

# Möglichkeiten und Grenzen der Analyse archäologischer DNA

Michael Hofreiter

Obwohl sich die Forschungsgebiete von Archäologen und Evolutionsforschern auf den ersten Blick relativ stark unterscheiden, haben sie doch eine ganz wesentliche Gemeinsamkeit: beide Wissenschaften beschäftigen sich mit Populationen, die in der Vergangenheit lebten. Neben der Auswertung morphologischer Merkmale werden in der Evolutionsforschung seit den 50er Jahren zunehmend die Ergebnisse molekularer Untersuchungen verwendet. Während sich morphologische Merkmale aber auch an Fossilien noch feststellen lassen, waren molekulare Techniken lange auf heute lebende Organismen beschränkt.

Dies änderte sich mit der Entdeckung, daß unter bestimmten Umständen auch molekulare Merkmale über Tausende von Jahren erhalten bleiben können. Obwohl Proteine auch in Funden, die unter extrem günstigen Bedingungen erhalten wurden, wie z.B. einem 40000 Jahre alten Mammut aus Permafrost sehr stark modifiziert sind, ist die strukturelle Information, die etwa von Albumin, einem Serumprotein erhalten geblieben ist, doch ausreichend, um mit Hilfe immunologischer Techniken die Verwandtschaft mit den heute lebenden Elefantenarten nachzuweisen (PRAGER et al. 1980). Ebenso war es möglich, Hämoglobin in bis zu 4500 Jahre alten Knochen nachzuweisen (ASCENZI et al. 1985).

1984 gelang es dann auch erstmals DNA, d.h. das Erbgut einer ausgestorbenen Tierart, dem Quagga, zu untersuchen (HIGUCHI et al. 1984). Neben zahlreichen Klonen mit bakteriellen Sequenzen gelang es auch, zwei Klone mit mitochondrialen Sequenzen aus einer 120 Jahre alten, getrockneten Quaggahaut zu identifizieren. Zwar konnten die Forscher eine nahe Verwandtschaft des Quagga mit dem Steppenzebra feststellen, zwei Sequenzpositionen aber waren sehr ungewöhnlich, da sie sich von allen anderen untersuchten Wirbeltieren unterschieden. Da die Effizienz bei der Klonierung alter DNA jedoch sehr gering ist, war es nicht möglich die Ergebnisse zu reproduzieren. Dasselbe galt für die erste Untersuchung älterer DNA aus einer 2300 Jahre alten ägyptischen Mumie (PÄÄBO 1985).

Sowohl das Problem der Reproduzierbarkeit, als auch das der geringen Effizienz lösten sich mit der Entdeckung der PCR (MULLIS & FALOONA 1987), mit deren Hilfe sich eine bestimmte DNA Sequenz in nahezu unbegrenzter Kopienzahl herstellen läßt. Der erste Nachweis, daß dies auch bei alter DNA möglich ist, war die Amplifikation von DNA von derselben Quaggahaut, die auch von HIGUCHI et al. verwendet wurde (PÄÄBO & WILSON 1988). Die amplifizierte Sequenz zeigte, daß es sich bei den beiden ungewöhnlichen Sequenzpositionen um Klonierungsartefakte handelte, die vermutlich auf Schäden an der DNA zurückzuführen waren.

Trotz der hohen Empfindlichkeit der PCR-Technik zeigte sich jedoch bald, daß die Untersuchung alter DNA auf vielfältige Schwierigkeiten stößt. Zunächst einmal ist DNA aus altem Gewebe sehr stark fragmentiert. Während sich aus frischem Gewebe DNA-Stücke von 10000 bis 100000 Basenpaaren (bp) Länge isolieren lassen, liegt die Länge dieser Stücke bei altem Gewebe bei etwa 100 bis 200 bp, und zwar unabhängig davon, ob ein vier Jahre altes Stück Schweinefleisch, eine 120 Jahre alte Beutelwolfhaut, eine 5000 Jahre alte ägyptische Mumie oder 13000 Jahre alte Überreste eines südamerikanischen Faultieres untersucht wurden (PÄÄBO 1989). Diese Fragmentierung scheint sehr rasch nach dem Tod eines Organismus aufzutreten und hat zur Folge, daß DNA-Sequenzen aus älterem Gewebe stets – wenn überhaupt – nur in kurzen überlappenden Fragmenten gewonnen werden können. Neben dieser sehr rasch auftretenden Fragmentierung treten im Laufe der Zeit – unter ungünstigen Bedingungen sehr rasch, unter günstigen Bedingungen sehr viel langsamer – weitere DNA-Schäden auf. Bei den beiden wichtigsten Beschädigungen handelt es sich um die hydrolytische Spaltung bestimmter Bindungen in der DNA sowie um oxidative Schäden an den Basen in der DNA. Durch Hydrolyse gehen vor allem Purinbasen sehr rasch verloren (LINDAHL 1993), und in der Folge tritt an solchen Stellen dann ein Strangbruch auf, wodurch die DNA zu immer kleineren Stücken reduziert wird, so daß eine Amplifikation schließlich unmöglich wird. Auch bestimmte oxidative Veränderungen an den Basen in der DNA verhindern eine Amplifikation, und es konnte gezeigt werden, daß eine Amplifikation von DNA aus alten Geweben oder Knochen nur bis zu einem bestimmten Gehalt an oxidativ modifizierten Basen möglich ist (Höss et al., 1996a). Dennoch gelang es in zahlreichen Fällen, DNA aus Funden zu isolieren und zu untersuchen, so z.B. aus Knochen neuseeländischer Moas (COOPER et al. 1992), eines 13000 Jahre alten südamerikanischen Faultieres (Höss et al. 1996b) oder aus bis zu 50000 Jahre alten Mammutresten (Höss & PÄÄBO 1994). Zum Teil zeigten die Ergebnisse, daß bisher allgemein akzeptierte Vorstellungen neu überdacht werden mußten, die DNA-Analyse der Moa Funde führte z.B. dazu, daß die Evolutionsgeschichte der flugunfähigen Vögel Neuseelands, d.h. der Moas und Kiwis neu interpretiert wurde.

Die Amplifikation sehr viel älterer DNA wurde zum ersten Mal 1990 veröffentlicht. Dabei handelte es sich um 17–20 Millionen alte pflanzliche Fossilien aus den Clarkia-Schichten in Idaho. Morphologisch sind diese Funde ausgezeichnet erhalten, und es schien GOLENBERG und seinen Mitarbeitern gelungen zu sein, ein 820 bp Stück

DNA zu isolieren und zu amplifizieren (GOLENBERG et al. 1990). Noch ältere DNA-Funde wurden von in Bernstein eingeschlossenen Insekten veröffentlicht (z.B. CANNINO et al. 1993), und im Jahr 1994 schien schließlich sogar Dinosaurier-DNA amplifiziert worden zu sein (WOODWARD et al. 1994). Es zeigte sich jedoch sehr bald, daß es sich bei diesen Funden nicht um endogene DNA handeln konnte, sondern daß offensichtlich Spuren kontaminierender moderner DNA amplifiziert worden waren. So fanden LOGAN et al. bei biochemischen Untersuchungen der Clarkia-Fossilien weder Polysaccharide noch Proteine (LOGAN et al. 1993), und weitere Untersuchungen zeigten, daß der molekulare Erhaltungszustand dieser Fossilien unvereinbar mit der Isolierung endogener DNA ist (POINAR et al. 1996). Dies schien bei den in Bernstein erhaltenen Insekten nicht der Fall zu sein. Untersuchungen zur Razemisierung der Proteine in diesen Proben deuteten auf einen guten Erhaltungszustand hin. Die Razemisierung, d.h. die Umwandlung von der D- in die L-Form läuft bei bestimmten Aminosäuren mit der gleichen Geschwindigkeit ab wie der Verlust der Purinbasen in der DNA. Das Verhältnis von D- zu L-Form von Asparagin kann deshalb als Indikator verwendet werden, ob eine Isolierung von DNA überhaupt möglich ist (POINAR et al. 1996). Dennoch konnten die zahlreichen DNA-Funde aus in Bernstein eingeschlossenen Insekten nicht reproduziert werden, und man kann heute davon ausgehen, daß es nicht möglich ist, aus diesen Fossilien DNA zu isolieren (AUSTIN et al. 1997). Auch die mutmaßliche Dinosaurier-DNA wurde mit großer Skepsis aufgenommen. Zwar war es den Forschern gelungen, eine bisher unbekannte Sequenz zu isolieren, bei Vergleichen zeigte sich jedoch, daß die größte, wenn auch relativ entfernte Ähnlichkeit mit dem menschlichen Cytochrom b Gen bestand, und nicht, wie für eine Dinosaurier-DNA zu erwarten, mit einer Sequenz einer Vogelart. Dies legte die Mutmaßung nahe, daß es sich bei der von WOODWARD et al. isolierten Sequenz um eine sehr alte Insertion des Cytochrom b Gens im menschlichen Zellkern handelte. Tatsächlich gelang es ZISCHLER et al. mehrere Insertionen im menschlichen Zellkern zu isolieren, die den veröffentlichten Dinosauriersequenzen äußerst ähnlich waren. Solche Insertionen mitochondrialer Gene in den Zellkern wurden in den verschiedensten Tierarten gefunden, und diese Insertionen unterscheiden sich umso mehr von den mitochondrialen Ursprungssequenzen, je länger das Insertionsereignis zurückliegt. Sie stellen damit eine besonders schwierig einzuschätzende Kontaminationsquelle dar. Aufgrund dieser Probleme wird die Entdeckung einer bis dahin unbekannten Sequenz nicht als Beweis dafür gesehen, daß diese Sequenz tatsächlich von endogener DNA des untersuchten Fossils stammt. Ein weiteres Problem stellt die Kontamination alter Proben mit von Mikroorganismen stammender DNA dar. So geht man heute davon aus, daß nur ein sehr geringer Teil der aus fossilen Funden gewonnenen DNA tatsächlich vom ursprünglichen Organismus stammt, der weitaus größte Teil hingegen

stammt von Bakterien und Pilzen, die die Überreste besiedeln. Bei einem 13000 Jahre alten Faultier aus Chile lag der Anteil an endogener DNA z.B. bei lediglich 0,1 % der isolierten DNA (HÖSS et al. 1996b).

Aufgrund dieser vielfältigen Probleme wurden im Laufe der Zeit eine ganze Reihe von Kriterien entwickelt, die für das Arbeiten mit alter DNA und das Auffinden verifizierbarer Sequenzen als notwendig angesehen werden (z.B. AUSTIN et al. 1997 und Referenzen darin), und von denen ich die wichtigsten nachfolgend kurz anführen möchte. Zunächst einmal ist es notwendig, sowohl während der Extraktion als auch bei der PCR Kontrollen durchzuführen, um mögliche Kontaminationen der verwendeten Reagenzien aufzudecken. Werden PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primern durchgeführt, wobei die amplifizierten Fragmente unterschiedliche Längen besitzen, so sollte die Amplifikationsstärke mit der Fragmentlänge abnehmen, eine typische Eigenschaft alter DNA, bedingt durch die oben erwähnte Fragmentierung. Es empfiehlt sich darüberhinaus, die PCR-Produkte zu klonieren und einzelne Klone zu sequenzieren sowie eine Quantifizierung der im Extrakt vorhandenen Kopienzahl der jeweils amplifizierten DNA vorzunehmen (HANDT et al. 1994). Ergebnisse sollten reproduzierbar sein, sowohl im eigenen Labor als nach Möglichkeit auch in einem fremden Labor (KRINGS et al. 1997), und schließlich sollten gegebenenfalls gefundene Sequenzen auch phylogenetisch Sinn machen. Eine Vorbedingung für das Arbeiten mit alter DNA sind getrennte Räumlichkeiten für das Arbeiten mit den alten Proben und für die PCR.

Daß es unter Einhaltung dieser Kriterien möglich ist, verlässliche Sequenzen von archäologischen und paläontologischen Funden zu erhalten wurde, immer wieder gezeigt, aber gerade die für viele Forscher wohl interessantesten Funde, nämlich die menschlicher Überreste sind auch die mit Abstand am schwierigsten zu untersuchen. Da bei diesen Funden Forscher und Forschungsobjekt von der Art her identisch sind, läßt sich ein wichtiges der oben genannten Kriterien nicht anwenden, nämlich das der Phylogenie. Dieses Problem wird noch dadurch verschärft, daß Kontamination durch menschliche DNA die weitaus häufigste Kontaminationsquelle darstellt. Untersucht man menschliche Überreste und findet DNA, so stellt sich immer die Frage, ob es sich um endogene DNA, oder aber Kontamination handelt. Da zudem Funde menschlicher Überreste häufig kontaminiert sind (RICHARDS et al. 1995), sollten Ergebnisse von molekularen Untersuchungen an menschlichen Funden mit besonderer Vorsicht interpretiert werden (HANDT et al. 1994; HANDT et al. 1996).

Trotz all dieser Probleme liefert die Untersuchung alter DNA immer wieder faszinierende Ergebnisse, wie die Veröffentlichung der Neandertaler-DNA (KRINGS et al. 1997) gezeigt hat. Ich möchte aber zum Abschluß betonen, daß alle Proben aus denen bisher reproduzierbar DNA isoliert wurde, 50000 Jahre oder jünger waren. Nach allem, was wir heute wissen gibt es wohl eine zeit-

liche Grenze für das Überleben von DNA in fossilen Funden, die irgendwo zwischen 100000 und 1000000 Jahren liegen dürfte.

### Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Hendrik POINAR und Svante PÄÄBO, unter deren Anleitung ich die Grundlagen des Arbeitens mit »Alter DNA« gelernt habe. Darüberhinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Münchener »Ancient DNA« Gruppe bedanken.

Anschrift des Verfassers:

Michael Hofreiter  
Zoologisches Institut  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Luisenstr. 14,  
D-80333 München

### Literatur

- ASCENI, A., M. BRUNORI, G. CITRO & R. ZITO (1985): Immunological detection of hemoglobin in bones of ancient Roman times and of Iron and Eneolithic Ages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7170–7172.
- AUSTIN, J. J., A. B. SMITH, and R. H. THOMAS (1997): Palaeontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA. *TREE* vol. 12, no. 8: 303–306.
- COOPER, A., C. MOURER-CHAUVIRE, G. K. CHAMBERS, A. VON HAESLER, A. C. WILSON & S. PÄÄBO (1992): Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 8741–8744.
- GOLENBERG, E. M., D. E. GIANNASI, M. T. CLEGG, C. J. SMILEY, M. DURBIN, D. HENDERSON & G. ZURAWSKI (1990): *Nature* 344: 656–658.
- HANDT, O., M. RICHARDS, M. TRONSDORF, C. KILGER, J. SIMANAINEN, O. GEORGIEV, K. BAUER, A. STONE, R. HEDGES, W. SCHAFFNER, G. UTERMANN, B. SYKES & S. PÄÄBO (1994): Molecular Genetic Analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 264: 1775–1778.
- HANDT, O., M. KRINGS, R. H. WARD & S. PÄÄBO (1996): The Retrieval of Ancient Human DNA Sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 368–376.
- HIGUCHI, R., B. BOWMAN, M. FREIBERGER, O. A. RYDER & A. C. WILSON (1984): DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282–284.
- HÖSS, M. & S. PÄÄBO (1994): Mammoth DNA sequences. *Nature* 370: 333.
- HÖSS, M., P. JARUGA, T. H. ZASTAWNY, M. DIZDAROGLU & S. PÄÄBO (1996a): DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissue. *Nucleic Acids Research* Vol. 24, No. 7: 1304–1307.
- HÖSS, M., A. DILLING, A. CURRANT & S. PÄÄBO (1996b): Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Mylodon darwini*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 181–185.
- KRINGS, M., A. STONE, R. W. SCHMITZ, H. KRAINITZKI, M. STONEKING & S. PÄÄBO (1997): Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* 90: 19–30.
- LINDAHL, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 365: 709–715.
- LOGAN, G. A., J. J. BOON & G. EGLINTON (1993): Structural biopolymer preservation in Miocene leaf fossils from the Clarkia site, northern Idaho. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2246–2250.
- MULLIS, K. B. & F. FALOONA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335–350.
- PÄÄBO, S. & A. C. WILSON (1988): Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334: 387–388.
- PÄÄBO, S. (1989): Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1939–1943.
- POINAR, H. N., M. HÖSS, J. L. BADA & S. PÄÄBO (1996): Amino Acid Racemization and the Preservation of Ancient DNA. *Science* 272: 864–866.
- PRAGER E. M., J. M. LOWENSTEIN & V. M. SARICH (1980): Mammoth albumin. *Science* 209: 287–289.
- RICHARDS, M. B., B. C. SYKES & R. E. M. HEDGES (1995): Authenticating DNA Extracted From Ancient Skeletal Remains. *Journal of Archaeological Science* 22: 291–299.
- WOODWARD, S. R., N. J. WEYNAND & M. BUNNELL (1994): DNA Sequence from a Cretaceous Period Bone Fragment. *Science* 265: 1229–1232.
- ZISCHLER, H., M. HÖSS, O. HANDT, A. VON HAESLER, A. C. van der KUYL, J. GOUDSMIT & S. PÄÄBO (1995): Detecting Dinosaur DNA. *Science* 268: 1192–1193.