

Von Affen, Neandertalern und modernen Menschen

Zusammenfassung

Obwohl viele Tiere vokal kommunizieren, erreicht keine existierende Art die sprachliche Verständigungsfähigkeit des Neuzeitmenschen. Es ist deshalb von größtem Interesse herauszufinden, unter welchen evolutionären Bedingungen sich unsere Sprechfähigkeit entwickelt hat. In dieser Studie stellen wir fest, dass unsere nächsten, ausgestorbenen Verwandten, die Neandertaler, sich mit dem Neuzeitmenschen zwei evolutionäre Veränderungen im FOXP2-Gen teilen, einem Gen, das eng mit der Entwicklung von Sprache und Sprechfähigkeit verbunden ist. Wir stellen weiterhin fest, dass diese Veränderungen beim Neandertaler auf dem selben Haplotyp stattgefunden haben, der gehäuft auch im Neuzeitmenschen auftritt und in diesem einen Selektionsschub erfahren hat. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass diese genetischen Veränderungen und der Selektionsschub vor der Aufspaltung vom gemeinsamen Vorfahren (der vor etwa 300.000 bis 400.000 Jahren gelebt hat) von Neuzeitmensch und Neandertaler stattgefunden haben. Dies steht im Widerspruch zur zeitlichen Einordnung des Selektionsschubs auf der Grundlage vorhandener menschlicher Diversitätsdaten. Damit unterstreichen die Ergebnisse die Wichtigkeit der direkten Gewinnung genetischer Informationen aus den Überresten von Urmenschen für das Verständnis der neueren menschlichen Evolution.

¹ Die Originalstudie wurde veröffentlicht als: Johannes Krause, Carles Lalueza-Fox, Ludovic Orlando, Wolfgang Enard, Richard E. Green, Hernán A. Burbano, Jean-Jacques Hublin, Catherine Hänni, Javier Fortea, Marco de la Rasilla, Jaume Bertranpetit, Antonio Rosas und Svante Paabo, „The Derived *FOXP2* Variant of Modern Humans Was Shared with Neandertals“ in *Current Biology* 17 (2007), S. 1908–1912. Wir danken für die Genehmigung, die deutsche Übersetzung zu veröffentlichen. Die Ernst Mayr Lecture basierte auf den hier dargestellten Untersuchungen.

Ergebnisse und Diskussion

Eine Methode, um den Ursprung und die Entwicklung der Sprache zu verstehen, ist das Studium der Evolution der für die Aneignung der Sprache erforderlichen Gene. Obwohl Sprache und Sprachfähigkeit ganz eindeutig komplexe genetische Phänomene sind, ist FOXP2 das einzige derzeit bekannte Gen, das bei der Entwicklung von Sprache und Sprechfähigkeit eine spezifische Rolle spielt [1, 2]. Die Inaktivierung einer FOXP2-Kopie führt in erster Linie zu Defiziten in den orofazialen Bewegungen und linguistischen Prozessen wie man sie bei Menschen mit einer im Erwachsenenalter erworbenen Broca'schen Aphasie findet [3]. Obwohl FOXP2 zu den 5 % Proteinen bei Säugetieren gehört, die weitgehend unverändert erhalten geblieben sind, gibt es im Verlauf der menschlichen Entwicklung seit der Trennung vom gemeinsamen Vorfahren von Mensch und Schimpanse zwei fixierte Aminosäure-Substitutionen in diesem Gen. Diese Aminosäure-Substitutionen werden von Nukleotid-Substitutionen an den Positionen 911 und 977 im Exon 7 des FOXP2-Gens verursacht und führen zu einem Austausch der Aminosäuren Threonin zu Arginin sowie Arginin zu Serin. Entsprechende Simulationen unter Verwendung vorhandener menschlicher Diversitätsdaten aus der Region um Exon 7 lassen den Schluss zu, dass es innerhalb der letzten 200.000 Jahre [4] einen Selektionsschub im FOXP2-Gen gegeben hat [4, 5]. Zusammen genommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die erwähnten Aminosäure-Substitutionen eng verbunden sind mit dem Auftreten einer vollständig entwickelten Sprachfähigkeit [4, 5]. Wir haben deshalb versucht, den Genotyp des Neandertalers an diesen zwei Positionen im FOXP2-Gen zu bestimmen.

Die Gewinnung nuklearer DNA-Sequenzen aus vorhandenen menschlichen Überresten durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist mit Schwierigkeiten verbunden, in erster Linie deshalb, weil die meisten vorhandenen Überreste extrem geringfügige Mengen an endogener DNA enthalten. Ein zusätzliches Problem bei der Untersuchung von Neandertaler-Überresten ist, dass sowohl diese, als auch Laborreagenzien [6], häufig mit neuzeitlicher menschlicher DNA kontaminiert sind, und dass die meisten menschlichen DNA-Sequenzen nicht von denen der Neandertaler unterschieden werden können [7]. Wir haben deshalb zusätzlich zu den sechs Primern, die in vier Kombinationen die Nukleotid-Positionen 911 und 977 amplifizieren (Abb. 1) drei Typen von Kontrollen entwickelt, um die Authentizität unserer Ergebnisse so weit wie möglich zu gewährleisten.

Als Erstes haben wir das Verhältnis von mitochondrieller (mt) DNA bei Neandertalern und Neuzeitmenschen in einem mtDNA-Segment bestimmt, in dem sich Neandertaler und heutige Menschen anhand verschiedener, fixierter Substitutionen [8] unterscheiden lassen. Unter 46 DNA-Extrakten, die 22 Neandertaler-Knochen ent-

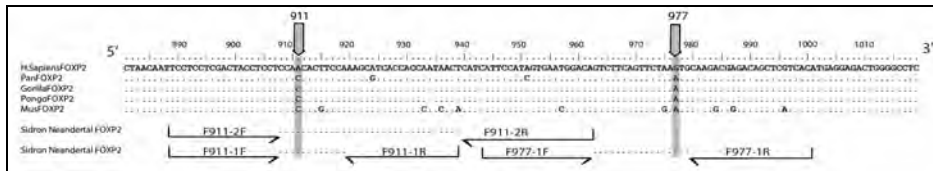


Abbildung 1

Sequenzierung der Nukleotid-Positionen 880 – 1020 aus dem FOXP2-Gen

Die beiden nicht-synonymen Nukleotid-Substitutionen in der menschlichen Linie sind durch Pfeile markiert. Identische Positionen sind als Punkte dargestellt. Die drei zur Gewinnung der beiden Substitutionen aus den El-Sidróon-Neandertalern verwendeten Primer-Paare sind durch Pfeile markiert.

nommen wurden, konnten wir zwei Knochen bestimmen, bei denen ca. 98 bis 99 % der Hominiden mtDNA in den Extrakten vom Neandertaler-Typ waren und die ausreichend DNA für eine PCR enthielten. Beide Knochen stammen aus der El-Sidróon-Höhle in Asturien (Nordspanien) [9]. Diese Knochen (Nr. 1253 und 1351 c) wurden 2006 direkt an der Ausgrabungsstelle unter sterilen Bedingungen entnommen, sofort eingefroren und in unserem Reinstraum transportiert, wo die DNA-Extrakte gewonnen wurden. Da zusätzliche DNA-Sequenzen aus dem hypervariablen mtDNA-Bereich zeigen, dass die Knochen von zwei verschiedenen Individuen stammen (Daten nicht gezeigt), werden sie im Folgenden als erster und zweiter Neandertaler bezeichnet.

Zum Zweiten entwickelten wir eine Anzahl zusätzlicher Kontrollen zur Untersuchung vorhandener Kontamination mit neuzeitlicher menschlicher DNA. Dazu wurden genomische Sequenzdaten eines 38.000 Jahre alten Neandertalers aus der Vindija-Höhle in Kroatien [8] verwendet, mit deren Hilfe sieben autosomale und X-chromosomale Sequenzpositionen bestimmt wurden, die beim Vindija-Neandertaler in der ursprünglichen (d.h. mit der Schimpansen-Sequenz identischen) Form, beim Neuzeitmenschen jedoch in einer veränderten (d.h. von der Schimpansen-Sequenz unterschiedlichen) und einer bei allen heute lebenden Menschen einheitlichen Form auftreten. Wir haben C-T- und G-A-Unterschiede vermieden, da es sich bei diesen häufig um geschädigte Positionen in der alten DNA handelt [10-14]. Anhand des Vindija-Neandertalers haben wir mehrere solcher Kontrollpositionen bestimmt. Diese müssen jedoch nicht unbedingt mit den El-Sidróon-Neandertalern übereinstimmen, da auch innerhalb der Neandertaler-Population Unterschiede auftreten können. Geht man weiterhin davon aus, dass die meisten Extrakte nur sehr geringe Mengen an Neandertaler-DNA enthalten, kann nur von einem Bruchteil der Kernzielsequenzen ein Versuchsergebnis erwartet werden. Drittens haben wir uns die detaillierte Phylogenie der Y-Chromosomen des Neuzeitmenschen [15] sowie die Tatsache zu Nutze gemacht, dass der zeitliche Abstand zu dem jüngsten gemeinsamen Vorfahren des Neuzeitmenschen in Bezug auf die Y-Chromosomen, mit ca. 90.000 Jahren [16],

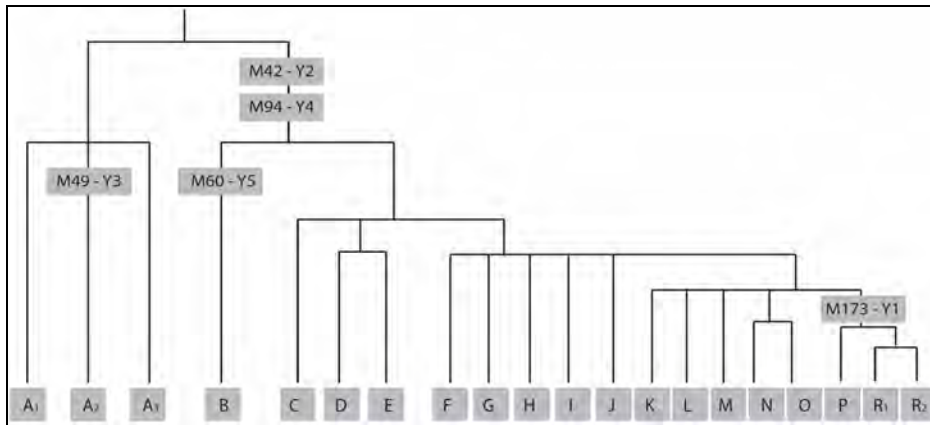


Abbildung S1
Schematische Darstellung der menschlichen Variation für das Y-Chromosom in einem Haplogruppen-Baum um die Lage der verwendeten SNP Kontrollpositionen Y1-Y5 zu illustrieren, modifiziert nach Y-DANN Haplogroup Tree 2007.

wesentlich geringer ist als der Abstand zur geschätzten Abspaltung der Population vom Neandertaler [17]. Wir erwarten deshalb *a priori*, dass die Y-Chromosomen der Neandertaler außerhalb der Variationsbreite der Y-Chromosomen des Neuzeitmenschen liegen, es sei denn, es hätte eine Übertragung männlicher Gene vom Neuzeitmenschen auf den Neandertaler stattgefunden oder umgekehrt. So konnten wir Primer zur Amplifikation von fünf Positionen erstellen, die die untersten Knotenpunkte im "Stammbaum" neuzeitlicher Y-Chromosomen sowie der Hauptgruppen definieren, die nahezu alle europäischen, asiatischen und die meisten afrikanischen Y-Chromosomen einschließen (Abb. S1, auch in "Supplemental Data" online verfügbar²).

Alle Kontrollprimerpaare wurden mit unterschiedlichen Primer-Sets für das FOXP2-Gen in vier unterschiedlichen Primer-Mixen kombiniert und es wurde eine zweistufige Multiplex-PCR [18] durchgeführt. Zunächst wurde in einer ersten PCR eine Amplifikation aller Primer über 30 Zyklen erreicht. Dann wurden Aliquots entnommen und in einer zweiten PCR individuelle Amplifikation mit je einem einzelnen Primerpaar durchgeführt. Für jeden Primer und jeden Primer-Mix wurden darüber hinaus Mock-Amplifikationen ohne DNA angesetzt. Keine der 108 Sekundär-PCRs aus diesen Negativ-Kontrollen ergab ein spezifisches Produkt. Die Ergebnisse für die beiden Neandertaler sind in Abbildung 2 dargestellt.

² Supplemental Data (Ergänzende Daten zum in Anm. 1 genannten Artikel): Experimentelle Verfahren, eine Abbildung, fünf Tabellen – abrufbar unter <http://www.current-biology.com/content/article/fulltext?uid=PIIS0960982207020659>

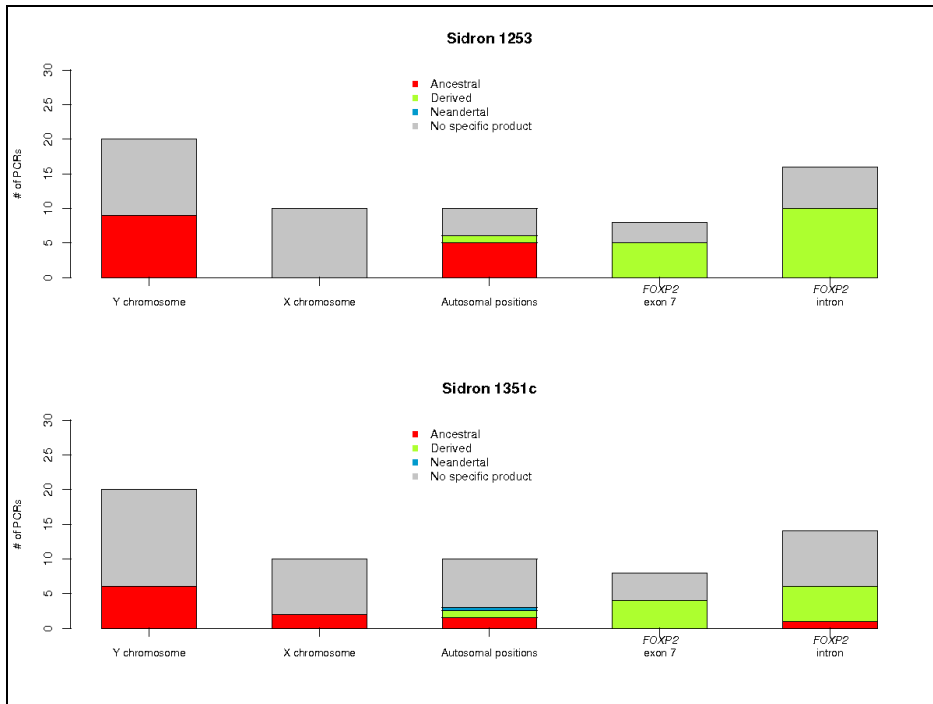


Abbildung 2

Zusammenfassung der Ergebnisse der vier Multiplex-PCRs mit Material der beiden El-Sidrón-Neandertaler, ausgeführt in Leipzig. Die PCRs ergaben Material mit ancestralen Allelen (rot), abgeleiteten Allelen (grün), abgeleitete Neandertaler-spezifische Formen (blau) und PCRs, die keinerlei spezifische Produkte ergaben (grau). Detaillierte Darstellung der Ergebnisse in den Tabellen S1 und S2

Bei den autosomalen Kontrollen ergaben neun von 20 Sekundär-PCRs relevante Produkte. Die Tatsache, dass nicht alle Primerpaare Produkte ergaben zeigt, dass die Extrakte geringe Mengen an Kern-DNA enthalten, so dass ein Amplifikationserfolg nur sporadisch eintritt und wahrscheinlich oft von Einzelmolekülen [10] ausgeht. Bei zwei der drei analysierten autosomalen Positionen tragen beide Individuen das ancestrale Allel.

In den fünf Produkten, die für die dritte autosomale Position (A1, Tabelle S1) gewonnen wurden, wurden bei beiden El-Sidrón-Neandertalern sowohl ancestrale als auch abgeleitete Allele festgestellt, woraus geschlossen werden kann, dass sie an dieser Position polymorph ausgeprägt waren.

Das zweite Individuum wies zusätzlich ein Allel auf, das weder beim Neuzeitmenschen noch beim Schimpansen auftritt. Vorausgesetzt dass diese Sequenzvariante eine Substitution von G nach T darstellt und nicht eine der üblicherweise mit frühzeitlichen DNA-Schäden einhergehenden Substitutionen [10], stellt diese Sequenz-

Primer pair	Sidrón 1263				Sidrón 1351c			
	Multiplex 1	Multiplex 2	Multiplex 3	Multiplex 4	Multiplex 1	Multiplex 2	Multiplex 3	Multiplex 4
Y-chromosome :								
Y1	-	A (16)	-	-	-	-	-	-
Y2	A (14)	A (15)	-	-	-	-	-	-
Y3	A (16)	-	-	-	A (7)	-	-	-
Y4	A (16)	A (16)	-	A (16)	A (16)	-	-	A (16)
Y5	A (3)	-	-	A (16)	-	A (7)	A (16)	A (13)
X-chromosome :								
X1	artefacts	artefacts	n/a	n/a	artefacts	artefacts	n/a	n/a
X3	-	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a
X4	-	-	n/a	n/a	-	A (10)	-	A (16)
autosomes :								
A1 (Chr1)	-	A (3)	A (15)	D (14)	A (14)	-	-	D (13)
A2 (Chr3)	-	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a
A3 (Chr6)	A (15)	A (13)	-	A (16)	A (5) N (5)	-	-	-
FOXP2 exon 7:								
F911 1	D (14)	n/a	D (7)	D (14)	-	n/a	D (3)	D (14)
F911 2	n/a	D (15)	n/a	n/a	n/a	-	n/a	n/a
F977 1	D (16)	n/a	-	-	-	n/a	D (15)	D (15)
F977 2	n/a	-	n/a	n/a	n/a	-	-	n/a
FOXP2 intron :								
S1	n/a	n/a	D (13)	D (14)	n/a	n/a	-	-
S2	n/a	n/a	-	D (13)	n/a	n/a	D (13)	-
S3	n/a	n/a	artefacts	artefacts	n/a	n/a	artefacts	artefacts
S4	n/a	n/a	artefacts	artefacts	n/a	n/a	artefacts	artefacts
S5	n/a	n/a	D (7)	D (11)	n/a	n/a	D (10)	D (5)
S6	n/a	n/a	-	D (15)	n/a	n/a	-	A (15)
S7	n/a	n/a	D (10)	D (14)	n/a	n/a	-	D (3)
S8	n/a	n/a	-	D (15)	n/a	n/a	-	-
S9	n/a	n/a	-	D (15)	n/a	n/a	D (16)	-

Tabelle S1

Resultate aller vier an beiden Neandertalern durchgeführten Multiplex PCRs. Alle PCRs die Produkte ergaben sind mit A, D oder N gekennzeichnet. „A“ steht für den ancestralen Schimpansen ähnlichen Zustand, „D“ steht für den abgeleiteten modernen menschlichen Zustand, „N“ bedeutet einen für den Neandertaler spezifischen Zustand, „-“ steht für die Abwesenheit eines PCR-Produktes, „artifacts“ für unspezifische PCR-Produkte und „n/a“ für nicht durchgeführte PCRs. Die Anzahl der Klonsequenzen für jedes Produkt sind in Klammern angegeben.

variante mit hoher Wahrscheinlichkeit ein authentisches Neandertaler-Allel dar, dessen Verifikation allerdings weitere Arbeiten erfordert. Nur für eine einzige von vier X-Chromosomen-Positionen konnte bei einem Individuum ein Produkt amplifiziert werden. Dieses Individuum wies die ancestrale Form auf. Bei beiden Neandertalern konnten für Y-chromosomale Primer Produkte amplifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass es sich um männliche Neandertaler gehandelt hat. Interessant ist, dass alle 15 Y-chromosomalen Produkte der fünf untersuchten Positionen das ancestrale Allel aufweisen. Dazu gehören zwei Polymorphismen, die die früheste Aufspaltung zwischen den heutigen menschlichen Y-Chromosomen (Y2 und Y4, Abb. S1) definieren, sowie zwei Polymorphismen, die weniger häufige afrikanischen Y-Chromosomen Gruppen definieren (Y3 und Y5, Abb. S1). Diese Y-Chromosomen-Varianten müssen dann entweder von Y-Chromosomen abstammen, die nicht zur Variabilität der Neuzeitmenschen gehören, oder von sehr seltenen afrikanischen Linien, die von der vorliegenden Untersuchung nicht erfasst worden sind (Abb. S1). Für unsere Zwecke bedeuten diese Ergebnisse, dass weder die mütterlicherseits vererbte mtDNA noch die väterlicherseits vererbten Y-Chromosomen einen Nachweis dafür erbringen, dass eine Genübertragung von Neuzeitmenschen auf Ne-

andertaler oder eine nachträgliche Kontamination von deren sterblichen Überresten stattgefunden haben kann. Aus diesen Ergebnissen können wir schlussfolgern, dass es sich bei dem Ausgangsmaterial der Multiplex PCRs um Kern-DNA von Neandertalern handelt.

Von den zwei FOXP2-Substitutionen in Exon 7 wurde Position 911 viermal aus dem ersten Individuum und zweimal aus dem zweiten Individuum gewonnen. In allen Fällen entsprach das gewonnene Allel dem abgeleiteten Allel des Neuzeitmenschen. Position 977 wurde beim ersten Individuum einmal und dem zweiten Individuum zweimal bestimmt. Wieder entsprachen die Allele in allen Fällen der abgeleiteten Variante des Neuzeitmenschen. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden Knochenfragmente eines Neandertaler-Individuums sowie Informationen über die Kontrollprimer an ein Labor in Barcelona/Spainien und an ein Labor in Lyon/Frankreich geschickt. Beide Labors bestätigten die Ergebnisse. Sie fanden stets die abgeleitete Form der FOXP2-Substitutionen und die ancestralen Formen in den Vergleichsproben (s. Supplemental Data (wie Anm. 2): Experimental Procedures und Tabellen S3 und S4). Das bestätigt nicht nur die in Leipzig gefundenen Ergebnisse, sondern beweist, dass zumindest das erste Individuum in Bezug auf die FOXP2-Substitutionen in Exon 7 sehr wahrscheinlich homozygot war, selbst unter dem Vorbehalt, dass jede erfolgreiche Amplifikation ein einzelnes Start-Molekül reflektiert (Individuum 1; Position 911, 13 Einzel-Amplifikationen, $p = 1,2 \times 10^{-4}$; Position 977, fünf Einzel-Amplifikationen, $p = 3,1 \times 10^{-2}$) [19].

Um die Frage zu beantworten, ob die Anzeichen für eine umfassende Selektion, wie sie anhand des Allel-Häufigkeits-Spektrums nahe Exon 7 des FOXP2-Gens bei heutigen Menschen festgestellt wurden, auch bei Neandertalern nachweisbar sind, wurden in die Multiplex PCRs 3 und 4 (wie zuvor beschrieben) neun Primer-Paare einbezogen, die Nukleotid-Polymorphismen in der intronischen Region oberhalb Exon 7 umschließen und hochfrequente Allele im Menschen umschließen, die bei den meisten Menschen in der abgeleiteten Form auftreten [4]. Bei sieben der neun für die Entdeckung und Datierung des Selektionsschubes (s. Supplemental Data: Experimental Procedures) wesentlichen Positionen konnte von beiden Neandertaler-Individuen zumindest ein Produkt gewonnen werden (Abb. 2). Bei sechs der sieben Positionen zeigten alle Neandertalerproben abgeleitete Allele (Tabelle S1). An einer Stelle trat in einer Probe des ersten Neandertaler-Individuums das abgeleitete Allel auf, beim zweiten Neandertaler hingegen das ancestrale Allel. Das deutet darauf hin, dass diese Position (S5, Tabelle S1) bei den Neandertalern polymorph war. Die Häufigkeit des abgeleiteten Allels an der genannten Position liegt beim Neuzeitmenschen bei 0,88, während sie bei den sechs anderen Positionen bei $>0,97$ liegt [4], woraus geschlussfolgert werden kann, dass dieses abgeleitete Allel jünger sein könnte als die anderen. Damit trat die abgeleitete Form des FOXP2-Proteins nicht

nur bei den Neandertalern auf, sondern ist auch mit dem im Neuzeitmenschen auftretenden Haplotypen verbunden und hat offenbar einen Selektionsschub erlebt. Wenn der Selektionsschub, der diese genomische Region beeinflusst hat, tatsächlich mit einer bzw. beiden Aminosäure-Substitutionen im FOXP2-Gen verbunden ist, dann trifft zwangsläufig eins der folgenden drei Szenarien für die Evolution des FOXP2-Gens bei den Hominiden zu. In einem ersten Szenario könnte es zu einer Übertragung des positiv selektierten FOXP2-Gens vom Neuzeitmenschen auf den Neandertaler bzw. in umgekehrter Richtung gekommen sein. Doch das ist eher unwahrscheinlich. Es konnte weder ein mitochondrieller noch – wie hier dargestellt – ein Y-chromosomaler-Genfluss zwischen den beiden Hominiden Gruppen nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist es auch in anderen Versuchen zum Nachweis einer Vermischung auf der Grundlage von autosomaler -Variationen bislang nicht gelungen, einen Genfluss in Richtung Neandertaler festzustellen (J. Mullikin und D. Reich, persönliche Mitteilungen). Eine zweite Möglichkeit besteht im Vorhandensein des relevanten FOXP2-Haplotyps in der ancestralen Population des Neuzeitmenschen und der Neandertaler und einer späteren positiven Selektion beim Neuzeitmenschen nach dessen Aufspaltung von den Neandertalern. Damit dieses Szenario wahrscheinlich ist, hätte der relevante Haplotyp in der ancestralen Population in einer beachtlichen Häufigkeit auftreten müssen, um die relativ hohe Häufigkeit bei den Neandertalern zu erklären. Je höher jedoch die Häufigkeit einer Variante vor der positiven Selektion, desto unwahrscheinlicher ist die Möglichkeit der Fixierung von Positionen während eines selektiven Schubs [20]. Damit erscheint auch dieses Szenario relativ unwahrscheinlich. Ein drittes Szenario könnte in einem Selektionsschub vor der Trennung der ancestralen Populationen der Neuzeitmenschen und der Neandertaler vor ca. 300.000 bis 400.000 Jahren bestehen [17].

Geht man von der Annahme aus, dass die Divergenzzeit von Schimpansen und Menschen bei 6,5 Millionen Jahren liegt [21, 22], läge der Zeitpunkt der Fixierung des Selektionsschubs innerhalb der letzten 260.000 Jahre, und ein Selektionsschub mit einem selektiven Vorteil von 1 % würde dann bis zu seiner Vollendung im Schnitt 50.000 bis 80.000 Jahre in Anspruch nehmen [23]. In Verbindung mit der Tatsache, dass Abweichungen von Modellannahmen über Entstehungszeiten, Selektionskoeffizienten, Populationsgrößen und Panmixia zu noch größeren Unterschieden in diesen Zeitannahmen führen können, könnte das bedeuten, dass der Selektionsschub in einer gemeinsamen ancestralen Population von Neandertalern und Neuzeitmenschen begonnen oder stattgefunden hat. Tatsächlich beruhen Schätzungen auf der Grundlage der Variation bei heutigen menschlichen Populationen notwendigerweise auf simplifizierten Modellen der menschlichen Populationsgeschichte und ungewissen Parametern, was diese Schätzungen zwangsläufig im Hinblick auf die Datierung bestimmter Ereignisse relativ unzuverlässig macht. Sollte also das dritte Szenario zutreffen, das

heißt sollten die FOXP2-Substitutionen und der Selektionsschub sich tatsächlich beim gemeinsamen Vorfahren von Neandertalern und Neuzeitmenschen ereignet haben, dann demonstriert die vorliegende Arbeit den Nutzen direkter Tests zur Bestimmung von neuzeitmenschlichen Substitutionen bei den Neandertalern. Die Genomsequenz eines Neandertalers wird also unschätzbare direkte Informationen über den Zeitpunkt genetischer Veränderungen in der menschlichen Abstammungsgeschichte bezüglich der Divergenz von den Neandertalern liefern [8].

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass nur die beiden Veränderungen analysiert wurden, von denen bekannt ist, dass sie sich nach der Trennung von Menschen und Schimpansen im Exon 7 des FOXP2-Gens ereignet haben. Obwohl die Wahrscheinlichkeit eher gering ist, ist es angesichts des hohen Konservierungsgrades dieses Gens möglich, dass an anderer Stelle im FOXP2-Gen weitere Neandertaler-spezifische Substitutionen vorhanden sind. Nur die vollständige Sequenz eines kompletten Gens, zum Beispiel eine Neandertaler-Genom-Sequenz [8], würde deshalb eine umfassende Evaluierung der Funktion des FOXP2-Gens beim Neandertaler erlauben. Die vorliegenden Ergebnisse beweisen, dass die Neandertaler über ein FOXP2-Protein verfügten, dass an den einzigen beiden Positionen, die bei Menschen und Schimpansen unterschiedlich sind, mit dem FOXP2 des heutigen Menschen identisch ist. Vernachlässigt man das eher unwahrscheinliche Szenario eines Genflusses, wird damit der Nachweis erbracht, dass diese Veränderungen bereits im gemeinsamen Vorfahren von Neuzeitmenschen und Neandertalern vorhanden waren. Der Zeitpunkt dieser genetischen Veränderungen muss folglich wesentlich weiter zurückliegen als bisher auf der Grundlage der verfügbaren menschlichen Diversitätsdaten angenommen, was den Nutzen eines direkten Nachweises anhand von Neandertaler-DNA-Sequenzen für das Verständnis der neuzeitmenschlichen Evolution zeigt. Was auch immer die Funktion der beiden Aminosäure-Substitutionen bei der Ausbildung der menschlichen Sprache sein mag, sie sind nicht auf den Neuzeitmenschen beschränkt, sondern bereits in Neandertalern nachweisbar. Weiterführende in-vivo- und in-vitro-Experimente sollten zur Klärung der Funktion der beiden Aminosäure-Substitutionen beitragen.

Versuchsaufbau

DNA-Extraktion und -amplifikation

Die Knochenproben des El-Sidrón-Neandertalers wurden unter sterilen Bedingungen, das heißt im Laborkittel, mit sterilen Handschuhen, Gesichtsmasken und sterilen Messern direkt an der Ausgrabungsstelle von 2006 entnommen, sofort eingefroren und nach Leipzig gebracht. In Leipzig wurden die DNA-Proben in einem auf früh-

zeitliche DNA spezialisierten Labor untersucht. Zur Minimierung der Kontamination mit heutiger menschlicher DNA wurde zunächst die Oberfläche der Knochen entfernt, dann wurden ~350 mg Knochenmasse entnommen, zerrieben und wie beschrieben extrahiert [24]. Die zweistufigen Multiplex-PCRs [17] wurden unter Verwendung eines Gesamtvolumens von 20 µl, das bis zu 14 Primer-Paare enthielt, eingeleitet und ca. 10 min bei Raumtemperatur mit 0,5 Einheiten Shrimp-Nuklease (Biotec Pharmacon) inkubiert, um doppelsträngige DNA zu zerstören, die die Reagenzien hätte verunreinigen können. Nach der Inaktivierung der Nuklease (30 min) bei 65°C, wurden 5 µl Extrakt zugegeben. In der ersten und zweiten PCR wurden je dreißig Zyklen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen mit Ausnahme der Annealing-Temperatur (55°C) der Beschreibung [18]. Amplifikationsprodukte von entsprechender Größe wurden mit Hilfe des TOPO-TA-Klon-Kits (Invitrogen) geklont. Zwischen drei und 16 Klone wurden pro PCR-Produkt in einem Kapillarsequencer ABI3730 (Applied Biosystems) (Tabelle 1) sequenziert. Primersequenzen, Extraktions- und Amplifikationsbedingungen sowie die Ergebnisse aus Barcelona und Lyon sind in den Supplemental Data beschrieben.

Supplemental Data (Ergänzende Daten)

Experimentelle Verfahren, eine Abbildung, fünf Tabellen – abrufbar unter <http://www.current-biology.com/content/article/fulltext?uid=PIIS0960982207020659>

Danksagungen

Wir danken Adrian Briggs, Michael Hofreiter und Tomislav Maricic für ihre Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an Susan Ptak für ihre statistischen Analysen und Matthias Meyer, der uns seine Laborerfahrung zur Verfügung gestellt hat, sowie der Max-Planck-Gesellschaft für ihren finanziellen Beitrag. Carles Lalueza-Fox und Antonio Rosas erhielten finanzielle Unterstützung vom Ministerium für Bildung und Wissenschaft Spaniens. Richard E. Green erhielt Unterstützung in Form eines Forschungsstipendiums von der Nationalen Wissenschafts-Stiftung. Das Ausgrabungsprojekt in El Sidrón wird durch den Principado de Asturias/Spanien finanziert. Antonio Rosas, Javier Fortea und Marco de la Rasilla stellten Neandertaler-Proben sowie paläontologische Daten zur Verfügung. Jean-Jacques Hublin stellte paläontologische und archäologische Daten zur Verfügung. Johannes Krause, Ludovic Orlando und Carles Lalueza-Fox übernahmen die Extraktion, Amplifikation, Sequenzierung und die Analysen der DNA. Richard E. Green und Hernán A. Burbano unterstützten uns beim Versuchsaufbau. Wolfgang Enard beteiligte sich an der Interpretation der Versuchsergebnisse. Catherine Hänni koordinierte die Arbeiten in Lyon.

Jaume Bertranpetit stellte sein Labor in Barcelona zur Verfügung. Svante Pääbo hat die Studie initiiert, geplant und koordiniert und Johannes Krause, Richard E. Green und Svante Pääbo haben den vorliegenden Bericht verfasst.

Autoren

Johannes Krause,¹ Carles Lalueza-Fox,² Ludovic Orlando,^{3,4} Wolfgang Enard,¹ Richard E. Green,¹ Hernán A. Burbano,¹ Jean-Jacques Hublin,¹ Catherine Hänni,^{3,4} Javier Fortea,⁵ Marco de la Rasilla,⁵ Jaume Bertranpetit,⁶ Antonio Rosas,⁷ und Svante Pääbo¹

¹*Max-Planck-Institut für Evolutionäre Anthropologie, Leipzig*

²*Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona / Spanien*

³*Paléogénétique et Évolution Moléculaire, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, CNRS, INRA, École Normale Supérieure de Lyon / Frankreich*

⁴*Institut Fédératif Biosciences Gerland Lyon Sud, Université Lyon 1, CNRS, INRA, École Normale Supérieure de Lyon / Frankreich*

⁵*Área de Prehistoria Departamento de Historia, Universidad de Oviedo / Spanien*

⁶*Unitat de Biologia Evolutiva, CEXS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona / Spanien*

⁷*Departamento de Paleobiología, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid / Spanien*

Literaturverzeichnis

- [1] Lai, C.S./Fisher, S.E./Hurst, J.A./Vargha-Khadem, F./Monaco, A.P.: A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. In: *Nature* 413 (2001), S. 519–523. [Medline]
- [2] MacDermot, K.D./Bonora, E./Sykes, N./Coupe, A.M./Lai, C.S./Vernes, S.C./Vargha-Khadem, F./McKenzie, F./Smith, R.L./Monaco, A.P. et al.: Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. In: *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005), S. 1074–1080. [Medline]
- [3] Vargha-Khadem, F./Gadian, D.G./Copp, A./Mishkin, M.: FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (2005), S. 131–138. [Medline]
- [4] Enard, W./Przeworski, M./Fisher, S.E./Lai, C.S./Wiebe, V./Kitano, T./Monaco, A.P./Pääbo, S.: Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. In: *Nature* 418 (2002), S. 869–872. [Medline]

- [5] Zhang, J./Webb, D.M./Podlaha, O.: Accelerated protein evolution and origins of human-specific features: Foxp2 as an example. In: *Genetics* 162 (2002), S. 1825–1835. [Medline]
- [6] Hofreiter, M./Serre, D./Poinar, H.N./Kuch, M./Pääbo, S.: Ancient DNA. In: *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001), S. 353–359. [Medline]
- [7] Pääbo, S.: Human evolution. In: *Trends Cell Biol.* 9 (1999), M13–M16. [Medline]
- [8] Green, R.E./Krause, J./Ptak, S.E./Briggs, A.W./Ronan, M.T./Simons, J.F./Du, L./Egholm, M./Rothberg, J.M./Paunovic, M. et al.: Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. In: *Nature* 444 (2006), S. 330–336. [Medline]
- [9] Rosas, A./Martínez-Maza, C./Bastir, M./García-Taberner, A./Lalueza-Fox, C./Huguet, R./Ortiz, J.E./Julià, R./Soler, V./de Torres, T. et al.: Paleobiology and comparative morphology of a late Neanderthal sample from El Sidron, Asturias, Spain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006), S. 19266–19271. [Medline]
- [10] Hofreiter, M./Jaenicke, V./Serre, D./Haeseler v., A./Pääbo, S.: DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. In: *Nucleic Acids Res.* 29 (2001), S. 4793–4799. [Medline]
- [11] Stiller, M./Green, R.E./Ronan, M./Simons, J.F./Du, L./He, W./Egholm, M./Rothberg, J.M./Keates, S.G./Ovodov, N.D. et al.: Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006), S. 13578–13584. [Medline]
- [12] Gilbert, M.T./Binladen, J./Miller, W./Wiuf, C./Willerslev, E./Poinar, H./Carlson, J.E./Leebens-Mack, J.H./Schuster, S.C.: Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis. In: *Nucleic Acids Res.* 35 (2007), S. 1–10. [Medline]
- [13] Brotherton, P./Endicott, P./Sanchez, J.J./Beaumont, M./Barnett, R./Austin, J./Cooper, A.: Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. In: *Nucleic Acids Res.* 35 (2007), 5717–5728. [Medline]
- [14] Briggs, A.W./Stenzel, U./Johnson, P.L./Green, R.E./Kelso, J./Prüfer, K./Meyer, M./Krause, J./Ronan, M.T./Lachmann, M. et al.: Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neanderthal. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007), S. 14616–14621. [Medline]
- [15] Underhill, P.A./Shen, P./Lin, A.A./Jin, L./Passarino, G./Yang, W.H./Kauffman, E./Bonné-Tamir, B./Bertranpetit, J./Francalacci, P. et al.: Y chromosome sequence variation and the history of human populations. In: *Nat. Genet.* 26 (2000), S. 358–361. [Medline]
- [16] Thomson, R./Pritchard, J.K./Shen, P./Oefner, P.J./Feldman, M.W.: Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), S. 7360–7365. [Medline]

- [17] Noonan, J.P./Coop, G./Kudaravalli, S./Smith, D./Krause, J./Alessi, J./Chen, F./Platt, D./Pääbo, S./Pritchard, J.K. et al.: Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. In: *Science* 314 (2006), S. 1113–1118. [Medline]
- [18] Krause, J./Dear, P.H./Pollack, J.L./Slatkin, M./Spriggs, H./Barnes, I./Lister, A.M./Ebersberger, I./Pääbo, S./Hofreiter, M.: Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. In: *Nature* 439 (2006), S. 724–727. [Medline]
- [19] Morin, P.A./Chambers, K.E./Boesch, C./Vigilant, L.: Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). In: *Mol. Ecol.* 10 (2001), S. 1835–1844. [Medline]
- [20] Przeworski, M./Coop, G./Wall, J.D.: The signature of positive selection on standing genetic variation. In: *Evolution. Int. J. Org. Evolution* 59 (2005). S. 2312–2323. [Medline]
- [21] Kumar, S./Filipski, A./Swarna, V./Walker, A./Hedges, S.B.: Placing confidence limits on the molecular age of the human-chimpanzee divergence. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005), S. 18842–18847. [Medline]
- [22] Patterson, N./Richter, D.J./Gnerre, S./Lander, E.S./Reich, D.: Genetic evidence for complex speciation of humans and chimpanzees. In: *Nature* 441 (2006), S. 1103–1108. [Medline]
- [23] Teshima, K.M./Przeworski, M.: Directional positive selection on an allele of arbitrary dominance. In: *Genetics* 172 (2006), S. 713–718. [Medline]
- [24] Rohland, N./Hofreiter, M.: Comparison and optimization of ancient DNA extraction. In: *Biotechniques* 42 (2007), S. 343–352. [Medline]

