

SUSANNE HUMMEL und BERND HERRMANN

FILM C 1854

Molekularbiologische Analyse alter DNA

Sonderdruck

Publ. Wiss. Film. Biol. 22 (1996), 213–232.

SUSANNE HUMMEL und BERND HERRMANN: Molekularbiologische Analyse alter DNA. Film C 1854. ISSN 0073–8417



GÖTTINGEN 1996

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

SUSANNE HUMMEL und BERND HERRMANN

Molekularbiologische Analyse alter DNA

Film C 1854

Mit 5 Abbildungen

Allgemeine Vorbemerkungen

Für molekulargenetische Studien steht ein weites Spektrum alter biologischer Quellenmaterialien zur Verfügung. Zu den natürlichen Erhaltungsformen zählen Überreste von Menschen, Tieren oder Pflanzen, wie Skelette, Bernsteineinschlüsse und Fossilien, also archäologisch und paläontologisch relevante Objekte. Es können dies aber auch Reste einzelner Gewebe sein, die in den Bereich der biologischen Spurenkunde zu ordnen sind, z. B. Blutspuren und Haare. Zu den artefiziellen Erhaltungsformen gehören ägyptische Mumien, präparierte Tierbälge und Herbarobjekte, außerdem Gewebeeinbettungen der Histopathologie und fixierte Präparate der medizinischen Anatomie. Vielfältig wie das Spektrum der Quellenmaterialien ist auch der Themenkatalog, der den molekulargenetischen Untersuchungen zugrundeliegt (HERRMANN u. HUMMEL [15]). Die Ansätze reichen von der Überprüfung und Erforschung evolutiver und phylogenetischer Zusammenhänge über die Populationsgenetik bis hin zur Identifikation genetischer Eigenschaften auf Individualebene.

Desoxiribonukleinsäure

Gegenstand dieser Untersuchungen sind Fragmente der Desoxiribonukleinsäure (DNA), die über den Tod hinaus in den Geweberesten erhalten bleiben können. Nahezu alle Zellen lebender Organismen enthalten DNA, den Träger der vollständigen genetischen Information eines Individuums. Durch die spezifische Abfolge der vier verschiedenen Nukleotide, aus denen sich das helikal gewundene Makromolekül zusammensetzt, die sogenannte Basensequenz, ist die genetische Information codiert.

Während prokaryontische Organismen wie Bakterien und Hefezellen vergleichsweise einfach strukturierte zirkuläre DNA-Stränge enthalten, weisen Eukaryonten wie Tiere, Pflanzen und Pilze in ihren Zellen verschiedene Typen von DNA auf. Die chromosomale oder nukleare DNA aus den Zellkernen wird von zwei elterlichen Individuen ererbt. Durch die Neukombination der Keimbahnzellen Ei und Spermium, die nur einen einfachen Chromosomensatz aufweisen, sowie durch rekombinante Prozesse bei den ersten Zellteilungen weist dieser DNA-Typ eine sehr hohe individuelle Spezifität auf. Chromosomale DNA ist damit zur Identifikation von Einzelindividuen oder zur Bestimmung von Verwandtschaftsgraden geeignet. Daneben ist DNA auch in den Mitochondrien enthalten, die den Energiestoffwechsel der Zelle regulieren. Im Vergleich zur individualspezifischen chromosomalen DNA ist mitochondriale (mt-)DNA wesentlich einheitlicher, basierend auf einem weitgehend mütterlichen Vererbungsweg. Durch die daraus resultierende unveränderte Weitergabe mitochondrialer DNA über Generationen hinweg ist mt-DNA für die Untersuchung evolutiver und phylogenetischer Fragestellungen geeignet, weil Unterschiede in der Basensequenz im wesentlichen auf Mutationen im Zeitverlauf zurückzuführen sind.

Dekomposition und DNA-Erhaltung

Voraussetzung für das Überdauern von genetischer Information ist die Unterbrechung des quantitativen biogenen Abbaus von Geweben, der unmittelbar nach dem Tod mit autolytischen Prozessen beginnt und fortschreitet über Fäulnis und Verwesung. Von der Autolyse, der Selbstzerstörung des Organismus, sind insbesondere enzym- und wasserreiche Gewebe wie die Leber und das Gehirn betroffen (BÄR U. a. [1]). Unter Flüssigkeitsverlust schließt sich die zweite Phase der Zerstörung an, die Fäulnis des toten Organismus, an der anaerobe Bakterien beteiligt sind. Zur weiteren Dekomposition, der Verwesung, tragen Pilze und später auch aerobe Bakterien und höhere Organismen, wie beispielsweise Insekten oder Wirbeltiere, bei (BERG [2]). Ebenfalls gewebezerstörend sind physikalische und chemische Dekompositionsfaktoren, wie Luft- oder Bodenfeuchte, Temperatur, pH-Wert, UV-Strahlung und radioaktive Belastung (EGLINGTON U. LOGAN [7]).

Geeignete physikalische und chemische Faktoren für das Überdauern von DNA sind Trockenheit, annähernde pH-Neutralität, Kälte oder eine Behandlung mit konservierenden Substanzen. Bei einem raschen Austrocknen von Geweben, wie beispielsweise bei natürlichen oder intendierten Mumifikationen gegeben, ist die Erhaltungsaussicht von analysefähiger DNA ebenso

wie in enzym- und wasserarmen Geweben, wie Knochen und Zähnen, erhöht (COOPER [4]; LASSEN [23]). Von den physiko-chemischen Dekompositionsfaktoren nimmt vor allem der pH-Wert des umgebenden Sediments bei bodenbestatteten Individuen Einfluß auf den Zustand der DNA. Da DNA in saurem Milieu vollständig hydrolysiert, es im stark alkalischen Bereich dagegen verstärkt zu Brüchen des Doppelstranges oder auch zur Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge kommt, sind besonders günstige Voraussetzungen für den Erhalt von DNA in etwa pH-neutralen Umgebungen oder leicht alkalischem Milieu gegeben (GOLENBERG [9]). Strukturveränderungen der DNA müssen im toten genau wie im lebenden Gewebe auch durch längerfristige UV-Exposition und radioaktive Strahlung angenommen werden. Neben sogenannten „cross-links“ durch „Verkleben“ des Doppelstranges kann es durch den Austausch von Basen zu Veränderungen der Basensequenzen kommen.

Im Hinblick auf DNA-Extraktion und PCR-Analyse kann zusammengefaßt werden, daß biogene Dekomposition zunächst nur eine Degradierung der im Organismus vorhandenen DNA bewirkt und damit die Chancen auf eine erfolgreiche Analyse längerer DNA-Abschnitte verringert. Besiedeln beispielsweise Mikroorganismen ein Gewebe, so muß bei der Analyse der DNA an Störungen durch den Eintrag von Fremd-DNA gedacht werden. Relativ gering scheint dieser Eintrag erwartungsgemäß in sehr harten und daher auch dauerhaften Geweben wie Zähnen zu sein. Durch längerfristig wirksame physiko-chemische Faktoren wird darüber hinaus auch die Struktur von DNA in einer Weise angegriffen, die zu Änderungen von Basensequenzen führen kann. Solche Strukturveränderungen müssen nicht zwangsläufig zu einer verminderten Amplifikationsfähigkeit führen. Bei der Interpretation von Sequenzabweichungen in Evolutionsstudien sollte die Möglichkeit einer „postmortalen Mutation“ jedoch nicht unbeachtet bleiben.

Eine Inhibition der Amplifikation wird dagegen praktisch regelhaft von Verunreinigungen verursacht, die in Form bräunlicher Rückstände in aDNA-Extrakten zu beobachten sind und bei kurzweiliger UV-Anregung blau-grün fluoreszieren. Sie sind entweder auf Fixantien aus der musealen Präparations-technik oder auf die in das Skelettmaterial aus dem Sediment eingewanderten Huminsäuren zurückzuführen.

Quellermaterialien und Erkenntnisinteresse

Evolutionsbiologische Arbeiten analysieren Sequenzunterschiede an hoch-repetitiver mitochondrialer DNA. Untersucht wurden beispielsweise DNA-Proben des ausgestorbenen neuseeländischen Moa (COOPER u. a. [5])

und von menschlichen ägyptischen Mumien (PÄÄBO [27]). Nachzuweisen waren entsprechende Sequenzen auch in Proben einer 17 Millionen Jahre alten Magnolienart (GOLENBERG u. a. [10]) oder im bislang ältesten Quellenmaterial, zwischen 25 und 120 Millionen Jahre alten Insekten aus Bernsteinschlüssen (POINAR u. a. [30]).

Populationsgenetische Arbeiten dagegen können sowohl an mitochondrialer als auch an chromosomaler DNA durchgeführt werden, wie beim Nachweis von mitochondrialen Sequenzen und chromosomalen HLA-Genen aus 7000 Jahre alten Gehirnresten einer nordamerikanischen menschlichen Population (PÄÄBO u. a. [28]; LAWLOR u. a. [24]).

Die Bestimmung individueller genetischer Eigenschaften erfolgt an chromosomaler DNA. Zur Identifikation wird ein Vergleich nicht-codierender Mikrosatelliten-DNA an Blut, Haaren¹ oder an wenige Jahre alten knöchernen Überresten² durchgeführt. Nachweise spezifisch Y-chromosomaler DNA zur Geschlechtsfeststellung sind auch an mittelalterlichen archäologisch geborgenen Skelettindividuen möglich (HUMMEL u. HERRMANN [18]; HUMMEL [17]).

Im Bereich der medizinischen Forschung ermöglicht die molekularbiologische Untersuchung alter histopathologischer Präparate neue Erkenntnisse zur Epidemiologie von Infektionskrankheiten. Durch die Untersuchung individueller Präparate erfolgen Annäherungen an die Geschichte moderner Krankheiten wie der HIV-Infektion, der Hepatitis oder der Herpes-Infektion (GRÜNEWALD u. a. [12]; GRODY [11]). Für weiter in die Vergangenheit gerichtete epidemiologische Studien (HERRMANN u. SPRANDEL [16]; PADBERG [26]) der heute nahezu besiegtten Seuchen oder infektiösen chronischen Erkrankungen stehen den umweltgeschichtlich-historischen Wissenschaftszweigen als Quellenmaterialien neben Skelettresten auch mittelalterliche Kloaken zur Verfügung (HERRMANN [14]). Durch ihre Analyse sind Untersuchungszugänge auf Gruppen- oder Populationsniveau denkbar.

Ermöglicht werden diese neuen Zugänge durch die Etablierung der erst Mitte der achtziger Jahre entwickelten Polymerase Chain Reaction (PCR). Durch die große Sensitivität des Analyseverfahrens lassen sich genetisch determinierte und erworbene individuelle oder kollektive molekularbiologische Eigenschaften auch noch an alten biologischen Quellen feststellen, die bereits einen mehr oder weniger intensiven Dekompositionsprozeß durchlaufen haben.

¹ SENSABAUGH u. VON BEROLDINGEN [37]; EDWARDS u. a. [6]; SAJANTILA [35].

² HAGELBERG u. a. [13]; JEFFREYS u. a. [21].

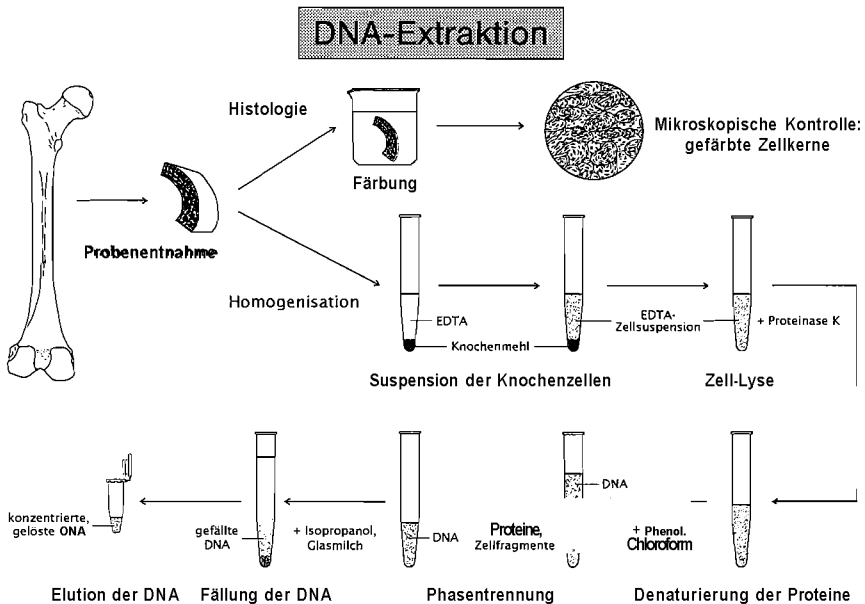


Abb. 1. Schematisierte Darstellung der Probenvorbereitung und des Extraktionsvorganges am Beispiel von Knochen (vgl. auch HUMMEL U. HERRMANN [19])

Zeichnung: HUMMEL, HERRMANN U. ZIERDT

Extraktion und Polymerase Chain Reaction

Für die Gewinnung von DNA aus biologischen Geweben müssen der Zellverband aufgelöst und die in großem Umfang vorhandenen Proteine enzymatisch und chemisch denaturiert werden. Durch eine Abfolge automatisierter Extraktions- und Reinigungsschritte werden alle Zellkomponenten bzw. deren denaturierte Reste von der DNA abgetrennt (Abb. 1). DNA-Extrakte aus alten Geweben weisen im Vergleich zu modernen Kontrollproben kleinere Mengen an DNA und diese als Folge der Dekomposition vorwiegend im niedermolekularen Bereich auf (Abb. 2).

Das der Polymerase Chain Reaction (PCR) zugrundeliegende Prinzip¹ ist die Vermehrung eines einzelnen, definierten DNA-Abschnittes *in vitro* (Abb. 3). Es kann sich hierbei um ein Gen, also eine funktionstragende Einheit auf

¹ MULLIS U. FALOONA [25]; SAIKI U. A. [34]; ERLICH [8]; CHA U. THILLY [3].

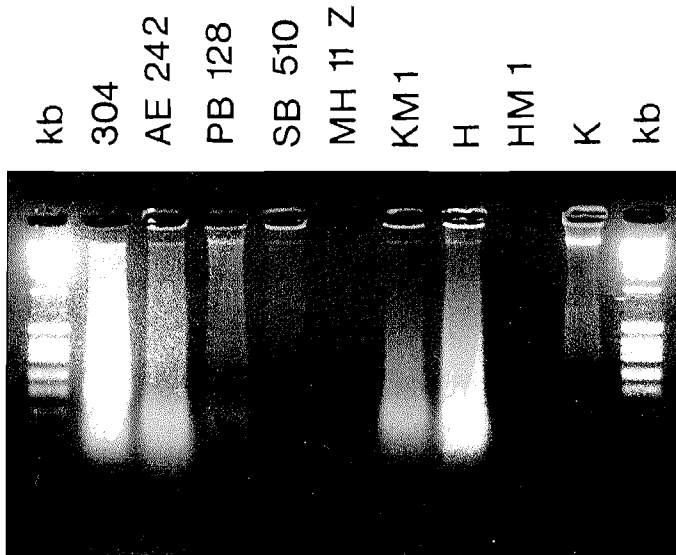


Abb. 2. Extraktion von DNA aus rezenten Knochen (304), rezenter Haut (H) und mittelalterlichen bis frühneuzeitlichen Knochenproben (Ae 242, PB 128 und SB 510). Bei MH 11Z handelt es sich um DNA aus einem frühmittelalterlichen Zahn. KM 1 und HM 1 sind Extraktionen aus Knochen- bzw. Hautproben einer südamerikanischen, präkolumbischen Mumie. K ist DNA aus einer mittelalterlichen Kloakenprobe. kb = DNA-Molekulargewichtsstandard. Die Extraktionen aus rezenten Knochen enthalten große Mengen auch hochmolekularer DNA, während alte Proben in der Regel nur kleinere Mengen vorwiegend niedermolekularer DNA enthalten.

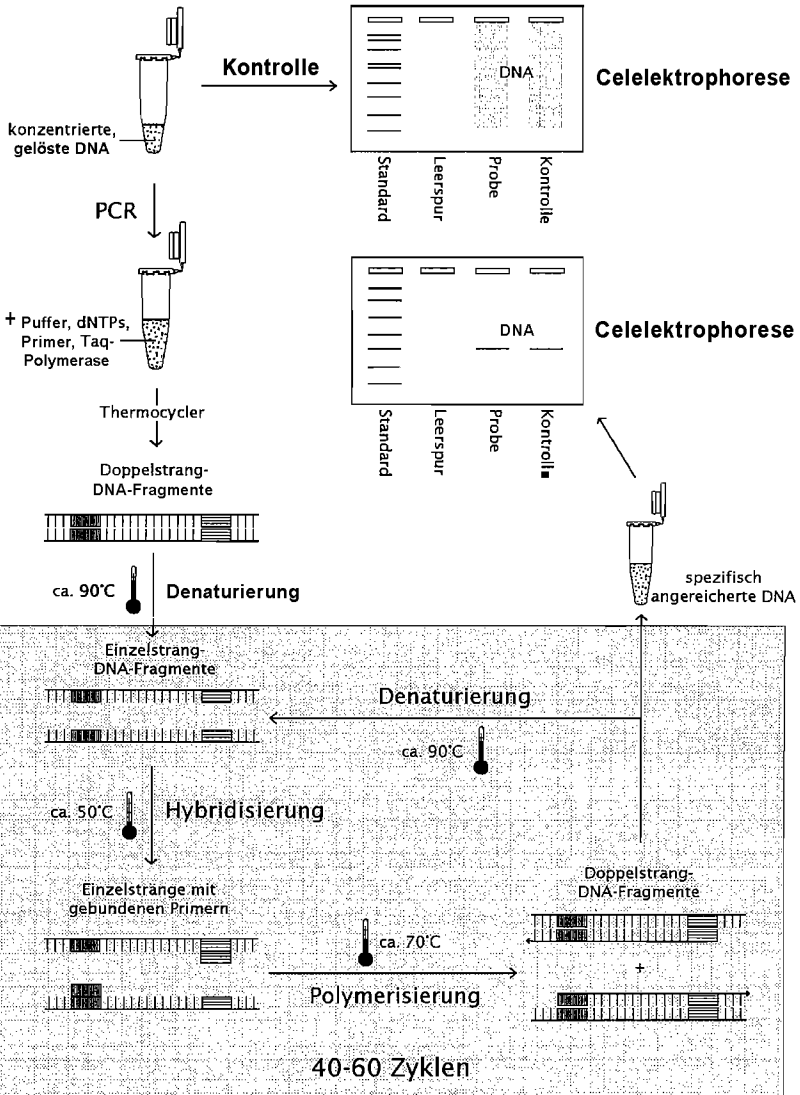
Foto: HUMMEL u. HERRMANN

einem Clirinosoin, handeln oder auch um einen nicht-codierenden Abschnitt, wie beispielsweise Mikrosatelliten-DNA (Abb. 4 und 5). Die Vermehrung eines solchen DNA-Abschnittes, die sogenannte Amplifikation, erfolgt im Verlauf einer zyklisch wiederkehrenden Abfolge von verschiedenen

Abb. 3. Schematisierte Darstellung der ersten Amplifikationszyklen einer Polymerase Chain Reaction

Zeichnung: HUMMEL, HERRMANN u. ZIERDT

Polymerase Chain Reaction



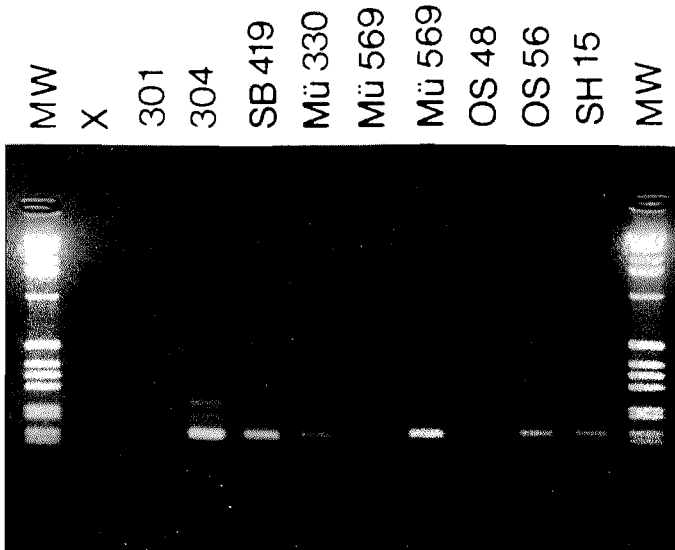


Abb. 4. Ergebnisse einer Anplifikation mit Primern, die spezifisch für einen 154 Basenpaare langen, auf dem Y-Chromosom lokalisierten DNA-Abschnitt sind. Sowohl die Kontrollprobe 304 eines rezenten männlichen Individuums als auch alle alten Proben männlicher Individuen weisen deutliche PCR-Produkte auf. Dagegen zeigen die Leerkontrolle X, die rezente Negativkontrolle 301 und OS 48 von weiblichen Individuen erwartungsgemäß keine Amplifikationsprodukte. MW = Molekulargewichtstandard.

Foto: HUMMEL U. HERRMANN

Temperaturen, denen das Reaktionsgemisch ausgesetzt wird. Mit der PCR steht nun auch Wissenschaftszweigen eine Methode zur Verfügung, denen bisher allein durch den schlechten Überlieferungscharakter ihrer Quellenmaterialien der Zugang zu molekularbiologischen Untersuchungen versperrt war (z.B. ROGAN U. SALVO [32], REYNOLDS U. SENSABAUGH [31]).

Kontrollproben

Durch die hohe Empfindlichkeit der PCR gerade im Spurenbereich, aber auch durch ihre Anfälligkeit gegen Störungen des Reaktionsverlaufes kommt der Auswahl von Kontrollproben besondere Bedeutung zu. Da nur geringe

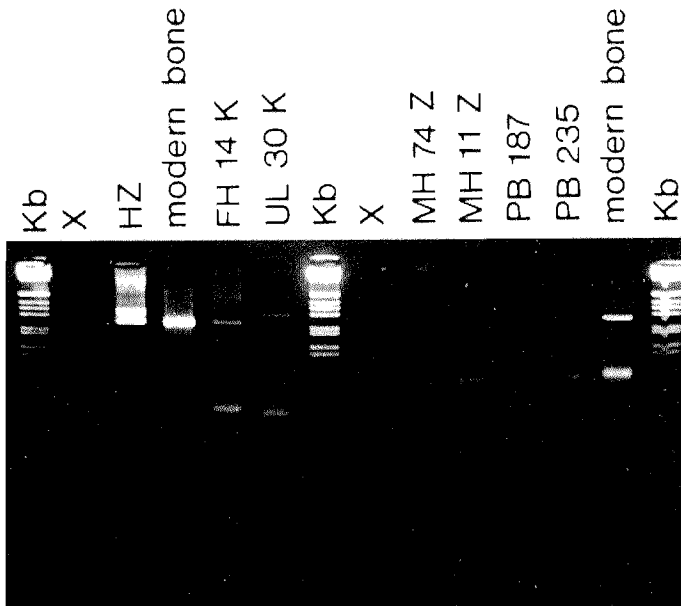


Abb. 5. Amplifikationsergebnisse mit Primern, die spezifisch für verwandtschaftsanzeigende Mikrosatelliten-DNA sind. Links im Bild mit dem Primer-System SE 33 (237–312 Basenpaare) die Kontrollproben HZ aus Speichel und rezente Knochen. Die alten Knochenproben FH 14K und UL 30K weisen zwar etwas schwächere, aber deutlich erkennbare PCR-Produkte auf. Rechts, mit dem System Mfd 49 (78–98 Basenpaare), sind die Produkte der alten Proben MH 74Z, MH 11Z, PB 187 und PB 235 nahezu gleich stark wie die der rezente Knochenprobe. Dies ist auf die statistisch höhere Zahl noch intakter DNA-Fragmente (targets) bei Amplifikationen von niedermolekularen PCR-Produkten zurückzuführen. Kb = Molekulargewichtstandard.

Foto: HUMMEL LI. HERRMANN

Mengen an DNA eingesetzt werden können und daher hohe Zyklenzahlen erforderlich sind, müssen besonders Kontaminationen des sogenannten „carry-over“-Typs (Kwok [22]) vermieden und kontrolliert werden.

Neben den allgemein in der PCR-Technik üblichen Leerkontrollen – eine solche Probe enthält zwar sämtliche Reaktionskomponenten, aber keine DNA – sollte wenn möglich auch eine sogenannte Negativkontrolle mitge-

führt werden. Diese Probe enthält DNA, die sicher nicht den ausgewählten Abschnitt aufweist, die aber den gesamten Extraktionsvorgang durchlaufen hat. Kontaminationen der Proben während des Arbeitsverlaufes lassen sich auf diese Weise sicher ausschließen. Positivkontrollen dienen der Überprüfung der Reaktionsparameter und stellen einen regulären Reaktionsverlauf fest. Sie enthalten DNA mit dem gesuchten Sequenzabschnitt und sollten den zu untersuchenden alten Proben hinsichtlich ihrer Herkunft und ihrer stofflichen Zusammensetzung so ähnlich wie möglich sein. Dies ist insbesondere wichtig für die Anpassung der Reaktionsparameter an die spezifischen Erfordernisse alter DNA-Extrakte. Eine solche Anpassung kann neben der Festlegung der Zyklenzahl beispielsweise auch in der Auswahl besonderer PCR-Techniken bestehen, wie beispielsweise biphasischer Amplifikationen mit voneinander abweichenden Stringenzkriterien (RUANO U. KIDD [33]; PÅÅBO u. a. [29]; HUMMEL U. a. [20]). Durch die Wahl geeigneter Kontrollproben können falsch-positive oder falsch-negative Amplifikationsergebnisse zwar nicht vermieden, aber sicher als solche erkannt werden.

Filmbeschreibung

Wortlaut des gesprochenen Kommentars¹

Alle lebenden Organismen besitzen genetische Information, durch die ihr Lebensweg bis hin zum Tod mitbestimmt wird. Die genetische Information ist in Form von DNA in jeder Zelle des Organismus vorhanden. Nach dem Tod werden durch Autolyse und Dekomposition alle komplexen Strukturen und Moleküle in ihre Grundbausteine zerlegt.

Durch besondere Erhaltungsbedingungen kann es selbst über sehr lange Zeiträume hinweg zu einem Überdauern sowohl der morphologischen als auch der molekularen Strukturen kommen wie hier bei der Fossilisierung von mehrere Millionen Jahre alten Pflanzenteilen durch den Eintrag von Mineralien.

Auch durch eine schnelle Austrocknung wird die genetische Information beispielsweise in Pflanzensamen gespeichert oder überdauert in mumifizierten Geweben, wie in diesen Gehirnresten einer mittelalterlichen Bestattung.

¹ Die kursiv gesetzten Textteile geben Einblendungen im Film wieder.

Auch biologische Spuren wie Blutstropfen durchlaufen einen Mumifikationsprozeß durch Austrocknung, ebenso die Zellen eines Haarbalges, die für die forensische Spurensicherung gleichfalls von Bedeutung sein können.

Ein Überdauern der Makro- und Mikrostrukturen kann auch durch die Behandlung der Gewebe mit konservierenden Chemikalien erzielt werden – praktiziert an menschlichen Leichnamen im alten Ägypten oder als Präparationsstechnik im musealen Bereich.

Ebenfalls konservierenden Charakter hat das beabsichtigte oder zufällige Einfrieren eines Organismus. – Der luftdichte Einschlug in Bernstein ist eine natürliche Konservierung, deren Prinzip bei der Einbettung von histologischen Präparaten in Kunststoff Anwendung findet.

Eine große Vielfalt an Geweberesten pflanzlicher, tierlicher und menschlicher Herkunft weisen Proben aus mittelalterlichen Kloaken auf. Praktisch regelhaft überdauern die Hartgewebe eines Organismus: Knochen und Zähne.

Alle diese Überreste enthalten noch Reste von Zellen und damit genetische Information, wenn auch lediglich in Fragmenten. Durch moderne molekularbiologische Techniken ist es seit kurzem möglich, auch diese bruchstückhafte Information auszuwerten mit dem Ziel, neue und zuverlässigere Erkenntnisse zu erhalten, zu Fragen der Evolution und der Populationsgenetik im Tier- und Pflanzenreich.

Solche molekularen Analysen ermöglichen auch die Feststellung genetisch determinierter Eigenschaften von Individuen aus längst vergangenen Epochen wie ihre Geschlechtszugehörigkeit und den Verwandtschaftsgrad, hier durch einen hypothetischen Stammbaum veranschaulicht.

Um Untersuchungen an alter, degradierter DNA – *aDNA-Analyse* –, kurz aDNA, vornehmen zu können, muß die DNA aus dem Gewebeverband isoliert werden – Extraktion –, um einen oder mehrere Abschnitte der extrahierten DNA zu vervielfältigen – Amplifikation – und gegebenenfalls eine Analyse der amplifizierten Abschnitte durchzuführen – *Sequenzierung*.

Die für eine aDNA-Analyse zu beachtenden Kriterien bei der Probenauswahl, der Probenvorbereitung, den Techniken der DNA-Extraktion, der Amplifikation und der Sequenzierung werden am Beispiel einer molekularen Geschlechtsdiagnose an mittelalterlichem Skelettmaterial demonstriert. Für die Extraktion von DNA sind bereits kleinste Probenmengen ausreichend, im Fall von Knochen reicht schon ein halbes Gramm.

Bei aDNA-Analysen sind Proben mit kleinen Außenflächen zu bevorzugen, da die Außenflächen mit moderner menschlicher DNA kontaminiert sein können.

Zur Dekontamination der Probe wird mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254nm bestrahlt. Hierdurch findet eine Inaktivierung kontaminierender DNA statt, die sich beispielsweise in kleinsten Speicheltröpfchen auf der Objektoberfläche befinden kann. Um eine vollständige Inaktivierung zu gewährleisten, wird die Probe von allen Seiten bestrahlt.

Die eigentliche Extraktion von DNA aus den gewebeeigenen Zellen erfordert zunächst eine grobe mechanische Zerkleinerung des Knochenstückes. Der Zerkleinerung schließt sich eine weitgehende Homogenisierung der Fragmente zu Knochenmehl an. Durch diese Vergrößerung der Probenoberfläche läßt sich der chemische Aufschluß beschleunigen.

Das Knochenmehl wird in sterile Probengefäße überführt und mit einer gepufferten Lösung aus 0,5 molar EDTA versetzt. EDTA bewirkt eine Auflösung der anorganischen Knochenmatrix und schafft damit eine wichtige Voraussetzung für den späteren Zellaufschluß.

Dieser Prozeß wird durch eine kontinuierliche Bewegung der Proben gefördert.

aDNA-Analyse / Extraktion / Amplifikation / Sequenzierung

Die Extraktion – **Extraktion** – besteht aus drei Schritten: der Zell-Lyse – **Zell-Lyse** –, der Denaturierung und Entfernung von Proteinen – **Protein-Denaturierung** – sowie der Fällung, Reinigung und Konzentration – **DNA-Konzentration** – der in wäßriger Lösung verbliebenen DNA.

Nach ein bis zwei Tagen ist die Probenvorbereitung abgeschlossen. Während die rezenten Kontrollpräparate gelblich weiß sind, weisen Proben von bodengelagertem archäologischem Skelettmaterial meist braune Verfärbungen durch Huminstoffe auf.

In der wäßrigen Lösung befinden sich jetzt vorwiegend einzelne Zellen bzw. deren Fragmente, aber auch wenige, schon freie Nukleinsäuren.

Für den maschinellen Extraktionsvorgang werden die Proben verdünnt. Die hierfür benötigte Lösung befindet sich in den Probengefäßen des Extraktors.

Durch den Zusatz von Proteinase K in dieser Lösung wird eine quantitative Zell-Lyse erreicht.

Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 56 °C sind Zellkerne und Zellorganellen, wie die DNA-tragenden Mitochondrien, in die Probenlösung freigesetzt.

Für die vollständige Denaturierung der jetzt in Lösung befindlichen Zellbestandteile werden die Proben mit Phenol versetzt. Phenol greift insbesondere die Histone an, welche die DNA im Zellkern komprimiert halten.

Nach etwa zehnminütigem Schütteln der Proben wird die phenolische Phase entfernt. In ihr sowie in der sogenannten Interphase befinden sich die denaturierten Zellbestandteile. In der wässrigen Phase dagegen, die nach der Behandlung mit Phenol eine Farbveränderung aufweisen kann, ist jetzt die aus den Zellkernen und Mitochondrien stammende DNA in Lösung.

Nach der Phenolextraktion wird eine weitere Extraktion der Probe mit dem leichter abtrennbaren Chloroform durchgeführt, um verbliebene Spuren von Phenol zu entfernen.

An diese Reinigungsschritte schließt sich eine Konzentration der DNA an. Diese wird durch Zugabe einer Trägersubstanz, der sogenannten Glasmilch, erreicht. Die Probe muß hierfür mit reinem Alkohol versetzt worden sein.

Während der etwa zehnminütigen Inkubationszeit binden die DNA-Moleküle adsorptiv an die Glasmilch. Der so entstandene DNA-Glasmilch-Verband wird auf den feinporigen Filtern an der unteren Öffnung der Probengefäße zurückgehalten.

Durch die Bindung an Glasmilch werden vor allem niedermolekulare DNA-Fragmente von nur wenigen hundert Basenpaaren Länge ausgefällt, die in alten Proben überwiegen.

Die an die Glasmilch gebundenen DNA-Abschnitte sollen jetzt wieder in Lösung gebracht werden. Hierfür wird das Filterpapier aus dem Filterhalter entnommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt.

Durch Spülen mit einem kleinen Volumen Wasser wird die DNA von der Glasmilch gelöst. Anschließend wird die Glasmilch durch Zentrifugieren von der Lösung abgetrennt.

Zur Überprüfung des Extraktionserfolges wird mit einem Teil des Probenvolumens eine Elektrophorese durchgeführt. Die Proben werden mit einer gefärbten Schwerelösung vermischt und in die Taschen eines Agarosegels einpipettiert.

Für die spätere Abschätzung der DNA-Fragmentlängen wird schließlich noch ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA nach Fragmentlängen erfordert etwa eine Stunde.

Bei Durchstrahlung des ethidiumbromidgefärbten Gels mit UV-Licht wird die DNA sichtbar. Zwischen den rezenten und den alten Proben sind deutlich Unterschiede zu erkennen.

Hochmolekulare DNA überwiegt in rezenten Proben: Typisch für alte Proben sind kleinere Mengen stark fragmentierter, niedermolekularer DNA.

Im Längenstandard ist hier ein Abschnitt mit etwa 1000 Basenpaaren zu sehen. – Hier ein Abschnitt mit etwa 100 Basenpaaren.

Alte Proben weisen außerdem gelegentlich Verunreinigungen z. B. durch Huminstoffe auf.

aDNA-Analyse / Extraktion / Amplifikation / Sequenzierung

Um die Amplifikation, also die Vermehrung des DNA-Abschnittes, zu erzielen, wird die Polymerase Chain Reaction – Polymerase Chain Reaction –, kurz PCR, eingesetzt.

Essentielle Komponenten einer PCR sind neben der zu untersuchenden DNA – DNA – zwei verschiedene Startermoleküle, sogenannte Primer – *Primer* –, freie Nukleotide – *dNTPs* – und das temperaturstabile Enzym Taq-Polymerase – *Taq-Polymerase* – in einer gepufferten Lösung – Reaktionspuffer.

Durch Zusammenfügen dieser Komponenten in bestimmten Konzentrationsverhältnissen zu einem Reaktionsgemisch wird die Vervielfältigung des gesuchten DNA-Abschnittes erreicht. Dazu muß das Reaktionsgemisch in einem programmgesteuerten Thermostaten zyklisch wechselnden Temperaturen ausgesetzt werden.

Zunächst wird die Denaturierungstemperatur von 94 °C angesteuert. Da insbesondere bei der Arbeit mit degradiertem aDNA nur relativ wenige intakte DNA-Abschnitte in die PCR-Reaktion eingesetzt werden können, muß die vergleichsweise hohe Zahl von 30–60 Zyklen durchlaufen werden.

Während die DNA bei Raumtemperatur noch als Doppelstrang vorliegt, teilt sie sich bei 94 °C in zwei Einzelstränge. Bei 58 °C hybridisieren die Primer genau an diejenigen Stellen der Einzelstränge, die den gesuchten DNA-Abschnitt begrenzen.

Initiiert durch das Enzym Taq-Polymerase wird bei 72°C an den DNA-Einzelsträngen von den Startermolekülen ausgehend mit dem Aufbau je eines Gegenstranges begonnen.

Bausteine dieser Reaktion sind die freien Nukleotide. Nach Abschluß dieses ersten Reaktionszyklus sind jetzt zwei Doppelstränge mit dem gesuchten Abschnitt vorhanden.

Wird nun, zu Beginn des zweiten Zyklus, die Temperatur erneut auf 94°C erhöht, denaturieren diese beiden Doppelstränge zu vier Einzelsträngen. Sobald die Temperatur wieder auf 58°C sinkt, lagern sich weitere Startermoleküle an. Bei 72°C werden wiederum Gegenstränge an den Einzelsträngen aufgebaut.

Auf diese Weise sollte sich am Ende eines jeden Temperaturzyklus die Anzahl der DNA-Stränge, die den gesuchten Abschnitt enthalten, verdoppelt haben.

Im Idealfall findet in den folgenden Zyklen eine exponentielle Vermehrung desjenigen DNA-Abschnittes statt, der erstmals nach Beendigung dieses dritten Zyklus auftritt: das sogenannte „short-product“. Dies Amplifikationsprodukt besteht ausschließlich aus dem gesuchten DNA-Fragment.

Mit den Proben wird jetzt zur Feststellung der Amplifikationsergebnisse erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Durchstrahlung des Gels mit UV-Licht läßt bei Proben männlicher Individuen DNA-Banden mit einer Länge von 154 Basenpaaren aufleuchten.

Hier sind während der Polymerase Chain Reaction sowohl in der rezenten als auch in der alten Probe DNA-Abschnitte amplifiziert worden, die ausschließlich auf dem Y-Chromosom lokalisiert sind. Da Frauen dieses Chromosom nicht besitzen, finden in ihren Proben keine Amplifikationsreaktionen statt.

aDNA-Analyse / Extraktion / Amplifikation / Sequenzierung

Soll die Sequenz eines DNA-Abschnittes neu ermittelt oder überprüft werden, schließt sich jetzt eine Analyse der Amplifikationsprodukte an.

Für eine Sequenzanalyse wird die Herstellung von Einzelstrang-DNA erforderlich. Die Amplifikationsprodukte werden zunächst in Plasmide eingebracht. Die so synthetisierten DNA-Ringe werden in Bakterienzellen eingeschleust.

Nun findet eine Infektion der Bakterienzellen mit Phagen statt, in deren Verlauf die Phagen-DNA in die Bakterienzelle eindringt. Durch das Zusam-

menwirken von Bakterien-, Phagen- und Plasmid-DNA kommt es nach der Infektion zu einer Produktion neuer Phagen, die das jetzt einzelsträngige Plasmid tragen. Davon unabhängig vermehren sich die Bakterienzellen.

Die neugebildeten Phagen werden freigesetzt. Aus ihnen können zunächst die einzelsträngigen Plasmide isoliert werden und hieraus dann die DNA-Abschnitte.

Sie werden im PCR-Verfahren erneut amplifiziert. Es entstehen verschiedenen lange DNA-Ketten, an denen nun die Sequenzanalyse durchgeführt wird. Sie werden auf ein hochtrennendes Sequenziergel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihren Längen getrennt.

Die Analyse des Gels im Sequenziergerät erfolgt rechnergestützt. Auf dem Bildschirm ist die Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnitts farbig codiert erkennbar. Zu Dokumentationszwecken wird das Ergebnis graphisch dargestellt. Die molekularbiologische Untersuchung des DNA-Abschnitts ist damit abgeschlossen.

Nicht nur für die Biologie, sondern auch für benachbarte Disziplinen sind diese neuen molekularbiologischen Analysen von zukunftsweisender Bedeutung. Anwendungsbereiche sind unter anderem: die medizinische Epidemiologie, die Materialprüfung biologischer Produkte, die biologisch-forensische Spurenkunde und die Umwelttechnik.

So wird die molekularbiologische Analyse alter DNA zu einem Beispiel, wie aus der Grundlagenforschung neue Einsichten gewonnen und nutzbar gemacht werden können.

Bibliographie

- [1] BÄR, W., A. KRATZER, M. MÄCHLER und W. SCHMID: Postmortem Stability of DNA. *Forensic Sci. Int.* 39 (1988), 59–70.
- [2] BERG, S.: Leichenzersetzung und Leichenzerstörung. In: MUELLER, B. (Hrsg.): *Gerichtliche Medizin*. Bd. 1. Berlin 1975.
- [3] CHA, R. S., und W. G. THILLY: Specificity, Efficiency, and Fidelity of PCR. *PCR Methods and Applications* 3 (1993), S18–S29.
- [4] COOPER, A.: DNA from Museum Specimens. In: HERRMANN und HUMMEL [15].
- [5] COOPER, A., C. MOURER-CHAUVIRE, G. K. CHAMBERS, A. VON HAESLER, A. C. WILSON und S. PÄÄBO: Independent Origins of New Zealand Moas and Kiwis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 8741–8744.

- [6] EDWARDS, A., A. CIVITELLO, H. A. HAMMOND und C.T. CASKEY: DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *Am. J. Hum. Gen.* 49 (1991), 746–756.
- [7] EGLINGTON, G., und G.A. LOGAN: Molecular Preservation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333 (1991), 315–328.
- [8] ERLICH, H.A. (Hrsg.): PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. New York 1989.
- [9] GOLENBERG, E.M.: Amplification and Analysis of Miocene Plant Fossil DNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333 (1991), 419–427.
- [10] GOLENBERG, E. M., D.E. GIANNASI, M.T. CLEGG, C.J. SMILEY, M. DURBIN, D. HENDERSON und G. ZURAWSKI: Chloroplast DNA Sequence from a Miocene Magnolia Species. *Nature* 344 (1990), 656.
- [11] GRODY, W. W: Embedded Samples. In: HERRMANN und HUMMEL [15].
- [12] GRÜNEWALD, K., H. FEICHTINGER, K. WEYRER und J. LYONS: DNA Isolated from Plastic Embedded Tissue is Suitable for PCR. *Nucleic Acids Research* 18 (1990), 6151.
- [13] HAGELBERG, E., I.C. GRAY und A.J. JEFFREYS: Identification of the Skeletal Remains of a Murder Victim by DNA Analysis. *Nature* 352 (1991), 427–429.
- [14] HERRMANN, B.: Parasitologisch-epidemiologische Auswertung mittelalterlicher Kloaken. *Z. Archäol. Mittelalters* 13 (1985), 377–386.
- [15] HERRMANN, B., und S. HUMMEL (Hrsg.): Ancient DNA. New York 1993.
- [16] HERRMANN, B., und R. SPRANDEL (Hrsg.): Determinanten der Bevölkerungsentwicklung im Mittelalter. Weinheim 1987.
- [17] HUMMEL, S.: Nachweis spezifisch Y-chromosomaler DNA-Sequenzen aus menschlichem bodengelagerten Skelettmaterial unter Anwendung der Polymerase Chain Reaction. Göttingen, Diss., 1992.
- [18] HUMMEL, S., und B. HERRMANN: Y-Chromosome-Specific DNA Amplified in Ancient Human Bone. *Naturwissenschaften* 78 (1991), 266–267.
- [19] HUMMEL, S., und B. HERRMANN: Y-Chromosomal DNA from Ancient Bones. In: HERRMANN und HUMMEL [15].
- [20] HUMMEL, S., G. NORDSIEK und B. HERRMANN: Improved Efficiency in Amplification of Ancient DNA and Its Sequence Analysis. *Naturwissenschaften* 79 (1992), 359–360.
- [21] JEFFREYS, A.J., M.J. ALLEN, E. HAGELBERG und A. SONNBERG: Identification of the Skeletal Remains of Joseph Mengele by DNA Analysis. *Forens. Sci. Int.* 56 (1992), 65–76.
- [22] KWOK, S.: Procedures to Minimize PCR-Product Carry-Over. In: INNIS, M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY und T.J. WHITE (Hrsg.): PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. San Diego 1990, 142–145.
- [23] LASSEN, C.: Polymerase Chain Reaction-bezogene Präparation von alten Haut- und Knochenproben zur Extraktion von DNA. Göttingen, Diplomarbeit, 1993.
- [24] LAWLOR, D.A., C.D. DICKEL, W. W. HAUSWIRTH und P. PARHAM: Ancient HLA Genes from 7,500-Year-Old Archaeological Remains. *Nature* 349 (1991), 785–787.

- [25] MULLIS, K. B., und F. A. FALOONA: Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction. *Meth. Enzymol.* 155 (1987), 335–350.
- [26] PADBERG, B.: Empirische Zugänge zu einer mittelalterlichen Epidemiologie. Göttingen, Magisterarbeit, 1991.
- [27] PÄÄBO, S.: DNA is Preserved in Ancient Egyptian Mummies. In: DAVID, R.A. (Hrsg.): *Science in Egyptology*. Manchester 1986.
- [28] PÄÄBO, S., J.A. GIFFORD und A.C. WILSON: Mitochondrial DNA Sequences from a 7000-Year-Old Brain. *Nucleic Acids Research* 16 (1988), 9775–9787.
- [29] PÄÄBO, S., D.M. IRWIN und A.C. WILSON: DNA Damage Promotes Jumping between Templates during Enzymatic Amplification. *J. Biol. Chem.* 265 (1990), 4718–4721.
- [30] POINAR, G.O., H.N. POINAR und R.J. CANO: DNA from Amber Inclusions. In: HERRMANN und HUMMEL [15].
- [31] REYNOLDS, R., und G. SENSABAUGH: Analysis of Genetic Markers in Forensic DNA Samples Using the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Chem.* 63 (1991), 2–15.
- [32] ROGAN, P.K., und J.S. SALVO: Study of Nucleic Acids Isolated from Ancient Remains. *Yearbook Phys. Anthropol.* 33 (1990), 195–214.
- [33] RUANO, G., und K. K. KIDD: Biphasic Amplification of Very Dilute DNA Samples via "Booster" PCR. *Nucleic Acids Research* 17 (1989), 5407.
- [34] SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS und H. A. ERLICH: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (1988), 487–491.
- [35] SAJANTILA, A.: DNA Analysis in Forensic Medicine. Application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to the Identification of Individuals. Helsinki, Diss., 1992.
- [36] SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH und T. MANIATIS: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- [37] SENSABAUGH, G.F., und C. VON BEROLDINGEN: Genetic Typing of Biological Evidence Using the Polymerase Chain Reaction. In: FARLEY, M.A., und J.J. HARRINGTON (Hrsg.): *Forensic DNA Technology* Chelsea 1991.

Angaben zum Film

Video (Komm., deutsch, Originalton), farbig, 21½ min. Hergestellt 1993, veröffentlicht 1994.

Der Film ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Die Aufnahmen entstanden unter Leitung von S. HUMMEL und B. HERRMANN, Institut für Anthropologie der Universität Göttingen. Aufgenommen, bearbeitet und veröffentlicht durch das Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, H. KALKOFEN; Kamera: M. SCHORSCH, K.-H. SEACK, J. WEISS, F. U. FANELLI; Grafik: J. CZECHOWSKI, M. WAGNER; Schnitt: I. LOHMANN-EGGERS, H. KALKOFEN; Tonmischung: K. KEMNER.

Inhalt des Films

Molekularbiologische Analyse alter **DNA**. Der Film versteht sich als Lehrmittel für Hochschulen, Museen und ähnliche Institutionen. Am Beispiel einer molekularen Geschlechtsbestimmung an historischen Skelettfunden wird die Analyse von DNA aus degradierten biologischen Quellenmaterialien gezeigt. Im Verlauf werden die Techniken der DNA-Extraktion, der Polymerase Chain Reaction und die Sequenzanalyse erläutert. Es werden paläontologische, archäologische, museale und forensische Quellen vorgestellt und die aus der DNA-Analytik resultierenden Perspektiven für die einzelnen Fachgebiete der Biologie, Medizin und Umwelttechnik aufgezeigt.

Film Summary

Molecularbiological Analysis of Ancient **DNA**. The film serves for instruction purposes at universities, museums, or similar institutions. Molecular sex diagnosis is taken as an example for the analysis of DNA from degraded biological source material~DNA extraction technique, polymerase chain reaction, and sequence analysis are demonstrated. Paleontological, archaeological, museum, and forensic specimens are introduced as well as the perspectives resulting from their DNA analysis in the fields of biology, medicine and environmental engineering.

Résumé du Film

Analyse de biologie **moléculaire** d'anciennes **ADN**. Le film est conçu comme matériel d'enseignement pour des universités, des musées et d'autres institutions du même genre. L'analyse de ADN à la base de matériels de source biologiques dégradés est montré à l'exemple d'une détermination moléculaire du sexe auprès de squelettes historiques. Le film explique les techniques de l'extraction de la ADN, de la réaction en chaîne polymérisation et de l'analyse en séquence. Le film présente des sources paléontologiques, archéologiques, de musée et judiciaires et signale les perspectives résultant de l'analyse ADN dans les domaines respectives de la biologie, de la médecine et de la technique écologique.

Danksagung

Für Mithilfe während der Dreharbeiten möchten wir uns bei den Mitarbeitern des Institutes für Anthropologie der Universität Göttingen bedanken, insbesondere bei Frau Dr. G. Nordsiek, Frau Dipl.-Biol. C. Lassen, Herrn Dipl.-Biol. J. Rameckers, Herrn E. George und Herrn R. Meister.

Herzlichen Dank für das freundliche Entgegenkommen auch an Herrn Dr. J. Gottwald und Mitarbeiter, II. Zoologisches Institut der Universität Göttingen, und Herrn Dr. S. Ritzkowski, Institut und Museum für Geologie und Paläontologie der Universität Göttingen.

Für die Unterstützung bei den Dreharbeiten danken wir außerdem der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, namentlich Herrn Dr. E. Arnoldi und Frau Dr. D. Hradetzky.

Die Arbeiten wurden im Rahmen des vom BMFT geförderten Forschungsvorhabens 03-HE9COE-9 im Schwerpunkt „Neue Technologien in den Geisteswissenschaften“ durchgeführt.