

der hier vorgestellten Organismen haben könnten, ist eine Frage, für deren Beantwortung noch einiges zu tun sein wird.

Perspektiven

Zum ersten Mal in der Geschichte der biologischen Forschung können heute ganze Genome im Überblick miteinander verglichen werden. Sobald zwei Genome eines Grundtyps zugänglich sind, wird man die Wirkung mikroevolutiver Prozesse auch auf dieser Ebene analysieren können. Dabei ist zu erwarten, daß Genome eines Grundtyps einander deutlich ähnlicher sind als Genome verschiedener Grundtypen. Mikroevolutive Veränderungen müßten damit im Prinzip – auch im genomweiten Überblick – molekular und populationsgenetisch nachvollziehbar werden.

Vorerst werden vermutlich jedoch eher Genome sequenziert werden, die für solche Untersuchungen zu weit auseinanderliegen (z.B. *Drosophila* – Mensch). Auf Bakterienebene könnte obiges Ziel am ehesten noch in absehbarer Zeit gelingen.

Prinzipiell hat das Tappen im Dunkeln wenigstens soweit ein Ende, als man nun die Größe der weißen Flecken auf den Genomkarten genau benennen kann. Über verschiedene gentechnische Methoden kann man deren Funktionen in jedem Fall wesentlich einfacher als früher herausfinden. Nach der Genomsequenzierung werden umfangreiche Struktur-Funktions-Analysen folgen, um die neu gefundenen Gene verstehen zu können (LANDER 1996):

- Welche verschiedenen Kopien dieses Gens mit welchen Funktionen gibt es in den natürlichen Populationen?
- Wann und wo wird dieses Gen im Organismus benötigt?
- Was geschieht beim Ausschalten bzw. Verändern dieses Gens alleine bzw. in Kombination mit anderen Genen?
- Wie funktioniert das dazugehörige Protein? Welche Struktur besitzt es? Womit interagiert es?
- Welche Funktionen haben die nichtcodierenden Regionen noch?

Der Forschung steht ein weites Feld offen, und wir können auf viele interessante Entdeckungen gespannt sein.

Dank: Dr. Reinhard JUNKER, Prof. Dr. Siegfried SCHERER und Martha LOEWE danke ich für die Durchsicht des Manuskripts und hilfreiche Verbesserungsvorschläge. Verena BÖHM danke ich für das Erfassen der Daten in Tab. 2 und Klaus NEUHAUS für Verbesserungsvorschläge bei den Abbildungen.

Anmerkungen

- ¹ Daneben sollen bereits auch *Helicobacter pylori*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Genomgröße: 1,7 Megabasen), *Mycoplasma pneumoniae* (0,8 Mega-

basen) und *Synchocystis* sp. (3,6 Megabasen) vollständig sequenziert worden sein, jedoch ohne daß die Ergebnisse bisher veröffentlicht wurden (GOFFEAU et al. 1996).

- ² RNA-Gene werden hier gesondert gezählt.
- ³ Strukturen zur Regulation und Sequenzen zwischen den Genen sind darin bereits enthalten.
- ⁴ Sollten in *Mycoplasma* jedoch schon immer nur UAA oder UAG in allen wesentlichen Fällen als Stoppcodons gedient haben, so wäre die „Neubelegung“ von UGA selbst aus mikroevolutiver Sicht möglicherweise kein Problem: einer Duplikation des vorhandenen tRNA-Trp Gens müßte mindestens eine Punktmutation in der erkennenden Region folgen. Alle anderen ca. 20 (beobachteten, s.u.) Punktmutationen wie auch alle tatsächlich benutzten UGA's (in den Proteinen) wären dann durch neutrale Evolution fixiert worden. Dies läßt sich momentan jedoch schlecht überprüfen. Zur Zeit ist außerdem kein Grund ersichtlich, weshalb im angenommenen, makroevolutiven Urahn aller Mycoplasmen UGA nicht als Stoppcodon benutzt worden sein soll, wenn dieser den Universalen Genetischen Code benutzt haben soll. Die beiden tRNA-Trp-Gene von *Mycoplasma genitalium* (aus National Center for Biological Information Entrez, CD-Release 24.0, 1996) besitzen an 52 von 74 Positionen die gleichen Basenpaare, wenn man in tRNA-Trp2 das T an Position 54 deletiert. Dies entspricht 70% Sequenzhomologie. In *Mycoplasma pneumoniae* findet sich dagegen ein tRNA-Trp-Gen, welches sich mit tRNA-Trp1 aus *M. genitalium* um 67 bp überlappt (bei 1 Punktmutation).
- ⁵ Daß die Ribosomen evolvieren, während alle anderen bakterienähnlichen Proteine in ihrem ursprünglichen Zustand festgehalten werden, ist aufgrund der Gesetze der neutralen Evolution sehr unwahrscheinlich. Man müßte hierzu fordern, daß sich in der betreffenden Zeit dort praktisch keine (oder nur bestimmte) Mutationen ereignen.
- ⁶ Anders ausgedrückt: Wenn eine neue Eigenschaft zur Besiedlung einer bestimmten ökologischen Nische von zwei Genen codiert wird, dann kann diese neue Eigenschaft entweder fehlen, und der Organismus bleibt in der alten Nische, oder beide Gene sind vorhanden, und die neue Umwelt kann besiedelt werden. Fällt eines der Gene in der neuen Umwelt aus, dann kann dies tödliche Wirkungen haben.

Literatur

Internet-Adressen

Hefe: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>
M.g./H.i./M.j.: <http://www.tigr.org/tdb/mdb/>
E. coli: <http://www.genetics.wisc.edu/>
The Institute for Genomic Research: <http://www.tigr.org/>
National Center for Biological Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (dort finden sich Genbank, Entrez, Genkarte zum menschlichen Genom etc.)
European Molecular Biology Lab: <http://www.embl-heidelberg.de/>

Interessante Schwerpunkt-Hefte

Menschliches Genom: Nature 377 Supplement: The Genome Directory 1995

Aktuelle Trends: Jährlicher „Genome Issue“: Science (1996) 274, S. 479ff.; Science 270, S. 349ff. usw.

Genome und Evolution: Current Opinion in Genetics & Development (1996) Vol. 6, Nr. 6, S. 683ff.

Weitere Literatur

- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K & WATSON J (1994) Molecular Biology of the Cell, Third Edition. New York, Garland Publishing, Inc.
- BIRD AP (1995) Gene number, noise reduction and biological complexity. *Tr. Genet.* 11, 94-100.
- BLATTNER F (1997) *E. Coli*. Im Internet: <http://www.genetics.wisc.edu/>
- BULT CJ, WHITE O, OLSEN GJ, ZHOU L, FLEISCHMANN RD, SUTTON GG, BLAKE JA, FITZGERALD LM, CLAYTON RA, GOCAYNE JD, KERLAVAGE AR, DOUGHERTY BA, TOMB J-F, ADAMS MD, REICH CI, OVERBECK R, KIRKNESS EF, WEINSTOCK KG, MERRICK JM, GLODECK A, SCOTT JL, GEOGHAGEN NSM, WEIDMAN JF, FUHRMANN JL, NGUYEN D, UTTERBACK TR, KELLEY JM, PETERSON JD, SADOW PW, HANNA MC, COTTON MD, ROBERTS KM, HURST MA, KAINE BP, BORODOVSKY M, KLENK H-P, FRASER CM, SMITH HO, WOESE CR & VENTER JC (1996) Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- BÜRGER R & LYNCH M (1995) Evolution and Extinction in a Changing Environment: A Quantitative-Genetic Analysis. *Evolution* 49, 151-163.
- DE DUVE C (1994) Ursprung des Lebens: Präbiotische Evolution und die Entstehung der Zelle. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- DOOLITTLE RF (1986) Proteine. *Spektrum der Wissenschaft, Die Moleküle der Lebens*, 42-52.
- DYBVIK K & VOELKER LL (1996) Molecular Biology of Mycoplasmas. *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 25-57.
- EIGEN M (1993) The origin of genetic information: viruses as models. *Gene* 135, 37-47.
- ESCARMIS C, DAVILA M, CHARPENTIER N, BRACHO A, MOYA A & DOMINGO E (1996) Genetic Lesions Associated with Muller's Ratchet in an RNA Virus. *J. Mol. Biol.* 264, 255-267.
- FLEISCHMANN RD, ADAMS MD, WHITE O, CLAYTON RA, KIRKNESS EF, KERLAVAGE AR, BULT CJ, TOMB J-F, DOUGHERTY BA, MERRICK JM, MCKENNEY K, SUTTON GG, FITZHUGH W, FIELDS C, GOCAYNE JD, SCOTT J, SHIRLEY R, LIU L-I, GLODECK A, KELLEY JM, WEIDMAN JF, PHILLIPS CA, SPRIGGS T, HEDBLUM E, COTTON MD, UTTERBACK TR, HANNA MC, NGUYEN DT, SAUDECK DM, BRANDON RC, FINE LD, FRITCHMAN JL, FUHRMANN JL, GEOGHAGEN NSM, GNEHM CL, McDONALD LA, SMALL KC, FRASER CM, SMITH HO & VENTER JC (1995) Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496-512.
- FOX GE, MAGRUM LJ, BALCH WE, WOLFE RS & WOESE CR (1977) Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4537-4541.
- FRASER CM, GOCAYNE JD, WHITE O, ADAMS MD, CLAYTON RA, FLEISCHMANN RD, BULT CJ, KERLAVAGE AR, SUTTON G, KELLEY JM, FRITCHMAN JL, WEIDMAN JF, SMALL KV, SANDUSKY M, FUHRMANN J, NGUYEN D, SAUDECK TRUDM, PHILLIPS CA, MERRICK HM, TOMB J-F, BOTT BADDF, HU P-C, LUCIER TS, PETERSON SN, SMITH HO, HUTCHINSON III CA & VENTER JC (1995) The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397-403.
- GOFFEAU A (1995) Life With 482 Genes. *Science* 270, 445-446.
- GOFFEAU A, BARRELL BG, BUSSEY H, DAVIS RW, DUJON B, FELD-MANN H, GALBERT F, HOHEISEL JD, JACO C, JOHNSTON M, LOUIS EJ, MEWES HW, MURAKAMI Y, PHILIPPSEN P, TETTELIN H & OLIVER SG (1996) Life with 6000 Genes. *Science* 274, 546-567.
- HURST LD & HURST GDD (1996) Evolutionary Genetics: Genomic revolutionaries rise up. *Nature* 384, 317-318.
- JOYCE GF (1989) RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338, 217-224.
- KIMURA M (1985) Die „neutrale“ Theorie der molekularen Evolution. In: *Evolution. Heidelberg, Spektrum der Wissenschaft*, 100-108.
- KIMURA M (1987) Die Neutralitätstheorie der molekularen Evolution. Berlin, Verlag Paul Parey.
- LANDER ES (1996) The New Genomics: Global Views of Biology. *Science* 274, 536-539.
- LEWIN B (1994) Genes V. Oxford, Oxford University Press.
- LYNCH M, CONERY J & BÜRGER R (1995) Mutational Meltdowns in Sexual Populations. *Evolution* 49, 1067-1080.
- MANILOFF J (1996) The minimal cell genome: „On being the right size“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10004-10006.
- MAYNARD SMITH J (1978) The Evolution of Sex. Cambridge, Cambridge University Press.
- MIKLOS GLG & RUBIN GM (1996) The Role of the Genome Project in Determining Gene Function: Insights from Model Organisms. *Cell* 86, 521-529.
- MORELL V (1996) Life's Last Domain. *Science* 273, 1043-1045.
- MUSHEGIAN AR & KOONIN EV (1996) A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10268-10273.
- ORENGO CA, JONES DT & THORNTON JM (1994) Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* 372, 631-634.
- PENNISI E (1996) Genome Meeting: Seeking Life's Bare (Genetic) Necessities. *Science* 272, 1098-1099.
- SCHERER S (1996) Entstehung der Photosynthese – Grenzen molekularer Evolution bei Bakterien? Neuhausen-Stuttgart, Hänssler.
- SHAPIRO R (1987) Schöpfung und Zufall. München, C. Bertelsmann Verlag.
- SHAPIRO R (1988) Prebiotic Ribose Synthesis: A Critical Analysis. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 18, 71-85.
- STRYER L (1990) Biochemie. Heidelberg, Spektrum der Wissenschaft.
- SZATHMAY E & MAYNARD SMITH J (1995) The major evolutionary transitions. *Nature* 374, 227-232.
- TORTORA GJ, FUNKE BR & CASE CL (1992) Microbiology: An Introduction. 4th Edition. Redwood City, The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- VOLLMERT B (1985) Das Molekül und das Leben – Vom makromolekularen Ursprung des Lebens und der Arten: Was Darwin nicht wissen konnte und Darwinisten nicht wissen wollen. Reinbek bei Hamburg, Rowohlt Verlag.
- WOESE CR, KANDLER O & WHEELIS ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4576-4579.

Wie lange bleiben DNA-Moleküle erhalten?

Zur chemischen Stabilität fossiler DNA

Harald Binder, Taborweg 8, 78467 Konstanz

Zusammenfassung: Molekularbiologische Techniken ermöglichen Untersuchungen kleinster Mengen von DNA. In jüngster Zeit werden mit diesen Methoden auch DNA-Fragmente aus Fossilien analysiert. In diesem Artikel werden Untersuchungen an Pflanzenfossilien aus der Fossilagerstätte Clarkia, Idaho, USA vorgestellt. Das diesen aus dem Miozän stammenden Fossilien zugeordnete Alter (17-20 Millionen Jahre) steht im Widerspruch zu bisherigen Erkenntnissen über die Langzeitstabilität von DNA. Danach geht man davon aus, daß Nukleinsäuren in einem Zeitraum von 10.000 bis maximal 100.000 Jahren zerfallen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse machen weitere grundlegende Untersuchungen nötig und motivieren zu kritischer Reflexion über bisher akzeptierte Erklärungen.

Einleitung

Mit dem Eintritt des Todes beginnen Lebewesen bzw. deren materielle Bestandteile, die organischen Moleküle, zu zerfallen. Diese Tendenz zum Zerfall ist auch im lebenden Organismus zu beobachten, jedoch werden hier mit dem Stoffwechsel, durch Synthese, Reparatur etc. empfindliche Gleichgewichtszustände gewährleistet. Diese biochemischen Gleichgewichte werden nach dem Tod nicht mehr aufrechterhalten. Typischerweise wird ein Kadaver unter Beteiligung von Mikroorganismen, Pilzen u.a. vollständig remineralisiert und damit die materiellen Komponenten der Lebewesen wieder dem Stoffkreislauf zugeführt.

In seltenen Fällen, z.B. in gestörten instabilen Ökosystemen wird diese Zerfallstendenz verlangsamt oder sogar eingefroren (z.B. Mammuts im sibirischen Eis, Gletscherleichen), oder die Gestalt des Körpers wird durch noch nicht verstandene Mechanismen mit anorganischen Mineralien abgebildet (z.T. unter Erhaltung zellulärer Strukturen) und kann als Versteinierung erhalten bleiben. Für die Paläontologie sind solche Fossilien (fossil: lat. „ausgegraben“) ergiebige Informationsquellen. Bisher konnten an solchen Fossilien vor allem strukturelle Merkmale verschiedenster auch unbekannter, schon ausgestorbener Lebewesen untersucht werden.

Die organischen Bestandteile sind bei Fossilien jedoch nicht immer vollständig durch anorganische Mineralien ersetzt. Abhängig von Bedingungen bei Entstehung und Lagerung der Fossilien können die organischen Komponenten noch weitgehend erhalten sein (bei Eis- oder Gletscherleichen und Bern-

steininklusen) oder in mehr oder weniger stark chemisch veränderter Form vorliegen (Moorleichen, Mumien, inkohlte Pflanzenreste).

Die Entwicklung hochempfindlicher analytischer Methoden ermöglicht Untersuchungen kleinster Stoffmengen. So können paläontologische Fragestellungen mit Hilfe der chemischen Analyse organischer Überreste an Fossilien bearbeitet werden.

Die makromolekularen Nukleinsäuren (DNA, RNA) mit ihren faszinierenden strukturellen Eigenschaften stellen in diesem Zusammenhang eine besonders interessante Klasse organischer Moleküle dar. Sie enthalten in allen bekannten Lebewesen die für den jeweiligen Organismus spezifische Erbinformation. Unter Anwendung molekularbiologischer Techniken werden heute in vielen Labors (z.T. weitgehend automatisiert) bestimmte Ausschnitte der genetischen Information, d.h. bestimmte Abschnitte auf der fadenförmigen Nukleinsäure von rezenten (heute lebenden) Organismen analysiert.

Mitte der achtziger Jahre gelang es erstmals, Ausschnitte der genetischen Information von Organismen zu untersuchen, die schon lange Zeit vor der Analyse tot und entsprechend präpariert worden waren. Die Nukleinsäureabschnitte aus Geweberesten eines 140 Jahre zuvor erlegten Quaggas (ein ausgestorbener Pferdeverwandter; HIGUCHI et al. 1984) und von ägyptischen Mumien (PÄÄBO 1985) konnten untersucht werden, nachdem Fragmente

Fragestellungen aus der Paläontologie können jetzt mit molekularbiologischen Techniken bearbeitet werden.

der jeweiligen Nukleinsäuren in Bakterien transferiert und vermehrt worden waren. Erwiesen sich die in diesen Arbeiten angewendeten Techniken noch als aufwendig und ineffektiv, so erlaubt die inzwischen entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (MULLIS 1990, Nobelpreis 1993) die Vermehrung von DNA-Fragmenten im Reagenzglas innerhalb von Stunden.

Durch diese Pionierarbeiten wurden Fragestellungen aus der Paläontologie der Bearbeitung mit molekularbiologischen Techniken zugänglich. Es war damit also die Möglichkeit eröffnet worden, chemische Untersuchungen an Nukleinsäurefrag-

menten aus organischen Geweberesten von Fossilien vorzunehmen. In internationalen Veröffentlichungen wird häufig die Bezeichnung „ancient DNA“ (ancient = alt, antik, ural) benutzt, seltener „fossil DNA“. Hier soll der zweite Begriff gewählt werden, da er den Sachverhalt treffend und weniger suggestiv beschreibt.

DNA-Sequenz aus einem Magnolienblatt aus dem Miozän

GOLENBERG et al. (1990) untersuchten ein fossiles Blatt aus der Fossilagerstätte Clarkia, Idaho, USA (s. Kasten), welches aufgrund morphologischer Merkmale als der fossilen Spezies *Magnolia latahensis* zugehörig klassifiziert wurde. Diese Art findet sich häufig in anderen miozänen Florengemeinschaften des Columbia Plateaus. Das Blatt wurde in seiner Matrix nach Aufbrechen des schiefrigen Materials fotografisch dokumentiert und identifiziert. Es wurde ausgekratzt und mechanisch zu einem feinen Pulver zermahlen. Aus diesem Pulver wurde nun die DNA extrahiert und durch entsprechende Auswahl der Primer (kurze einsträngige DNA Stücke, die für die PCR notwendig sind) ein DNA-Abschnitt aus den Chloroplasten mittels PCR vervielfältigt. Dieses Fragment des isolierten Chloroplastengens kodiert für die große Untereinheit des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (rbcL). Dieses Enzym katalysiert in der Photosynthesereaktion (Calvin-Cyclus) die Fixierung von CO₂; es findet sich also nur in photosynthetisierenden Organismen. Das isolierte und durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigte Fragment wies eine Länge von 770 Basenpaaren (bp) auf. (Die Gesamtlänge des rbcL-Gens aus *Magnolia macrophylla* beträgt 1428 bp.) Vergleichende (phylogenetische) Untersuchungen der gefundenen Sequenz mit bereits bekannten rbcL-Sequenzen anderer Organismen stützen die Vermutung, daß die fossile DNA aus dem Magnolienblatt stammt: Ein Vergleich der rbcL-Sequenzen der fossilen Magnolienart mit einer rezenten (*Magnolia macrophylla*) zeigt deutliche Abweichungen.

Reaktionen und deren Diskussion

Das dem untersuchten Blatt zugeordnete Alter (Miozän: 17-20 Millionen Jahre) erregte Aufsehen, weil die bis dahin älteste veröffentlichte DNA-Sequenz aus Geweberückständen am Fell eines auf ca. 13.000 Jahre datierten chilenischen Riesenfaultiers (*Myloodon*) bekannt war (PÄÄBO 1989). In der Arbeit von GOLENBERG et al. wird der Anspruch erhoben, fossile DNA erfolgreich vervielfältigt und sequenziert zu haben, die etwa um den Faktor 1000 älter ist. Als Reaktion auf die Veröffentlichung von GOLENBERG

Die miozäne Fossilagerstätte bei Clarkia

In diesem Beitrag werden Arbeiten über fossile DNA, welche an Fossilien aus der Fossilagerstätte Clarkia, Idaho, USA vorgenommen wurden, präsentiert und diskutiert.

Die Fossilagerstätte bei Clarkia ist eine bekannte, gut untersuchte Fundstelle von Fossilien verschiedenster Organismen aus dem Miozän (SMILEY 1985, GOLENBERG 1991). Die Organismen stammen aus limnischen (z.B. Fische) wie aus terrestrischen (z.B. Pflanzen) Biotopen. Die Entstehung der Fossilagerstätte wird als Talfüllung entlang des heutigen Entwässerungssystems des St. Maries River interpretiert. Das Tal soll damals durch Lavaflüsse abgeriegelt und das Wasser zu einem großflächigen See – dem miozänen Clarkia Lake – gestaut worden sein. Von diesem miozänen See zeugen heute verschiedene Aufschlüsse mit den oben genannten Fossilagerstätten. Die am besten untersuchte Fundstelle (sie wird mit P-33 bezeichnet) ist gekennzeichnet durch ein 9 Meter mächtiges lakustrines Schichtpaket aus weichem, nicht oxidiertem, fein laminiertem Ton, in welchen gelegentlich Schichten von vulkanischem Aschestaub

zwischen geschaltet sind. Aufgrund paläontologischer und sedimentologischer Untersuchungen geht man davon aus, daß die klimatischen Bedingungen dieser Region im Miozän warm und feucht waren. Dem entsprechend repräsentiert die fossil überlieferte Pflanzenwelt dieser Gegend, die im Gegensatz zur heutigen vorwiegend aus Nadelwäldern besteht, ein warmes, feuchtes Waldökosystem. Das Sediment und die Fossilien haben sich vermutlich am sauerstoffarmen Seeboden angesammelt und blieben dort bis heute in nichtoxidiertem und wassergesättigtem Zustand.

Die pflanzlichen Megafossilien bestehen hauptsächlich aus Blättern, daneben sind jedoch auch Blüten und andere Pflanzenteile zu finden. Die Blattfossilien liegen in plattgepreßter Form vor, wobei das zelluläre Gewebe intakt ist und oft die zellulären Ultrastrukturen, einschließlich Zellwänden und Organellen auffällig gut erhalten sind. Auch Untersuchungen organischer Substanzen in den Blattfossilien deuten darauf hin, daß diagenetische Veränderungen nur in sehr begrenztem Umfang stattgefunden haben.

et al. (1990) wurden kritische, zur Vorsicht mahnende Arbeiten publiziert. So untersuchten SIDOW et al. (1991) fossiles Pflanzenmaterial aus Clarkia und konnten dabei ebenfalls „hochmolekulare“ DNA isolieren. Sie konnten allerdings keine fossile DNA pflanzlichen Ursprungs erhalten. Vielmehr erhielten sie bei ihren Experimenten DNA-Fragmente, die als bakterielle Nukleinsäuren identifiziert wurden. Die Autoren vermuten, daß es sich dabei um DNA rezenter Bakterien handelt.

Zuvor bereits hatten dieselben Autoren (PÄÄBO & WILSON 1991) aufgrund experimenteller Laboraten (LINDAHL & NYBERG 1972 und LINDAHL & ANDERSON 1972) eine Abschätzung der Überlebensdauer von DNA-Fragmenten vorgenommen und publiziert. Diese Abschätzung ergab, daß von 10¹² Kopien (die angenommene Zahl von Kopien des Chloroplastengenoms in 1 g Blattgewebe) eines DNA Moleküls mit einer Länge von 800 bp in wässrigem Milieu, bei pH 7 und 15 °C, nach ca. 5000 Jahren kein komplettes DNA-Molekül mehr vorhanden sein dürfte. Sie sind alle durch Depurinierung und nachfolgenden Strangbruch zerstört worden.

In einer Erwiderung auf diese Kritik betont GOLENBERG (1991) vor allem die Priorität experimenteller Daten gegenüber theoretischen Erwä-

Allgemeine Betrachtungen zur chemischen Stabilität von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren bestehen aus den Kohlenhydraten Ribose im Falle der RNA bzw. 2-Desoxyribose bei DNA. Diese Kohlenhydrate sind über ihre 3- bzw. 5-OH-Funktion mittels einer Phosphorsäurediesterbrücke verknüpft und stellen das sogenannte Rückgrat des Nukleinsäurepolymers dar. Über die 1-OH Funktion ist jedes Kohlenhydrat über eine N-glycosidische Bindung mit einem N-Heterocyclus verknüpft. Die in Nukleinsäuren vorkommenden N-Heterocyclen lassen sich in die monocyclischen Pyrimidine Cytosin, Thymin und Uracil, welches in RNA Thymin ersetzt, und die beiden bicyclischen Purine Adenin und Guanin, unterteilen. (Daneben treten in Nukleinsäuren, anzahlmäßig von untergeordneter Bedeutung, noch Nukleotide mit modifizierten N-Basen auf.) Die so aufgebauten Markomoleküle DNA bzw. RNA weisen verschiedene Typen chemischer Bindungen auf, die sich hinsichtlich ihrer Stabilität unter entsprechenden Bedingungen unterscheiden.

So erweist sich die Phosphorsäurediesterbindung, bedingt durch die Anwesenheit der 2-OH Gruppe in der Ribose, verglichen mit DNA als viel empfindlicher gegen **Hydrolyse**. Diese Empfindlichkeit wird bei Anwesenheit 2-wertiger Kationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+} noch verstärkt. D.h., in der DNA finden wir in den meisten Organismen ein hinsichtlich eines Kettenbruchs durch Hydrolyse chemisch stabileres Molekül zur Speicherung genetischer Information, als dies mit RNA gewährleistet wäre. Dagegen sind durch Wegfall der 2-OH Gruppe (welche sich für die Phosphorsäurediesterbrücke der DNA bezüglich deren hydrolytischer Spaltung stabilisierend auswirkt) die N-glycosidischen Bindungen in der DNA zwischen Kohlenhydraten und N-Heterocyclen sehr empfindlich gegen Hydrolyse.

LINDAHL & NYBERG (1972) und LINDAHL & ANDERSSON (1972) haben experimentelle Untersuchungen zur Freisetzung von N-Basen unter physiologischen Bedingungen angestellt. Die Purine Guanin und Adenin werden mit vergleichbaren Geschwindigkeiten freigesetzt, wobei Guanin etwas empfindlicher ist. Die Geschwindigkeit für die Hydrolyse der Pyrimidine Cytosin und Thymin beträgt dagegen nur 5% verglichen mit den Purinen. Die Reaktion verläuft unter physiologischen Bedingungen säurekatalysiert. Die Ausbildung von doppelsträngiger DNA mittels komplementärer Basenpaarung (H-Brücken) verringert die Geschwindigkeit der Depurinierung nur um den Faktor 4 und stellt somit keinen effektiven Schutz gegen den Verlust von N-Basen dar. Die Abschirmung der Ladung an der Phosphorsäurediesterbrücke durch Mg^{2+} -Ionen hat keinen meßbaren Einfluß auf die Freisetzung der N-Heterocyclen.

Ein Verlust von N-Heterocyclen (v.a. Purinen) hat eine Destabilisierung des Rückgrates aus über Phosphorsäurediester verbrückte 2-Desoxyribosen an der betreffenden Stelle zur Folge, was in einem Strangbruch zum Ausdruck kommt. Dieser Strangbruch erfolgt durch β -Eliminierung nach Hydrolyse der N-glycosidischen Bindung aufgrund der Öffnung des Desoxyribofuranoserings nach Freisetzung der 1-OH Funktion. Solche Vorgänge spielen sich auch in menschlichen Zellen ab. LINDAHL & NYBERG (1972) rechnen pro Tag und menschlicher Zelle mit 2.000 - 10.000 Purinabsplatzungen im menschlichen Genom, wobei in den lebenden Zellen solche Schäden durch ein effizientes Reparatursystem behoben werden.

Ein weiterer Aspekt chemischer Veränderung an der DNA stellt die **Desaminierung** der N-Base Cytosin dar. Bei 37 °C und pH 7,4

beträgt die Halbwertszeit für die hydrolytische Abspaltung der NH_2 -Funktion eines Cytosins in einsträngiger DNA ca. 200 Jahre. Im Gegensatz zur Depurinierung stellt die Ausbildung von DNA-Doppelsträngen für diese Reaktion einen effektiven Schutz dar, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit auf 0,5-0,7% sinkt, was die Halbwertszeit auf ca. 30.000 Jahre verlängert (FREDERICO et al. 1990). Für den Reaktionsmechanismus für die Desaminierung bei neutralen pH-Werten kommen sowohl alkalisch katalysierte Desaminierung als auch ein säurekatalysierter Ablauf in Frage, wobei ein H_2O -Molekül die protonierte NH_2 -Funktion angreift. Im Säugetiergenom sind etwa 3% des Cytosins der DNA zum 5-Methylcytosin methyliert. Dieses 5-Methylcytosin wird etwa um den Faktor 3-4 mal schneller desaminiert als Cytosin selbst. Auch an den Purinbasen Adenin und Guanin kann eine Desaminierung erfolgen. Allerdings ist hier die Rate nur 2-3% derjenigen von Cytosin (KARRAN & LINDAHL 1980).

Diese chemischen Änderungen an den N-Basen in der DNA beeinträchtigen die komplementäre Basenpaarung in der DNA-Doppelhelix und machen deshalb für lebende Zellen zur Stabilisierung ihrer genetischen Information ein aufwendiges und effizientes Reparatursystem notwendig.

Eine weitere Quelle chemischer Veränderungen an der DNA stellen **oxidative Prozesse** dar. Darunter fällt z.B. die Umwandlung von Guanin in 8-Hydroxyguanin durch OH-Radikale. Diese Modifikation hat eine veränderte Spezifität bei der komplementären Basenpaarung zur Folge. Eine zweite Erscheinung oxidativer Reaktionen ist die Bildung gesättigter Derivate der Pyrimidine (die 5,6-Doppelbindung verschwindet), wobei die Planarität der

gungen und Abschätzungen. Den Einwand der hohen Depurinierungs- und daraus resultierenden Strangbruchraten versucht der Autor mit dem Hinweis abzuschwächen, daß sie unter den Bedingungen der Clarkia-Sedimente, verglichen mit den Laboraten, sehr viel geringer gewesen sein könnten. Es sei vorstellbar, daß Austrocknung, Freisetzung von pflanzlichen phenolischen Verbindungen, sowie eine erneute Befeuchtung mit tanninreichem Wasser besonders gut konservierende Bedingungen schaffe. Weiterhin führt GOLENBERG die erfolgreiche Reproduktion seiner früheren Ergebnisse wie auch die fehlenden Hinweise auf epiphytisches Bakterienwachstum bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei der Zurückweisung der Kritik an. Schließlich erwähnt er auch noch vorläufige, d.h. noch unveröffentlichte positive Resultate von Kolle-

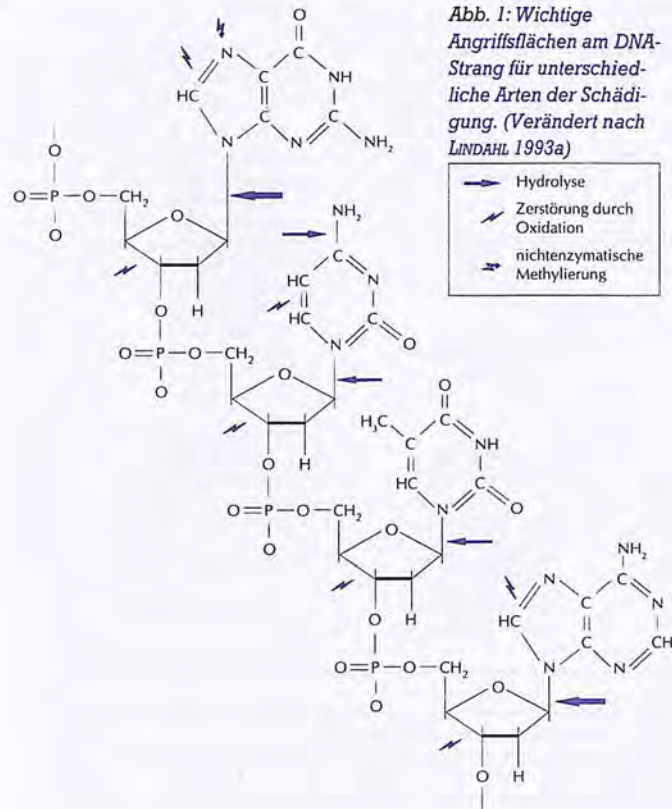
gen aus Untersuchungen an *Taxodium*- und *Quercus*-Arten, sowie eigene Untersuchungen an *Cocculus* aus dem Miozän.

SOLTIS et al. konnten 1992 ein rbcL-Fragment aus einer fossilen *Taxodium*-Art einer Länge von 1320 bp erfolgreich isolieren und vervielfältigen. Damit konnte der größte Teil des insgesamt 1431 bp langen rbcL-Gens einer fossilen Pflanze ebenfalls aus der Fundstelle Clarkia nachgewiesen und damit der Nachweis fossiler DNA aus dem Miozän reproduziert werden. In ihrer Publikation deuten SOLTIS et al. an, daß sie auch doppelsträngige DNA vergleichbarer Größe aus fossilen *Platanus*- und *Pseudofagus*-Resten aus der Clarkia-Fundstelle erfolgreich vervielfältigt hätten. Versuche mit rbcL von *Metasequoia*, *Hydrangea* und *Lindera* seien in ihren Labors bisher fehlgeschlagen.¹

ursprünglichen heteroaromatischen Ringssysteme verloren geht und damit auch die Fähigkeit zur Bindung komplementärer N-Basen über H-Brücken. Beide oxidative Prozesse sind bisher nicht experimentell in vivo quantifiziert worden. Eine weitere durch Sauerstoffradikale induzierte Schädigung der DNA stellt die Störung der helikalen Struktur der DNA-Doppelhelix durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Purinen und dem Kohlenhydrat-Phosphat-Rückgrat, sowie zwischen zwei Purinbasen innerhalb desselben Stranges dar.

Da in den Zellkernen eukaryotischer Zellen keine experimentell nachweisbare O_2 -Konzentration vorliegt, ist diese Gefährdung der genetischen Information als verhältnismäßig gering einzuschätzen. Anders sieht die Situation allerdings bei mitochondrialer DNA aus.

OH-Radikale, die in Folge von Einwirkung **ionisierender Strahlung** auf Wasser entstehen, rufen vielfältige Reaktionen in biogenen Makromolekülen, besonders auch in DNA, hervor. In Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Strahlenempfindlichkeit einer Zellart weitgehend ihrem DNA-Gehalt proportional ist. SCHULTE-FROHLINDE (1990) zählt in einem zusammenfassenden Artikel folgende Klassen von Strah-



Tab. 1: Einige Schäden an den Zellkernen von Säugerzellen durch 1 Gy low-LET Strahlung. Gy: Einheit der Energiedosis: 1 Gray = 1 Gy = 1J/kg; LET: „linear energy transfer“. (In Auswahl nach GOODHEAD 1994)

Physikalische Schäden

Ionisierungen im Zellkern	ca. 100.000
Ionisierungen direkt in der DNA	ca. 2.000
Anregungen direkt in der DNA	ca. 2.000

Auswahl von biochemischen Schäden

DNA-Einzelstrangbrüche	1.000
DNA-Doppelstrangbrüche	40
DNA-Protein-Quervernetzung	150

lenschäden auf: Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenschäden, Verluste von Basen, Nukleosiden und Nukleotiden, Adduktbildung, Vernetzung zwischen DNA-Strängen und Proteinen und Änderungen der DNA-Struktur. Schädigungen der DNA treten auch bei niedrigen Strahldosen auf (HAGEN 1987). Der Einfluß radioaktiver Strahlung als Schadensquelle für fossile DNA läßt sich nur sehr schwer abschätzen, da keine Daten über die Strahlenverteilung und -intensität vor Ort

und über die Zeit vorliegen. Angesichts des zur Diskussion stehenden Alters der Fossilien von Clarkia und der damit verbundenen Expositionszeit des fossilen Gewebes wird allerdings deutlich, daß es sich bei den Schädigungen der DNA durch ionisierende Strahlungen um einen in der bisherigen Diskussion stark vernachlässigten Faktor handelt. GOODHEAD (1994) hat eine Auswahl über die Schädigungen in Zellkernen von Säugerzellen durch eine niedrige LET Strahlung von 1Gy zusammengestellt (s. Tab. 1).

In Tab. 2 sind die Untersuchungen zu fossiler DNA aus der Fossilagerstätte bei Clarkia im Überblick dargestellt.

GOLENBERG (1991) führt zur Begründung seiner Wahl für die Untersuchung des rbcL-Gens folgende Argumente an, welche offensichtlich auch für weitere Untersuchungen genutzt wurden (POINAR et al. 1993): eine große Zahl von Kopien des Chloroplastengenoms im Blattgewebe („tausende pro Blatt“), nach mikroskopischen Untersuchungen guter Erhaltungszustand der Chloroplasten, nach GOLENBERGS Ansicht eine gute Eignung dieser Gene für phylogenetische Vergleiche und schließlich die Tatsache, daß diese Gene in Hefe und den meisten Bakterien nicht auftreten und damit die Möglichkeit von Kontaminationen reduziert sind. Doch auch angesichts dieser Argumente sind die Anfragen

aufgrund der chemischen Stabilitätsbetrachtungen des Makromoleküls DNA nicht soweit ausgeräumt, daß die mit diesen Untersuchungen erzielten Resultate allgemeine Anerkennung gefunden hätten.

Erhaltung biochemischer Moleküle in Fossilien

Die bisher angeführten und diskutierten Arbeiten zeigen, daß in mehrfacher Wiederholung DNA aus fossilen Pflanzenteilen von der Fundstelle Clarkias isoliert und mittels PCR vervielfältigt worden sind. Durch Sequenzierung und vergleichende Untersuchungen konnte in einigen Fällen die Vermutung,

Organismus	DNA	bp	Quelle
<i>Magnolia latahensis</i> ¹	Genfragment aus Chloroplasten: rbcL	820	Golenberg et al. 1990,
<i>Taxodium</i>	Genfragment aus Chloroplasten: rbcL	1320	Golenberg 1991 Soltis et al. 1992
Bakterien	?	370	Sidow A. et al. 1991
<i>Quercus</i> ²	Genfragment aus Chloroplasten: rbcL	–	Wichman H.A., Hamilton M.
<i>Cocculus</i> ²	–	–	Wichman H.A., Hamilton M.
<i>Liriodendron</i> ²	Retrotransposon-Sequenzen	–	Cummings M., Voytas D., Rodermel S., Konieczny A., Ausubel F.
<i>Platanus</i> ²	Retrotransposon-Sequenzen	–	Cummings M., Voytas D., Rodermel S., Konieczny A., Ausubel F.
<i>Platanus</i> ³	entspricht rbcL	–	Soltis et al. 1992
<i>Pseudofagus</i> ³	entspricht rbcL	–	Soltis et al. 1992
<i>Metasequoia</i> ⁴	Genfragment aus Chloroplasten: rbcL	–	Soltis et al. 1992
<i>Hydrangea</i> ⁴	Genfragment aus Chloroplasten: rbcL	–	Soltis et al. 1992
<i>Lindera</i> ⁴	Genfragment aus Chloroplasten: rbcL	–	Soltis et al. 1992

¹ Die Ergebnisse wurden von derselben Arbeitsgruppe reproduziert (s. GOLENBERG 1991)
² Von erfolgreicher Amplifikation wurde berichtet, die Sequenz jedoch bisher noch nicht veröffentlicht; zitiert in GOLENBERG (1991)
³ Von erfolgreicher Amplifikation wurde berichtet, jedoch ohne detaillierte Sequenzdaten; zitiert in SOLTIS et al. (1992)
⁴ Versuche zur Amplifikation waren bisher nicht erfolgreich; zitiert in SOLTIS et al. (1992)

Tab. 2: Untersuchungen an fossiler DNA aus der Fossilagerstätte Clarkia, Idaho, USA (Miozän). bp = Basenpaare.

daß es sich um DNA aus den fossilen Pflanzenresten handelt, erhärtet werden. Was kann über die Konservierung von molekularen Strukturen aus Organismen unter den geologischen Rahmenbedingungen von Clarkia gesagt werden? EGLINTON & LOGAN (1991) diskutieren die Erhaltung unterschiedlichster molekularer Strukturen aus toten Organismen unter verschiedenen Umweltbedingungen. Sie beziehen die Fossilagerstätte bei Clarkia in ihre Untersuchungen mit ein und bezeichnen die dort vorgefundenen Sedimente als unreif. D.h.: Diese Schichten wären seit ihrer Ablagerung keinem thermischen Streß ausgesetzt und während ihrer Geschichte höchstens mit wenigen 100 m Sediment überlagert gewesen. EGLINTON & LOGAN haben zunächst Lipidkomponenten von Clarkia-Blätterfossilien untersucht und dabei Hinweise auf eine sehr gute Erhaltung gefunden. D.h. die Analysen lieferten bezüglich der Verteilung der Komponenten vergleichbare Resultate wie bei Wachszusammensetzungen rezenter Blätter. Dies wird von den Autoren als Indiz für exzellente Erhaltung, sehr geringen Bioabbau und Diagenese gewertet. Im weiteren Verlauf ihrer Untersuchungen konnten sie empfindlichere und hochselektive Analysenmethoden mit einbeziehen. So berichten LOGAN et al. (1993) über vergleichende Untersuchungen von gut erhaltenen fossilisierten Eichenblättern (*Quercus* sp.) aus der Lagerstätte Clarkia, von Eichenblättern (*Quercus*

robur) aus 2 Jahre zurückliegendem Laubfall mit entsprechendem Bioabbau durch Mikroorganismen und von frischen Eichenblättern. Die beiden schon abgestorbenen Blattgewebe weisen bei massenspektroskopischen Analysen ein vergleichbares Muster an Signalen auf, die als Fragmente von Ligninbestandteilen von sehr gutem Erhaltungszustand interpretiert werden. Im frischen Blattgewebe dominieren dagegen deutlich Signale, die von cytosolischen Komponenten herrühren, wie Stärke, Proteine und Lipide. Im fossilen Eichenblatt fehlen auffälligerweise Signale, die eine Erhaltung von Polysacchariden anzeigen würden. Im 2 Jahre alten Blatt dominieren Signale von strukturellen Polysacchariden (Cellulose) das Spektrum. Diese Befunde werden durch andere Methoden bestätigt. Die C-16- und C-18-Fettsäuren des Cutins konnten beim 2 Jahre alten Blattmaterial als Indiz von intakten Cutinpolyestern im Gegensatz zu den miozänen Blattfossilien nachgewiesen werden. Obwohl die in dieser Untersuchung zur Anwendung gebrachten Analysenmethoden, verglichen mit PCR, um mehrere Größenordnungen unempfindlicher sind, zeigen sie jedoch deutlich, daß die Fossilagerstätte bei Clarkia aus dem Miozän keine generelle, also alle Typen von Makromolekülen aus Organismen in gleicher Weise betreffende, ausgezeichnete Erhaltung bietet. Die Autoren betonen in den Schlußfolgerungen ihrer Studie, daß trotz einer ausgezeichneten anatomischen Erhaltung der Fossilien von den meisten Biopolymeren keine nennenswerten Mengen nachgewiesen werden konnten, d.h. diese sind abgebaut worden.

Chemische Stabilität von DNA aus der Fossilagerstätte bei Clarkia

Was die Mechanismen zum Abbau von DNA betrifft (s. Kasten), so ist zu erwarten, daß Hydrolyse ebenso wie Desaminierung, DNA-Oxidation und mit Einschränkungen die nichtenzymatische Methylierung Prozesse darstellen, die auch nach Tod, Einbettung des Organismus in Sedimentschichten und Lagerung unter nicht extremen geologischen Bedingungen (v.a. Druck, Temperatur) weiterhin wirksam sind. Dadurch würden sich die Abbauprodukte im Laufe der Zeit anhäufen, mit dem Effekt, daß das Makromolekül DNA zunehmend in kleine Bruchstücke fragmentiert wird und schließlich vollständig abgebaut wäre. DESALLE & GRIMALDI (1994) schätzen aufgrund der von LINDAHL (1993) publizierten Daten für die Halbwertszeit der Depurinierung, daß ein Genom von der Größe des menschlichen in weniger als 30.000 Jahren zu einzelnen Basenpaaren abgebaut werden würde. Diese wären ihrerseits weiter abgebaut worden. T. LINDAHL (1993a) selbst hält es für möglich, daß in Verbindung mit

vorteilhaften Konservierungsbedingungen – insbesondere auch niedrige Temperaturen – mit PCR vervielfältigbare DNA-Fragmente mit einem Alter von zehntausenden von Jahren gewonnen werden können. Über veröffentlichte Untersuchungsergebnisse an wesentlich älteren Proben äußert er sich sehr skeptisch.

Nun sind Daten über Abbauraten vergangener Zeiten mit naturwissenschaftlichen Methoden nicht direkt zugänglich. Werden also die postulierten hohen Alter für fossile DNA aufrecht erhalten, dann sind Argumente gefragt, die eine bessere Konservierung, d.h. wirksame Schutzmechanismen in Übereinstimmung mit unserem gegenwärtigen Erkenntnisstand wahrscheinlich machen.

Mögliche Konservierungseffekte

So haben NIKLAS et al. (1988; zitiert nach GOLENBERG, 1991) vermutet, daß die Blätter von *Clarkia* vor dem Laubfall einer natürlichen Dehydratisierung unterworfen waren und nach der Einbettung möglicherweise durch wässrige Lösungen rehydratisiert wurden, die konservierende Bestandteile wie Tannine oder phenolische Verbindungen pflanzlicher Herkunft enthalten haben. Dazu ist einschränkend anzumerken, daß DNA auch in getrocknetem Gewebe immer noch partiell hydratisiert vorliegt und damit weiterhin hydrolytischen Abbauprozessen ausgesetzt bleibt. Vollständig dehydratisierte DNA (nur unter extremen Bedingungen, wie z.B. über Phosphorpentoxid, P_2O_5 möglich) ist stark hygroskopisch und rehydratisiert bei Luftkontakt sehr rasch. Die Möglichkeit, daß die angeführten Verbindungen (Tannine und pflanzliche phenolische Verbindungen) vor hydrolytischen Prozessen schützen, muß experimentell erst noch gezeigt werden. Die von LOGAN et al. (1993) veröffentlichten Resultate bezüglich anderer biogener Makromoleküle scheinen dieser Prognose für die Lokalität bei *Clarkia* eher zu widersprechen.

Als weiteres Argument wird die Möglichkeit angeführt, daß Adsorption von DNA auf mineralischen Oberflächen konservierende Wirkung haben könnte. Doch ist die experimentelle Datenbasis für solche Aussagen nicht sehr umfangreich. ROMANOWSKI et al. (1991) haben im Zusammenhang mit Untersuchungen zu horizontalem Gentransfer festgestellt, daß Plasmid-DNA adsorbiert auf chemisch reinem Seesand, verglichen mit freier DNA in Lösung, 100 mal widerstandsfähiger gegen Abbau durch DNase I ist. ROBINS & LINDAHL (zitiert in LINDAHL 1993) geben für auf Hydroxyapatit adsorbierte DNA eine im Vergleich zur reinen wässrigen Lösung halbierte Depurinierungsrate an. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß die fossile DNA aus der Fundstelle bei *Clarkia* nicht frei vorliegt, sondern in gut erhaltenen zellulären Substrukturen eingebettet ist, d.h. sie kann gar nicht in gleicher Weise wie freie

DNA an mineralische Oberflächen adsorbiert und auf diese Weise geschützt werden.

Wie schon eingangs angesprochen erfolgte die Identifizierung der fossilen DNA aufgrund vergleichender Untersuchungen der Primärstruktur, auch als „phylogenetische Tests“ bezeichnet. Dazu äußern sich DESALLE & GRIMALDI (1994): „Lindahl's critique includes a discussion of the 'knowability' of the origin of DNA from PCR experiments using ancient tissue sources. This critique is impossible to discuss or refute without the acceptance of the phylogenetic method as the final test of the relationship of the DNA from the specimen with that of living species. The determination of the fossil DNA sequence as a close relative to living forms is really the only way that such verification can proceed. Many aspects of phylogenetic analysis have to be discussed, however, in order for such criteria to be valid.“

Fehlerquelle: Amplifikation

Ein weiteres bekanntes Problemfeld stellt die Vervielfältigung fossiler DNA mittels PCR dar. Die einfach zu handhabende Technik und die enorm hohe Empfindlichkeit dieser Methode (theoretisch würde eine Kopie eines DNA Fragments für eine Vervielfältigung mit PCR ausreichen) zählen zweifellos zu ihren Vorzügen. Diese Vorzüge verführen zum einen dazu, diese Technik in vielen Labors einzusetzen, in denen das nötige molekularbiologische Hintergrundwissen nicht verfügbar ist und dadurch fehlerhafte Ergebnisse provoziert werden. Die enorme Empfindlichkeit der PCR-Technik macht sie zum anderen anfällig für falsche Resultate durch Infektionen der Proben mit Spuren fremder DNA. So könnte gerade bei Untersuchungen fossiler DNA eine Kontamination der Probe (bei Probennahme, Transport oder Aufbereitung) zu vermeintlichen Ergebnissen führen, die jedoch nicht auf die Probe selbst, sondern auf die Verunreinigung (z.B. durch Bakterien-DNA oder andere DNA-Proben, welche im Labor bearbeitet werden) zurückgehen. In der Literatur werden diese Fehlerquellen benannt und diskutiert. LINDAHL (1993) schlägt zur besseren Absicherung der Ergebnisse vor, auch die fehlgeschlagenen Versuche, fossile DNA zu untersuchen, zu dokumentieren, damit zufällige positive Ergebnisse leichter zu erkennen sind. Des weiteren fordert er, daß auch solche Untersuchungen reproduziert werden müssen, daß eine größere Zahl von Blindproben durchgeführt werden sollen und daß auch die chemische Analytik anderer Moleküle in den Fossilien zu Vergleichszwecken verstärkt herangezogen werden sollte (vgl. auch LINDAHL 1993b; HANDT et al. 1994).

POINAR et al. (1996) haben die Razemisierungsgeschwindigkeit der Aminosäure Asparaginsäure als Prüfkriterium eingeführt, um die Wahrschein-

lichkeit besser abschätzen zu können, ob in alten Gewebeproben noch endogene DNA vorhanden ist. Diese Überlegungen basieren auf folgenden Zusammenhängen: die proteinogenen Aminosäuren kommen (mit Ausnahme von Glycin) in zwei voneinander unterscheidbaren spiegelbildlichen Formen (D- und L-Enantiomere) vor. Für die Proteinbiosynthese werden aber jeweils ausschließlich die L-Enantiomere eingesetzt. Werden Aminosäuren vom Stoffwechsel abgeschnitten, so gehen die L-Aminosäuren durch chemische Reaktionen in ein Gemisch aus D- und L-Aminosäuren über (Razemisierung). BADA et al. (1994) haben gezeigt, daß die Razemisierungsreaktion von denselben Faktoren beeinflusst wird, die auch für den hydrolytischen Abbau der DNA verantwortlich sind (Gegenwart von Wasser, pH-Wert, Temperatur, Komplexierung von bestimmten Metallionen). Außerdem haben diese Untersuchungen ergeben, daß die Razemisierung von Asparaginsäure bei neutralem pH-Wert über einen weiten Temperaturbereich eine mit der Depurinierung von DNA vergleichbare Aktivierungsenergie und Geschwindigkeitskonstante aufweist. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß bei einem D/L Verhältnis von Asparagin von 0,08 keine DNA mehr nachgewiesen werden konnte. Bei Proben mit einem Verhältnis D/L-Asparaginsäure um 0,05 (dieser Wert wird im Laborexperiment bei einer Behandlung mit 6 N Salzsäure erreicht) konnten DNA Fragmente mit 140 bis 340 bp mittels PCR vervielfältigt und nachgewiesen werden. In allen von POINAR et al. (1996) untersuchten Proben aus *Clarkia* konnte keine Asparaginsäure nachgewiesen werden, und die D/L Verhältnisse bei anderen Aminosäuren zeigten umfangreiche Razemisierung an. Nach Ansicht der Autoren spricht dieses Resultat dafür, daß es sich bei den bisher publizierten Ergebnissen über Untersuchungen fossiler DNA um Artefakte aufgrund von Kontaminationen der Proben mit moderner DNA handelt.

Ein Vergleich der beiden veröffentlichten rbcL-Sequenzen von *Magnolia latahensis* (GOLENBERG et al. 1991) und einem fossilen *Taxodium* (SOLTIS et al. 1992)² mit der DNA-Sequenz von jeweils rezenten Vertretern zeigt folgende Sequenzunterschiede:

Magnolia latahensis – *Magnolia macrophylla*: (ein rbcL Fragment von 820 bp einer Gesamtsequenz von 1431 bp wurde untersucht) 17 Substitutionen, davon 4 nicht-synonyme 1. und 2. Substitutionen (diese verursachen einen Austausch der entsprechenden Aminosäure im Genprodukt, bei 12 Veränderungen (Transitions) erfolgt im Genprodukt keine Veränderung in den Aminosäuren.

fossiles *Taxodium* – *Taxodium distichum*: (ein rbcL Fragment von 1380 bp einer Gesamtsequenz von 1431 bp wurde untersucht) 11 Substitutionen. Alle 11 Veränderungen (Transitions) sind ohne verändernden Einfluß auf das Genprodukt. Diese Differenzen sind zwar markant, insgesamt

aber doch so geringfügig, daß sie deutlich gegen eine Kontamination der fossilen DNA-Proben mit rezenter DNA sprechen, wobei die Variationsbreite der rezenten Pflanzen nicht genau untersucht ist und somit eine letzte Beurteilung aussteht. Das unterstreicht auch PÄÄBO (1996), wenn er seine skeptische Haltung zur Frage der Originalität dieser fossilen DNA-Sequenzen mit der Bemerkung abschließt: „Thus, at the moment I would keep an open mind on the authenticity of these sequences.“

Schlußfolgerung

Angeichts der vorliegenden und hier vorgestellten Veröffentlichungen über die Untersuchungen fossiler DNA aus dem Miozän von der Fossilagerstätte bei Clarkia, Idaho, scheint das von vielen Autoren aus diesem Arbeitsgebiet immer wieder geforderte Kriterium der Reproduzierbarkeit (z.B. HANDT et al. 1994) vorläufig erfüllt zu sein. Deswegen bleibt zu hoffen, daß angesichts der Ergiebigkeit dieses Fundorts noch eine große Zahl von Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt werden.

Andererseits erfordern die kritischen Anfragen nach der chemischen Langzeitstabilität des Makromoleküls DNA viel substanziellere Antworten als die gegenwärtig vorliegenden, damit diese Fragen als beantwortet gelten können.

Die Anfragen nach der chemischen Langzeitstabilität der DNA erfordern viel substanziellere Antworten als die gegenwärtig vorliegenden.

In dieser zwiespältigen Situation scheinen dem Autor verschiedene Möglichkeiten zukünftiger Strategien möglich. Die postulierten Schutzmechanismen gegen einen vollständigen Abbau der DNA bedürfen dringend einer experimentellen Grundlage; hier ist der gegenwärtige Erkenntnisstand absolut unbefriedigend. Dabei darf allerdings nicht übersehen werden, daß auch gute experimentelle Grundlagen prinzipiell keinen letzten Beweis für die Wirksamkeit eines solchen Mechanismus für die Konservierung fossiler DNA in der geologischen Zeitspanne erbringen können. Dies deshalb, weil die Fragestellung nach ihrer Grundstruktur eine historische ist und darum grundsätzlich nicht mit naturwissenschaftlichen Methoden direkt beantwortet werden kann, sondern nur Möglichkeiten aufgezeigt werden können, die nicht im Widerspruch zu unserem gegenwärtigen Erkenntnisstand stehen. Um den Resultaten von Untersuchungen zu fossiler DNA eine größere Aussagekraft zu verlei-

hen, ist es aus der Sicht eines Chemikers unbedingt wünschenswert, diese insofern breiter anzulegen, als daß auch andere biogene Makromoleküle mit einbezogen werden. Erfreulicherweise sind erste Schritte in dieser Richtung unternommen worden (LOGAN et al. 1993; BADA et al. 1994), auch wenn die Empfindlichkeit der Analysemethoden für andere Makromoleküle im Vergleich zur PCR z.T. erheblich geringer sind.

Solange sich keine durch experimentelle Befunde gestützten Argumente finden lassen, welche eine Konservierung der molekularen Struktur der DNA über lange Zeiträume vorstellbar machen, stehen die zeitlichen Zuordnungen geologischer Schichtfolgen im Widerspruch zu den Befunden der fossilen DNA.

Anmerkungen

- ¹ Schriftliche Anfragen an Dr. E. M. GOLENBERG und Dr. P. S. SOLTIS nach weiteren Daten zu fossiler DNA aus Clarkia-Fossilien blieben bisher unbeantwortet.
- ² Weitere Sequenzdaten, die in den Publikationen erwähnt werden, habe ich auf schriftliche Anfragen bei den Autoren bis heute nicht erhalten.

Literatur

- BADA JL, WANG XS, POINAR HN, PÄÄBO S & POINAR GO (1994) Amino acid racemization in amber-entombed insects: implications for DNA preservation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 3131-3135.
- DESALLE R & GRIMALDI D (1994) Very old DNA. *Curr. Op. Genetics Develop.* 4, 810-815.
- EGLINTON G & LOGAN GA (1991) Molecular preservation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333, 315-328.
- FREDERICO LA, KUNKEL TA & SHAW BR (1990) A sensitive genetic assay for the detection of Cytosine deamination: Determination of rate constants and the activation energy. *Biochem.* 29, 2532-2537.
- GOLENBERG EM (1991) Amplification and analysis of Miocene plant fossil DNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333, 419-427.
- GOLENBERG EM, GIANNASI DE, CLEGG MT, SMILEY CJ, DURBIN M, HENDERSON D & ZURAWSKI G (1990) Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. *Nature* 344, 656-658.
- GOODHEAD DT (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 7-17.
- HAGEN U (1987) Genetische Wirkung kleiner Strahlendosen. *Naturwissenschaften* 74, 3-11.
- HANDT O, HÖSS M, KRINGS M & PÄÄBO S (1994) Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 50, 524-529.
- HIGUCHI R, BOWMAN B, FREIBERGER M, RYDER OA & WILSON AC (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312, 282-284.
- KARRAN P & LINDAHL T (1980) Hypoxanthin in deoxyribonucleic acid: generation by heat induced hydrolysis of Adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochem.* 19, 6005-6011.
- LINDAHL T & NYBERG B (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochem.* 11, 3610-3618.
- LINDAHL T & ANDERSSON A (1972) Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochem.* 11, 3618-3623.
- LINDAHL T (1993a) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- LINDAHL T (1993b) Recovery of antediluvian DNA. *Nature* 365, 700.
- LOGAN GA, BOON JJ & EGLINTON G (1993) Structural biopolymer preservation in Miocene leaf fossil from the Clarkia site, northern Idaho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2246-2250.
- MULLIS KB (1990) Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft* (6) 60-67.
- PÄÄBO S (1985) Molecular cloning of an Egyptian mummy DNA. *Nature* 314, 644-645.
- PÄÄBO S (1996) Persönliche Mitteilung vom 21.10.1996
- PÄÄBO S & WILSON AC (1991) Miocene DNA sequences – a dream come true? *Current Biology* 1, 45-46.
- POINAR HN, CANO RJ & POINAR JR. GO (1993) DNA from an extinct plant. *Nature* 363, 677.
- POINAR HN, HÖSS M, BADA JL & PÄÄBO S (1996) Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272, 864-866.
- ROMANOWSKI G, LORENZ MG & WACKERNAGEL W (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1057-1061.
- RYDBERG B & LINDAHL T (1982) Nonenzymatic methylation of DNA by the intra cellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO J.* 1, 211-216.
- SCHULTE-FROHLINDE D (1990) Die Chemie des zellulären Strahlentodes. *Chem. i. u. Zeit* 24, 37-44.
- SETLOW P (1992) I will survive: protecting and repairing spore DNA. *J. Bact.* 174, 2737-2741.
- SETLOW B & SETLOW P (1995) Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1787-1790.
- SMILEY CS (ed, 1985) Late Cenozoic History of the Pacific Northwest. AAAS, San Francisco, California.
- SIDOW A, WILSON AC & PÄÄBO S (1991) Bacterial DNA in Clarkia fossils. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333, 429-433.
- SOLTIS PS, SOLTIS DE & SMILEY CJ (1992) An rbcL sequence from a Miocene Taxodium (bald cypress). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 449-451.