

- KLAK C, KHUNOU A, REEVES G & HEDDERSON T (2003) A phylogenetic hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) based on four plastid DNA regions. *Amer. J. Bot.* 90, 1433-1445.
- KLAK C, REEVES G & HEDDERSON T (2004) Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature* 427, 63-65.
- LANDRUM JV (2001) Wide-band tracheids in leaves of genera in Aizoaceae: the systematic occurrence of a novel cell type and its implications for the monophyly of the subfamily Ruschioideae. *Plant Syst. Evol.* 227, 49-61.
- SCHWANTES G (1971) The classification of the Mesembryanthemaceae. In HERRE H (ed) *The genera of the Mesembryanthemaceae*. Cape Town, South Africa: Tafelberg.
- THIEDE J, SCHMIDT SA & RUDOLPH B (2007) Phylogenetic implication of the chloroplast *rpoC1* intron loss in the Aizoaceae (Caryophyllales). *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 372-380.

Neue Befunde zu alten Proteinen aus Dinosaurierfossilien

Zusammenfassung: Erste Veröffentlichungen über die Erhaltung von Weichteilen und Proteinfragmenten in Dinosaurierfossilien haben anhaltende und kontroverse Diskussionen ausgelöst. Eine zweite Untersuchung an anderen, noch älteren fossilen Saurierknochen bestätigt die ursprünglichen Befunde. In dieser neuen Studie wurden die wesentlichen Kritikpunkte an der ersten Arbeit berücksichtigt. Dies bedeutet, dass derzeit starke Hinweise dafür vorliegen, dass organisches Gewebe in Fossilien über sehr lange Zeit flexibel erhalten bleiben kann und dass auch Proteinfragmente nach langen Zeiträumen noch analytisch nachgewiesen werden können. Nach wie vor stehen diese Befunde allerdings im Widerspruch zu bisherigen Erkenntnissen und Erfahrungen, wonach Weichteile nicht über lange Zeit als flexibles Gewebe erhalten bleiben und auch Proteine chemisch nicht stabil sind. Mechanismen, die zu dieser außergewöhnlichen Erhaltung führen, sind bisher unbekannt. Diese Bestätigung von aufsehenerregender fossiler Erhaltung provoziert auch Fragen nach dem Alter der Fossilien.

Einleitung. Hinweise auf flexible Gewebereste aus Dinosaurierfossilien (SCHWEITZER et al. 2005, 2007a; s. auch BINDER 2005) lösten Erstaunen, große Erwartungen aber auch kontroverse Diskussionen aus. Von dem fossilen Oberschenkelknochen eines *Tyrannosaurus rex* aus der Unteren Kreide von Montana (radiometrisches Alter: ca. 68 Millionen Jahre) waren nach Auflösung der mineralischen Bestandteile flexible Strukturen isoliert und charakterisiert worden. Anstelle der Interpretation als Überreste ursprünglichen Gewebes von Dinosauriern wurden alternativ z.B. bakterielle Biofilme¹ angeführt (HECHT 2008, KAYE et al. 2008, STOKSTAD 2006, ZIMMER 2008, vgl. BINDER 2008). Als SCHWEITZER et al. (2007b) immunologische und massenspektrometrische Daten veröffentlichten (ASARA et al. 2007a), anhand derer sie behaupteten, Proteinfragmente aus den Fossilien nachgewiesen zu haben, gab dies erneut Anlass zu widersprüchli-

chen Reaktionen. Diese reichten von Begeisterung über molekularbiologische Zugänge in der Paläontologie bis zu massiver Kritik und zu Hinweisen auf methodische Mängel in der Untersuchung. Auch diese Diskussion wurde intensiv geführt, jedoch ohne dass zunächst eine entscheidende Klärung erreicht werden konnte (ASARA et al. 2007b, PEVZNER et al. 2008, ORGAN et al. 2008, BUCKLEY et al. 2008, ASARA & SCHWEITZER 2008, ASARA et al. 2008).

Ein neues Fossil. Ein Team unter der Leitung von Mary H. SCHWEITZER (2009) hat nun neue Befunde über Proteinfragmente aus Dinosaurierfossilien veröffentlicht. Ein fossiler Oberschenkelknochen (Femur) des Hadrosauriers (Entenschnabelsaurier) *Brachyophosaurus canadensis* wurde unter umfangreichen Sicherheitsmaßnahmen im Jahr 2007 unter einer 7 m mächtigen Sandsteinschicht der Judith River Formation geborgen. Diese Formation wird ins Campan – einer Stufe der Oberkreide – gestellt, das radiometrische Alter der Fundstelle wird mit ca. 80 Millionen Jahren angegeben. Der fossile *B. canadensis*-Femur wurde in seiner Sandsteinmatrix geborgen, d.h. er war von einer 10 bis 12 cm dicken Sandsteinschicht umgeben. Unmittelbar nachdem das Fossil frei präpariert worden war, wurden unter sterilen Bedingungen Proben sowohl aus dem Sediment als auch aus dem Fossil entnommen, mit Folie umwickelt und trocken gelagert. Diese Proben wurden nun umfangreichen Untersuchungen unterzogen, wobei vor allem Kritikpunkte an früheren Studien berücksichtigt wurden, insbesondere die Frage, ob die flexiblen Gewebestrukturen und die Proteinfragmente wirklich authentisch sind (vom Dinosaurier) oder ob sie von auf oder im Fossil siedelnden Mikroorganismen stammen.

Mikroskopische Untersuchungen. Nach Auflösung der mineralischen Bestandteile von Fossilproben zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen eine faserige Struktur, wobei die Fasern in einzelnen Schichten wie in Sperrholz angeordnet

waren, was der Orientierung der Kollagenfasern in Knochen entspricht. Außerdem sind zellartige Gebilde erkennbar, die hinsichtlich Größe und Struktur Knochenzellen (Osteocyten) entsprechen. Die demineralisierten fossilen Proben waren von entsprechend behandelten modernen Knochen eines Vogel Strauß mikroskopisch nicht zu unterscheiden. SCHWEITZER et al. fanden auch in diesen Proben flexible Gefäße, diese waren hohl und die Wände von einheitlicher Stärke. Die Oberflächenbeschaffenheit (Textur) dieser Gefäßwände entsprach nicht derjenigen von Biofilmen, sehr wohl aber denjenigen aus Knochen eines Vogel Strauß, nachdem dieser demineralisiert und mit Kollagenase (eine Protease, also ein Enzym zum Abbau von Kollagen) behandelt worden war. SCHWEITZER et al. weisen auf eine Vielzahl mikroskopischer Besonderheiten hin, die sie auch in modernen Knochen – nach entsprechender Behandlung – finden und die nur schwer durch Einwandern von Mikroben zu erklären sind.

Immunologische Untersuchungen. Sowohl Extrakte aus dem fossilen Oberschenkelknochen von *B. canadensis* als auch demineralisierte Proben zeigten positive Reaktionen mit Antikörpern gegen Proteine, die am Knochenaufbau beteiligt sind bzw. dort vorkommen. Diese immunologischen Untersuchungen wurden in mehreren Labors unabhängig voneinander durchgeführt. Positive Reaktionen wurden mit polyklonalen Antikörpern erzielt, die gegen Kollagen I von Vögeln, Osteocalcin und gegen Gesamtextrakt aus Knochen eines Vogel Strauß gerichtet sind. Monoklonale Antikörper gegen einen spezifischen Bereich (Epitop) von Osteocalcin zeigt dagegen keine Bindung. Dies erklären die Autoren damit, dass dieser Bereich in *B. canadensis*-Osteocalcin nicht vorhanden war bzw. nicht im Fossil erhalten geblieben ist. Die immunologischen Resultate wurden durch umfangreiche Kontrollexperimente abgesichert.

In einer Reihe weiterer immunologischer Untersuchungen wurden Antikörper eingesetzt, die gegen Proteine gerichtet sind, die in Verbindung mit Blutgefäßen bekannt sind (Elastin, Laminin und Hämoglobin).

Elastin ist ein für Wirbeltiere spezifisches, hochkonserviertes Protein, d.h. bei verschiedenen Organismen unterscheidet sich die Aminosäuresequenz nur wenig. Elastin ist vergleichsweise stabil gegen Abbaureaktionen. Elastin-Antikörper zeigten deutliche positive Reaktionen in den immunologischen Tests, ebenso auch Antikörper gegen Laminin. Extrakte aus den fossilen Gefäßen zeigten keine Bindung an Hämoglobin-Antikörper, aber die Antikörper markierten spezifisch entsprechende fossile Gewebeproben. Auch diese Experimente wurden durch Kontrollexperimente abgesichert und unabhängig in einem zweiten Labor bestätigt.



Massenspektrometrische Proteinanalysen. In Kollagen findet man als eine Besonderheit, dass die Aminosäure Prolin teilweise hydroxyliert (mit einer –OH-Gruppe versehen) ist. Diese Modifikation erfolgt nach der Biosynthese des Proteins und diese chemische Veränderung an Prolin ist von Mikroorganismen nicht bekannt.

Isolierte Gefäße sowie demineralisierte Proben aus dem fossilen Oberschenkelknochen von *B. canadensis* wurden massenspektrometrisch analysiert. Es wurden sowohl verschiedene organische Fragmente nachgewiesen als auch Verbindungen, die Kohlenstoff (C), Stickstoff (N) und Eisen (Fe) enthalten. In den letztgenannten Verbindungen sehen die Autoren ursprüngliches organisches Material, das im Verlauf der Fossilisation modifiziert worden ist, und keine Hinweise auf Kontamination.

Abb. 1: Tyrannosaurus rex, Palais de la Découverte, Paris.
© David MONNIAUX;
GNU-Lizenz für freie Dokumentation

Die erste Beschreibung von Kollagenfragmenten aus fossilen Dinosauriern wurde nun durch eine zweite Untersuchung bestätigt.

Extrakte aus dem fossilen Saurierknochen wurden nach entsprechender Vorbereitung (Verdauung mit Trypsin, einem proteinspaltenden Enzym, Reinigungs- und Konzentrierungsschritte) massenspektroskopisch untersucht. Dabei fanden SCHWEITZER et al. acht Peptide, die sie anhand von synthetischen und natürlichen Vergleichsproben sowie durch verschiedene Suchstrategien in Proteindatenbanken als Kollagenfragmente identifizieren konnten. Insgesamt bestehen die acht Fragmente aus 149 Aminosäuren und jedes Peptid enthält mindestens ein hydroxyliertes Prolin. Von den acht Peptiden konnten die Autoren sechs dem Kollagen a1 Typ I und zwei dem Kollagen a2 Typ I zuordnen. Dabei umfassen die nachgewiesenen Proteinfragmente 7,8% vom Kollagen a1 Typ I und 2,5%

vom Kollagen $\alpha 2$ Typ I von bekannten Kollagensequenzen ähnlicher Lebewesen. Drei der Peptidsequenzen konnten unabhängig in einem zweiten Labor bestätigt werden. Alle Kontrollexperimente mit Extrakten des Sandsteins, der das Fossil umgeben hatte, waren negativ, d.h. es fand sich kein Hinweis auf vergleichbare Peptide.

In einem unabhängigen Labor waren Extrakte des fossilen Knochens mit einem Gemisch von polyklonalen Antikörpern gegen Kollagen Typ I getestet worden (Immunoblot). Dabei waren positive Reaktionen in einem Bereich für Molekularmassen von 250 bis 300 kD (kilo Dalton). Kontrollen an Proben des umgebenden Gesteins waren negativ. Dies bestätigt zunächst den Nachweis von Kollagenfragmenten in den fossilen Knochen von *B. canadensis*. Weil die immunologisch nachgewiesenen Molekulargewichte sehr viel größer sind als die der massenspektrometrisch sequenzierten Peptide schließen SCHWEITZER et al., dass die Kollagenfragmente in den Fossilien teilweise modifiziert sind, z.B. Quervernetzungen aufweisen, wodurch diese mit den derzeit verfügbaren Analysemethoden nicht sequenzierbar² sind. Die Autoren vermuten, dass Prozesse, die zur Erhaltung von chemisch nicht sehr beständigen Proteinen beitragen und diese überhaupt erst einem Nachweis zugänglich machen, andererseits die Analyse erschweren und die Menge des verwertbaren Materials verringern. An Proteinen aus frischen Proben beobachtet man solche Prozesse nicht.

Derzeit ist nicht verstanden, wie Peptide über einen Zeitraum von ca. 80 Millionen Jahren erhalten werden können.

Phylogenetische Untersuchungen. Schließlich haben SCHWEITZER et al (2009) noch die erhaltenen Kollagensequenzen aus dem fossilen *B. canadensis* mit denjenigen von 21 heutigen Lebewesen und zwei aus Fossilien von *Mammuth americanum* und *T. rex* (ASARA et al. 2007) mit Hilfe von verschiedenen Algorithmen (BayesPhylogenies) miteinander verglichen. Aufgrund der fragmentarischen Daten der beiden fossilen Dinosaurier werden diese in der phylogenetischen Analyse nicht gut aufgelöst, aber innerhalb der Archosauria nahe bei Vögeln (Huhn und Vogel Strauß) und Alligator platziert. Auch diese Resultate stützen die Annahme, dass es sich bei den nachgewiesenen Kollagenfragmenten um organische Überreste der Dinosaurier handelt.

Schlussfolgerungen und offene Fragen. Nach der ersten Publikation von Hinweisen auf Proteinfragmente aus Fossilien eines *T. rex* aus der Kreide (ASARA 2007) legt ein erweitertes Autorenteam ebenfalls unter Leitung von Mary H. SCHWEITZER eine zweite Arbeit vor, in der sie Untersuchungen

eines weiteren Dinosauriers *B. canadensis* vorstellen. Die angeführten Daten widersprechen einer Interpretation der Peptide als Produkte moderner Mikroorganismen (mikroskopische Befunde, Hydroxylierung von Prolin und phylogenetische Analyse). Außerdem wurden Kritikpunkte an der ersten Arbeit insofern berücksichtigt, als alle Rohdaten der massenspektrometrischen Untersuchungen in Datenbanken hinterlegt und zugänglich gemacht wurden und die Untersuchungen in verschiedenen Labors parallel durchgeführt wurden. Damit ist die erste Beschreibung von Kollagenfragmenten aus fossilen Dinosauriern durch eine zweite Untersuchung bestätigt. In ersten Reaktionen äußern sich selbst Kritiker der ersten Arbeit dahingehend, dass die nun vorliegenden Daten eine Interpretation als Überreste ursprünglichen Gewebes von Dinosauriern nahe legen (SERVICE 2009).

SCHWEITZER et al. (2009) beschließen ihre Veröffentlichung mit der Feststellung, dass die chemischen Prozesse, die zur Erhaltung von organischen Molekülen aus Dinosauriern der Kreide führen, immer noch unbekannt ist. Dies weist darauf hin, dass derzeit nicht verstanden ist, wie Peptide aus der Kreide bis heute – also über einen Zeitraum von radiometrisch ca. 80 Millionen Jahren – erhalten werden können. Man darf auf weitere Untersuchungen gespannt sein.

Harald Binder

Literatur

- ASARA JM, SCHWEITZER MH, FREIMARK LM, PHILLIPS M & CANTLEY LC (2007a) Protein Sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus Rex* revealed by Mass Spectrometry. *Science* 316, 280-285.
- ASARA JM, GARAVELLI JS, SLATTER DA, SCHWEITZER MH, FREIMARK LM, PHILLIPS M & CANTLEY LC (2007b) Interpreting sequences from Mastodon and *T. rex*. *Science* 317, 1324-1325.
- ASARA JM & SCHWEITZER MH (2008a) Response to Comment on „Protein sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry.“ *Science* 319, 33d.
- ASARA JM, SCHWEITZER MH, CANTLEY LC & COTTELL JS (2008b) Response to Comment on „Protein sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry.“ *Science* 321, 1040c.
- BINDER H (2005) Elastisches Gewebe aus fossilen Dinosaurierknochen. *Stud. Int. J.* 12, 72-73.
- BINDER H (2007) Proteine aus einem fossilen Oberschenkelknochen von *Tyrannosaurus rex*. *Stud. Int. J.* 14, 72-73.
- BUCKLEY M, WALKER A et al. (2008) Comment on „Protein sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry“. *Science* 319, 33c.
- HECHT J (2008) *T. rex* 'tissue' may be bacterial scum. New Scientist.com news service. http://www.newscientist.com/article/dn14427-t-rex-tissue-may-just-be-bacterial-scum.html?DCMP=ILC-hmts&nsref=news4_head_dn14427
- KAYE TG, GAUGLER G & SAWLOWICZ Z (2008) Dinosaurian Soft Tissues Interpreted as Bacterial Biofilms. *PLoS ONE* 3(7): e2808. doi:10.1371/journal.pone.0002808
- ORGAN CL, SCHWEITZER MH, ZHENG W, FREIMARK LM, CANTLEY LC & ASARA JM (2008) Molecular Phylogenetics of Mastodon and *Tyrannosaurus rex*. *Science* 320, 499.
- PEVZNER PA, KIM S & NG J (2008) Comment on „Protein

- sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry". Science 321, 1040b.
- SCHWEITZER MH, WITTMAYER JL, HORNER JR & TOPORSKI JK (2005) Soft-tissue vessels and cellular preservation in *Tyrannosaurus rex*. Science 307, 1952-1955.
- SCHWEITZER MH, WITTMAYER JL & HORNER JR (2007a) Soft tissue and cellular preservation in vertebrate skeletal elements from the Cretaceous to the present. Proc. R. Soc. London 274B, 183-197.
- SCHWEITZER MH, SUO Z, AVCI R, ASARA JM, ALLEN MA, ARCE FT & HORNER JR (2007b) Analyses of Soft Tissue from *Tyrannosaurus rex* Suggest the Presence of Protein: Science 316, 277-280.
- SCHWEITZER MH, ZHENG W et al. (2009) Biomolecular characterization and protein sequence of the Campanian Hadrosaur *B. canadensis*. Science 324, 626-630.
- SERVICE RF (2009) 'Protein' in 80-Million-Year-Old fossil bolter controversial *T. rex* claim. Science 324, 578.

- STOKSTAD E (2006) Soft Tissue in dinosaur fossils? The evidence hardens. Science 314, 920.
- ZIMMER C (2008) Is dinosaur 'soft tissue' really slime? Science 321, 623.

Anmerkungen

- ¹ Biofilm: eine dünne Schleimschicht, die sich an Grenzflächen in wässrigen Systemen bildet. Sie besteht neben verschiedenen Mikroorganismen (Bakterien, Algen, Pilze) aus von diesen ausgeschiedenen Polymeren (Polysaccharide, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren), die eine kompakte Matrix bilden, in der die Mikroben auch widrige Umweltbedingungen überleben können.
- ² Durch die oben erwähnte Verdauung der Proben mit Trypsin werden lineare Peptidbereiche für die massenspektrometrische Sequenzierung zugänglich.

Evolution und Geist

Benötigt man das Evolutionsparadigma, um naturwissenschaftliche Forschung betreiben zu können? Im Kommentar „Nur Sinn im Lichte der Evolution“ in der letzten Ausgabe von *Studium Integrale Journal* wurde dies mit wissenschaftstheoretischen Gründen verneint (JUNKER 2009). Dass diese Einschätzung zutrifft, macht ein *Nature*-Artikel deutlich, der sich der Frage widmet „Can evolution explain how mind works?“ (Kann Evolution erklären, wie Geist /Verstand funktioniert?) (BOLHUIS & WYNNE 2009). Die Autoren beginnen mit der Feststellung, dass gar nicht klar sei, welche Zusammenhänge zwischen der Theorie DARWINS und der Erforschung des Erkenntnisvermögens bestünden. Arten gleicher Abstammung sollten ähnliche Fähigkeiten ihres Erkenntnisapparats besitzen; auch Charles DARWIN habe sich dieses Arguments bedient.¹ Doch die Realität sehe nicht so einfach aus.

Vielmehr zeige sich, dass viele kognitive Fähigkeiten konvergent entstanden sein müssen, wenn man Evolution voraussetzt. Das heißt: Es zeigen sich Ähnlichkeiten im Verhalten nicht näher verwandter Arten, so dass eine mehrfach unabhängige Entstehung angenommen werden muss.²

So berichten BOLHUIS und WYNNE, dass Vögel zu Leistungen fähig sind, die die Fähigkeiten von Affen übertreffen. Beispielsweise reiben Krähen ihre Schnäbel aneinander, wenn eine von ihnen in einer Auseinandersetzung mit einem anderen Vogel war. Ein vergleichbares Verhalten bei Schimpansen würde man als Tröstung bezeichnen. Außerdem gebe es Hinweise auf Ichbewusstsein bei Vögeln. Kaledonische Krähen übertreffen Affen in ihrer Fähigkeit, schwer zugängliche Nahrung aus einer Röhre zu ergattern.³

Seit Jahrzehnten wird versucht, Affen eine einfache Form der Sprache beizubringen, aber Linguisten seien sich darin einig, dass die Fähigkeiten

von Schimpansen und Bonobos nicht als Sprache gelten können (BOLHUIS & WYNNE 2009). Eine Voraussetzung für Sprache ist die Fähigkeit zur Nachahmung. Während viele Papageien und Singvögel darin Meister sind, zeigen unsere Primaten-Vettern dazu keine Neigung. Darüber hinaus erfolgt das Erlernen des Singens bei Vögeln auf eine ähnliche Weise wie das Erlernen des Sprechens bei Kindern.

Die Autoren ziehen die Schlussfolgerung, dass das unabhängige Auftreten ähnlicher Fähigkeiten in entfernt verwandten Arten zeige, dass kognitive Fähigkeiten nicht in einer Skala evolutionärer Verwandtschaft angeordnet werden können. Evolution ist nicht der Schlüssel zum Verständnis.

Es gibt Ähnlichkeiten im Verhalten nicht näher verwandter Arten, so dass eine mehrfach unabhängige Entstehung angenommen werden muss.

Geschichte der kognitiven Fähigkeiten ist nicht erforschbar. Die Autoren stellen auch fest, dass es extrem schwierig wenn nicht unmöglich sei, die Faktoren herauszufinden, die zur Herausbildung der heutigen Fähigkeiten geführt haben. Mehr als Vermutungen anzustellen sei hier nicht möglich.⁴ Evolutionäre Analysen seien durchgeführt worden, um Fragen in Angriff zu nehmen, für die sie schlecht geeignet seien. „Evolutionäre Untersuchungen können jedoch nicht klären, wie Tiere eine bestimmte Fähigkeit erlangten, weil es sich um Erforschungen der Geschichte handelt.“ Als Beispiel nennen die Autoren das Verhalten mancher Vögel, Nahrung zu bevorraten. Manchmal zeigen nah verwandte Arten hier ein sehr unterschiedliches Ver-