
DMSO	100 %		1,0
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	37,5 mM	0,75
Immolase (Bioline)	5 U/µl	1 U	0,2
Mastermix			23
Probe			2

Anhang

Tabelle 17c: Temperaturprofil für die Amplifikation der mitochondrialen D-Loop Fragmente.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	10 min	1
94 °C	1 min	40
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	30 min	1
10 °C	∞	

Tabelle 18a: Sequenzierreaktion mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem). Angegeben ist der Primer in der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit aufgeführt. Abhängig von der Bandenintensität auf dem Agarosegel, kann die Menge des einzusetzenden PCR-Produktes zwischen 1-4 μl variieren. Entsprechend muss die Menge des H₂O angepasst werden.

Sequenzierreaktion			
Primerpaar	Ausgangskonzentration in pmol/μl	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
mt-Primer Forward oder Reverse	10	0,1	0,5
BigDye® Terminator v3.1 Buffer (Applied Biosystem)			3,0
BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystem)			2,0
H ₂ O			10,5
Mastermix			16,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			4,0

Tabelle 18b: Temperaturprofil der Sequenzierreaktion mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem).

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min.	1
96 °C	10 sek	25
50 °C	5 sek	
60 °C	4 min	
10 °C	∞	1

Anhang

Tabelle 19a: Verwendete Primer für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die Primersequenzen mit der jeweiligen Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp). Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp	SNP-ID
OCA2 Forward	GGCTCTCTGTGTCTGATCCAA	81	rs12913832
OCA2 Reverse	CTGATGATGATAGCGTGCAGA		

Tabelle 19b: PCR-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion. Angegeben ist das Primerpaar (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl, die SNP-ID und die Firmennamen mit aufgeführt.

Singleplex				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM je Primer	Volumen in μl (Primermix)
OCA2-81 bp	rs12913832	20	0,1	0,125
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				1,125
Mastermix				7,5
Probe				5,0

Tabelle 19c: Temperaturprofil für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	40
58 °C	30 sek	
72 °C	30 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Tabelle 19d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion zur Augenfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die Sequenzen der SBE-Primer mit deren 5'-Verlängerung und der daraus resultierenden Gesamtlänge in Basenpaaren (= bp). Zusätzlich ist das SNP Allel sowie die SNP-ID mit aufgeführt.

Singleplex				
SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	Gesamt-Primerlänge in bp
rs12913832	G/A	GCCAGTTTCATTGAGCATTAA	(A) ₁₃	35

Anhang

Tabelle 19e: SBE-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben.

Singleplex			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl (SBE-Primer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
SBE-Primer			
rs12913832	10	0,2	0,1
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			
Mastermix			4,5
aufgereinigtes PCR-Produkt			0,5

Tabelle 19f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion.

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	10 sek.	25
55°C	5 sek.	
60°C	30 sek.	
10°C	∞	1

Tabelle 20a: Verwendete Primer für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion. Angegeben sind die Primersequenzen mit der jeweiligen Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp). Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp	SNP-ID
MC1R	GGACCGCTACATCTCCATCTT	100	rs1805007
MC1R	GACACTGGCCACCCAGAT		rs1805008

Anhang

Tabelle 20b: PCR-Ansatz für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion. Angegeben ist das Primerpaar (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl, die SNP-ID und die Firmennamen mit aufgeführt.

Singleplex				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM je Primer	Volumen in μl (Primermix)
MC1R-100 bp	rs1805007	50	0,4	0,2
	rs1805008			
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				1,05
Mastermix				7,5
Probe				5,0

Tabelle 20c: Temperaturprofil für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	40
64 °C	30 sek	
72 °C	30 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Tabelle 20d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion zur Rotstichrekonstruktion. Angegeben sind die Sequenzen der SBE-Primer mit deren 5'-Verlängerung und der daraus resultierenden Gesamtlänge in Basenpaaren (= bp). Zusätzlich ist das SNP Allel sowie die SNP-ID mit aufgeführt.

Singleplex				
SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	Gesamt-Primerlänge in bp
rs1805008	C/T	AGCATCGTGACCCTGCCG	(A) ₁₄	32
rs1805007	C/G/T	TCTCCATCTTCTACGCACTG	(GACT) ₅	40

Anhang

Tabelle 20e: SBE-Ansatz für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben.

Singleplex			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl (SBE-Primer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
SBE-Primer			
rs1805008	20	0,3	0,075
rs1805007	20	0,3	0,075
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			3,85
Mastermix			4,5
aufgereinigtes PCR-Produkt			0,5

Tabelle 20f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion.

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	10 sek.	25
55°C	5 sek.	
60°C	30 sek.	
10°C	∞	1

Tabelle 21a: Verwendete Primer für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die Primersequenzen mit der jeweiligen Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp). Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers. Alle Primerpaare wurden jeweils in einer Singleplex-PCR verwendet. Die Primer für die Amplifikation des SNP rs12913832 sind in Tabelle 19a angegeben.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp	SNP-ID
SLC24A4-Forward	ATTGAGTATCCTATATTTTATCTG	114	rs12896399
SLC24A4-Reverse	TCTTGATGTTGTATTGATGAGG		
IRF4-Forward	TCATGTGAAACCACAGGGCA	121	rs12203592
IRF4-Reverse	CTGGCACCAAAAGTACCACA		

Anhang

Tabelle 21b: PCR-Ansatz für die Single-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion. Angegeben ist das Primerpaar (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenparen (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl, die SNP-ID und die Firmennamen mit aufgeführt. Die SNPs rs12896399, rs12203592, rs12913832 wurden jeweils in einer Singleplex-PCR amplifiziert. Die Analyse des SNP rs12913832 ist in den Tabellen 19a-f beschrieben.

Singleplex				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM je Primer	Volumen in μl (Primermix)
SLC24A4-114 bp	rs12896399	50	0,2	0,1
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				1,15
Mastermix				7,5
Probe				5,0

Singleplex				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM je Primer	Volumen in μl (Primermix)
IRF4-121 bp	rs12203592	50	0,2	0,1
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				1,15
Mastermix				7,5
Probe				5,0

Tabelle 21c: Temperaturprofil für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	40
58 °C	30 sek	
72 °C	30 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Anhang

Tabelle 21d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktionen zur Haarfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die Sequenzen der SBE-Primer mit deren 5'-Verlängerung und der daraus resultierenden Gesamtlänge in Basenpaaren (= bp). Zusätzlich ist das SNP Allel sowie die SNP-ID mit aufgeführt. Die SBE-Primer für die Analyse des SNP rs12913832 sind in Tabelle 19d zu finden. Die SBE-Primer für die Analyse der SNPs rs12896399 und rs12203592 werden jeweils in einer Singleplex-PCR verwendet.

Singleplex-PCRs				
SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	Gesamt-Primerlänge in bp
rs12896399	G/T	CTTTAGGTCAGTATATTTTGGG		22
rs12203592	G/A (C/T)	ACTTTGGTGGGTAAAAAGAAGG	(GACT) ₈	53

Tabelle 21e: SBE-Ansatz für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben. Die SBE-Reaktion für die Analyse des SNP rs12913832 ist der Tabelle 19e zu entnehmen.

Singleplex -PCR			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl (SBE-Primer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
SBE-Primer			
rs12203592	20	0,4	0,1
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			3,4
Mastermix			4,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			1,0

Singleplex -PCR			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl (SBE-Primer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
SBE-Primer			
rs12896399	5	0,4	0,4
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			3,1
Mastermix			4,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			1,0

Anhang

Tabelle 21f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion.

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	10 sek.	25
55°C	5 sek.	
60°C	30 sek.	
10°C	∞	1

Tabelle 22a: Verwendete Primer für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion. Angegeben sind die Primersequenzen mit der jeweiligen Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp). Alle angegebenen Primer sind von der Firma Biomers. Die Primer für die Analyse der SNPs rs1805007 und 1805008 sind in der Tabelle 20a zu finden.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße in bp
HERC2-Forward	TCAAGGGAAATCAGAATTATATTGAAC	102
HERC2-Reverse	GCTGTAAATTCCTCCCATCA	

Tabelle 22b: PCR-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion. Angegeben ist das Primerpaar (Genbezeichnung + Fragmentgröße in Basenpaaren (= bp)) mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl, die SNP-ID und die Firmennamen mit aufgeführt. Der PCR-Ansatz für die Analyse der SNPs rs1805007 und 1805008 ist der Tabelle 20b zu entnehmen.

Singleplex-PCR				
Primerpaar (-bp)	SNP-ID	Ausgangskonzentration in pmol/μl (Einzelprimer)	Endkonzentration in μM je Primer	Volumen in μl (Primermix)
HERC2-102 bp	rs4778138	50	0,4	0,2
Multiplex PCR Mix (Qiagen)				6,25
H ₂ O				1,05
Mastermix				7,5
Probe				5,0

Anhang

Tabelle 22c: Temperaturprofil für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion. Das Temperaturprofil für die Analyse der SNPs rs1805007 und 1805008 ist der Tabelle 20c zu entnehmen.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min.	1
94 °C	30 sek	35
58 °C	90 sek	
72 °C	60 sek	
60 °C	30 min	1
10 °C	∞	1

Tabelle 22d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion zur Hauttyprekonstruktion. Angegeben sind die Sequenzen der SBE-Primer mit deren 5'-Verlängerung und der daraus resultierenden Gesamtlänge in Basenpaaren (= bp). Zusätzlich ist das SNP Allel sowie die SNP-ID mit aufgeführt. Die verwendeten Primer für die Analyse der SNPs rs1805007 und 1805008 sind in der Tabelle 20d zu finden.

Singleplex-PCR				
SNP-ID	SNP Allele	SBE-Primer Sequenz	5'-Verlängerung	Gesamt-Primerlänge in bp
rs4778138	G/A	GTGAAATATAACATATCAAAATTG	(GACT) ₆	49

Tabelle 22e: SBE-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in pmol/μl und der Endkonzentration in μM. Zusätzlich sind die zu pipettierenden Volumina in μl und die Firmennamen mit angegeben. Der SBE-Ansatz für die Analyse der SNPs rs1805007 und 1805008 ist der Tabelle 20e zu entnehmen.

Singleplex			
Reagenzien	Ausgangskonzentration in pmol/μl (SBE-Primer)	Endkonzentration in μM (Einzelprimer)	1x Volumen in μl
SBE-Primer			
rs4778138	20	0,4	0,1
SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystem)			0,5
H ₂ O			3,4
Mastermix			4,0
aufgereinigtes PCR-Produkt			1,0

Anhang

Tabelle 22f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion. Das Temperaturprofil für die Analyse der SNPs rs1805007 und 1805008 ist das Gleiche wie hier dargestellt.

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	10 sek.	25
55°C	5 sek.	
60°C	30 sek.	
10°C	∞	1

Anhang

Tabelle 23: Ergebnisse der Realtime-PCR. Angegeben sind die DNA-Mengen in ng/µl. Gelb hinterlegt sind die Extrakte aus Blut.

Probanden-Nr.	ng/µl	Probanden-Nr.	ng/µl	Probanden-Nr.	ng/µl	Probanden-Nr.	ng/µl	Probanden-Nr.	ng/µl	Probanden-Nr.	ng/µl	Probanden-Nr.	ng/µl
1	4	844,66	66	93	1,72	131	175	1,48	196	240	1,01	261	305
2	5	97,50	67	94	0,36	132	176	1,72	197	241	0,29	262	306
3	6	350	68	95	16,29	133	177	3,23	198	242	2,47	263	307
4	8	0,3	69	97	195,70	134	178	1,83	199	243	1,88	264	308
5	10	210,50	70	98	5,95	135	179	6,48	200	244	3,65	265	309
6	11	0,05	71	99	0,19	136	180	1,41	201	245	0,99	266	310
7	12	0,05	72	102	1,78	137	181	0,68	202	246	5,34	267	311
8	15	957,80	73	103	3,29	138	182	6,82	203	247	0,81	268	312
9	16	219,56	74	104	0,09	139	183	2,82	204	248	1,19	269	313
10	17	292,45	75	105	9,36	140	184	4,00	205	249	6,24	270	314
11	18	0,15	76	107	0,64	141	185	3,46	206	250	1,42	271	315
12	19	1806,67	77	109	231,5	142	186	5,59	207	251	2,56	272	316
13	20	28,17	78	110	2,1	143	187	9,74	208	252	0,26	273	317
14	21	830,00	79	111	1,34	144	188	4,53	209	253	0,85	274	318
15	22	4,04	80	112	1,57	145	189	7,89	210	254	0,27	275	319
16	23	1011,34	81	114	0,1	146	190	3,13	211	255	1,16	276	320
17	24	2600,00	82	115	1,34	147	191	1,10	212	256	0,75	277	321
18	25	61,87	83	116	1,47	148	192	3,55	213	257	0,25	278	322
19	28	4,97	84	118	3,35	149	193	1,54	214	258	0,78	279	323
20	29	550,04	85	119	4,32	150	194	17,95	215	259	3,52	280	324
21	30	159,93	86	120	6,09	151	195	13,35	216	260	6,54	281	325
22	31	3,93	87	121	32,06	152	196	6,63	217	261	8,37	282	327
23	33	21,17	88	122	8,89	153	197	8,17	218	262	2,19	283	328
24	34	1,22	89	123	0,05	154	198	13,04	219	263	0,59	284	331
25	35	257,92	90	124	65,86	155	199	5,86	220	264	1,87	285	332
26	36	198,98	91	127	141,90	156	200	3,07	221	265	1,76	286	333
27	37	86,39	92	128	0,56	157	201	6,95	222	266	2,36	287	334
28	38	38,93	93	129	0,48	158	202	4,45	223	267	0,11	288	335
29	40	0,80	94	130	1,51	159	203	14,17	224	268	4,68	289	336
30	41	1,27	95	131	0,99	160	204	1,90	225	269	3,86	290	337
31	42	0,93	96	133	6,3	161	205	5,69	226	270	0,49	291	338
32	43	60,05	97	134	529,90	162	206	0,90	227	271	1,44	292	339
33	44	0,13	98	135	6,19	163	207	2,11	228	272	4,43	293	346
34	51	0,30	99	136	8,1	164	208	3,28	229	273	7,89	294	347
35	52	0,49	100	137	340,23	165	209	1,95	230	274	8,28	295	348
36	53	0,49	101	138	219,00	166	210	8,89	231	275	1,65	296	349
37	56	11,80	102	139	331,30	167	211	2,24	232	276	3,67	297	350
38	57	4,81	103	140	186,99	168	212	0,82	233	277	1,24	298	351
39	59	6,59	104	141	1,98	169	213	1,39	234	278	0,64	299	352
40	60	0,78	105	142	0,15	170	214	1,18	235	279	3,25	300	353
41	61	9,75	106	143	394,80	171	215	1,41	236	280	0,89	301	N1
42	63	1,83	107	144	5,40	172	216	0,79	237	281	0,67	302	N2
43	64	714,00	108	145	0,37	173	217	0,54	238	282	0,84	303	N3
44	66	0,34	109	146	0,57	174	218	1,11	239	283	3,39	304	N4
45	67	1,8	110	147	248,30	175	219	4,73	240	284	4,71	305	N5
46	68	1,77	111	148	1,19	176	220	0,39	241	285	0,62	306	N6
47	69	0,08	112	151	0,80	177	221	2,02	242	286	0,69	307	N7
48	70	1,77	113	152	0,435	178	222	3,27	243	287	1,71	308	N9
49	71	3,96	114	154	0,81	179	223	0,38	244	288	4,29	309	N10
50	75	6,21	115	155	0,555	180	224	0,37	245	289	3,73	310	N11
51	76	0,76	116	159	0,38	181	225	1,66	246	290	2,79	311	N12
52	77	2,39	117	160	4,99	182	226	1,12	247	291	2,7	312	N13
53	78	5,67	118	161	163,63	183	227	1,26	248	292	0,96	313	N14
54	79	2,56	119	162	1,32	184	228	0,29	249	293	0,6	314	N15
55	80	1,17	120	163	2,57	185	229	0,53	250	294	4,03	315	N16
56	83	2,69	121	165	1,14	186	230	2,10	251	295	1,25	316	N17
57	84	0,48	122	166	0,38	187	231	1,62	252	296	2,9	317	N18
58	85	1,62	123	167	0,64	188	232	0,71	253	297	1,22	318	N19
59	86	0,27	124	168	238,12	189	233	3,16	254	298	0,95	319	N20
60	87	4,07	125	169	0,38	190	234	1,30	255	299	1,78	320	N21
61	88	2,35	126	170	1,74	191	235	5,75	256	300	0,68	321	N22
62	89	1,23	127	171	3,81	192	236	1,09	257	301	6,07	322	N23
63	90	0,35	128	172	7,94	193	237	6,32	258	302	3,11	323	N24
64	91	6,32	129	173	2,77	194	238	0,33	259	303	3,21	324	N25
65	92	4,76	130	174	2,36	195	239	4,23	260	304	2,17	325	N26

Anhang

Tabelle 24b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich der Augenfarbe. Angeben sind die Quotenverhältnisse (= OD) sowie die Signifikanzwerte (= p-Wert) der simplen und multiplen Regressionsanalyse in den Stufen I und II. Zusätzlich sind die SNP-IDs, das Gen, das Referenzallel (= ref.) sowie das bevorzugte Allel (= bev.) dargestellt. Getestet wurde blau gegen nicht blau. BF=Bonferroni-Methode; n= Stichprobenmenge

SNP-ID Gen (ref./bev.)		Stufe I (n=300)		Stufe II (n=100)	
		simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1	rs1805007	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	MC1R				
2	rs1805008	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	MC1R				
3	rs12913832 (A/G)	OR=24.22	OR=39.65, $p < 2 \cdot 10^{-16}$	OR=14.59	OR=10.32, $p = 9.9 \cdot 10^{-6}$
	HERC2	$p < 10^{-16}$	$p_{BF} < 2.4 \cdot 10^{-15}$	$p = 1.5 \cdot 10^{-6}$	$p_{BF} = 1.1 \cdot 10^{-4}$
4	rs1800407 (G/A)	nicht signifikant	OR=4.90, $p = 0.0022$	nicht signifikant	nicht signifikant
	OCA2		$p_{BF} = 0.026$		
5	rs7495174 (G/A)	OR=36.44	nicht signifikant	OR=25.20	nicht signifikant
	OCA2	$p = 1.7 \cdot 10^{-6}$		$p = 0.0033$	
6	rs4778241 (A/C)	OR=3.57	nicht signifikant	OR=8.26,	OR=4.87, $p = 0.0094$
	OCA2	$p = 1.6 \cdot 10^{-6}$		$p = 3.7 \cdot 10^{-5}$	$p_{BF} = 0.11$
7	rs4778138 (G/A)	OR=4.95	nicht signifikant	OR=3.13	nicht signifikant
	OCA2	$p = 7.5 \cdot 10^{-8}$		$p = 0.0078$	
8	rs916977 (A/C)	OR=10.20	nicht signifikant	OR=21.99	nicht signifikant
	HERC2	$p = 4.3 \cdot 10^{-12}$		$p = 0.0048$	
9	rs12896399	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	SLC24A4				
10	rs1393350	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	TYR				
11	rs1805009	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	MC1R				
12	rs12203592	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	IRF4				

Anhang

Tabelle 25b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich des Rotstichs. Angeben sind die Quotenverhältnisse (= OD) sowie die Signifikanzwerte (= p-Wert) der simplen und multiplen Regressionsanalyse in den Stufen I und II. Zusätzlich sind die SNP-IDs, das Gen, das Referenzallel (= ref.) sowie das bevorzugte Allel (= bev.) dargestellt. Getestet wurde blau gegen nicht blau. BF=Bonferroni-Methode; n= Stichprobenmenge

SNP-ID Gen (ref./bev.)		Stufe 1 (n=300)		Stufe 1 (n=300)	
		simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1	rs1805007 (C/T)	OR=5.52	OR=9.68, $p=1.0 \cdot 10^{-8}$	OR=3.66	OR=4.77 $p=0.00392$
	MC1R	$p=2.5 \cdot 10^{-6}$	$p_{BF}=1.3 \cdot 10^{-7}$	$p=0.011$	$p_{BF}=0.047$, $p=0.036$
2	rs1805008 (C/T)	OR=3.37	OR=5.21, $p=3.5 \cdot 10^{-7}$	nicht signifikant	OR=2.72
	MC1R	$p=2.1 \cdot 10^{-5}$	$p_{BF}=4.1 \cdot 10^{-6}$		$p_{BF}=0.43$
		nicht signifikant	Interaktion: rs1805007, -008 $p=0.026$, $p_{BF}=0.31$	nicht signifikant	nicht signifikant
3	rs12913832	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	HERC2				
4	rs1800407	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	OCA2				
5	rs7495174	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	OCA2				
6	rs4778241	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	OCA2				
7	rs4778138	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	OCA2				
8	rs916977	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	HERC2				
9	rs12896399	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	SLC24A4				
10	rs1393350	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	TYR				
11	rs1805009 (G/C)	OR=5.19	OR=6.42, $p=0.023$	nicht signifikant	nicht signifikant
	MC1R	$p=0.0267$	$p_{BF}=0.28$		
12	rs12203592	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	IRF4				

Anhang

Tabelle 26b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich der Haarfarbe. Angeben sind die Quotenverhältnisse (= OD) sowie die Signifikanzwerte (= p-Wert) der simplen und multiplen Regressionsanalyse in den Stufen I (= S1) und II (= S2). Zusätzlich sind die SNP-IDs, das Gen, das Referenzallel (= ref.) sowie das bevorzugte Allel (= bev.) dargestellt. Getestet wurde blau gegen nicht blau. BF=Bonferroni-Methode; n= Stichprobenmenge

SNP-ID Gen (ref./bev.)	blond vs. non-blond	blond vs. non-blond	ordinale Regression	ordinale Regression	lineare Regression	lineare Regression
	simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1 rs1805007 <i>MC1R</i>	nicht signifikant	nicht signifikant-	nicht signifikant	nicht signifikant-	nicht signifikant	nicht signifikant-
2 rs1805008 (T/C) <i>MC1R</i>	nicht signifikant	nicht signifikant-	OR _{S1} =2.11, p _{S1} =0.0015	OR _{S1} =2.15, p _{S1} =0.0012, p _{S1,BF} =0.014	OR _{S1} =2.45	OR _{S1} =2.03 p _{S1} =0.0037
			OR _{S2} =2.53, p _{S2} =0.030	OR _{S2} =2.65, p _{S2} =0.021, p _{S2,BF} =0.25	p _{S1} =0.0014	p _{S1,BF} =0.044
3 rs12913832 (A/G) <i>HERC2</i>	OR _{S1} =2.74, p _{S1} =2.7·10 ⁻⁵	OR _{S1} =3.06, p _{S1} =7.5·10 ⁻⁶ , p _{S1,BF} =9.1·10 ⁻⁴	OR _{S1} =3.31, p _{S1} =2.6·10 ⁻⁹	OR _{S1} =3.89, p _{S1} =5.9·10 ⁻¹¹ , p _{S1,BF} =7.0·10 ⁻¹⁰	OR _{S1} =4.21, p _{S1} =5.5·10 ⁻¹⁰	OR _{S1} =3.66, p _{S1} =9.4·10 ⁻⁹ , p _{S1,BF} =1.1·10 ⁻⁷
	OR _{S2} =3.94, p _{S2} =0.0051	OR _{S2} =3.94, p _{S2} =0.0051, p _{S2,BF} =0.061	OR _{S2} =4.7, p _{S2} =6.3·10 ⁻⁵	OR _{S2} =3.65, p _{S2} =0.0018, p _{S2,BF} =0.022	OR _{S2} =4.77, p _{S2} =1.8·10 ⁻⁵	OR _{S2} =2.90, p _{S2} =0.0057, p _{S2,BF} =0.068
4 rs1800407 <i>OCA2</i>	nicht signifikant	nicht signifikant-	nicht signifikant	nicht signifikant-	nicht signifikant	nicht signifikant-
5 rs7495174 (G/A) <i>OCA2</i>	OR _{S1} =3.85, p _{S1} =0.0038	nicht signifikant-	OR _{S1} =4.51, p _{S1} =9.4·10 ⁻⁵	OR _{S2} =15.66, p _{S2} =0.0032, p _{S2,BF} =0.038	OR _{S1} =6.11, p _{S1} =5.8·10 ⁻⁵	OR _{S2} =6.62, p _{S2} =0.0051, p _{S2,BF} =0.061
			OR _{S2} =34.10, p _{S2} =3.9·10 ⁻⁵		OR _{S2} =15.64, p _{S2} =1.6·10 ⁻⁵	
6 rs4778241 (A/C) <i>OCA2</i>	OR _{S1} =1.99, p=0.0063	nicht signifikant-	OR _{S1} =2.43, p _{S1} =6.4·10 ⁻⁵	-nicht signifikant	OR _{S1} =2.96, p _{S1} =2.8·10 ⁻⁵	nicht signifikant-
			OR _{S2} =2.86, p _{S2} =0.0082		OR _{S2} =3.06, p _{S2} =0.0027	
7 rs4778138 (G/A) <i>OCA2</i>	OR _{S1} =2.69, p _{S1} =0.00056	nicht signifikant-	OR _{S1} =3.09, p _{S1} =8.0·10 ⁻⁶	nicht signifikant-	OR _{S1} =3.78, p _{S1} =5.0·10 ⁻⁶	OR _{S1} =1.73 p _{S1} =0.045, p _{S1,BF} =0.54
			OR _{S2} =2.76, p _{S2} =0.010		OR _{S2} =2.86, p _{S2} =0.0025	
8 rs916977 (A/G) <i>HERC2</i>	OR _{S1} =2.81, p _{S1} =0.00044	nicht signifikant-	OR _{S1} =3.28, p _{S1} =1.5·10 ⁻⁶	nicht signifikant-	OR _{S1} =4.19, p _{S1} =7.3·10 ⁻⁷	nicht signifikant-
			OR _{S2} =3.14, p _{S2} =0.038		OR _{S2} =3.21, p _{S2} =0.038	
9 rs12896399 (T/G) <i>SLC24A4</i>	OR _{S1} =1.63 p _{S1} =0.0042	OR _{S1} =1.57 p _{S1} =0.013, p _{S1,BF} =0.16	OR _{S1} =1.72, p _{S1} =0.00022	OR _{S1} =1.63 p _{S1} =0.00095, p _{S1,BF} =0.011	OR _{S1} =1.93, p _{S1} =0.00013	OR _{S1} =1.67 p _{S1} =0.00071, p _{S1,BF} =0.0085
10 rs1393350 <i>TYR</i>	nicht signifikant	nicht signifikant-	nicht signifikant	nicht signifikant-	nicht signifikant	nicht signifikant-
11 rs1805009 (G/C) <i>MC1R</i>	nicht signifikant	nicht signifikant-	OR _{S1} =4.05, p _{S1} =0.039	OR _{S1} =4.05 p _{S1} =0.044, p _{S1,BF} =0.53	OR _{S1} =5.66, p _{S1} =0.034	nicht signifikant-
12 rs12203592 (T/C) <i>IRF4</i>	OR _{S1} =3.25, p _{S1} =0.00034	OR _{S1} =3.67 p _{S1} =0.00016, p _{S1,BF} =0.0019	OR _{S1} =3.42, p _{S1} =1.9·10 ⁻⁶	OR _{S1} =4.87, p _{S1} =3.4·10 ⁻⁹ , p _{S1,BF} =4.1·10 ⁻⁸	OR _{S1} =4.52, p _{S1} =1.3·10 ⁻⁶	OR _{S1} =4.55 p _{S1} =8.5·10 ⁻⁸ , p _{S1,BF} =1.0·10 ⁻⁶

Anhang

Tabelle 27b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich des Hauttyps. Angeben sind die Quotenverhältnisse (= OD) sowie die Signifikanzwerte (= p-Wert) der simplen und multiplen Regressionsanalyse in den Stufen I (= S1) und II (= S2). Zusätzlich sind die SNP-IDs, das Gen, das Referenzallel (= ref.) sowie das bevorzugte Allel (= bev.) dargestellt. Getestet wurde blau gegen nicht blau. BF=Bonferroni-Methode; n= Stichprobenmenge; vs= versus

SNP-ID Gen (ref./bev.)		type I, II vs. type III, IV	type I, II vs. type III, IV	ordinale Regression	ordinale Regression
		simple Analyse	multiple Analyse	simple Analyse	multiple Analyse
1	rs1805007 (T/C)	OR _{S1} =2.34, p _{S1} =0.0040	OR _{S1} =2.63, p _{S1} =0.0021, p _{S1,BF} =0.025	OR _{S1} =2.16, p _{S1} =0.0052	OR _{S1} =2.36, p _{S1} =0.0035, p _{S1,BF} =0.042
	MC1R			OR _{S2} =2.77, p _{S2} =0.022	OR _{S2} =3.50, p _{S2} =0.0068, p _{S2,BF} =0.082
2	rs1805008 (T/C)	OR _{S1} =2.71, p _{S1} =0.00034	OR _{S1} =3.35, p _{S1} =4.3·10 ⁻⁵ , p _{S1,BF} =5.2·10 ⁻⁴	OR _{S1} =2.79, p _{S1} =8.5·10 ⁻⁵	OR _{S1} =2.99, p _{S1} =4.6·10 ⁻⁵ , p _{S1,BF} =5.5·10 ⁻⁴
	MC1R				OR _{S2} =2.70, p _{S2} =0.023, p _{S2,BF} =0.28
3	rs12913832 (G/A)	OR _{S2} =3.06, p _{S2} =0.016	nicht signifikant-	OR _{S1} =2.03, p _{S1} =0.0043	nicht signifikant-
	HERC2			OR _{S2} =3.51, p _{S2} =0.0027	
4	rs1800407	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	OCA2				
5	rs7495174 (A/G)	nicht signifikant	OR _{S1} =5.08, p _{S1} =0.017, p _{S1,BF} =0.204	OR _{S1} =3.70, p _{S1} =0.0081	nicht signifikant
	OCA2			OR _{S2} =5.72, p _{S2} =0.020	
6	rs4778241 (C/A)	OR _{S1} =1.81, p _{S1} =0.045	OR _{S2} =3.83, p _{S2} =0.0057, p _{S2,BF} =0.068	OR _{S1} =2.12, p _{S1} =0.0056	nicht signifikant
	OCA2	OR _{S2} =3.83, p _{S2} =0.0057		OR _{S2} =3.46, p _{S2} =0.0031	
7	rs4778138 (A/G)	OR _{S1} =2.13, p _{S1} =0.0284	nicht signifikant	OR _{S1} =3.20, p _{S1} =0.00027	OR _{S1} =3.15, p _{S1} =0.00043, p _{S1,BF} =0.0052
	OCA2	OR _{S2} =3.31, p _{S2} =0.0082		OR _{S2} =3.38, p _{S2} =0.0024	OR _{S2} =3.72, p _{S2} =0.0016, p _{S2,BF} =0.019
8	rs916977 (G/A)	nicht signifikant	nicht signifikant	OR _{S1} =1.87	nicht signifikant
	HERC2			p _{S1} =0.038	
9	rs12896399	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	SLC24A4				
10	rs1393350	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	TYR				
11	rs1805009	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant
	MC1R				
12	rs12203592 (T/C)	OR _{S1} =1.91, p _{S1} =0.0335	OR _{S1} =2.11, p _{S1} =0.026, p _{S1,BF} =0.31	nicht signifikant	nicht signifikant
	IRF4				

9.1 Abkürzungen

A	Adenin
AC	engl. <i>after Christ</i>
aDNA	engl. <i>ancient DNA</i>
Abb.	Abbildung
AUC	engl. <i>area under the curve</i>
BC	engl. <i>before Christ</i>
BF	engl. Bonferroni
bp	Basenpaare
BP	engl. <i>before present</i>
bev.	bevorzugt
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
AMP	Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
D-Loop	engl. displacement loop
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendinitrotetraacetat Dinatriumsalz-Dihydrat
engl.	aus dem Englischen
et al.	lat. <i>et alteri</i>
etc.	lat. <i>et cetera</i>
EVCs	externally visible characteristics
F	engl. <i>Forward</i>
g	Gramm
G	Guanin
h	engl. <i>hour</i>
HERC2	engl. <i>hect domain and RLD2</i>
HL	engl. <i>hyperladder</i>

Anhang

HVRI	engl. <i>hypervariable region 1</i>
HVRII	engl. <i>hypervariable region 2</i>
HVRIII	engl. <i>hypervariable region 3</i>
IKMB	Institut für klinische Molekularbiologie
IMIS	Institut für medizinische Informatik und Statistik
IRF4	engl. <i>Interferon regulatory factor 4</i>
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
M	Molar
MC1R	Melanocortinrezeptor 1
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
μM	Mikromolar
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Gesamtmenge
n. Chr.	nach Christus
nDNA	nukleäre DNA
ng	Nanogramm
NTC	engl. <i>negative template control</i>
n. v.	nicht vorhanden
OCA2	Oculocutane albinismus Typ 2
OR	engl. <i>odds ratio</i>
p	p-Wert (engl. <i>probability</i>)
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pg	Pikogramm
pH	lat. <i>pondus Hydrogenii</i>
pmol	Pikomol
R	engl. <i>Reverse</i>
ref.	Referenz-Allel
rfu	relative Fluoreszenzeinheit

Anhang

RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. <i>realtime polymerase chain reaction</i>
S1	Stufe 1
S2	Stufe 2
SBE	engl. <i>single base extension</i>
sek	Sekunde
SLC24A4	engl. <i>Solute carrier family 24 member 4</i>
SLC24A5	engl. <i>Solute carrier family 24 member 5</i>
SLC45A2	engl. <i>Solute carrier family 45 member 2</i>
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
STR	engl. <i>short tandem repeat</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris / HCL-EDTA-Puffer
™	engl. <i>Trade Mark</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TYR	engl. <i>Tyrosinase</i>
TYRP	engl. <i>Tyrosinase related protein</i>
U	engl. <i>unit</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. Chr.	vor Christus
%	Prozent
∞	unendlich
®	rechtlich geschützt
=	gleich
&	und
∅	Durchmesser
≈	circa

9.2 Geräte, Chemikalien und Einwegmaterialien

- **Geräte und Software**

ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS

DNA-Extractor EZ1 Biorobot, QIAGEN

DNA-Thermal-Cycler Typ Mastercycler® Gradient, EPPENDORF

DNA-Thermal-Cycler GeneAmp® 2700 Gradient, APPLIED BIOSYSTEMS

DNA-Workstation UV-Cleaner UVC/T-M-AR, KISKER

Electrophoresis Power Supply ST 304, GIBCO

Gel-Doc EQ, BIORAD

Gel-Doc EQ, Software Quantity One Version 4.5.0, BIORAD

Gelelektrophorese-Einheit (horizontal) MIDI, ROTH

GeneScan® Analysis Software Version 3.2, APPLIED BIOSYSTEMS

Kugelschwingmühle Typ MM200, RETSCH

MAXI-Vertikal Doppel-Elektrophorese-Kammer (horizontal), ROTH

Mikrowelle 800, SEVERIN

Pipetten Typ Reference®

und Research®: 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 1-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, EPPENDORF

Präzisionswaage , SARTORIUS

Real-Time PCR System 7300, APPLIED BIOSYSTEMS

Rotilabo®-Mini-Zentrifuge "Uni-fuge", ROTH

Thermoschüttler Typ 5437, EPPENDORF

Tischzentrifuge 5415C, EPPENDORF

Trockenschrank, MEMMERT

Vortex Genie® 2™, SCIENTIFIC INDUSTRIE

Waage SAC62, SCALTEC

Zentrifuge minispin, EPPENDORF

Zentrifuge Typ 5402, EPPENDORF

Zentrifuge, Micro Centrifuge, 6000rpm, ROTH

- **Einwegmaterialien**

Dental-Diamantsägeblatt Typ Diaflex-T H350 220, HORICO

Einmalskalpell, FEATHER

Einmaluntersuchungshandschuhe Peha®-safe, Peha®-soft, HARTMANN

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,2, 0,5 ml und 2,0 ml) safe-lock, EPPENDORF

FA-Mikrotiterplatte, APPLIED BIOSYSTEMS

Gesichtsmasken Surgine face mask, JOHNSON & JOHNSON

Kimwipes® Präzisionstücher, KIMBERLEY-CLARK

Kleenex® Tücher, KIMBERLEY-CLARK

Parafilm®, AMERICAN NATIONAL CANTM

Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, EPPENDORF

Schutzanzüge, TYVEK

- **Chemikalien und Kits**

ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, APPLIED BIOSYSTEMS

ABI PRISM® SNaPshotTM Multiplex Kit, APPLIED BIOSYSTEMS

Agarose LE, BIOZY

Ammoniumpersulfat, SERVA

Borsäure, MERCK

Bromphenolblau, MERCK

Danklorix, PALMOLIVE

Dimethylsulfoxide (DMSO), BIOGENE

dNTP Mix, 2,5mM each, BIOLINE

DyeEx Kit, QIAGEN

Essigsäure, ROTH

Ethanol absolut, J.T. BAKER

Ethanol vergällt, BÜFA

Ethidiumbromid, 10 mg/ml, INVITROGEN

Ethylendiaminetetraacetat (EDTA), 0,5 M, pH 8,0, ROTH

Exonuklease I, FERMENTAS

ExoSAP-IT®, Fermentas

EZ1 DNA Tissue Kit, QIAGEN

Anhang

Ficoll 400, SIGMA

Formaldehyd 37 %, ROTH

Formamid Hi-Di, APPLIED BIOSYSTEMS

GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, FERMENTAS

GeneScan™-120 LIZ®, APPLIED BIOSYSTEMS

Gummiseptaplatte für FA-Mikrotiterplatte, APPLIED BIOSYSTEMS

Haarhaube, BARRIER

H₂O – HPLC analyzed, J.T. BARKER

Hyperladder™ I, IV, V, BIOLINE

ImmoBuffer 10x, BIOLINE

Immolase™ DNA Polymerase, BIOLINE

MinElute® PCR Purification Kit, QIAGEN

Proteinase K, BIOLINE

QIAGEN Multiplex PCR Kit, QIAGEN

Rotiphoese-Gel 40 (19:1): 40 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1, ROTH

Salpetersäure 65%, ROTH

Schutzbrille, UVEX

Schutzanzug, TYVEK

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), FERMENTAS

Silbernitrat, MERCK

Thermosensitive FastApp Shrimp Alkaline Phosphatase, FERMENTAS

Trishydroxymethylaminomethan (TRIS), SERVA

- **Ansätze der Reagenzien**

Ladepuffer für Gele (100 ml: 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylene-Cyanol, 25 % Ficoll)

5x TBE-Puffer (270 g TRIS, 137,5 g Borsäure, 100 ml 0,5 M, pH 8,0 EDTA)

Entwicklerlösung für die Silberfärbung (Natriumcarbonat 0,28 M, Formaldehyd 0,04%)

Silbernitratlösung (3% mit destilliertem Wasser auf 200 ml auffüllen)

Tris-Formiat (0,5 M Tris, 0,12 M Ameisensäure)

10. Literaturverzeichnis

- Alaluf, S., Barrett, K., M., B. & Carter, N., 2003. Ethnic variation in tyrosinase and TYRP1 expression in photoexposed and photoprotected human skin. *Pigment Cell Res.*, 16(1), pp.35-42.
- Alonso, A. et al., 2004. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int*, 139(2-3), pp.141-49.
- Ammermann, A. & Cavalli.Sforza, L., 1984. *The Neolithic Transition and the Genetics of Populations in Europe*. New Jersey: Princeton Univ. Press.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, G.B. & al., e., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, pp.457-65.
- Andrews, R.M. et al., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.. *Nat Genet*, 23(2), p.147.
- Apelt, U., 2009. Molekulargenetische Analyse von Haaren in der forensischen Praxis.
- Axenfeld, T., 1915. *Lehrbuch der Augenheilkunde*. Gustav Fischer.
- Barbujani, J. & Bertorelle, G., 2002. Genetics and the population history of Europe. *PNAS*, 98(1), pp.22-25.
- Bastiaens, M. et al., 2001. The melanocortin-1 receptor gene is the major freckle gene. *Hum Mol Genet.*, 10, p.1701–1708.
- Beaumont, K.A. et al., 2008. Red hair is the null phenotype of MC1R. *Human Mutat.*, 29, pp.E88-94.
- Bell, M., 1967. *Ultrastructure of differentiating hairfollicle*. Oxford: Pergamon Pres.
- Bennett, D.C. & Lamoreux, M.L., 2003. The color loci of mice — A genetic century. *Pigment Cell Research*, 16, pp.333-44.
- Benninghoff, 1993. *Anatomie*. Oldenburg: Urban & Schwarzenberg.
- Bonte, W., Johansson, J., Garbe, G. & Berg, S., 1976. Die Bestimmung des Aminosäurenspektrums als Hilfsmittel bei der Datierung von Skelettfunden. *Arch. Kriminol.*, 158, pp.163-74.
- Bouwman, A.S. & Brown, T.A., 2004. The limits of biomolecular palaeopathology: ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis. *J Arch Sci*, 32, pp.703-15.
- Box, N.F. et al., 1997. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum. Mol. Genet.*, 6, pp.1891-97.
- Branicki, W. et al., 2007. Determination of the Phenotype Associated SNPs in the MC1R Gene. *J Forensic Sci.*, 52(2), pp.349-54.

- Branicki, W. et al., 2011. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Hum Genet.*, 129, pp.443-54.
- Brenner, M. & Hearing, V.J., 2008. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*, 84(3), pp.539-49.
- Brenner, M. & Hearing, V.J., 2009. What are melanocytes really doing all day long...? : from the ViewPoint of a keratinocyte: Melanocytes – cells with a secret identity and incomparable abilities. *Exp Dermatol*, 18(9), pp.799-819.
- Brilliant, M.H., 2001. The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res.*, 14, pp.86-93.
- Brinkmann, B. & Wiegand, P., 1997. *DNA-Technologie in der medizinischen Kriminalistik. Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik*. Lübeck: Schmidt-Römhild Verlag.
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), pp.177-86.
- Burger, J., Hummel, S., Pfeifer, I. & Herrmann, B., 2000. Palaeogenetic analysis of (pre)historic artifacts and its significance for anthropology. *Anthro. Anz.*, 58, pp.69-76.
- Busca, R. & Ballotti, R., 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.*, 13, p.60–69.
- Butler, J.M., 2009. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. London: Academic Press.
- Cargill, M. et al., 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.*, 22(3), pp.231-38.
- Coble, M.D. & Butler, J.M., 2005. Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.*, 50(1), pp.43-53.
- Collins, S.F., Brooks, L.D. & Chakravarti, A., 1998. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Research*, 8, pp.1229-31.
- Colombo, S., Berlin, I., Delmas, V. & Larue, L., 2011. Classical and Nonclassical Melanocytes in Vertebrates. In Borovansky J., R.P.A. *Melanins and Melanosomes*. Weinheim: Wiley-VCH. pp.21-62.
- Cooper, A. et al., 2001. Human origins and ancient human DNA. *Science*, 292(5522), pp.1655-56.
- Cornish-Bowden, 1985. IUBAC-IUB symbols for nucleotide nomenclature. *Nucl. Acids Res.*, 13, pp.3021-30.
- Davenport, C.G. & Davenport, C.B., 1907. HEREDITY OF EYE-COLOR IN MAN. *Science*, 26(670), pp.589-92.
- Duffy, D.L. et al., 2007. A three-single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of OCA2 explains most human eye-color variation. *Am J Hum Genet*, 80(2), pp.241-52.

- Eagle C.R., 1988. Iris pigmentation and pigmented lesions: an ultrastructural study. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 86, p.581–687.
- Edwards, M. et al., 2010. Association of the OCA2 Polymorphism His615Arg with Melanin Content in East Asian Populations: Further Evidence of Convergent Evolution of Skin Pigmentation. *PLoS*, 6(3), p.e1000867.
- Eiberg, H. et al., 2008. Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. *Hum. Genet.*, 123, pp.177-87.
- Eisinger, M. & Marko, O., 1982. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Nat Acad Sci USA.*, 79(6), pp.2018-22.
- Fehren-Schmitz, L. et al., 2011. Pre-Columbian population dynamics in coastal southern Peru: A diachronic investigation of mtDNA patterns in the Palpa region by ancient DNA analysis. *Am J Phys Anthropol.*, 141 (2), pp.208-21.
- Fitzpatrick, T.B., 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Archives of Dermatology*, 124, pp.869-71.
- Flanagan, N. et al., 2000. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet.*, 9, p.2531–2537.
- Fritsch P., 2009. *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Frost, P., 1986. Skin color preference, sexual dimorphism and sexual selection: A case of gene culture co-evolution? *Ethnic and Racial Studies*, pp.87-113.
- Frost, P., 2006. European hair and eye color: A case of frequency-dependent sexual selection? *Evolution and Human Behavior*, 27, pp.85-103.
- Frudakis, T. et al., 2003. Sequences associated with human iris pigmentation. *Genetics*, 165, p.2071–2083.
- Fukamachi, S., Shimada, A. & Shima, A., 2001. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nature Genet*, 28, pp.381-85.
- Gantz, I. et al., 1994. Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 ([alpha]-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24. 3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 19(2), pp.394-95.
- Garcia-Borron, J.C. & Sanchez, M.C.O., 2011. Biosynthesis of Melanins. In *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological, and Pathological Functions*. Wiley-VCH.
- Giebel, L.B., Strunk, K.M. & Spritz, R.A., 1991. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics*, 9, pp.435-45.

- Goding C.R., 2000. Mitf from neuralcrest to melanoma:signaltransduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes* , 14, p.1712–1728.
- Graf, J., Voisey, J., Hughes, I. & van Daal, A., 2007. Promotor Polymorphisms in the MATP (SLC45A2) Gene Are Associated With Normal Human Skin Color Variation. *Human Mutation*, 28(7), pp.710-17.
- Grossman, A. et al., 1996. Cloning of human lymphocyte-specific interferon regulatory factor (hLSIRF/ hIRF4) and mapping of the gene to 6p23-p25. *Genomics*, 37, pp.229-33.
- Haak, W. et al., 2008. Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proc Natl Acad Sci*, 105(47), pp.18226-31.
- Hamel, E., 2007. *Das Werden der Völker in Europa*. Berlin: Rottenbücher Verlag.
- Han, J. et al., 2008. A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet*, 4/5, p.e1000074.
- Hearing V.J., 2000. The melanosome: the perfect model for cellular responses to the environment. 13/8, pp.23-24.
- Hinds, D.A. et al., 2005. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*, 307/5712, pp.1072-79.
- Hoek, K.S. et al., 2008. Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 21/6, pp.665-76.
- Hummel, S., Schultes, T., Bramanti, B. & Herrmann, B., 1999. Ancient DNA profiling by megaplex amplifications. *Electrophoresis*, 20/8, pp.1717-21.
- Inagaki, K. et al., 2004. Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *Am J Hum Genet.*, 74/3, pp.466-71.
- International HapMap Consortium, 2007. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 449/7164, pp.851-61.
- Ji, Y. et al., 2000. Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. *Genome Res*, 10, pp.319-29.
- Kanetsky, P.A. et al., 2002. A polymorphism in the Agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *Am. J. Hum. Genet.*, 70, pp.770-75.
- Kayser, M. & de Knijff, P., 2011. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat. Rev. Genetics*, 12, pp.179-92.
- Kayser, M. et al., 2008. Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. *Am J Hum Genet*, 82/2, pp.411-23.

- Kayser, M. & Schneider, P.M., 2009. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Science International: Genetics*, 3, pp.154-61.
- Kitchin, P.A., Szotyori, Z., Fromholz, C. & Almond, N., 1990. Avoidance of false positives. *Nature*, 344/ 6263, p.201.
- Kleindorff, R., 2006. *Vergleichende Untersuchung der DNA-Erhaltung in verschiedenen Skelettelementen*. Universität Göttingen: Kleindorff R.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. & Spencer, C.A., 2007. *Genetik*. München: Pearson Studium.
- Konrad, K. & Wolff, K., 1973. Hyperpigmentation, melanosome size, and distribution patterns of melanosomes. *Arch Dermatol*, 107, p.853-60.
- Kushimoto, T. et al., 2003. The melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. 16, pp.237-44.
- Lacan, M. et al., 2011. Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route. *Proc Natl Acad Sci*.
- Lamason, R.L. et al., 2005. SLC24A5, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. *Science*, 310/5755, pp.1782-86.
- Lee, E.J., Anderson, L.M., Dale, V. & Merriwether, D.A., 2009. MtDNA origins of an enslaved labor force from the 18th century Schuyler Flatts Burial Ground in colonial Albany, NY Africans, Native Americans, and Malagasy? *J Archaeol Sci*, 36(12), pp.2805-10.
- Lee, S.T. et al., 1995. Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. *Genomics*, 26, p.354-363.
- Li, X.F., Kraev, A.S. & Lytton, J., 2002. Molecular cloning of a fourth member of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger gene family, NCKX4. *J. Biol. Chem.*, 277, pp.48410-17.
- Logan, D.W., Burn, S.F. & Jackson, I.J., 2006. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. *Pigment Cell Res*, 19/3, pp.206-13.
- Longo, M.C., Berninger, M.S. & Hartley, J.L., 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93/1, pp.125-28.
- Lucotte, G., Mercier, G., Dieterien, F. & Yuasa, I., 2010. A Decreasing Gradient of 374F Allele Frequencies in the Skin Pigmentation Gene SLC45A2, from the North of West Europe to North Afrika. *Biochem Genet.*, 48, pp.26-33.
- Lu, D. et al., 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, 371, pp.799-802.
- Mülhardt, C., 2009. *Der Experimentator*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Marks, M.S. & Seabra, M.C., 2001. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, p.738–748.
- Martin R., 1996. *Labor im Fokus Elektrophorese von Nucleinsäuren*. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mellars P.A., 1992. Archaeology and the population-dispersal hypothesis of modern human origins in Europe. . *Biological sciences*, 337/1280, pp.225-34.
- Miyamura, Y. et al., 2007. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell & Melanoma*, 20(1), pp.2-13.
- Montiel, R., Malgosa, A. & Francalacci, P., 2001. Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Hum Biol.*, 73/5, pp.689-713.
- Murken, J., Grimm, T. & Holinski-Feder, E., 2006. *Taschenlehrbuch Humangenetik*. Stuttgart, NewYork: Georg Thieme Verlag.
- Newton, J.M. et al., 2001. Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet.*, 69/5.
- Nielsen, R., 2000. Estimation of Population Parameters and Recombination Rates From Single Nucleotide Polymorphisms. *Genetics*, 154, pp.931-42.
- Nordlund, J.J. et al., 1998. *The Pigmentary System - Physiology and Pathophysiology*. Oxford: Oxford University Press.
- Norton, H.L. et al., 2007. Genetic Evidence for the Convergent Evolution of Light Skin in Europeans and East Asians. *Mol Biol Evol.*, 24/3, pp.710-22.
- Oetting, W.S. & King, R.A., 1999. Molecular basis of albinism: Mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Human Mutation*, 13/2, pp.95-115.
- Otte M., 1990. The northwestern European plain around 18,000 BP.. In *The world at 18,000 BP*. London: Unwin Hyman. pp.54-68.
- Otto, S. & Whitlock, M., 1997. The probability of fixation in populations of changing size. *Genetics*, 2, pp.723-33.
- Ou, C.Y., Moore, J.L. & Schochetman, G., 1991. Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 10/4, pp.442-46.
- Pakendorf, B. & Stoneking, M., 2005. Mitochondrial DNA and human evolution.. *Annu Rev Genomics Hum Genet* , 6, pp.165-83.
- Parra E.J., 2007. Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health.. *Am J Phys Anthropol* , 45, pp.85-105.

- Pathak, M.A., 1995. Functions of melanin and protection by melanin. *Zeise L, Chedekel MR, Fitzpatrick TB, Melanin: its role in human photoprotection. Overland Park: Valdenmar Publishing Company; 1995. p. 125—34., pp.124-34.*
- Philipps, C., Lareu, V., Salas, A. & Carracedo, A., 2004. Nonbinary single-nucleotide polymorphism markers. *International Congress Series*, 1261, pp.27-29.
- Poinar, H. et al., 2003. Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol*, (13), pp.1150-52.
- Pouchkarev, V.P., Shved, E.F. & Novikov, P.I., 1998. Sex determination of forensic samples by polymerase chain reaction of the amelogenin gene and analysis by capillary electrophoresis with polymer matrix. *Electrophoresis*, 19, pp.76-79.
- Prota G., 1980. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol*, 75/1, pp.122-27.
- Prota, G., 1992. *Melanin and Melanogenesis*. New York: Academic Press.
- Prota, G., 1994. Melanins melanogenesis and skin photoprotection. *Eur J Cancer*, 30A, pp.553-54.
- Quevedo, W.C. & Holstein, T.J., 2006. General biology of mammalian pigmentation. *BUCH! Nordlund J.J. The pigmentary system: physiology and pathophysiology. Malden M.A. Blackwell Publisher*, pp.63-90.
- Röpke, M., 2008. Mitochondriale DNA-Mutagenese im Cerebellum von Alkoholkranken. *Diplomarbeit*.
- Raposo, G. & Marks, M.S., 2007. Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8/10, pp.786-97.
- Rebbeck, T.R. et al., 2002. P Gene as an Inherited Biomarker of Human Eye Color. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11, p.782–784.
- Rees J.L., 2003. Genetics of hair and skin color. *Annu. Rev. Genet.*, 37, pp.67-90.
- Reidla, M. et al., 2003. Origin and Diffusion of mtDNA Haplogroup X. *Am J Hum Genet.* , 73(5), pp.1178-90.
- Relethford J.H., 1997. Hemispheric difference in human skin color. *Am J Phys Anthropol.*, 104, pp.449-57.
- Renfrew C., 1987. *Archaeology and Language: The Puzzle of Indo-European Origins*. London: Cape.
- Rinchik, E.M. et al., 1993. A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*, 361, pp.72-76.

- Roberts, D.W., Newton, R.A., Leonard, J.H. & Sturm, R.A., 2008a. Melanocytes expressing MC1R polymorphisms associated with red hair color have altered MSH-ligand activated pigmentary responses in coculture with keratinocytes. *J Cell Physiol*, 215/2, pp.344-55.
- Roberts, D.W., Newton, R.A. & Sturm, R.A., 2008b. MC1R expression in skin: is it confined to melanocytes? *J Invest Dermatol*, 127/10, pp.2472-73.
- Robins A.H., 1991. *Biological Perspectives on Human Pigmentation*. Cambridge, UK: Univ. Press.
- Roostalu, U. et al., 2007. Origin and Expansion of Haplogroup H, the Dominant Human Mitochondrial DNA Lineage in West Eurasia: The Near Eastern and Caucasian Perspective. *Mol Biol Evol*, 24(2), pp.436-48.
- Rozanowska, M., 2011. Properties and Functions of Ocular Melanins and Melanosomes. In *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological, and Pathological Functions*. Wiley-VCH.
- S., G., 2003. Photo Protection Begins at the Cellular Level: Microparasols on the Job. *J Invest Dermatol*, 121(4), p.viii.
- Sato, C., Ito, S. & Takeuchi, T., 1985. Establishment of a mouse melanocyte clone which synthesizes both eumelanin and pheomelanin. *Cell Struct Funct*, 10/4, pp.421-25.
- Schiöth, H. et al., 1999. Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun.*, 260, pp.488-91.
- Schilz, F., 2006. *Molekulargenetische Verwandtschaftsanalysen am prähistorischen Skelettkollektiv der Lichtensteinhöhle*. Göttingen: Doktorarbeit.
- Schmidt, T., Hummel, S. & Herrmann, B., 1995. Evidence of contamination in PCR laboratory disposables. *Naturwissenschaften*, 82, p.431.
- Schrimpf, G., 2002. *Gentechnische Methoden*. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schwarz, C. et al., 2009. New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Res.*, 37(10), pp.3215-29.
- Seiji, M., Shimao, K., Birbeck, M.S.C. & Fitzpatrick, T.B., 1963. Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci*, 100, p.497—533.
- Sherry, S.T. et al., 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.*, 29/1, pp.308-11.
- Shriver, M.D. et al., 2005. Large-scale SNP analysis reveals clustered and continuous patterns of human genetic variation. *Hum Genomics.*, 2, pp.81-89.
- Slominski, A. et al., 2005. Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol.*, 124/1, pp.13-21.
- Smith, R. et al., 1998. Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Dermatol.*, 111, p.119–122.

- Sosa, C. et al., 2011. Nuclear DNA Typing From Ancient Teeth. *The American journal of forensic medicine and pathology*
- Spritz R.A., 1994. Molecular genetics of oculocutaneous albinism. *Hum. Molec. Genet.*, 3, pp.1469-75.
- Stenn, K.S. & Paus, R., 2001. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 81(1):49-494., 81/1, pp.449-94.
- Stokowski, R.P. et al., 2007. A Genomewide Association Study of Skin Pigmentation in a South Asian Population. *American Journal of Human Genetics*, 81(6), pp.1119-32.
- Straus L.G., 1989. Age of the modern Europeans. *Nature* , 342, pp.476-77.
- Sturm R.A., et al., 2004. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *TRENDS in Genetics*, 20/8, pp.327-32.
- Sturm R.A., 2009. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet*, 18/R1, pp.R9-R17.
- Sturm, R.A., 2006. A golden age of human pigmentation genetics. *Trends Genet*, 22, pp.464-68.
- Sturm, R.A., Box, N.F. & Ramsay, M., 1998. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. 20, pp.712-21.
- Sturm, R.A. et al., 2008. A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color. *Am J Hum Genet*, 82/2, pp.424-31.
- Sturm, R.A. & Frudakis, T.N., 2004. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *TRENDS in Genetics*, 20/8, pp.327-32.
- Sturm, R.A. & Larsson, M., 2009. Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, pp.544-62.
- Sturm, R.A. et al., 1995. Chromosomal structure of the human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family. 29, pp.24-34.
- Sturm, R.A., Teasdale, R.D. & Box, N.F., 2001. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene*, 277, pp.49-62.
- Sulem, P. et al., 2007. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat. Genet.*, 39, pp.1443-52.
- Sweet, H.O. et al., 1998. A new allelic series for the underwhite gene on mouse chromosome 15. *J Hered*, 89, pp.546-51.
- Szabo, G., Gerald, A.B., Pathak, M.A. & Fitzpatrick, T.B., 1969. Racial differences in the fate of melanosomes in human epidermis. *Nature*, 222, pp.1081-82.

- Taanman, J.W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochemica et Biophysica*, 1410, pp.103-23.
- Tadokoro, T. et al., 2005. Mechanisms of Skin Tanning in Different Racial/Ethnic Groups in Response to Ultraviolet Radiation. *The Society for Investigative Dermatology*, 124, pp.1326-32.
- Tamariz, J., Voynarovska, K., Prinz, M. & Caragine, T., 2006. The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA. *J Forensic Sci*, 51/4, pp.790-94.
- Thomas, A.J. & Erickson, C.A., 2008. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21/6, pp.598-610.
- Thorpe I., 1996. *The Origins of Agriculture in Europe*. London: Routledge.
- Tobin, D.J. & Paus, R., 2001. Graying:gerontobiology of the hairfollicle pigmentary unit. *Exp Gerontol.*, 36/1, pp.29-54.
- Tomita, Y. & Suzuki, T., 2004. Genetics of pigmentary disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 131C/1, pp.75-81.
- Toyofuku, K. et al., 2001. Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *FASEB J.*, 15/12, pp.2149-61.
- Tully, G., 2007. Genotype versus phenotype: human pigmentation. *Forensic Sci Int Genet.*, 1/2, pp.105-10.
- Valverde, P. et al., 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.*, 11, pp.328-30.
- von Wurmb-Schwark N, et al., 2008. The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research. *Leg Med.*, 10(3).
- von Wurmb-Schwark, N. et al., 2009. A new multiplex-PCR comprising autosomal and y-specific STRs and mitochondrial DNA to analyze highly degraded material. *Forensic Sci Int Genet.* , 3(2), pp.96-103.
- Wakeley, J., Nielsen, R., Liu-Cordero, S.N. & Ardlie, K., 2001. The Discovery of Single-Nucleotide Polymorphisms—and Inferences about Human Demographic History. *Am J Hum Genet*, 69/6, pp.1332-47.
- Walsh, S. et al., 2011. IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci Int Genet.*, 5(3), pp.170-80.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), pp.506-13.
- Welch, L. et al., 2011. A comparison of mini-STRs versus standard STRs--results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci Int Genet.*, 5(3), pp.257-58.

Wilkerson, C.L. et al., 1996. Melanocytes and iris color. Light microscopic findings. 114/4, pp.437-42.

Willerslev, E. & Cooper, A., 2005. Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B.*, 272, pp.3-16.

Willerslev, E. et al., 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, 300/5620, pp.791-95.

Yuasa, I. et al., 2007. OCA2*481Thr, a hypofunctional allele in pigmentation, is characteristic of northeastern Asian populations. *J. Hum. Genet.*, 52, pp.690-93.

Zhao, H. et al., 2006. The study of neighboring nucleotide composition and transition/transversion bias. *Science in China Series C: Life Sciences*, 49/4, pp.395-402.

Zvelebil M., 1989. On the transition to farming in Europe, or what was spreading with the Neolithic: a reply to Ammermann. *Antiquity*, 63, pp.379-83.

Zvelebil, M. & Zvelebil, K.V., 1988. Agricultural transition and Indo-European dispersals. *Antiquity*, 62, pp.574-83.

11. Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

- **Tabellen**

Tabelle 1: Analyseergebnis der 18 SNPs und Übersicht über die Pigmentierungsmerkmale der 400 Probanden.

Tabelle 2: Tabellarische Einteilung der Hauttypen nach (Fitzpatrick, 1988).

Tabelle 3a: Verwendete Primer und Sonden der Realtime-PCR für die Quantifizierung der nukleären DNA.

Tabelle 3b: PCR-Ansatz der Realtime-PCR für die Quantifizierung der nukleären DNA.

Tabelle 3c: Temperaturprofil der Realtime-PCR für die Quantifizierung der nukleären DNA.

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der 18 ausgewählten SNPs.

Tabelle 5a: Tabellarische Übersicht der Irisplex-SNPs nach (Walsh et al., 2011).

Tabelle 5b: Analyseergebnis der 100 Probanden mit den SNPs aus (Walsh et al., 2011) (Irisplex).

Tabelle 6a: Tabellarische Übersicht der SNPs und MC1R Varianten zur Rekonstruktion der Haarfarbe nach (Branicki et al., 2011).

Tabelle 6b: Analyseergebnis der 108 Probanden mit den SNPs und Markern aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 7a: Tabellarische Darstellung der PCR-Fragmente aus Multiplex I und II.

Tabelle 7b: Verwendete Primer für die Multiplex I + II.

Tabelle 7c: PCR-Ansatz für die Multiplex-PCRs I und II.

Tabelle 7d: Temperaturprofil der Multiplex-PCRs I und II.

Tabelle 7e: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion der Multiplex-PCRs I und II.

Tabelle 7f: SBE-Ansätze der Multiplex-PCRs I und II.

Tabelle 7g: Temperaturprofil des SBE-Ansatzes der Multiplex I und II.

Tabelle 8a: Tabellarische Darstellung des PCR-Fragmentes zur Analyse des SNPs rs16891982.

Tabelle 8b: Verwendete Primer für die Amplifikation des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Tabelle 8c: Singleplex-PCR-Ansatz für die Amplifikation des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Tabelle 8d: Temperaturprofil der Singleplex-PCR für die Amplifikation des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Tabelle 8e: Verwendeter Primer für die SBE-Reaktion des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Tabelle 8f: SBE-Ansatz des SNPs rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Tabelle 8g: Temperaturprofil der SBE-Reaktion für den SNP rs16891982 aus (Walsh et al., 2011).

Tabelle 9a: Tabellarische Darstellung der verschiedenen PCR-Ansätze für die Analyse der sieben SNPs aus der Publikation von (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9b: Verwendete Primer für die SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9c: PCR-Ansätze für die Amplifikation der SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9d: Temperaturprofil für die Amplifikation der SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9e: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion der SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9f: SBE-Ansätze für die SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9g: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9h: Verwendete Primer für die Amplifikation des MC1R-Exons aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9i: PCR-Ansatz für die Amplifikation des MC1R-Exons aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 9j: Temperaturprofil für die Amplifikation des MC1R-Exons aus (Branicki et al., 2011).

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der neolithischen Proben.

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der mittelalterlichen Proben.

Tabelle 12: Tabellarische Übersicht über die Vorgehensweise der anschließenden Probenbearbeitung basierend auf den Ergebnissen der Screening-PCRs.

Tabelle 13a: Verwendete Primer der Hexaplex-Screening-PCR nach (Apelt, 2009).

Tabelle 13b: Hexaplex-PCR-Ansatz nach (Apelt, 2009).

Tabelle 13c: Temperaturprofil der Hexaplex-Screening-PCR nach (Apelt, 2009).

Tabelle 14a: Verwendete Primer zur Ergänzung des PowerPlex®S5 System Kits (Promega).

Verzeichnisse

Tabelle 14b: PCR-Ansatz des modifizierten PowerPlex®S5 System Kits (Promega).

Tabelle 14c: Temperaturprofil des PowerPlex®S5 System Kits (Promega).

Tabelle 15a: PCR-Ansatz des PowerPlex 16HS System Kits (Promega).

Tabelle 15b: Temperaturprofil des PowerPlex 16 HS System Kits (Promega).

Tabelle 15c: Ergebnisse des PowerPlex 16 HS System Kits (Promega) für die mittelalterlichen Proben.

Tabelle 16a: PCR-Ansatz des AmpFISTR NGM™ PCR Amplification Kits (Applied Biosystem).

Tabelle 16b: Temperaturprofil des AmpFISTR NGM™ PCR Amplification Kits (Applied Biosystem).

Tabelle 16c: Ergebnisse des AmpFISTR NGM™ Kits (Applied Biosystems) für die mittelalterlichen Proben.

Tabelle 17a: Verwendete Primer für die Amplifikation der mitochondrialen D-Loop Fragmente aus (Lee et al., 2009) und (Fehren-Schmitz et al., 2011).

Tabelle 17b: PCR-Ansatz für die Amplifikation der mitochondrialen D-Loop Fragmente.

Tabelle 17c: Temperaturprofil für die Amplifikation der mitochondrialen D-Loop Fragmente.

Tabelle 18a: Sequenzierreaktion mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem).

Tabelle 18b: Temperaturprofil der Sequenzierreaktion mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem).

Tabelle 19a: Verwendete Primer für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion.

Tabelle 19b: PCR-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion.

Tabelle 19c: Temperaturprofil für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion.

Tabelle 19d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion zur Augenfarbenrekonstruktion.

Tabelle 19e: SBE-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion.

Tabelle 19f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Singleplex-PCR zur Augenfarbenrekonstruktion.

Tabelle 20a: Verwendete Primer für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion.

Tabelle 20b: PCR-Ansatz für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion.

Tabelle 20c: Temperaturprofil für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion.

Tabelle 20d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion zur Rotstichrekonstruktion.

Tabelle 20e: SBE-Ansatz für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion.

Tabelle 20f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Duplex-PCR zur Rotstichrekonstruktion.

Tabelle 21a: Verwendete Primer für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion.

Tabelle 21b: PCR-Ansatz für die Single-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion.

Tabelle 21c: Temperaturprofil für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion.

Tabelle 21d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktionen zur Haarfarbenrekonstruktion.

Tabelle 21e: SBE-Ansatz für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion.

Tabelle 21f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Singleplex-PCRs zur Haarfarbenrekonstruktion.

Tabelle 22a: Verwendete Primer für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion.

Tabelle 22b: PCR-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion.

Tabelle 22c: Temperaturprofil für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion.

Tabelle 22d: Verwendete Primer für die SBE-Reaktion zur Hauttyprekonstruktion.

Tabelle 22e: SBE-Ansatz für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion.

Tabelle 22f: Temperaturprofil der SBE-Reaktionen für die Singleplex-PCR zur Hauttyprekonstruktion.

Tabelle 23: Ergebnisse der Realtime-PCR. Angegeben sind die DNA-Mengen in ng/μl.

Tabelle 24a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Augenfarbe.

Tabelle 24b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich der Augenfarbe.

Tabelle 24c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Augenfarbenrekonstruktion.

Tabelle 25a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich des Rotstichs im Haar.

Tabelle 25b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich des Rotstichs.

Tabelle 25c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Rotstichrekonstruktion.

Tabelle 26a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Haarfarbe.

Tabelle 26b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich der Haarfarbe.

Tabelle 26c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Haarfarbenrekonstruktion.

Tabelle 27a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich des Hauttyps.

Tabelle 27b: Statistische Ergebnisse der 400 modernen Proben bezüglich des Hauttyps.

Tabelle 27c: Tabellarische Darstellung der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Hauttyprekonstruktion.

Tabelle 28: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse des SNPs rs12913832 im Vergleich zu den sechs SNPs aus (Walsh et al., 2011).

Tabelle 29a: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Haarfarbenrekonstruktion, die beim Vergleich der Methode von (Branicki et al., 2011) mit der selbstentwickelten Methode (rs12913832, rs12896399, rs12203592) und dem einzelnen SNP rs12913832, erzielt wurden.

Tabelle 29b: Tabellarische Darstellung der statistischen Ergebnisse bezüglich der Rotstichrekonstruktion, die beim Vergleich der Methode von (Branicki et al., 2011) mit der selbstentwickelten Methode (rs1805007, rs1805008) und dem einzelnen SNP rs1805007, erzielt wurden.

Tabelle 30a: Tabellarische Darstellung der Genotypen rs12913832 und rs12913832/ rs12203592/ rs12896399 zur Augenfarben- und Haarfarbenrekonstruktion und den daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten des Familienquartetts a).

Tabelle 30b: Tabellarische Darstellung der Genotypen rs1805007/ rs1805008 und rs1805007/ rs1805008/ rs4778138 zur Rotstich- und Hauttyprekonstruktion und den daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten des Familienquartetts b).

Tabelle 31: Tabellarische Darstellung des Genotyps rs12913832 zur Augenfarbenrekonstruktion und die daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten.

Tabelle 34: Tabellarische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der hypervariablen Regionen I und II (HVRI, II) und den daraus resultierenden Haplogruppen der neolithischen Proben.

Tabelle 35: Tabellarische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der hypervariablen Regionen I und II (HVRI, II) und den daraus resultierenden Haplogruppenzuordnungen der mittelalterlichen Proben.

Tabelle 36: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der neolithischen Proben, bei denen die Pigmentierungs-SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 untersucht wurden.

Tabelle 37: Tabellarische Darstellung der Pigmentausprägungen der neolithischen Proben basierend auf den Wahrscheinlichkeiten, die sich aus den unterschiedlichen Genotypen der SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 ergeben.

Tabelle 38: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der mittelalterlichen Proben, bei denen die Pigmentierungs-SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 untersucht wurden.

Tabelle 39: Tabellarische Darstellung der Pigmentausprägungen der mittelalterlichen Proben basierend auf den Wahrscheinlichkeiten, die sich aus den unterschiedlichen Genotypen der SNPs rs12913832 rs1805007, rs1805008, rs4778138, rs12203592 und rs12896399 ergeben.

- **Abbildungen**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Melaninsynthese, verändert nach (Fritsch P., 2009; Tully, 2007).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Melaninsynthese mit den wichtigsten Pigmentierungsgenen (rot markiert), verändert nach (Fritsch P., 2009; Tully, 2007).

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Haarschaftes, verändert nach (Slominski A., 2005).

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Auges und der Augenfarbenausprägung, verändert nach (Sturm R.A., 2004).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Epidermis, verändert nach (Benninghoff, 1993).

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Verteilung von hellen Augen und Haaren in Europa.

Abbildung 7: Schematische Darstellung der demographischen Prozesse in Europa im archäologischen Kontext nach (Barbujani & Bertorelle, 2002).

Abbildung 8: Schematische Darstellung eines *single nucleotid polymorphism* (= SNP).

Abbildung 9: Schematische Darstellung der postmortalen DNA-Modifikationen nach (Willerslev & Cooper, 2005).

Abbildung 10: Darstellung der unterschiedlichen Augenfarben. Fotografische Abbildungen.

Abbildung 11: Darstellung der unterschiedlichen Haarfarben und Kategorien. Fotografische Abbildung.

Verzeichnisse

Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Augen-, Haar- und Hauttypen in Form eines Tortendiagramms (rezente Proben).

Abbildung 13: Schematische Darstellung der Pigmentausprägungen des Familienquartetts a).

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Pigmentausprägungen des Familienquartetts b).

Abbildung 15: Darstellung der unterschiedlichen Augenfarben bei Iris-Heterochromatie. Fotografische Abbildung.

Abbildung 16: Ausschnitt einer humanen MC1R-Sequenz.

Abbildung 17: Bild eines 2 %-igen Agarosegels nach der Gelelektrophorese

Abbildung 18: Bild eines 10 %-igen Polyacrylamidgels nach der Gelelektrophorese

Abbildung 19: Schematische Darstellung der single base extension (SBE) Reaktion unter Verwendung des SNaPshot® Multiplex Systems von Applied Biosystem.

Abbildung 20: Typisierungsergebnis der SNPs aus den Multiplex-PCRs I und II.

Abbildung 21: Typisierungsergebnis des SNPs rs16891982 (SLC45A2) aus (Walsh et al., 2011) analysiert als Singleplex-PCR.

Abbildung 22: Typisierungsergebnisse der SNPs aus (Branicki et al., 2011).

Abbildung 23: Typisierung von zwei neolithischen Proben mit der Hexaplex-PCR.

Abbildung 24: Typisierung von zwei mittelalterlichen Probe mit dem modifizierten Powerplex® S5 Kit (Promega).

Abbildung 25: Typisierung einer neolithischen Probe mit dem PowerPlex® 16HS Kit (Promega).

Abbildung 26: Verwendete Primerpaare zur Amplifikation der D-Loop Regionen HVI und HVII.

Abbildung 27: Bild eines 2 %-igen Agarosegels nach der Gelelektrophorese.

Abbildung 28: Graphische Darstellung der mittleren Menge an nukleärer DNA in den DNA-Extrakten aus Blut und Mundschleimhautzellen.

Abbildung 29: Schematische Darstellung der Pigmentausprägungen des Familienquartetts a) und den Analyseergebnissen der SNPs rs12913832 (HERC2-Gen), rs12203592 (IRF4-Gen) und rs12896399 (SLC24A4).

Abbildung 30: Schematische Darstellung der Pigmentausprägungen des Familienquartetts b) und den Analyseergebnissen der SNPs rs1805007, rs1805008 (MC1R-Gen) und rs4778138 (OCA2-Gen).

Abbildung 31: Schematische Darstellung der Screening-Ergebnisse mittels Hexaplex-PCR in Form eines Tortendiagrammes.

Abbildung 32: Schematische Darstellung der Proben mit mitochondrialer DNA (= mtDNA) differenziert nach mtDNA in den Extrakten a und b sowie a oder b.

Abbildung 33: Schematische Darstellung der Proben mit chromosomaler DNA differenziert nach chromosomaler DNA in den Extrakten a und b sowie a oder b.

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Screening-Ergebnisse mittels modifiziertem Powerplex[®] S5 Kit in Form eines Tortendiagramms.

Abbildung 35: Schematische Darstellung der Proben mit mitochondrialer DNA (= mtDNA) differenziert nach mtDNA in den Extrakten a und b sowie a oder b.

Abbildung 36: Schematische Darstellung der Proben mit chromosomaler DNA differenziert nach chromosomaler DNA in den Extrakten a und b sowie a oder b.

Abbildung 37: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Augen-, Haar- und Hauttypen in Form eines Tortendiagramms (neolithische Proben).

Abbildung 38: Schematische Darstellung der Wanderbewegung aller mitochondrialen Haplogruppen sowie die Pigmentierungserscheinungen und Haplogruppen der typisierten neolithischen Proben.

Abbildung 39: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Augen-, Haar- und Hauttypen in Form eines Tortendiagramms (mittelalterliche Proben).

Abbildung 40: Schematische Darstellung der Wanderbewegung aller mitochondrialen Haplogruppen sowie die Pigmentierungserscheinungen und Haplogruppen der typisierten mittelalterlichen Proben

12. Danksagung

Im Rahmen dieser Danksagung möchte ich meiner Doktormutter Frau PD. Dr. rer. nat. Nicole von Wurmb-Schwark dafür danken, dass sie es mir ermöglicht hat über dieses Thema zu promovieren. Darüber hinaus danke ich ihr für die Unterstützung und die lehrreichen Jahre.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Dr. jur. Hans-Jürgen Kaatsch für die Hilfe beim Erstellen des Ethikantrages sowie für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin in Kiel durchführen zu können.

Zudem danke ich der Graduiertenschule "Human Development in Landscapes" und der DFG, dass sie mich in der Zeit der Promotion finanziell unterstützt haben und ich mein interdisziplinäres Wissen ständig erweitern konnte.

Bei meinen Laborkollegen Andrea Preuße-Prange, Anke Heinrich, Ben Krause-Kyora, Rebecca Renneberg, Esther Lee, Patrick Meyer und Jan-Hendrik Modrow möchte ich an dieser Stelle ebenfalls bedanken. Es hat immer viel Spaß gemacht mit Euch im Team zusammenzuarbeiten. Vielen Dank für die Unterstützung, die lustigen Stunden während und nach der Arbeit und die hilfreichen Gesprächen im Laboralltag.

Mein Dank geht ebenfalls an Stefanie Petzel, die mich jeden Tag mit Vitaminen versorgt hat und auch im Labor immer eine große Hilfe war. Auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes der Rechtsmedizin möchte ich für die nette Zusammenarbeit und die schönen Jahre danken.

Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle Amke Caliebe danken, die eine große Hilfe bei der statistischen Auswertung war.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an meinen Mann, der immer ein offenes Ohr hatte und jedes Mal dafür Verständnis gezeigt hat, wenn es mal wieder im Labor später wurde.

Ich danke ebenfalls meinen Eltern, weil sie mich immer auf diesem Weg unterstützt haben.

Mein Dank geht auch an Nina Wellendorf, die bei der Literaturrecherche eine große Hilfe war.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei all den Probanden für die Teilnahme am Projekt und bei Thomas Scholz für die Unterstützung bedanken.

13. Lebenslauf

Name: Melanie Harder, geb. Röpke
Geburtsdatum 02.10.1980
Geburtsort: Kiel
Anschrift: Hahnbusch 22
D - 24146 Kiel
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

weitere Ausbildung

seit 2008 Stipendiatin der Graduiertenschule
"Human Development in Landscapes" der
Christian-Albrechts-Universität (CAU) in Kiel,
Beginn der Promotion
2007 - 2008 Diplomarbeit in der Rechtsmedizin des UK-SH, Kiel
Abschluß Diplom
2001 - 2007 Studium der Biologie an der CAU in Kiel
Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfach: Rechtsmedizin

Schulausbildung

1998 - 2001 Hebbelschule (Gymnasium), Kiel
Abschluß Abitur
1997 - 1998 Schuljahr in São José dos Campos, Brasilien
1991 - 1997 Ricarda-Huch Schule (Gymnasium), Kiel
1987 - 1991 Grund- und Hauptschule Kiel Holtenau

Lebenslauf

Hiermit erkläre ich, Melanie Harder, geboren am 02.10.1980 in Kiel, dass diese Abhandlung nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Beiträge von anderen als meiner Person wurden deutlich als solche hervorgehoben.

Diese Arbeit wurde weder im Ganzen noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens zur Begutachtung vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurden bei der Entstehung dieser Arbeit eingehalten.

Kiel den 28.01.2012

Melanie Harder