

Literatur

- CARELL T (2015a) Die Erbgut-Reparaturen. Nachrichten aus der Chemie 63, 1065-1067.
- CARELL T (2015b) DNA-Reparatur. Angew. Chem. Int. Ed. 54, 15330-15333; Angew. Chem. 127, 15546-15549.
- CHARGAFF E (1971) Preface to a grammar of biology. Science 172, 637-642.
- DAHM R (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. Hum. Genet. 122, 565-581.
- IVER RR, PLUCIENNIC A, BURDETT V & MODRICH PL (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. Chem. Rev. 106, 302-323.
- SADEGHIAN K, FLAIG D, BLANK ID; SCHNEIDER S, STRASSER R, STATHIS D, WINNACKER M, CARELL T & OCHSENFELD C (2014) Ribose-protonated DNA base excision repair: a combined theoretical and experimental study. Angew. Chem. 126, 10208-10212.
- SANCAR A (2003) Structure and function of DNA Photolyase and Cryptochrome blue-light Photoreceptors. Chem. Rev. 103, 2203-2237.
- WATSON JD & CRICK FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids. Nature 171, 737-738.

Ist der Erreger der Beulenpest erst vor 3000 Jahren entstanden?

Historische Evolution kann man nicht direkt beobachten. Deshalb haben sich Evolutionsbiologen lange gewünscht, DNA-Sequenzen von fossilen Organismen zu kennen. Inzwischen kann man sogar fossile Genome (= komplettes Erbgut) sequenzieren. Mehrere fossile und noch dazu sehr gut datierte Genome des Pestbakteriums *Yersinia pestis* legen nahe, dass der gefürchtete Erreger der Beulenpest erst vor etwa 3000 Jahren entstanden ist. Damit ist der Pesterreger ein Beispiel dafür, dass die Sequenzierung fossiler DNA die historische Evolutionsbiologie in eine neue Ära führt.

Siegfried Scherer

Pest: Eine alte biologische Waffe

Yersinia pestis verursacht die Beulenpest und gehört damit zu den gefürchtetsten bakteriellen Krankheitserregern. Nicht erst heute ist der Erreger als Biowaffe im Gespräch. Es gibt Indizien dafür, dass der Pesterreger bereits im Jahr 1346 bei der Belagerung der Stadt Kafa durch die Tataren eingesetzt wurde. Die Belagerer sollen ihre Pesttoten über die Mauern der Stadt katapultiert haben (WHEELIS 2002). Die infizierten Flüchtenden könnten die verheerende mittelalterliche Pestpandemie („Schwarzer Tod“) in Europa mit einem Höhepunkt zwischen 1347-1353 ausgelöst haben, sie soll schätzungsweise 25 Millionen Todesopfer gefordert haben.

Beschreibungen von Epidemien, die mutmaßlich auf *Yersinia pestis* zurückgehen, kennt man schon aus dem 5. Jahrhundert vor Christus und man weiß heute, dass auch die spätantike Justinianische Pandemie, welche zur Zeit des oströmischen Kaisers Justinian (527-565) grassierte, mit großer Wahrscheinlichkeit durch *Yersinia pestis* verursacht wurde. Die dritte Pandemie begann in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts und forderte wohl weit über 10 Millionen Todesopfer. Zwischen diesen drei Pandemien traten immer wieder kleinere Epidemien in Europa und in Asien auf und bis heute ist *Yersinia pestis* eine Bedrohung für den Menschen (BOIRE 2013).

Während der dritten Pandemie wurde der Erreger von dem französischen Arzt Alexandre YERSIN isoliert und die Übertragung durch Flöhe konnte aufgeklärt werden. *Yersinia pestis* ist ein Gram negatives Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae, zu welchen unter anderem Bakterien wie *Escherichia coli* gehören, die den Darm von vielen Tieren besiedeln. Die Herkunft der zahlreichen Gene, welche den Pesterreger zu einem der gefährlichsten bakteriellen Krankheitserreger der Menschheitsgeschichte machen („Virulenzfaktoren“), ist noch ungeklärt, derzeit existiert eine Reihe unterschiedlicher Hypothesen.

Taxonomische Stellung von *Yersinia pestis*

Zur Gattung *Yersinia* zählt man heute rund 20 Arten. Darunter finden sich neben dem Pesterreger die pathogenen Species *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, die beim Menschen die Yersiniose auslösen, eine durch Lebensmittel übertragene Erkrankung des Gastrointestinaltraktes, zuweilen kommt es in Folge auch zur Infektion von Gelenken und der Skelettmuskulatur. Für die Übertragung dieser Erreger ist ihre Kältetoleranz wichtig, wodurch sie sehr gut in gekühlten Lebensmitteln wachsen können

(NEUHAUS et al. 2003). Heute hat man Hinweise darauf, dass ein natürliches Reservoir von *Y. enterocolitica* möglicherweise Insekten sind, weil das Bakterium insektizide Toxine produziert (FUCHS et al. 2008).

Y. enterocolitica gehört zu einer anderen Speciesgruppe der Gattung *Yersinia* als der Pesterreger und man vermutet, dass die krankmachenden Eigenschaften der humanpathogenen *Yersinia*-Arten unabhängig voneinander in einer Parallel-evolution entstanden sind (REUTER et al. 2014). *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* sind sehr eng miteinander verwandt, bei Anwendung etablierter taxonomischer Kriterien dürfte man den Pest-erreger keinesfalls als eigene Art führen, doch man hat das Bakterium aufgrund seiner hochgefährlichen Eigenschaften in einer eigenen Art belassen. Einen ähnlichen Fall findet man bei dem ebenfalls biowaffentauglichen, extrem gefährlichen Milz-branderreger *Bacillus anthracis*, welcher genetisch lediglich eine wenig unterschiedliche Variante des vergleichsweise harmlosen Durchfallerregers *Bacillus cereus* ist (BOHM et al. 2015).

Innerartliche Biodiversität des Pesterregers: Darwin’sche oder Neutrale Evolution?

Insgesamt wurden Hunderte kompletter *Y. pestis*-Genome von Isolatn aus aller Welt sequenziert. Beim Vergleich dieser Genome fällt auf, dass im Gegensatz zur Umgruppierung von Genen durch Rekombination (Änderung der Reihenfolge der Gene auf dem Chromosom) nur sehr wenige Punktmutationen vorkommen. Man kann analysieren, wie viele dieser Punktmutationen in proteincodierenden Genen eine Aminosäureänderung ergeben (dann spricht man von nicht-synonymen Mutationen, dN) und wie viele stille Mutationen vorkommen, welche nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen (= synonyme Mutationen, dS). Vereinfachend gilt, dass stille Mutationen neutral sind, also nicht der Selektion unterliegen, denn sie verändern nicht die Funktion der

codierten Proteine. Nichtsynonyme Mutationen führen dagegen oft zu Verschlechterungen oder in Ausnahmefällen auch zur Verbesserung einer Proteinfunktion (zuweilen sind sie auch neutral) und unterliegen daher der negativen oder positiven Selektion. An dem Verhältnis von dS und dN kann man erkennen, ob bei der Evolution einer Gruppe Selektion eine Rolle spielte, dann liegt Darwin’sche Evolution vor, oder ob keine Selektion nachgewiesen werden kann, dann liegt Neutrale Evolution vor (SCHERER 2013).

Eine solche Analyse ergab bei *Y. pestis* sehr deutliche Hinweise darauf, dass die intraspezifische molekulare Diversität zum weit überwiegenden Teil nicht durch Darwin’sche Selektion, sondern durch neutrale Evolution entstanden ist (ACHTMAN et al. 1999). Das Vorliegen neutraler Evolution ist ein Argument dafür, dass eine hypothetische Molekulare Uhr eher mit konstanten Raten „tickt“.

Wann ist der Pesterreger entstanden?

In einer vielbeachteten Arbeit von 1999 schlugen ACHTMAN et al. aufgrund der Anwendung der molekularen Uhr vor, dass der Pesterreger erst vor 1500–20 000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* hervorging, das wäre relativ kurz vor den ersten bekannten Pestepidemien gewesen (ACHTMAN et al. 1999). Sie schlossen das aufgrund von zwei Beobachtungen: Sechs Gene, deren Sequenzen aus über 30 aus der ganzen Welt isolierten *Y. pestis*-Stämmen teilsequenziert wurden, wiesen keinerlei Unterschiede auf (extrem klonale Populationsstruktur) und diese Gene waren nahezu identisch mit den entsprechenden Genen aus *Y. pseudotuberculosis*.

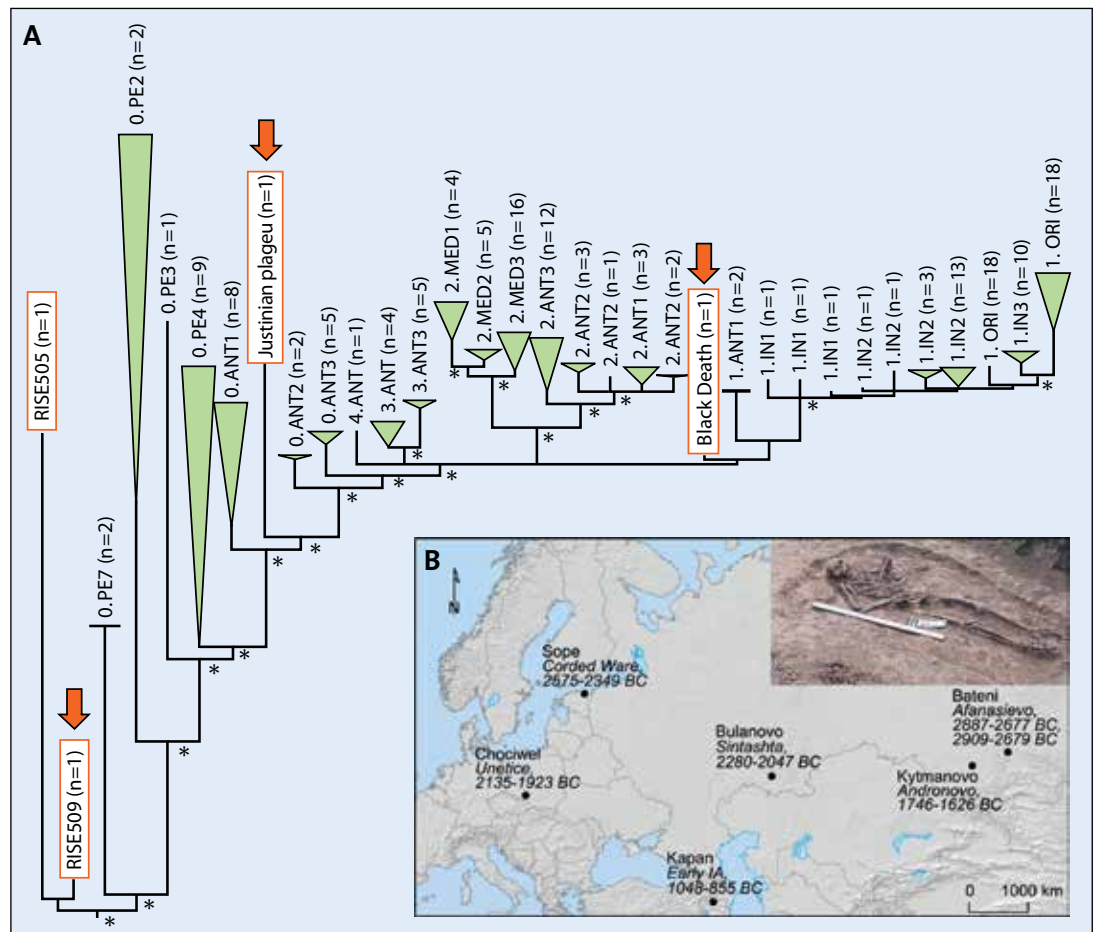
Neun Jahre später revidierte ACHTMAN seine Einschätzung (ACHTMAN 2008). Er nannte eine ganze Reihe von Gründen, warum die molekularen Uhren von Bakterien keine verlässlichen Altersangaben liefern; eines der Hauptprobleme ist die problematische Eichung der Uhren, die aufgrund hochspekulativer Annahmen erfolgt.

Tab. 1 Zusammenstellung der bekannten fossilen *Y. pestis*-Genomsequenzen. Die Sequenzierabdeckung gibt an, wie viele Sequenzen aus fossilem Material pro Zielsequenz erreicht wurden. Je höher die Sequenzierabdeckung, desto zuverlässiger kann die Sequenz des fossilen Genoms ermittelt werden. * Die aus einem auf ca. 950 Jahre vor Christus datierten Skelett stammende *Y. pestis*-Sequenz enthielt zum ersten Mal das *ymt*-Gen, welches für die Besiedlung von Flöhen durch *Y. pestis* erforderlich ist. Erst die Übertragung des Erregers durch den Biss eines infizierten Flohs führt zur epidemischen Beulenpest.

Zeitliche Einordnung	Zahl der Skelette	Sequenzierabdeckung	Erkrankungstyp	Referenz
„Schwarzer Tod“ 1346 – 1352 AC	1	22x	Beulenpest	Bos et al. 2011
Justinianische Pest 541 – 543 AC	2	5x	Beulenpest	Wagner et al. 2014
Pestinfektionen der Bronzezeit ca. 950 v. Chr.	1	0,25x	Beulenpest*	Rasmussen et al. 2015
ca. 1700 v. Chr.	1	8x	Lungenpest	
ca. 2000 – 2400 v. Chr.	3	0,14 – 0,82x	Lungenpest	
ca. 2700 – 2800 v. Chr.	2	0,2 – 29x	Lungenpest	

Abb. 1 A Stammbaum heutiger und fossiler (rote Pfeile) *Y. pestis*-Genome. „RISE505“ (ca. 1700 Jahre v. Chr.) und „RISE509“ (ca. 2850 Jahre v. Chr.) sind zwei bronzezeitliche Genome. Das Genom „Justinian plague“ wurde auf etwa 540 Jahre datiert und „Black Death“ bezeichnet ein Genom aus der Pestepidemie um 1350 n. Chr. Die unterschiedlichen Astlängen einzelner Abstammungslinien weisen auf unterschiedliche Evolutionsgeschwindigkeiten, d. h. verschiedene Ganggeschwindigkeiten der molekularen Uhr, hin.

B Karte der archäologischen Fundstellen bronzezeitlicher Skelette mit Datierungen, in deren Zähnen *Y. pestis*-DNA gefunden wurde. (Aus RASMUSSEN et al. 2015, Abb. 1 und Abb. 4B, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.009>; CC BY 4.0)



Als einzigen Ausweg aus dem Eichungsdilemma nannte ACHTMAN verlässlich datierte fossile DNA-Sequenzen, die aber 2008 nicht vorhanden waren.

Nahezu komplette Genome von fossilen Pesterregern

Nur drei Jahre später publizierten Bos et al. (2011) die DNA-Sequenz eines nahezu kompletten *Yersinia pestis*-Genoms, welches aus den Zähnen von Pesttoten eines Londoner Friedhofs aus der Pandemie von 1346–1352 gewonnen wurde (Tab. 1, Abb. 1). Dieses Genom unterschied sich von einem heutigen *Y. pestis*-Genom überraschenderweise nur durch 97 Punktmutationen an insgesamt rund 4 Millionen chromosomalen Basenpaaren. Dieser Stamm gehörte zu den Vorfahren aller späteren in Europa auftretenden Pestepidemien. Erstmals konnte die molekulare Uhr an einem fossilen, exakt datierten Genom geeicht werden. Allerdings fanden CUI et al. (2013) nur zwei Jahre später durch Vergleich von 133 kompletten heutigen *Y. pestis*-Genomen mit diesem fossilen Genom, dass die Raten der molekularen *Y. pestis*-Uhr stark variieren (CUI et al. 2013). Sie liegen zwischen 3×10^{-9} – 130×10^{-9} Nukleotidaustauschen pro DNA-Position und pro Jahr – das ist eine Schwankung um einen Faktor größer 40.

Im Jahr 2014 legten WAGNER et al. die nahezu kompletten Genomsequenzen von zwei weiteren *Y. pestis*-Stämmen aus dem Bajuwarenring-Friedhof von Aschheim in Bayern vor, der aus der Zeit der Justinianischen Pestepidemie (ca. 540–543 n. Chr.) stammt (WAGNER et al. 2014). Nur ein Jahr später erfolgte die Sequenzierung von sieben *Y. pestis*-Genomen aus bronzezeitlichen Skeletten (Abb. 1B), die ein durch Dendrochronologie geeichtes Radiokarbonalter von ca. 950–3000 Jahren v. Chr. aufwiesen (RASMUSSEN et al. 2015, Tab. 1). Damit ist insgesamt eine fossile, relativ breite und sehr genau datierte Datenbasis gegeben, um durch statistische Methoden den Zeitpunkt der Entstehung des Pesterregers durch eine fossil geeichte molekulare Uhr einzugrenzen. Die derzeitigen Befunde lassen eine Reihe von nachfolgend genannten Schlussfolgerungen zu (vgl. Abb. 2). Diese Schlussfolgerungen stehen allerdings unter dem Vorbehalt einer zwar substantiellen, aber immer noch zu schmalen fossilen Datenbasis. Sowohl neue fossile Sequenzen als auch neue Genome heutiger *Y. pestis*-Stämme könnten das Bild deutlich ändern.

- Der aus einem bronzezeitlichen Skelett isolierte *Y. pestis*-Stamm RISE509 steht an der Basis aller fossilen und heutigen *Y. pestis*-Stämme, deren Ursprung vor etwa 5000–7000 Jahren anzusetzen ist (Abb. 2).

- Die frühen bronzezeitlichen Erreger konnten nur die Lungenpest auslösen, weil ihnen das

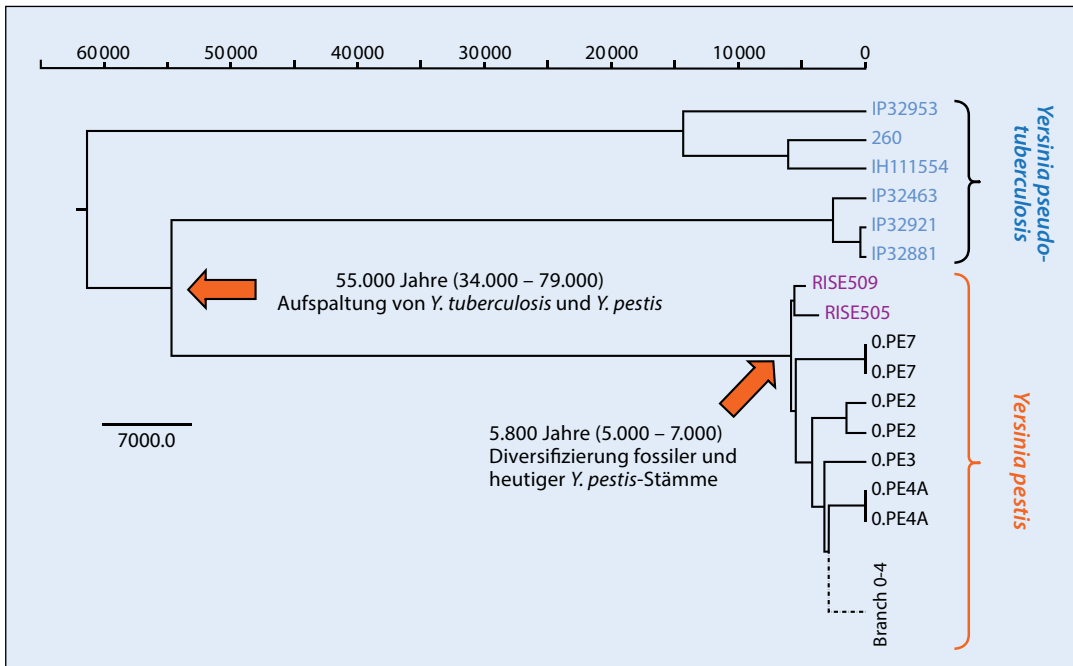


Abb. 2 Durch ein komplexes statistisches Verfahren wurde aus den fossilen und heutigen *Y. pestis*-Genomsequenzen sowie aus den direkten Datierungen der fossilen Proben eine molekulare Uhr berechnet. Je weiter die Aufspaltungsereignisse zurück liegen, desto größer wird der potentielle Fehler der molekularen Uhr. (Nach RASMUSSEN et al. 2015, Abb. 4C, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.009>; CC BY 4.0)

Gen *ymt* fehlte, welches für die stabile Besiedlung von Flöhen durch *Y. pestis* nötig ist. Der Erreger der Beulenpest entstand daher wohl erst vor etwa 3000 Jahren, denn im spätbronzezeitlichen Isolat von 950 v. Chr. wurde dieses Gen erstmalig gefunden (vgl. Tab. 1).

- Der Erreger der Justinianischen Pestpandemie könnte unabhängig vom Erreger der Schwarzen Pestpandemie aus einer Nagetierpopulation auf den Menschen übertragen worden sein.

- *Yersinia pestis* ist tatsächlich eine extrem klonale Art (s. o.), die taxonomisch zu *Y. pseudotuberculosis* gehört, von der sie sich vor rund 55.000 Jahren getrennt hat (Abb. 2).

Wenn man die an den fossilen, datierten *Y. pestis*-Genomen geeichte molekulare Uhr spekulativ auf die Gattung *Yersinia* überträgt, könnte diese möglicherweise nur eine Million Jahre alt sein, was im Gegensatz zu früheren Schätzungen von 41–186 Millionen Jahren steht (ACHTMAN et al. 1999). Falls die für *Y. pestis* abgeschätzte Ganggeschwindigkeit der molekularen Uhr auch für andere Enterobakterien gelten sollte (was man allerdings noch nicht gemessen hat), dann könnte auch die oft zitierte, auf ca. 140 Millionen Jahre geschätzte Aufspaltung von *Escherichia* und *Salmonella* (OCHMAN & WILSON 1987) um zwei Größenordnungen zu hoch gegriffen sein.

Literatur

ACHTMAN M (2008) Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 53–70.
 ACHTMAN M, ZURTH K, MORELLI G, TORREA G, GUIYOULE A & CARNIEL E (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14043–14048.

BOHM ME, HUPTAS C, KREY VM & SCHERER S (2015) Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons hbl, cytK and nhe. *BMC Evol. Biol.* 15, 246.
 BOIRE NA, RIEDEL VAA, PARRISH NM & RIEDEL S (2013) Lessons learned from historic plague epidemics: The relevance of an ancient disease in modern times. *J. Anc. Dis. Prev. Rem.* 2, 1–17.
 BOS KI, SCHUENEMANN VJ, GOLDING GB, BURBANO HA, WAGLECHNER N, COOMBS BK, MCPHEE JB, DEWITTE SN, MEYER M, SCHMEDES S et al. (2011) A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature* 478, 506–510.
 CUI Y, YU C, YAN Y, LI D, LI Y, JOMBART T, WEINERT LA, WANG Z, GUO Z, XU L et al. (2013) Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 577–582.
 FUCHS TM, BRESOLIN G, MARCINOWSKI L, SCHACHTNER J & SCHERER S (2008) Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiol.* 8, 214.
 NEUHAUS K, ANASTASOV N, KABERDIN V, FRANCIS KP, MILLER VL & SCHERER S (2003) The AGUAAA motif in *cspA1/A2* mRNA is important for adaptation of *Yersinia enterocolitica* to grow at low temperature. *Mol. Microbiol.* 50, 1629–1645.
 OCHMAN H & WILSON AC (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* 26, 74–86.
 RASMUSSEN S, ALLENTOF ME, NIELSEN K, ORLANDO L, SIKORA M, SJOGREN KG, PEDERSEN AG, SCHUBERT M, VAN DAM A, KAPEL CM et al. (2015) Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago. *Cell* 163, 571–582.
 REUTER S, CONNOR TR, BARQUIST L, WALKER D, FELTWELL T, HARRIS SR, FOOKES M, HALL ME, PETTY NK, FUCHS TM et al. (2014) Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6768–6773.
 SCHERER S (2013) Molekulare Evolutionsmechanismen. In: JUNKER R & SCHERER S (Hrsg) *Evolution, ein kritisches Lehrbuch*. Gießen, S. 138f. und S. 170f.
 WAGNER DM, KLUNK J, HARBECK M, DEVAULT A, WAGLECHNER N, SAHL JW, ENK J, BIRDSSELL DN, KUCH M, LUMIBAO C et al. (2014) *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect Dis.* 14, 319–326.
 WHEELIS M (2002) Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerg Infect Dis.* 8, 971–975.