

Doch nicht nur „indels“ vergrößern den Unterschied zwischen den beiden Genomen. Auch ganze Gene werden dupliziert oder eliminiert. Diese Vorgänge verursachen nach Berechnungen von HAHN und Mitarbeitern (2006) einen Unterschied von 6,4%. Nach Ansicht der Autoren spielten Genduplikationen (Verdoppelungen) und Genverluste bei der Entwicklung von spezifisch menschlichen Phänotypen (äußere Gestalt) eine größere Rolle als der Austausch von Basen und ganz sicher eine größere Rolle, als man bisher geschätzt hat.

GESCHWIND hat gemeinsam mit Mitarbeitern untersucht, welche von 4000 Genen in bestimmten Arealen des Gehirns gleichzeitig angeschaltet (exprimiert) werden und aus den gewonnenen Daten ein Gen-Netzwerk für verschiedene Organismen konstruiert. Die Autoren berichten, dass im Cortex beim Menschen 17,4% der Vernetzungen spezifisch sind und beim Schimpansen nicht auftreten (GESCHWIND et al. 2006).

Abschließend zitiert COHEN Svante PÄÄBO vom Max Planck-Institut für Evolutionäre Anthropologie in Leipzig; dieser antwortete auf die Frage, ob man unter Berücksichtigung aller bekannten Daten den Unterscheid zwischen Mensch und Schimpanse genau beziffern könne: Er glaube nicht, dass es eine Möglichkeit gebe, eine Zahl zu berechnen. Weiter wird PÄÄBO mit der Aussage zitiert: „In the

end, it's a political and social and cultural thing about how we see our differences.“ Dem ist eigentlich nichts hinzuzufügen außer vielleicht der Wunsch, dass sich diese Einsicht ähnlich rasch und nachhaltig in das Allgemeinwissen eingräbt wie die noch viel zu häufig und unreflektiert erwähnten 1%-Unterschied zwischen Mensch und Schimpanse. Wir wissen inzwischen mehr!

Harald Binder

Literatur

- COHEN J (2007) Relative differences: the myth of 1%. *Science* 316, 1836.
- DEMUTH JP, BIE TD, STAJICH JE, CHRISTIANINI N & HAHN MW (2006) Evolution of mammalian gene families. *PLoS ONE* 1(1): e85, doi:10.1371.
- KING MC & WILSON AC (1975) Evolution at two levels in human and chimpanzees. *Science* 188, 107-116.
- OLDHAM MC, HORWATH S & GESCHWIND DH (2006) Conservation and evolution of gene coexpression networks in human and chimpanzee brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17973-17978.
- The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium (2005) Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437, 69-87.
- The ENCODE Project Consortium (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799-816.

Proteine aus einem fossilen Oberschenkelknochen von *Tyrannosaurus rex*

Zusammenfassung: In Fossilien, denen ein hohes Alter (ca. 70 Millionen Jahre) zugeordnet wird, haben Wissenschaftler wiederholt flexibles Gewebe isoliert und auch zellähnliche Strukturen nachgewiesen. Jetzt wurden mit leistungsfähigen Analysemethoden Fragmente von Proteinen festgestellt. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den etablierten Erfahrungen über die chemische Stabilität von Proteinen. Danach sollten diese biologisch bedeutsamen Makromoleküle nach einer Zeitspanne, die deutlich unter einer Million Jahre liegt, nicht mehr analytisch nachweisbar sein. Zur Lösung dieser Diskrepanz könnten bisher unbekannte Mechanismen zur Langzeitstabilisierung von Polypeptiden beitragen. Solange solche nicht aufgezeigt werden können, stehen die hier vorgestellten Befunde im Widerspruch zu den konventionellen Altersangaben der Fossilien.

Einleitung. Nachdem SCHWEITZER et al. (2005) aus fossilen Dinosaurierknochen flexible Gewebefragmente isolieren konnten (s. auch BINDER 2005), leg-

ten sie jetzt Untersuchungen zum Nachweis von Proteinfragmenten aus demselben Material vor (SCHWEITZER et al. 2007a, ASARA et al. 2007). Wenn sich die Befunde und deren Interpretation bestätigen, bedeutet das, dass Proteine – zumindest Teile davon – innerhalb von fossilen Knochen unter besonderen Bedingungen aus der unteren Kreide (hier konkret von der Basis der Hell Creek Formation in Ost Montana/USA) bis heute erhalten geblieben und nachweisbar sind. Angesichts des Alters der Probe ist dieser Befund für die Wissenschaftler überraschend.

Die fossilen Überreste stammen von *Tyrannosaurus rex* (Museum of Rockies specimen, MOR 1125) und umfassen u.a. Schädel, Wirbel, beide Oberschenkel- (Femur) und Schienbeinknochen (Tibia) in außergewöhnlich guter Erhaltung. Die Fossilien waren in mittelförnigem Sandstein eingesedimentiert, der mit feinkörnigem Schlamm (muds) verzahnt ist. Aufgrund dieser Befunde wird als Ablagerungssystem ein Strömungskanal (stream channel) angenommen.

Die Proben. Für die Untersuchungen wurden Proben aus beiden Oberschenkelknochen teilweise demineralisiert, d.h. die Mineralbestandteile wurden durch Zugabe eines Komplexbildners (EDTA) in Lösung gebracht. Die dadurch freigelegten Gewebe würden bei frischen Knochen der extrazellulären Matrix (Osteoid) entsprechen, deren Hauptbestandteil Kollagen I ist.

Als Strukturprotein des Bindegewebes hat Kollagen einen hohen Anteil am Proteingehalt des Körpers; beim Menschen sind ca. 30% der Eiweißmasse Kollagen. Kollagen besteht typischerweise aus drei Polypeptidketten, die je aus einigen hundert bis mehreren tausend Aminosäuren aufgebaut sind. Typisch für Kollagen ist der hohe Anteil an Glycin – jede dritte Aminosäure ist ein Glycin; auch Prolin und Lysin kommen verhältnismäßig häufig vor.

Nachweis von Kollagen aus Tyrannosaurus-Material.

Die Aminosäuresequenz von Kollagen I ist stark konserviert, d.h. die Sequenzen zeigen beim Vergleich zwischen verschiedenen Lebewesen nur geringe Abweichungen. Daher können Antikörper, welche sich in immunologischen Reaktionen spezifisch an Kollagen binden können, mit Kollagenen aus verschiedenen Organismen reagieren. Bereits 2005 hatten SCHWEITZER et al. (supporting online material) erste Hinweise auf positive Befunde von immunologischen Tests veröffentlicht. Dabei hatten sie mit Antikörpern gegen Kollagen I vom Huhn und gegen Osteocalcin vom Rind – einem weiteren Protein, das einen hohen Anteil der organischen Knochensubstanz ausmacht – schwache, aber signifikante Reaktionen mit Präparationen aus Dinosaurierknochen erhalten. Kontrollexperimente mit dem umgebenden Sediment oder mit Pflanzenresten, die mit den Fossilien zusammen eingebettet waren, ergaben dagegen keine Reaktion. Das ist ein starker Hinweis dafür, dass das Kollagen aus dem Fossil stammt.

In den jüngsten Arbeiten konzentrierten sich SCHWEITZER et al. (2007a) auf Nachweise für Kollagen, da dies in großen Mengen in Knochenmaterial lebender Organismen vorkommt, vergleichsweise stabil gegen Abbauprozesse ist und mit verschiedenen Methoden analytisch nachgewiesen werden kann. Die Extrakte aus den fossilen Knochen reagierten mit Antikörpern gegen Kollagen I vom Huhn. Die Reaktionen waren im Vergleich zu Extrakten aus frischen Knochen schwach und variierten stark in der Intensität, waren aber mindestens doppelt so stark wie negative Kontrollen. Diese Ergebnisse konnten durch weitere immunohistochemische Tests am fossilen Material bestätigt werden, die an Dünnschnitten von demineralisierten Proben aus dem äußeren Bereich des Knochen (Cortex) und dem Bereich, in dem sich bei lebenden Tieren das Knochenmark (Medulla) befindet, vorgenommen wurden. Wiederholt wur-



Abb. 1: Tyrannosaurus rex (Tyrrell-Museum, Drumheller, Alberta / Kanada. Foto: Richard Wischn)

den schwache Antikörperreaktionen nachgewiesen. Diese konnten durch Zugabe von Kollagen vom Huhn unterbunden werden. Wurden die fossilen Proben mit Kollagenase – einem Kollagen abbauenden Enzym – vorbehandelt, war die Immunreaktion deutlich abgeschwächt. Die mittels Fluoreszenzaufnahmen dokumentierten Immunreaktionen waren verglichen mit Negativkontrollen deutlich stärker und im Gewebe lokalisiert. Die Verteilungsmuster waren vergleichbar mit entsprechenden Proben aus frischen Emu-Knochen.

Wie bereits bei den ersten Untersuchungen waren die Kontrollexperimente an Sedimentproben negativ. Diese Befunde zeigen, dass die Konzentration von Erkennungsbereichen für die Antikörper (Epitope) in den Tyrannosaurus-Fossilien (MOR 1125) sehr gering ist. Der *in situ*-Nachweis an Dünnschnitten ist deutlicher im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit Extrakten erhalten werden konnten. Insgesamt stützen die Ergebnisse den Befund, dass das Kollagen aus dem Fossil stammt.

Absicherung der Befunde. Zur weiteren Absicherung der Befunde wurden massenspektrometrische Untersuchungen (time-of-flight secondary ion mass spectrometry; TOF-SIMS) an demineralisiertem fossilem Gewebe vorgenommen. Diese Analyse, bei der sowohl Ionen von der Probenoberfläche als auch deren Fragmente mit hoher

Abb. 2: Oberschenkelknochen (Femur) von T. rex im Fundzustand (weißer Pfeil) vor der Bergung. Aus dem präparierten fossilen Knochen (MOR 1125) konnten Fragmente von Kollagen isoliert und nachgewiesen werden. (Foto: J. R. HORNER; Museum of the Rockies, Montana, USA; Abdruck mit freundlicher Genehmigung)



Auflösung analysiert werden können, ergab Signale für die Aminosäuren Glycin (mit 33% häufigste Aminosäure in Kollagen), Alanin (ca. 10% in Kollagen), Prolin, Lysin und Leucin bzw. Isoleucin. Mit anderen MS-Techniken konnten auch hydroxylierte Aminosäuren nachgewiesen werden, welche mit TOF-SIMS nicht nachweisbar waren (ASARA et al. 2007). Das Verhältnis von Glycin : Alanin für Kollagen $\alpha 1$ Typ 1 des Huhns wird in der Literatur mit 2,5:1 angegeben. SCHWEITZER et al. (2007a) fanden in ihrer fossilen Probe ein Verhältnis für Glycin: Alanin von 2,6:1. In Sandsteinproben aus dem Sediment, in dem das Fossil eingeschlossen war, konnten keine Aminosäuren oder nur Spuren davon nachgewiesen werden. Es gelang auch noch der Nachweis anderer Stickstoff-(N)-haltiger Molekülfragmente in Fossilproben wie z. B. $C_7H_{18}N_2$, welche in Proben aus dem umgebenden Sediment fehlten. In den Proben aus den *T. rex*-Fossilien waren außerdem Eisen-(Fe)-haltige Ionen enthalten ($FeCH$, $FeCH_2$, $FeCH_3$). Die Autoren konnten solche Ionen auch in Sedimentproben in der Matrix der Fossilien finden, nicht jedoch in *frischen* Knochenproben. Sie vermuten, dass es sich dabei um Produkte von Mikroorganismen handelt und interpretieren diese als Hinweise darauf, dass Fe-Ionen an der fossilen Erhaltung von Gewebe durch Auslösen von intra- und intermolekularen Quervernetzungen beteiligt sind.

Weitere Ergebnisse. Die Menge an Protein oder proteinähnlicher Substanz in MOR 1125 ist nach Aussagen der Autoren minimal (0,62% aus dem Cortex und 1,3% aus dem Medulla-Bereich, jeweils nach Extraktion und Gefriertrocknung). SCHWEITZER et al. berichten auch von sehr unterschiedlichen Mikrobereichen in den Fossilien, d.h. die einzelnen Proben unterscheiden sich in ihrem Gehalt an extrahierbarem organischem Material erheblich. Ein interessanter Befund ist auch, dass über den Zeitraum der Untersuchungen die jeweilige Intensität der Signale für die nachgewiesenen organischen Bestandteile immer geringer wurden, d.h. Extraktionen in jüngster Zeit lieferten geringere Mengen an organischem Material. Dies zeigt einen fortschreitenden Abbau des Knochenmaterials seit der Bergung der Fossilien an.

Aus diesem Grund haben SCHWEITZER et al. umfangreiche Vorsichtsmaßnahmen für die Untersuchungen getroffen. Ein Resultat wurde nur als positiv in die Publikation aufgenommen, wenn es mehrfach (mindestens dreimal) gemessen werden

konnte. Außerdem wurden die Untersuchungen in mindestens drei verschiedenen Labors von zahlreichen Wissenschaftlern durchgeführt.

Mögliche Ursachen der außergewöhnlichen Konservierung. SCHWEITZER et al. (2007b) stellen Befunde vor, die belegen, dass in Sandstein eingebettete Fossilien häufiger Weichteile und Zellstrukturen erhalten. Die Autoren vermuten, dass durch die Poren in der Sandsteinmatrix die flüssigen, den Abbau fördernden Komponenten abgeführt werden können und so aufgrund der Porosität des Sandsteins die Kontaktzeit des fossilisierenden Kadavers mit zerstörenden Flüssigkeiten im Vergleich zu in Ton eingebetteten Organismen reduziert wird (SCHWEITZER et al. 2007a).

Befunde und bisherige Erfahrungen. SCHWEITZER und Mitarbeiter haben in ihrer jüngsten Publikation (SCHWEITZER et al. 2007a) mit umfangreichen, sorgfältig durchgeführten und durch entsprechende Kontrollexperimente gut abgesicherten Studien deutliche Hinweise für die Erhaltung von Proteinfragmenten aus Fossilien der Kreide vorgelegt. Die Autoren weisen darauf hin, dass ihre Befunde und

Ursprüngliche Gewebebestandteile von Organismen sollten durch Prozesse während der Fossilisierung innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne zerstört oder mindestens so stark verändert sein, dass sie nicht mehr analytisch nachweisbar sind.

Interpretationen aufgrund verschiedener Untersuchungen wie z.B. LINDAHL (1993), BADA et al. (1999), STANKIEWICZ et al. (2000) unerwartet sind. Deren Veröffentlichungen (und auch andere Studien) unterstützen die Vermutung, dass ursprüngliche Gewebebestandteile von Organismen durch Prozesse während der Fossilisierung innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne (die deutlich unter 1 Million Jahren liegt) zerstört oder mindestens so stark verändert sein sollten, dass sie nicht mehr analytisch nachweisbar sind. In diesen Studien waren u. a. Untersuchungen zur Kinetik der Hydrolyse von Proteinen und Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen unter verschiedenen Bedingungen extrapoliert worden.

Bereits 1992 hatten MUYZER et al. mit verschiedenen immunologischen Reaktionen Hinweise auf Osteocalcin in Knochen von Dinosauriern und anderen fossilen Wirbeltieren aus verschiedenen geologischen Schichten vorgelegt. Der analytische Nachweis sowohl von Glutaminsäure als auch von Peptidbindungen bestätigte das Vorkommen von

Dieser Artikel wurde nach Veröffentlichung auf www.genesisnet.info von Martin NEUKAMM unter wissenschaftstheoretischen Gesichtspunkten kritisiert (www.evolutions-biologen.de/genesis220507.html). Die Kritik berührt die Darstellung der empirischen Befunde nicht. Das Thema wird weiter bearbeitet und eine umfassendere Darstellung ist geplant.

Protein (-fragmenten). Die Erhaltung des Proteins in den fossilen Knochen war nach Ansicht der Autoren stark von den Umständen der Ablagerung abhängig und nicht einfach vom Alter. Als Reaktion auf den kritischen Einwand, dass aufgrund kinetischer Untersuchungen von Abbaureaktionen ein solcher Befund nicht zu erwarten sei, legten die Autoren eine weitere experimentelle Arbeit vor (COLLINS et al. 2000). Frisches Knochenmaterial wurde pulverisiert und erhitzt (75 °C, 85 °C, 95 °C) und mittels monoklonaler Antikörper die Abbaukinetik von darin enthaltenem Osteocalcin untersucht. Die Extrapolation der erhaltenen Daten zeigt, dass bei Ablagerungstemperaturen von durchschnittlich unter 10 °C eine Erhaltung von Peptidfragmenten aus dem Mesozoikum möglich erscheint. Eine Kontrolle an fossilen Knochen aus dem Neolithikum (ca. 6000 Jahre) zeigt jedoch, dass die Erhaltung über weite Bereiche streut und stark vom Zustand des Mineralanteils abhängt. *Die Zulässigkeit der Extrapolation erscheint daher zur Zeit noch wenig belastbar und bedarf der Bestätigung durch*

Es besteht eine Diskrepanz zwischen etablierten Erfahrungen aus der Proteinchemie und der behaupteten extremen Stabilität von Proteinen.

weitere Studien. Osteocalcin ist in jüngerer Zeit wiederholt in fossilen Knochen unterschiedlichen Alters nachgewiesen worden, nicht zuletzt in fossilen Knochen von Neandertalern (NIELSEN-MARSH et al. 2005).

Schlussfolgerungen. Die widersprüchlichen Befunde, einerseits reproduzierbar nachgewiesene Proteinfragmente in Fossilien mit einem hohen Alter von ca. 70 Millionen Jahren, andererseits die Erfahrung, dass Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren unter kontrollierbaren Laborbedingungen in vergleichsweise kurzer Zeit abgebaut werden, weisen auf die dringende Notwendigkeit weiterer Untersuchungen hin. Solange die Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen und Mineralien bzw. deren Oberfläche nicht im Detail verstanden sind und deren Beitrag zur Konservierung unter extremen Bedingungen bzw. über extrem lange Zeiträume mechanistisch aufgezeigt werden können, hinterlässt die Behauptung vom Nachweis ursprünglicher Proteinfragmente in sehr alten Fossilien (einige Zehner Millionen Jahre)

viele offene Fragen. Die Vermutung von MUYZER et al. (1992), dass die fossile Erhaltung von Fragmenten organischer Makromoleküle (Osteocalcin) nicht einfach vom Alter abhängig ist, sollte ebenfalls zu weiterer Forschung motivieren. Ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkung zwischen Mineralien und Makromolekülen während der Ablagerungsgeschichte ist dringend erforderlich, um die offenen Fragen gründlicher diskutieren und vielleicht beantworten zu können.

Beim gegenwärtigen Kenntnisstand kann jedenfalls die zeitliche Zuordnung der geologischen Systeme aufgrund der Diskrepanz zwischen etablierten Erfahrungen aus der Proteinchemie und der behaupteten extremen Stabilität von Proteinen in Fossilien begründet in Frage gestellt werden.

Harald Binder

Literatur

- ASARA JM, SCHWEITZER MH, FREIMARK LM, PHILLIPS M & CANTLEY LC (2007) Protein Sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus Rex* revealed by Mass Spectrometry. *Science* 316, 280-285.
- BADA JL, WANG XS & HAMILTON H (1999) Preservation of key molecules in the fossil record: current knowledge and future challenges. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 354, 77-87.
- BINDER H (2005) Elastisches Gewebe aus fossilen Dinosaurierknochen. *Stud. Int. J.* 12, 72-73.
- COLLINS MJ, GERNAEY AM, NIELSEN-MARSH CM, VERMEER C & WESTBROEK P (2000) Slow degradation of osteocalcin: Green light for fossil bone protein? *Geology* 28, 1139-1142.
- LINDAHL T (1993) Recovery of antediluvial DNA. *Nature* 365, 700.
- MUYZER G, SANDBERG P, KNAPPEN MHJ, VERMEER C, COLLINS M & WESTBROEK P (1992) Preservation of the bone protein osteocalcin in dinosaurs. *Geology* 20, 871-874.
- NIELSEN-MARSH CM, RICHARDS MP, HAUSCHKA PV, THOMAS-OATES JE, TRINKAUS E, PETTITT PB, KARAVAIĆI, POINAR H & COLLINS MJ (2005) Osteocalcin protein sequences of Neanderthals and modern primates. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 102, 4409-4413.
- SCHWEITZER MH, WITTMAYER JL, HORNER JR & TOPORSKI JK (2005) Soft-tissue vessels and cellular preservation in *Tyrannosaurus rex*. *Science* 307, 1952-1955. (supporting online material: www.sciencemag.org/cgi/content/full/307/5717/1952/DC1)
- SCHWEITZER MH, SUO Z, AVCI R, ASARA JM, ALLEN MA, ARCE FT & HORNER JR (2007a) Analyses of Soft Tissue from *Tyrannosaurus rex* Suggest the Presence of Protein. *Science* 316, 277-280.
- SCHWEITZER MH, WITTMAYER JL, HORNER JR (2007b) Soft tissue and cellular preservation in vertebrate skeletal elements from the Cretaceous to the present. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 274, 183-197.
- STANKIEWICZ BA, BRIGGS DEG, MICHELS R, COLLINS ME, FLANNERY MB & EVERSLED RP (2000) Alternative origin of aliphatic polymer in kerogen. *Geology* 28, 559-562.